

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени. Н. Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

ПАЛТУЕВ

Руслан Маликович

**БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ
ИНДИВИДУАЛИЗАЦИИ ЛЕЧЕНИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

Диссертация

на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАН

Семиглазов Владимир Федорович

Санкт-Петербург – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РОЛИ КЛИНИЧЕСКИХ, ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИХ, ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ ПРОГНОСТИЧЕСКИХ И ПРЕДИКТИВНЫХ ФАКТОРОВ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	16
1.1. Рак молочной железы: актуальность проблемы	16
1.2. Персонализация классификации TNM за счет интеграции в систему дополнительных прогностических категорий (рецептора эстрогенов, рецептора прогестерона, HER2, степени гистологической злокачественности, генетического профиля опухоли).....	18
1.3. Прогностическое значение статуса аксиллярных лимфатических узлов.....	24
1.4. Прогностическая роль возраста на момент постановки диагноза	26
1.5. Прогностическая значимость степени гистологической злокачественности	31
1.6. Роль биомаркеров в выборе тактики лечения рака молочной железы	36
1.7. Прогностическое и предсказывающее значение рецепторов стероидных гормонов	40
1.8. Выбор порогового значения экспрессии рецептора эстрогенов	42
1.9. Прогностическое значение рецепторов прогестерона	46
1.10. Прогностическое значение Ki-67	48
1.11. Молекулярно-генетические подтипы рака молочной железы	50
1.12. Мультигенные сигнатуры	57
1.13. Прогностическое значение циклина D1	60
1.14. Прогностическое значение CDK4, CDK6.....	61
1.15. Прогностическое значение CDK 8/19.....	63
1.16. Прогностическое значение PNH3.....	63
1.17. Определение чувствительности к гормональной терапии ESR1	65

1.18. Прогностическое значение рецепторов андрогенов.....	66
1.19. Прогностическое значение FOXA1	71
1.20. Прогностическое значение p53.....	78
1.21. Прогностическое значение маркеров базального рака молочной железы CK5/6, CK14, EGFR, p63	81
1.22. Прогностическое значение SMA	84
1.23. Прогностическое значение EGFR	85
1.24. Прогностическое значение иммунологических маркеров, связанных с TILs CD4, CD8, PD-L1, FOXP3	86
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	97
2.1. План работы и общее описание дизайна исследования	97
2.2. Ретроспективный анализ данных канцер-регистра	97
2.3. Гистологические и иммуногистохимические исследования образцов ткани рака молочной железы.....	103
2.4. Молекулярно-генетические исследования образцов ткани рака молочной железы	106
2.5. Методы статистического анализа.....	112
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	115
3.1. Анализ распределения прогностических и предиктивных маркеров рака молочной железы	115
3.2. Анализ патоморфологических, иммуногистохимических характеристик опухоли в возрастных подгруппах <50 лет и ≥50 лет	117
3.3. Анализ патоморфологических и иммуногистохимических характеристик опухоли в зависимости от степени гистологической злокачественности.....	124
3.4. Анализ патоморфологических и иммуногистохимических характеристик опухоли в зависимости от уровня экспрессии Ki-67.....	127
3.5. Анализ патоморфологических и иммуногистохимических характеристик опухоли в зависимости от рецепторного статуса	132

3.6. Оценка прогностической и предиктивной значимости клинических, гистологических, морфологических и иммуногистохимических факторов и разработка прогностических шкал.....	137
3.6.1 Разработка моделей прогностических шкал	137
3.6.2 Традиционная прогностическая шкала.....	144
3.6.3 Регрессионная прогностическая шкала	150
3.7. Молекулярная диагностика РМЖ.....	158
3.7.1 Сравнение результатов оценки типа опухоли с помощью молекулярно-генетического анализа и иммуногистохимического исследования	158
3.7.2 Результаты оценки экспрессии отдельных генов	163
3.7.2.1 Оценка экспрессии <i>ESR1</i> , <i>PGR</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>ERB2</i> , <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>CD274</i>	163
3.7.2.2 Оценка экспрессии <i>BCAR4</i> , <i>BCAS2</i> , <i>CCND1</i> , <i>CCND2</i> , <i>CCND3</i> , <i>FOXAI</i>	171
3.7.2.3 Оценка экспрессии <i>EGFR</i> , <i>CDH3</i> , <i>FOXC1</i> , <i>KRT14</i> , <i>KRT5</i>	174
3.7.2.4 Оценка экспрессии <i>CDK4</i> , <i>CDK6</i>	177
3.7.2.5 Оценка экспрессии <i>P53</i> , <i>PTEN</i> , <i>CHEK2</i>	178
3.7.2.6 Оценка экспрессии <i>AR</i>	180
3.7.2.7 Оценка экспрессии <i>CLDN3</i> , <i>CLDN7</i>	180
3.7.2.8 Оценки экспрессии <i>TOP2a</i> , <i>TUBBIII</i>	181
3.7.3 Клинические примеры.....	183
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	187
ВЫВОДЫ.....	199
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	202
ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ДАННОЙ ТЕМЫ	204
СОКРАЩЕНИЯ И УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ	205
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	206
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА	253

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Рак молочной железы (РМЖ) – наиболее часто встречающееся онкологическое заболевание в женской популяции. Более 2 млн случаев в мире выявляется ежегодно. В Российской Федерации по данным на 2018 г. РМЖ у женского населения является ведущей онкологической патологией (20,9 %) и основной причиной смертности от злокачественных новообразований (16,2 %). В период с 2008 по 2018 гг. абсолютное число впервые выявленных случаев РМЖ увеличилось с 52 469 до 70 682, показатель заболеваемости на 100 тыс. населения – с 42,83 до 51,63. На 2018 г. в структуре онкологической заболеваемости РМЖ занимает 1-е место у женщин в возрасте 30–59 лет (27,2 %), 2-место – у женщин в возрасте 60 лет и старше (18,1 %) и 3-е место у лиц в возрасте 0-29 лет (7,0 %) [1].

За последние десятилетия смертность от РМЖ в мире несколько снизилась благодаря широкому внедрению маммографического скрининга, адъювантной и неоадъювантной системной терапии [107]. Активно развивающимся направлением современной онкологии является индивидуализация лечения РМЖ на основе анализа прогностических и/или предиктивных маркеров. Персонализированный подход позволяет повысить эффективность лечения и качество жизни пациента, а также снизить затраты на оказание медицинской помощи за счет выбора оптимальной схемы лечения [88].

Клинико-морфологическая гетерогенность РМЖ была отмечена В. Ф. Семиглазовым и другими исследователями задолго до формирования современных представлений о вариантах течения РМЖ. В 1979–1983 гг. на основании изучения клинико-эпидемиологических признаков и анализа уровня продукции эстрогенов, прогестерона и других биохимических показателей были выделены овариальная, надпочечниковая и инволютивная формы РМЖ, отличающиеся по прогнозу и ответу на эндокринотерапию и химиотерапию [9]. В 2000 г. К М. Пожариский одним из первых в России продемонстрировал роль иммуногистохимических методов в общей характеристике биологических

особенностей опухоли и определении прогноза заболевания [6]. К настоящему времени рецепторы стероидных гормонов, HER2 продемонстрировали свою предиктивную и прогностическую значимость в многочисленных клинических исследованиях, радикально изменили подходы к лечению РМЖ.

На основании достижений последних генетических исследований получено представление о генетическом многообразии РМЖ [26, 29, 31, 119, 178]. Для каждого подтипа характерны различные факторы риска, патологические признаки, ответ на лечение и отдаленные его результаты. После ретроспективного анализа предложено несколько прогностических и предиктивных тестов, основанных на оценке экспрессии генов: Oncotype DX (Genomic Health, США), MammaPrint (Agendia BV, Нидерланды), PAM 50, MapQuant DX (Ipsogen, Франция) [17, 18, 20, 22, 33, 34]. Однако внедрение молекулярно-генетического профилирования опухоли в рутинную практику затруднено из-за высокой стоимости теста и отсутствия полученных в проспективных исследованиях доказательств прогностической и предиктивной ценности для выбора адъювантного лечения. Для практического здравоохранения представляют важность новые научные данные, практические рекомендации и разработки в данной области.

Все более актуальным становится изучение биологических маркеров РМЖ, являющихся альтернативой стандартным маркерам, которые широко применяются в рутинной клинической практике. Целый ряд показателей таких, как p53 [199], CK5/6 [17], SMA [68], p63 [99], PNH3 [148], E-кадгерин [168], EGFR [227], FOXA1 [46], рецепторы андрогенов (РА) [155], TILs [102] и другие в многочисленных исследованиях демонстрируют свою предиктивную и/или прогностическую значимость. Результаты данных исследований свидетельствуют о том, что новые биологические маркеры РМЖ требуют дальнейшего подробного изучения. Подобные исследования в будущем могут существенно повлиять на формирование новых подходов к лечению РМЖ.

Все вышеизложенное определило актуальность проведения настоящего исследования.

Степень разработанности темы

РМЖ представляет собой гетерогенную группу опухолей с различными гистологическими формами, молекулярными свойствами, клиническими особенностями и результатами лечения. Анализ данных параметров на индивидуальном уровне должен улучшать результаты лечения пациента, влияя на качество жизни и выживаемость.

Используемые в клинической практике прогностические шкалы основаны преимущественно на оценке клиничко-морфологических характеристик опухоли и не включают результаты оценки новых биологических маркеров РМЖ.

Исследования по оценке экспрессии определенных генов в отдельных подгруппах опухолей позволили создать мультигенные сигнатуры. В настоящее время доступны прогностические и предиктивные сигнатуры, однако разработки, объединяющие оба данных кластера и позволяющие выполнять комплексную оценку, отсутствуют.

Актуальность проблемы, ее недостаточная научная разработанность, предопределили выбор темы диссертационного исследования.

Цель

Повысить эффективность системной терапии РМЖ и снизить количество необоснованных назначений, используя данные об индивидуальных иммуногистохимических и молекулярно-биологических характеристиках опухоли на основе современных методов исследований, разработать прогностические шкалы и мультигенные панели для обеспечения персонализированного подхода к назначению системного лечения РМЖ.

Задачи

1. Определить прогностическое значение возраста больной, размера первичной опухоли, состояния регионарных лимфатических узлов, степени гистологической злокачественности, маркера клеточной пролиферации Ki-67,

уровня рецепторов стероидных гормонов (эстрогена и прогестерона), экспрессии HER2.

2. Определить прогностическое значение рутинных маркеров и создать на основе полученных результатов традиционную прогностическую шкалу.

3. Определить прогностическое значение малоизученных иммуногистохимических маркеров (p53, CK5/6, FOXA1, PNH3, E-кадгерина, EGFR, CD4, CD8, клеточной плотности) и создать на основе полученных результатов регрессионную прогностическую шкалу.

4. Используя разработанные прогностические шкалы, выделить группы высокого, среднего и низкого риска летального исхода и провести анализ эффективности адъювантной химиотерапии в группах разного риска.

5. Изучить молекулярно-биологические характеристики опухоли на основе современных методов исследований и создать мультигенную сигнатуру, включающую молекулярные подтипы и лечебно-ориентированные кластеры.

6. Провести исследование диагностической эффективности разработанной мультигенной сигнатуры при различных стадиях и подтипах РМЖ.

Научная новизна исследования

Впервые в Российской Федерации на достаточном материале с длительным сроком наблюдения проведено ретроспективное исследование биологических, морфологических, иммуногистохимических маркеров РМЖ, выделены группы пациентов в зависимости от риска летального исхода и оценено предсказывающее значение каждого фактора и их совокупности.

На обширном материале проанализированы возможности определения различных иммуногистохимических маркеров методом тканевых матриц в качестве прогностического и предиктивного теста. Созданы традиционная (на основе рутинных маркеров) и регрессионная (на основе малоизученных маркеров) прогностические шкалы.

Впервые создана 100-генная мультигенная сигнатура, включающая молекулярные подтипы и лечебно-ориентированные кластеры. Проведено исследование диагностической эффективности данной сигнатуры.

Впервые в Российской Федерации выделены молекулярные подтипы РМЖ (люминальный А, люминальный В, базальный).

Теоретическая и практическая значимость работы

На основе результатов изучения индивидуальных клинических, гистологических, морфологических, иммуногистохимических и молекулярно-генетических характеристик РМЖ разработаны прогностические шкалы и мультигенная панель для обеспечения персонализированного подхода к назначению системного лечения РМЖ.

Продемонстрировано, что низкий уровень экспрессии стероидных гормонов (ЭР и ПР), повышенный уровень экспрессии HER2, Ki-67, CK5, CK14, EGFR, PDL и пониженный уровень экспрессии FOXA1 ассоциированы с более злокачественным течением РМЖ.

Разработана регрессионная прогностическая шкала для определения группы риска пациентки в отношении летального исхода (низкий, средний, высокий риск) на основании результатов оценки 10 факторов, включая уровень экспрессии новых маркеров РМЖ. Продемонстрированы преимущества регрессионной шкалы по сравнению с традиционной шкалой на основе рутинных маркеров.

В результате выполненных исследований показано, что молекулярно-генетическое профилирование опухоли является более точным методом определения подтипа опухоли у пациенток с мРМЖ в сравнении с рутинным суррогатным иммуногистохимическим исследованием.

Проведенные исследования с использованием технологии nCounter, основанной на прямой цифровой детекции мишеней с помощью флуоресцентных штрих-кодов, продемонстрировали возможность оценки

экспрессии мРНК широкой панели генов в рамках одного лабораторного исследования гистологического материала.

Разработана мультигенная сигнатура из 100 генов, обладающих высокой прогностической и предиктивной значимостью, которая позволяет обеспечить персонализированный подход к назначению системного лечения РМЖ.

Методология и методы исследования

Проведен ретроспективный анализ анамнестических, клинических, патоморфологических и иммуногистохимических данных пациенток с РМЖ, полученных из объединенного канцер-регистра ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия) за 2000–2012 гг. Выполнены гистологические и иммуногистохимические исследования архивного материала из парафиновых блоков опухолей исследуемой популяции больных с T1–2N0M0 РМЖ. Иммуногистохимический анализ образцов ткани проводился с использованием метода тканевых матриц. Анализ экспрессии генов проводили с использованием технологии nCounter, основанной на прямой цифровой детекции мишеней с помощью флуоресцентных штрих-кодов (nCounter Analysis System компании NanoString). Исследования с целью подтверждения мутации генов проводили методами NGS (секвенирование нового поколения) и RT-PCR (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией). Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью пакетов прикладных программ Statistica 10 и SAS JMP 11.

Положения, выносимые на защиту

1. Уровень экспрессии стероидных гормонов (ЭР и ПР), HER2, Ki-67, CK5, CK14, EGFR, P53 может быть использован в многофакторном анализе для оценки риска рецидива у больных T1-2N0M0 независимо от подтипа РМЖ.

2. Разработаны традиционная прогностическая шкала, включающая рутинные маркеры РМЖ («T2N0M0», «ПР<8», «G2G3», «ЭР<8», «HER2=3» и «Ki-67>5 %»), и регрессионная прогностическая шкала, включающая уровень

экспрессии новых маркеров РМЖ («СК14, есть»; «FOXP3=0»; «T2N0M0»; «E-cadherin»; «P53»; «HER2=3»; «CD8>0»; «EGFR есть»; «степень G2, G3»; «CD4>0»), с выделением групп высокого, среднего и низкого риска летального исхода на основании суммы баллов. Регрессионная прогностическая шкала обладает более высокой специфичностью, эффективностью, прогностической и предсказывающей значимостью по сравнению с традиционной шкалой

3. Разработана мультигенная сигнатура из 100 генов, обладающих высокой предиктивной и прогностической значимостью (пролиферативно-референсная часть – 58 генов, лечебно-ориентированная часть – 37 генов, референс – 5 генов), позволяющая обеспечить персонализированный подход к назначению системного лечения РМЖ.

4. Технология nCounter, основанная на прямой цифровой детекции мишеней с помощью флуоресцентных штрих-кодов, позволяет оценить экспрессию мРНК широкой панели генов в рамках одного лабораторного исследования гистологического материала.

5. Молекулярно-генетическое профилирование опухоли является точным методом определения подтипа опухоли (люминальный А, люминальный В, базальный) у пациенток с метастатическим РМЖ в сравнении с рутинным суррогатным иммуногистохимическим исследованием.

Обоснованность и степень достоверности результатов исследования

Результаты диссертационного исследования достоверны и обоснованы, что обеспечивается достаточным объемом материала (исследованы данные 1216 пациенток с T1–2N0M0 РМЖ и 84 пациенток с метастатическим РМЖ), использованием современных методик гистологических, иммуногистохимических, молекулярно-генетических исследований на сертифицированном оборудовании, применением адекватных методов статистического анализа данных (критерий Шапиро – Уилка, критерий χ^2 Пирсона, критерий Манна – Уитни, критерий Краскела – Уоллеса, дисперсионный анализ (MANOVA), метод Каплана – Майера, регрессионная

модель Кокса, для построения прогностической модели использовали метод логистической регрессии).

Основные результаты научного исследования доложены и обсуждены на IV Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи 2018» (5-8 июля 2018 г., Санкт-Петербург), V Юбилейном Международном форуме по онкологии и радиологии (19-23 сентября 2022 г., Москва), XXV Российском онкологическом конгрессе (9-11 ноября 2021 г., Москва), VII Ежегодном конгрессе Российского общества онкопатологов (21-22 апреля 2023 г., Москва), форуме экспертов РООМ и ВГИСС с международным участием (2 декабря 2022 г., Екатеринбург), форуме экспертов РООМ с международным участием (4 июля 2023 г., онлайн), Российской научно-практической конференции с международным участием «Современные достижения в диагностике, хирургическом, лучевом и лекарственном лечении злокачественных опухолей» (11 июня 2020 г., Барнаул; 18 июня 2021 г., Барнаул), Ежегодном Всероссийском конгрессе РООМ (4-6 сентября 2014 г., Сочи; 3-5 сентября 2015 г., Сочи; 8-10 сентября 2016 г., Сочи; 6-8 сентября 2018 г., Сочи; 5-7 сентября 2019 г., Сочи; 3-5 сентября 2020 г., Сочи; 9-10 сентября 2021 г., Краснодар; 8-9 сентября 2022 г., Санкт-Петербург), Всероссийском мультидисциплинарном форуме РООМ (2 апреля 2021 г., Москва; 1 апреля 2022 г., Москва), мультидисциплинарном форуме РООМ по диагностике и лечению РМЖ в Уральском федеральном округе (4 апреля 2014 г., Екатеринбург), Северо-Кавказском и Южном федеральном округе (9 апреля 2015 г., Пятигорск), Приволжском федеральном округе (8 апреля 2016 г., Казань), Сибирском, Дальневосточном и Уральском федеральным округам (7 апреля 2017 г., Томск), Новосибирско-Алтайско-Томском форуме РООМ (18 сентября 2020 г., Новосибирск; 11 марта 2022 г., Новосибирск; 17 марта 2023 г., Новосибирск), Челябинско-Омско-Сургутском форуме РООМ (30 октября 2020 г., Челябинск), Пермско-Оренбургско-Тверском форуме РООМ (20 ноября 2020 г., Пермь), Уральском форуме РООМ (4 декабря 2020 г., Екатеринбург; 3 декабря 2021 г., Екатеринбург; 2 декабря 2022 г., Екатеринбург), Краснодарско-Архангельско-Астраханском форуме РООМ (5

февраля 2021 г., Краснодар), Воронежско-Ярославско-Липецком форуме РООМ (26 февраля 2021 г., Воронеж), Ижевско-Иркутско-Красноярском форуме РООМ (12 марта 2021 г., Ижевск), Красноярско-Камчатско-Сахалинском форуме РООМ (22 апреля 2022 г., Красноярск), Казанско-Нижегородско-Ивановском форуме РООМ (23 апреля 2021 г., Казань), Саратовско-Самарско-Ульяновском форуме РООМ (21 мая 2021 г., Саратов), Ставропольско-Пятигорско-Владикавказском форуме РООМ (4 июня 2021 г., Ставрополь), Ставропольско-Махачкалинско-Грозненском форуме РООМ (20 мая 2022 г., Ставрополь), Санкт-Петербургско-Архангельско-Калининградском форуме РООМ (4 февраля 2022 г., Санкт-Петербург), Воронежско-Липецко-Белгородском форуме РООМ (25 февраля 2022 г., Воронеж; 28 апреля 2023 г., Воронеж), Нижегородско-Казанско-Уфимском форуме РООМ (3 марта 2023 г., Нижний Новгород), Краснодарско-Ростовско-Ставропольском форуме РООМ (26 мая 2023 г., Краснодар).

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования внедрены в клиническую и научную практику отделения опухолей молочной железы, хирургического отделения опухолей молочной железы, научной лаборатории морфологии опухолей и патологоанатомического отделения ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (акты внедрения от 04.09.2018, 17.09.2019, 31.05.2021, 17.01.2022).

Материалы диссертационного исследования использованы при подготовке клинических рекомендаций Российского общества онкомаммологов (РООМ) и используются в научной деятельности СПбГБУЗ «Городской клинический онкологический диспансер» (соглашение о научном сотрудничестве от 26.02.2016), ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер» МЗ РТ УФА. (соглашение о научном сотрудничестве от 26.02.2016), ГБУЗ НО «Нижегородский областной клинический онкологический диспансер» (соглашение о научном сотрудничестве от 07.04.2016), КГБУЗ «Алтайский краевой онкологический диспансер» (соглашение о научном сотрудничестве от

25.02.2021), ОБУЗ «Ивановский областной онкологический диспансер» (соглашение о научном сотрудничестве от 25.03.2021), ГБУЗ СК «Пятигорский межрайонный онкологический диспансер» (соглашение о научном сотрудничестве от 24.05.2021), ГБУЗ СК «Ставропольский краевой клинический онкологический диспансер» (соглашение о научном сотрудничестве от 31.05.2021), ГАУЗ ТО МКМЦ «Медицинский город» Тюмень (соглашение о научном сотрудничестве от 4.10.2022).

Личное участие автора в получении результатов

Автору принадлежит идея проведения комплексных научных исследований с целью разработки прогностических шкал и мультигенной сигнатуры (100-генная панель) для внедрения в клиническую практику индивидуализированного подхода к лечению РМЖ. Автором сформулированы цель и задачи исследования, разработан план исследования и отдельных его этапов, осуществлен углубленный анализ отечественной и зарубежной научной литературы, проведен набор клинического материала. В сотрудничестве с сотрудниками лаборатории ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, автором были разработаны и проведены гистологические, иммуногистохимические и молекулярно-биологические исследования образцов опухолевой ткани молочной железы. Автором были оперированы пациенты из группы T1-2N0M0, проведен анализ тепловых карт с рекомендаций системного лечения у 84 больных мРМЖ. При непосредственном участии автора выполнены обобщение и статистический анализ полученных результатов, написание и оформление рукописи диссертации и публикаций по выполненной работе.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Основные результаты работы, научные положения и выводы, описанные в диссертационной работе, соответствуют паспорту специальности «3.1.6 – Онкология, лучевая терапия» («медицинские науки»).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 18 научных работ, из них 12 – в журналах, включенных в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для публикации научных результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора медицинских наук. По результатам работы получено 4 патента на изобретение РФ. Результаты работы вошли в клинические рекомендации РООМ 2018 г. по диагностике и лечению рака молочной железы (М.: ИД «АБВ-пресс», 2018).

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 260 страницах машинописного текста и содержит введение, обзор литературы, описание программы, материалов и методов, результаты собственных исследований и их обсуждение, выводы, практические рекомендации. Список литературы включает 387 источников, из них 14 отечественных и 373 зарубежных. Работа иллюстрирована 25 таблицами и 74 рисунками.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РОЛИ КЛИНИЧЕСКИХ, ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИХ, ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ ПРОГНОСТИЧЕСКИХ И ПРЕДИКТИВНЫХ ФАКТОРОВ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Рак молочной железы: актуальность проблемы

Рак молочной железы (РМЖ) – наиболее часто встречающееся онкологическое заболевание в женской популяции. Более 2 млн случаев в мире выявляется ежегодно. В Российской Федерации по данным на 2018 г. РМЖ у женского населения является ведущей онкологической патологией (20,9 %) и основной причиной смертности от злокачественных новообразований (16,2 %). В период с 2008 по 2018 гг. абсолютное число впервые выявленных случаев РМЖ увеличилось с 52 469 до 70 682, показатель заболеваемости на 100 тыс. населения – с 42,83 до 51,63. На 2018 г. в структуре онкологической заболеваемости РМЖ занимает 1-е место у женщин в возрасте 30–59 лет (27,2 %), 2-место – у женщин в возрасте 60 лет и старше (18,1 %) и 3-е место у лиц в возрасте 0-29 лет (7,0 %) [1]. В последние годы увеличивается количество пациентов, у которых заболевание диагностировано в I-II стадиях. Так, в 2018 г. этот показатель составил 71,2 %, тогда как 10 лет назад – 62,7 %. Стандартизированный показатель смертности снизился с 2008 по 2018 гг. с 17,05 до 14,02 соответственно. Риск умереть от РМЖ у женщин в 2018 г. составил 1,6 %. Доля женщин, состоящих на учете 5 и более лет, составляет 59,8 % [8].

За последние десятилетия смертность от РМЖ в мире несколько снизилась благодаря широкому внедрению маммографического скрининга, адъювантной и неоадъювантной системной терапии [5, 107]. Современный подход к выбору адъювантной терапии существенно отличается от принятого в прошлом. Адъювантная химиотерапия, ранее рассматриваемая в качестве обязательной при определенных клинических условиях, уже не является общепринятым стандартом лечения.

Клинико-морфологическая гетерогенность РМЖ отмечена В. Ф. Семиглазовым и другими исследователями задолго до формирования современных представлений о вариантах течения РМЖ. Такие параметры, как возраст [53], гистологическая степень злокачественности [302], статус аксиллярных лимфатических узлов [300], в планировании лечения использовались задолго до настоящего времени. С момента открытия в опухолевых клетках рецепторов стероидных гормонов [43] и, в дальнейшем, рецептора эпидермального фактора роста 2-го типа (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) [259] начался этап развития индивидуализированного подхода к лечению РМЖ. Рецепторы стероидных гормонов, HER2 продемонстрировали свою предиктивную и прогностическую значимость в многочисленных клинических исследованиях, радикально изменили подходы к лечению РМЖ.

На основании достижений последних генетических исследований получено представление о генетической многообразии РМЖ [265]. Благодаря этому стало возможным выделение молекулярных подтипов РМЖ с характерными для них факторами риска, морфологическими признаками, особенностями ответа на лечение, отдаленными результатами, что впоследствии позволило разработать более адекватные терапевтические подходы к каждому из них.

Сегодня методики анализа молекулярно-генетического профиля опухоли позволяют детально изучить свойства опухоли. Оценка экспрессии генов позволяет выделить группу благоприятного прогноза среди больных HER2-отрицательным РМЖ с наличием экспрессии рецептора эстрогенов (ЭР), которые не нуждаются в адъювантной химиотерапии. Доля больных с благоприятным прогнозом в данной группе может составлять не менее 40 % [20]. Однако внедрение молекулярно-генетического профилирования опухоли в рутинную практику затруднено из-за высокой стоимости теста и отсутствия полученных в проспективных исследованиях доказательств прогностической и предиктивной ценности для выбора адъювантного лечения. Именно пациентам с

ЭР-положительным HER2-отрицательным РМЖ может проводиться неоптимальная, избыточная химиотерапия. Суррогатное определение подтипов РМЖ на основании оценки уровня экспрессии ЭР, рецептора прогестерона (ПР), HER2, Ki-67 с помощью иммуногистохимических (ИГХ) методов эффективно с точки зрения формирования индивидуального прогноза и выбора адъювантного лечения [32]. Это доказывает ряд исследований, в которых определение подтипа опухоли проводилось с помощью суррогатных маркеров одновременно с анализом генетического профиля опухоли [60].

Все более актуальным становится изучение биологических маркеров РМЖ, являющихся альтернативой стандартным маркерам, которые широко применяются в рутинной клинической практике. Целый ряд показателей таких, как p53 [199], CK5/6 [17], SMA [68], p63 [99], PNH3 [148], E-кадгерин [168], EGFR [227], FOXA1 [46], рецепторы андрогенов (РА) [155], TILs [102] и другие во многочисленных исследованиях демонстрируют свою предиктивную и/или прогностическую значимость. Результаты данных исследований свидетельствуют о том, что новые биологические маркеры РМЖ требуют дальнейшего подробного изучения. Подобные исследования в будущем могут существенно повлиять на формирование новых подходов к лечению РМЖ.

1.2. Персонализация классификации TNM за счет интеграции в систему дополнительных прогностических категорий (рецептора эстрогенов, рецептора прогестерона, HER2, степени гистологической злокачественности, генетического профиля опухоли)

С момента внедрения в клиническую практику в 1940-х гг. система TNM, основанная на работе Pierre Denoix, стала универсальным инструментом определения стадии опухолевого заболевания [176]. В настоящее время система TNM отражает размер первичной опухоли, ее взаимоотношения с соседними структурами, состояние регионарных лимфатических узлов (число пораженных узлов, степень вовлечения узла и наличие экстракапсулярного распространения метастазов), наличие или отсутствие отдаленных метастазов.

Система TNM регулярно претерпевает изменения: с момента внедрения в клиническую практику было опубликовано 8 версий. Последняя версия системы стадирования была опубликована в 2016 г. Принципиальным отличием последней версии системы TNM от всех предыдущих является применение биомаркеров для стадирования болезни. Эти существенные изменения системы TNM коснулись и РМЖ. Заболевание в настоящее время включает 4 молекулярных подтипа, каждый из которых имеет характерный генетический «портрет». С учетом того, что анализ генетического профиля крайне мало доступен в рутинной практике, молекулярная классификация адаптирована к клинической практике за счет использования стандартных биомаркеров: ЭР, ПР, HER2, Ki-67. Определение молекулярного подтипа не только играет важную роль в выборе лечебного подхода, но и имеет прогностическую значимость. Таким образом, включение данных параметров в систему стадирования практически целесообразно.

При разработке последней версии системы TNM перед экспертным советом стояла задача создать наиболее эффективную систему стадирования, которая бы включала валидизированные прогностические маркеры и при этом сохраняла бы анатомическую классификацию, позволяющую определять стадию при условии, что использование прогностических маркеров по каким-либо причинам невозможно.

Ряд изменений, касающихся анатомической классификации РМЖ, был внесен в 8-ю версию системы TNM. Прежде всего, из классификации был исключен дольковый рак *in situ*, в том числе в категории pTis. Данное изменение обосновано недостаточным количеством данных, свидетельствующих о злокачественном характере данного вида новообразований.

Изменения также коснулись категории T1–3. После округления до 0,1 мм при измерении микроинвазивных опухолей диапазоны размеров опухолей в настоящее время следующие: pT1mi (микро) – 0,1–1,0 мм, pT1a – 1,1–5,4 мм, pT1b – 5,5–10,4 мм, pT1c – 10,5–20,4 мм, pT2 – 20,5–50,4 мм, pT3 ≥ 50,5 мм.

Уточнены также характеристики первичной отечно-инфильтративной формы РМЖ. В классификации указано, что воспалительный РМЖ – это клиничко-морфологический диагноз с рядом характерных клинических признаков и наличием морфологически подтвержденной опухоли. Эритема или отек кожи должны быть диффузными и вовлекать не менее 1/3 кожи молочной железы, темпы развития опухоли должны быть высокими: интервал от момента появления симптомов до постановки диагноза не должен превышать 6 мес [19]. Данные критерии позволяют отделить первичную отечно-инфильтративную форму от местно-распространенного РМЖ. Также в классификации упоминается клинический вариант течения заболевания, при котором присутствуют все признаки первичной отечно-инфильтративной формы, но в процесс вовлечено менее 1/3 кожи молочной железы. Данную клиническую ситуацию рекомендуется расценивать как T4b–c [19].

Изменения не коснулись категории (p)N. При морфологической верификации степени вовлечения лимфатических узлов до хирургического лечения используется клиническая категория – cN. Для уточнения способа верификации добавляются следующие символы: f – при тонкоигольной аспирационной биопсии, кор- или трепанобиопсии, sn – при биопсии сигнального лимфатического узла. Категория pN используется после хирургического лечения – удаления первичной опухоли и аксиллярных лимфатических узлов [19]. Обозначение наличия отдельных опухолевых клеток в лимфатических узлах не изменилось – pN0(i+), но в 8-й версии системы TNM присутствуют категории pN0(mol+) и pN0(mol-) для описания выявленных, но морфологически незначимых клеток.

Категория M также не изменилась. Изолированные опухолевые клетки в отдаленных анатомических областях (циркулирующие опухолевые клетки и опухолевые клетки в костном мозге) обозначаются как M0(i+). Для описания изолированных опухолевых клеток, выявленных с помощью молекулярных методов, существует категория M0(mol+) и M0(mol-) [347].

После проведения неoadьювантной терапии используются категории урТ и урN, оценка которых проводится путем измерения наибольшего из сохраняющихся узлов резидуальной инвазивной опухоли без включения зоны фиброза вокруг капсулы опухоли или вовлеченного лимфатического узла.

Изменения в системе стадирования коснулись определения размеров первичных опухолей маленького размера, категории Т при наличии множественных первичных опухолевых узлов, наличии сателлитных опухолевых узлов в коже. Также изменилось определение размеров метастазов в аксиллярных лимфатических узлах, категории cNx, cM1 и pM1.

В постнеoadьювантном разделе классификации изменены определение размеров урТ, определение размеров резидуальных метастазов в подмышечных лимфатических узлах, пересмотрено определение полной морфологической ремиссии (ПМР).

Существенно отличаются варианты системы TNM 8-й версии, предлагаемые Союзом по международному контролю рака (Union for International Cancer Control) и Американским объединенным комитетом по изучению рака (American Joint Committee on Cancer, AJCC). Анатомические классификации в обеих системах идентичны, но AJCC позволяет выделять более сложные прогностические стадии. Помимо общих категорий Т, N и M, для оценки прогностической стадии используются такие параметры, как уровень экспрессии ЭР, ПР, HER2. В дополнение может использоваться анализ генетического профиля, который позволяет снижать прогностическую стадию. Прогностическое стадирование позволяет распределять пациентов по прогностическим группам со сходным прогнозом. За счет применения дополнительных категорий в классификации прогностическая стадия может не совпадать с анатомической.

Дополнительные прогностические факторы могут по-разному влиять на прогноз заболевания, оцененный на основании анатомической классификации. Так, отсутствие экспрессии ПР при наличии экспрессии ЭР может повышать стадию РМЖ. Наличие экспрессии HER2 само по себе ассоциировано с

неблагоприятным прогнозом, однако благодаря наличию современной анти-HER2-терапии данный параметр может снижать прогностическую стадию. Тройной негативный фенотип, как правило, повышает прогностическую стадию. Степень гистологической злокачественности также может изменять стадию заболевания в ту или иную сторону.

Принципиальные изменения в классификации заключаются во внедрении 4 биомаркеров: ЭР, ПР, HER2 и степени гистологической злокачественности. Таким образом, к прогностическим параметрам системы Т, N и М были добавлены молекулярные параметры, которые в совокупности позволили более точно формировать прогностические группы.

Для пациентов, 1-м этапом лечения которых была операция, последняя версия системы TNM открывает возможность морфологической прогностической оценки (Т и М в сочетании с биомаркерами). У больных, которые проходят неoadъювантную химиотерапию, используется постнеoadъювантное стадирование (ypT и ypN). В связи с недостаточным количеством статистических данных о пациентах, прошедших неoadъювантную терапию, прогностическое стадирование для них пока не разработано.

В 8-й версии классификации TNM предпринята попытка интеграции анализа генного профиля опухоли и стадирования заболевания. За прошедшие два десятилетия несколько исследовательских групп сформировали панели генов, анализ экспрессии которых позволяет более точно определять прогноз в каждом конкретном клиническом случае. Одна из таких панелей – MammaPrint – была изучена в проспективном исследовании MINDACT, в котором сопоставлены клиничко-морфологическая оценка и оценка с помощью веб-инструмента Adjuvant! Online [49, 257]. После хирургического лечения пациентам с гормоноположительным HER2-отрицательным РМЖ с поражением или отсутствием поражения аксиллярных лимфатических узлов, с низким риском по данным обоих методов была назначена только адъювантная гормонотерапия. Пациентам с высоким риском по данным обоих методов была назначена адъювантная химиотерапия. Пациенты с промежуточным риском

были рандомизированы и получали оба вида лечения. Целью исследования было сравнение результатов оценки риска обоими методами. При первичном анализе MammaPrint позволил выделить группу пациентов с благоприятным прогнозом, которые не нуждались в адъювантной химиотерапии [291].

В исследовании TAILORx в качестве прогностического инструмента использовался анализ экспрессии 21 гена с помощью методики Oncotype DX [319]. Пациенты с гормоноположительным HER2-отрицательным РМЖ без поражения аксиллярных лимфатических узлов и с оценкой риска прогрессирования <11 баллов получали только адъювантную гормонотерапию. Пациентам с риском прогрессирования болезни ≥ 25 баллов была назначена адъювантная химиотерапия с последующей гормонотерапией. Пациенты с промежуточным риском (11–24 балла) были рандомизированы и получали только гормонотерапию или химиотерапию с последующей гормонотерапией. В настоящее время проанализированы результаты только в группе низкого риска: безрецидивная выживаемость в течение 6,9 года составила 98,6 %. Аналогичные результаты анализа 3 крупных баз данных: SEER [267], западногерманской исследовательской группы PlanB [250] и Clalit [323] – свидетельствуют о высокой воспроизводимости результатов и позволяют с уверенностью отказываться от адъювантной химиотерапии в группе пациентов с низким риском.

Два вышеупомянутых метода применялись более чем у 100 тыс. больных, что является весомым доказательством воспроизводимости результатов и прогностической точности методов. На основании этих результатов стадия болезни у пациентов с гормоноположительным HER2-отрицательным РМЖ при размере первичной опухоли T1–2 и отсутствием метастазов в аксиллярных лимфатических узлах может клинически расцениваться как Ia независимо от размера опухоли. Экспертный совет системы TNM рекомендует такой подход к стадированию только для пациентов с низким риском прогрессирования болезни на основании анализа экспрессии 21 гена с помощью методики Oncotype DX.

Система TNM 8-й версии в варианте AJCC, позволяющая выделять прогностические группы пациентов, является попыткой индивидуализировать лечение пациентов за счет включения в систему дополнительных прогностических маркеров (ЭР, ПР, HER2, степень гистологической злокачественности, анализ генетического профиля опухоли).

1.3. Прогностическое значение статуса аксиллярных лимфатических узлов

Статус аксиллярных лимфатических узлов – один из важных прогностических факторов для РМЖ [117, 161]. Пятилетняя выживаемость больных РМЖ при наличии пораженных аксиллярных лимфатических узлов на 40 % ниже, чем у пациентов с отсутствием поражения аксиллярных лимфатических узлов [103, 293, 370]. Увеличение количества пораженных аксиллярных лимфатических узлов снижает общую выживаемость независимо от размера первичной опухоли и других факторов [31]. Кроме того, риск локорегионарного рецидива повышается при увеличении количества пораженных лимфатических узлов [289]. Помимо характеристик первичной опухоли, состояние аксиллярных лимфатических узлов также определяет показания к адъювантной системной и лучевой терапии.

Классификация TNM не регламентирует количество аксиллярных лимфатических узлов, которые должны быть удалены. AJCC рекомендует удалять не менее 6 лимфатических узлов, но общепринятым является удаление не менее 10 лимфатических узлов с целью адекватного стадирования [72, 300]. Неадекватная лимфодиссекция может стать причиной необоснованного снижения стадии заболевания. Некоторые авторы предполагают, что отношение количества пораженных лимфатических узлов к количеству удаленных лимфатических узлов может быть прогностическим фактором. В нескольких клинических исследованиях это соотношение изучалось как более значимый фактор, чем абсолютное количество пораженных аксиллярных лимфатических узлов [64, 357].

Р. R. Rosen и соавт. в 1989 г. опубликовали результаты наблюдения за 644 больными РЖМ с I стадией (T1N0M0) и II стадией (T1N1M0). Длительность наблюдения составила 18,2 года. По окончании наблюдения оказалось, что 23 % пациентов умерли, у 3 % зарегистрировано прогрессирование заболевания, у 74 % не было признаков прогрессирования. Вероятность рецидива болезни имела прямую связь с ее распространенностью. Рецидив заболевания в 16 % случаев и летальный исход в 25 % случаев возникли во 2-й декаде наблюдения. При стратификации по размеру опухоли установлено, что пациенты с T1N0M0 и первичной опухолью размером $\leq 1,0$ см имели существенно более высокую 20-летнюю безрецидивную выживаемость (86 %), чем пациенты с T1N0M0 и первичной опухолью размером 1,1–2,0 см (69 %) [293].

В ретроспективном исследовании M. Schaapveld и соавт. проанализированы результаты лечения 5314 больных РМЖ, перенесших мастэктомия или органосохраняющую операцию в период с 1994 по 1999 гг. Оценен прогностический эффект количества исследованных лимфатических узлов. Медиана количества гистологически исследованных лимфатических узлов составила 12 (интервал 1–43), у 59 % пациентов отсутствовало поражение лимфатических узлов. Количество исследованных лимфатических узлов было обратно пропорционально возрасту ($p < 0,001$) и прямо пропорционально размеру первичной опухоли ($p < 0,001$). Общая выживаемость пациентов, у которых количество исследованных лимфатических узлов составило < 10 , была ниже, чем у пациентов с количеством исследованных лимфатических узлов ≥ 10 ($p < 0,001$). После поправки на возраст, размер опухоли, количество пораженных лимфатических узлов оказалось, что количество исследованных лимфатических узлов не влияло на относительную выживаемость [300].

Р. J. M. Ding и соавт. изучили данные канцер-регистра Нидерландов за 1999–2005 гг. В анализ включили 25 315 случаев РМЖ с поражением аксиллярных лимфатических узлов. Больные были разделены на группы в зависимости от отношения количества пораженных лимфатических узлов к количеству удаленных лимфатических узлов (низкое $\leq 0,20$, промежуточное

0,21–0,65, высокое $>0,65$). Выживаемость оценивали методом Каплана – Мейера. Для всей когорты 5- и 10-летняя выживаемость составила 78 и 62 % соответственно. Количество пораженных лимфатических узлов коррелировало с общей выживаемостью (5-летняя общая выживаемость 84, 72 и 55 % соответственно при количестве узлов 1–3, 4–9 и ≥ 10 , $p < 0,001$). Отношение количества пораженных лимфатических узлов к количеству удаленных лимфатических узлов также коррелировало с общей выживаемостью (5-летняя общая выживаемость 86, 75, 54 % соответственно при низком, промежуточном и высоком риске, $p < 0,001$). При многофакторном анализе риск смерти увеличивался пропорционально увеличению отношения количества пораженных лимфатических узлов к количеству удаленных лимфатических узлов ($p < 0,001$) [103].

1.4. Прогностическая роль возраста на момент постановки диагноза

В настоящее время РМЖ в большей степени рассматривается не как единая нозология, а как гетерогенная группа как минимум из 4 основных подтипов: люминальный подтип А, люминальный подтип В, базальноподобный и HER2-положительный [265]. Подтипы различаются экспрессией ЭР и ПР, экспрессией и/или амплификацией *HER2* и пролиферативной активностью опухоли. Третье негативный подтип (ТНРМЖ) характеризуется неблагоприятным прогнозом прежде всего из-за ограниченной чувствительности к химиотерапии [247, 275]. Четко прослежена связь между молекулярными подтипами РМЖ и прогнозом [275, 317]. Известна также взаимосвязь между возрастом пациента на момент постановки диагноза и прогнозом заболевания [22, 41].

Под молодым возрастом в современной медицине подразумевается возраст моложе 40–45 лет [122]. На основании наличия определенных факторов риска, исхода заболевания, биологических особенностей опухоли ряд авторов выделяет отдельную возрастную группу очень молодых больных – моложе 35 лет [294]. Несмотря на достижения современной диагностики и адъювантной терапии РМЖ, выживаемость данной возрастной категории пациентов все еще

существенно ниже, чем выживаемость других групп больных. Это обусловлено как неблагоприятными морфологическими характеристиками опухоли, характерными для данной возрастной группы, так и непосредственно возрастом больных: даже при наличии благоприятных факторов риск рецидива у этой категории больных существенно выше [294]. Общая выживаемость больных РМЖ моложе 40 лет значительно ниже, чем больных 40–50 лет [122]. РМЖ среди молодых женщин (моложе 40 лет) характеризуется высокой пролиферативной активностью, менее благоприятным прогнозом и более высокой смертностью в сравнении с РМЖ у женщин более старшего возраста (40 лет и старше) [26]. Для молодых больных характерны более крупные опухоли, более высокая степень злокачественности, отрицательный рецепторный статус и более частое поражение лимфатических узлов, что определяет менее благоприятный прогноз [361]. Разница в распределении факторов риска (раса, тип конституции, репродуктивные функции) между более молодыми и менее молодыми больными также может быть связана с разными характеристиками опухолей.

По-прежнему противоречивы данные о влиянии на прогноз возраста пациентов при определенных молекулярных подтипах РМЖ. В одном из крупных исследований Н. А. Azim и соавт. с использованием анализа данных ДНК-микрочипов у 3522 больных РМЖ в ходе многофакторного анализа доказали прогностическую роль возраста вне зависимости от молекулярного подтипа опухоли [33]. При этом результаты другого крупного исследования, проведенного Е. О. Jenkins и соавт. с использованием анализа данных ДНК-микрочипов у 3947 больных РМЖ, свидетельствуют о том, что прогностическая роль возраста обусловлена исключительно биологическими особенностями молекулярных подтипов [171]. С. Liedtke и соавт. изучили морфологические и клинические данные 1732 больных ТНРМЖ. Пациенты были разделены на 5 возрастных когорт (≤ 30 , 31–40, 41–50, 51–60 и > 60 лет). При однофакторном и многофакторном анализе было установлено, что увеличение возраста на момент постановки диагноза коррелировало с улучшением безрецидивной выживаемости ($p = 0,0003$) и общей выживаемости ($p < 0,0001$). Медиана

безрецидивной выживаемости пациентов 31–40 лет и старше 60 лет составила соответственно 4 года (95 % доверительный интервал (ДИ) 2–5 года) и 8 лет (95 % ДИ 5–14 лет) ($p = 0,0003$). При многофакторном анализе размер первичной опухоли, статус аксиллярных лимфатических узлов, степень злокачественности и возраст оказались независимыми прогностическими факторами. Больные моложе 40 лет имели существенно более неблагоприятный прогноз [204]. В другом исследовании С. Liedtke и соавт. путем микроматричного анализа данных 4467 больных выявлено, что ТНPMЖ и HER2-положительный подтипы чаще встречаются у молодых пациенток. Анализ данных отдельных подтипов позволил установить, что достаточную прогностическую значимость имеет возраст <40 лет преимущественного при ТНPMЖ, а при люминальных подтипах она существенно ниже, при HER2-положительном подтипе – отсутствует. Молодой возраст ассоциировался с высокой частотой ТНPMЖ и HER2-положительного подтипов, с низкой частотой люминального PMЖ подтипа А. Пятилетняя выживаемость без рецидивов и прогрессирования у больных моложе 40 лет, больных в возрасте 40–50 лет и больных старше 50 лет составила соответственно $54,3 \pm 3,5$; $68,5 \pm 1,9$ и $70,0 \pm 1,3$ %. Взаимосвязь возраста и молекулярного подтипа PMЖ свидетельствует о его важной роли как прогностического фактора [206].

L. Chollet-Hinton и соавт. провели ретроспективное исследование опухолевых характеристик и эпидемиологических факторов у больных PMЖ в пременопаузе и постменопаузе, участвовавших в исследовании Carolina Breast Cancer Study. Всего проанализировано 5309 случаев, численность контрольной группы составила 2022 человека. Как в пременопаузальной, так и в постменопаузальной группах у молодых больных отмечалась тенденция к большей агрессивности PMЖ: более высокая стадия заболевания, отрицательный рецепторный статус, высокая частота базальных подтипов, высокая частота поражения аксиллярных лимфатических узлов, больший размер опухоли [71].

С целью оценки частоты локорегионарного прогрессирования у молодых больных ранним РМЖ и прогностических факторов, влияющих на данное событие, М. А. Vollet и соавт. организовали исследование, в которое были включены 209 пациенток моложе 40 лет. Проведено органосохраняющее оперативное лечение, адъювантная лучевая терапия с добавлением или без добавления адъювантной химиотерапии. Медиана возраста составила 37 лет, 66 (32 %) пациенток были в возрасте 35 лет или моложе, 143 (68 %) были старше 35 лет. Медиана длительности наблюдения составила 12 лет. Наиболее частыми характеристиками опухоли были первичная опухоль T1 (75 %) и статус аксиллярных лимфатических узлов pN0 (60 %). За период наблюдения зарегистрировано 76 локорегионарных рецидивов: 61 случай местного рецидива, 6 случаев рецидива болезни в регионарных лимфатических узлах, 9 случаев местного и регионарного рецидива. Частота локорегионарных рецидивов составила 38 % за 10 лет, частота развития контралатерального РМЖ – 12 %. Возраст оказался единственным прогностическим фактором для локорегионарных рецидивов, относительный риск развития локорегионарных рецидивов увеличивался на 7 % при уменьшении возраста на каждый год. Наиболее часто локорегионарные рецидивы встречались в первые 2–3 года наблюдения [53].

Е. О. Jenkins и соавт. провели ретроспективный анализ 3947 случаев РМЖ. Особенностью исследования было особое внимание к пациентам пожилого возраста (≥ 70 лет). Для выявления молекулярных подтипов РМЖ использовался алгоритм анализа генных сигнатур PAM50. Оценивалась взаимосвязь возраста и молекулярного подтипа с безрецидивной, общей выживаемостью, выживаемостью, связанной непосредственно с заболеванием. Частота люминальных подтипов (A, B и A + B) увеличивалась с возрастом больных ($p < 0,01$, $p < 0,0001$ и $p < 0,0001$ соответственно), в то время как частота базальноподобных опухолей снижалась ($p < 0,0001$). Среди пациенток 70 лет и старше люминальный B подтип, HER2-положительный и базальноподобный рак встречались с частотой соответственно 32, 11 и 9 %. У пожилых женщин с

люминальным РМЖ наблюдались более благоприятные результаты лечения, чем у пациентов с ТНРМЖ и HER2-положительным подтипами. При многофакторном анализе с учетом молекулярных подтипов, вида лечения, размера опухоли, статуса регионарных лимфатических узлов, степени злокачественности оказалось, что увеличение возраста не оказывает отрицательного влияния на безрецидивную выживаемость и выживаемость, связанную непосредственно с заболеванием, в данной возрастной группе [171].

S. Loibl и соавт. изучили прогностическую значимость полной морфологической ремиссии (ПМР) после неoadъювантной химиотерапии у молодых больных РМЖ. Проведен метаанализ 8 исследований, в которых пациентки прошли неoadъювантную терапию. В анализ включены 8949 случаев РМЖ. Группу больных моложе 40 лет ($n = 1453$) сравнивали с группами 40–49 лет и старше 50 лет с учетом таких параметров, как ПМР, безрецидивная выживаемость, выживаемость без местных рецидивов, выживаемость без отдаленных метастазов, общая выживаемость, рецепторный статус, HER2-статус. Выявлена четкая ассоциация ПМР с возрастом. Частота ПМР была статистически значимо выше в группе больных моложе 40 лет, чем в других возрастных группах (20,9 % против 17,7 % и против 13,7 %, $p < 0,001$). Данная зависимость прослеживалась для ТНРМЖ и гормоноположительного/HER2-отрицательного РМЖ. Безрецидивная выживаемость, выживаемость без местных рецидивов, выживаемость без отдаленных метастазов, общая выживаемость были существенно ниже в подгруппе больных моложе 40 лет. Возраст оказался независимым прогностическим фактором для больных гормоноположительным/HER2-отрицательным РМЖ. Безрецидивная выживаемость оказалась самой низкой у женщин моложе 40 лет и без ПМР. Частота ПМР была выше у молодых женщин, в особенности при гормоноположительном/HER2-отрицательном и ТНРМЖ [216].

В ретроспективном исследовании L. C. Collins и соавт. проанализировали патоморфологические характеристики и распределение молекулярных подтипов в зависимости от возраста в группе больных РМЖ моложе 40 лет ($n = 399$).

Люминальный подтип А встречался в 33 % случаев, люминальный подтип В – в 35 %, HER2-положительный – в 11 %, ТНPMЖ – в 21 %. В сравнении с обычной популяцией больных PMЖ в исследуемой группе частота люминального подтипа В была выше (35 % против 10–25 %), частота люминального подтипа А была ниже (33 % против 60–70 %). Отличий в частоте выявления разных стадий заболевания, степени злокачественности в исследуемой группе по сравнению с обычной популяцией не наблюдалось [76].

Е. Т. Warner и соавт. провели ретроспективное исследование взаимосвязи между частотой репродуктивных факторов и риском развития PMЖ у женщин моложе 40 лет в пременопаузальном периоде в сравнении с женщинами старше 40 лет в пременопаузальном периоде. Изучено 374 случая PMЖ у больных моложе 40 лет и 2533 случая PMЖ у больных 40 лет и старше. Установлено, что для больных моложе 40 лет были характерны факторы неблагоприятного течения: более высокая степень злокачественности, большие размеры опухоли, большая частота гормоноотрицательных опухолей. Существенной взаимосвязи возраста, репродуктивных факторов и риска развития PMЖ в пременопаузальном возрасте обнаружено не было [361].

Таким образом, возраст – один из ключевых предикторов биологической и этиологической гетерогенности PMЖ. По некоторым данным, возраст является более существенным фактором гетерогенности опухоли, нежели менопаузальный статус.

1.5. Прогностическая значимость степени гистологической злокачественности

Лечение PMЖ должно опираться на надежные клинические и патоморфологические, прогностические и предиктивные факторы, позволяющие подобрать оптимальный терапевтический подход. При раннем PMЖ, при котором целесообразность системной терапии необходимо оценивать для каждого пациента индивидуально, в рутинной практике используются 3 базовых прогностических критерия: статус аксиллярных лимфатических узлов, размер

первичной опухоли и степень злокачественности опухоли. Ноттингемская (Elston-Ellis) модификация системы оценки злокачественности Скарфа – Блума – Ричардсона, также известная как ноттингемская система оценки степени злокачественности опухолей молочной железы, рекомендована различными профессиональными организациями, такими как Всемирная организация здравоохранения, AJCC, британская Королевская коллегия патологов (Royal College of Pathologists).

Прогностическая значимость ноттингемской системы оценки злокачественности впервые была продемонстрирована в 1991 г. [110], а затем была подтверждена множеством независимых исследований [49, 282]. В связи с тем, что оценка злокачественности по ноттингемской системе имеет независимое прогностическое значение, она была объединена со статусом аксиллярных лимфатических узлов и размером опухоли в ноттингемский прогностический индекс [138]. Вследствие прогностической значимости ноттингемской системы она была включена в клинические рекомендации [10] и алгоритмы выбора терапии и прогноза ее исхода [194]. Ноттингемская система обеспечивает возможность простой и малозатратной оценки биологических и клинических свойств опухоли, легко осуществляемой в рутинной практике наряду с оценкой статуса аксиллярных лимфатических узлов и определением размера опухоли.

Инвазивный РМЖ классифицируется в соответствии с гистологическим типом и степенью злокачественности. Хотя гистологический тип и может нести полезную прогностическую информацию, большая часть опухолей (60–75 %) не имеет особых характеристик (в связи с чем и существует термин «инвазивный протоковый рак неспецифического типа») [262]. Иные гистологические типы РМЖ, имеющие прогностические особенности, встречаются гораздо реже. Вследствие этого роль гистологических типов опухоли в выборе тактики лечения существенно ограничена [262].

Прогностическая значимость ноттингемской системы сопоставима со значимостью других параметров, таких как статус аксиллярных лимфатических узлов и размер опухоли. В исследовании D. E. Henson и соавт. изучена

выживаемость 22 616 пациентов с РМЖ. Показатели выживаемости в группе пациентов с I степенью злокачественности и II стадией оказались аналогичны показателям пациентов с III степенью злокачественности и I стадией. Кроме того, в группе больных с I степенью злокачественности и опухолью размером ≤ 2 см 5-летняя выживаемость составила 99 %, даже несмотря на наличие пораженных аксиллярных лимфатических узлов [153]. В исследовании E. A. Rakha и соавт. проанализированы 2219 случаев РМЖ с длительным периодом наблюдения. Исследование продемонстрировало, что степень злокачественности является важным параметром при лечении РМЖ, влияющим на отдаленные результаты при различных вариантах статуса аксиллярных лимфатических узлов. Подтверждено, что степень злокачественности совместно со статусом аксиллярных лимфатических узлов позволяет более точно прогнозировать результаты лечения, что является основанием для использования данного параметра в таких многофакторных инструментах прогноза, как ноттингемский прогностический индекс или Adjuvant! Online [282].

Существуют убедительные доказательства того, что степень злокачественности позволяет точно предсказывать поведение опухоли, в особенности на ранних стадиях РМЖ, в отличие от таких зависимых от времени прогностических факторов, как размер опухоли (pT1a–c) [282]. Степень злокачественности является также независимым прогностическим фактором для отдельных групп больных РМЖ. С. Desmedt и соавт. продемонстрировали, что при гормоноположительных HER2-отрицательных опухолях ($n = 628$), по данным многофакторного анализа, только степень злокачественности влияла на безрецидивную выживаемость (отношение рисков (OR) 2,00; 95 % ДИ 1,18–3,37; $p = 0,01$) [97]. В работе E. A. Rakha и соавт. степень злокачественности оказалась единственным независимым прогностическим фактором для безрецидивной выживаемости при гормоноположительном HER2-отрицательном РМЖ ($n = 1,077$) (OR 2,13; 95 % ДИ 1,79–2,53; $p < 0,0001$) [282]. Аналогичная взаимосвязь между степенью злокачественности и выживаемостью была выявлена у больных РМЖ без поражения аксиллярных лимфатических узлов

($n = 797$), которые получали только адъювантную гормонотерапию в послеоперационном периоде (ОР 1,85; 95 % ДИ 1,46–2,34; $p < 0,0001$; риск прогрессирования заболевания в течение 10 лет составил 7 % при I степени, 14 % при II степени и 31 % при III степени злокачественности) [280]. Для больных гормоноположительным РМЖ pN1 ($n = 316$) (ОР 2,07; 95 % ДИ 1,51–2,86; $p < 0,0001$) риск прогрессирования в течение 10 лет составил 5 % при I степени, 24 % при II степени и 43 % при III степени злокачественности [280].

А. М. Schwartz и соавт. провели анализ 161 708 случаев операбельного РМЖ из базы данных SEER за период 1990–2000 гг. [302]. Временной промежуток был выбран с учетом необходимости десятилетнего периода наблюдения. С помощью специально разработанного алгоритма была проанализирована 10-летняя выживаемость при каждой из комбинаций следующих факторов: T, N, степень злокачественности (всего 36 комбинаций). В исследование были включены только случаи инфильтративного протокового рака неспецифического типа и инфильтративного протокового угревидного РМЖ. Десятилетняя выживаемость оценивалась методом Каплана – Майера. Для любой из комбинаций T и N увеличение степени злокачественности приводило к пропорциональному снижению 10-летней выживаемости независимо от количества пораженных аксиллярных лимфатических узлов и размеров первичной опухоли (Рисунок 1). Аналогичный анализ выживаемости был выполнен для каждой из 36 комбинаций. При определенной заданной степени поражения лимфатических узлов выживаемость снижалась по мере увеличения размера первичной опухоли. При заданном размере первичной опухоли выживаемость снижалась по мере увеличения степени поражения лимфатических узлов. Для каждой заданной комбинации T и N выживаемость уменьшалась по мере увеличения степени злокачественности.

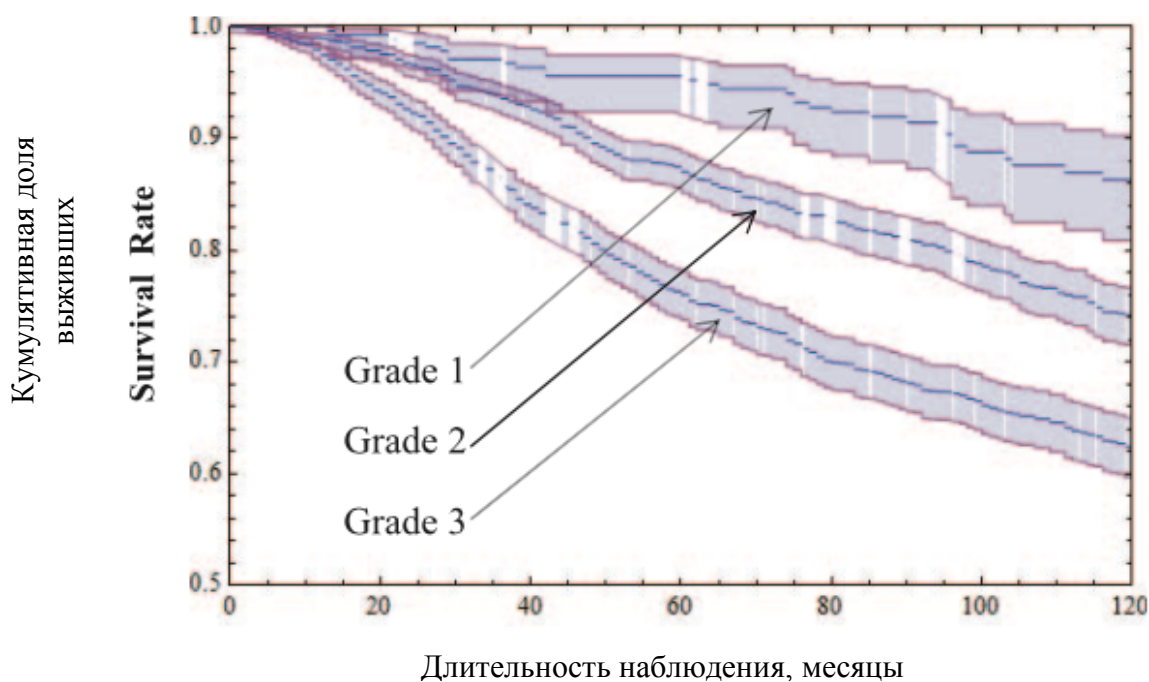


Рисунок 1 – Кривые Каплана – Майера, отражающие выживаемость при раке молочной железы T1N2 разной степени злокачественности (grade) [302]

Таким образом, степень злокачественности остается одним из ключевых самостоятельных прогностических факторов, влияющих на отдаленные результаты лечения независимо от размера первичной опухоли и степени поражения аксиллярных лимфатических узлов [302].

За прошедшее десятилетие произошел значительный прогресс в понимании молекулярных основ канцерогенеза, что внесло существенный вклад в развитие лечебных подходов и положило начало эпохе персонализированной медицины. РМЖ, как наиболее распространенное среди женщин онкологическое заболевание, стал одним из основных объектов приложения молекулярной диагностики с целью оптимизации лечебных подходов. Достижения молекулярной генетики привели к разработке и внедрению методов, вошедших в клиническую практику и используемых для определения молекулярных подтипов РМЖ и подбора оптимальных вариантов адъювантной терапии.

В связи со стремительным научным прогрессом практикующие врачи и патоморфологи нуждаются в определении не только традиционных морфологических параметров, но и молекулярных особенностей РМЖ. Роль молекулярной генетики становится ведущей в эпоху персонализированной медицины и мультидисциплинарных подходов.

1.6. Роль биомаркеров в выборе тактики лечения рака молочной железы

Биомаркеры играют важнейшую роль в лечении РМЖ. В настоящее время маркеры перестают рассматриваться в рамках привычного перечня (ЭР, ПР, HER2). Маркером может считаться параметр, отражающий нормальный биологический процесс, патологический процесс, ответ на терапевтическое вмешательство [113]. Гистологические, иммуногистохимические, физиологические и радиологические параметры могут быть биомаркерами. Американское общество клинической онкологии (American Society of Clinical Oncology, ASCO) опубликовало рекомендации по клиническому использованию биомаркеров (помимо системы TNM) для выбора терапии при диссеминированном РМЖ [31] и для выбора адъювантной терапии при ранних стадиях РМЖ [150]. Несмотря на растущее число маркеров, используемых в клинической практике, их количество пока существенно меньше количества маркеров, находящихся на стадии изучения. Это обусловлено многочисленными трудностями внедрения маркеров в клиническую практику.

В настоящее время существуют препятствия для рутинного использования исследуемых маркеров в клинической практике и принятия терапевтического решения: разнообразие методов анализа, их неодинаковая информативность и надежность, различия в условиях забора и хранения биообразцов, гетерогенность популяции и пр. [239].

Для клинического применения маркеров требуется использование надежных методов их оценки. Для внедрения метода оценки маркера необходимо сочетание 3 принципиальных условий: материала для оценки, метода измерения и критериев оценки результатов измерения [140].

Большинство методов оценки маркеров, влияющих на тактику лечения РМЖ, уже претерпело эволюцию. К примеру, ЭР прежде оценивались с помощью реакции связывания с лигандом в опухолевом цитозоле и измерялись в единицах (количественный анализ). В настоящее время экспрессия ЭР выявляется ИГХ методами в срезе парафинового блока и оценивается полуколичественным методом [147].

Для оценки клинического потенциала маркера необходимо ясно понимать цель его использования при принятии клинических решений. Основные цели – формирование прогноза, выбор терапии и оценка степени прогрессирования болезни [113]. При использовании маркера также следует учитывать клинические параметры, включая стадию заболевания, проведенное лечение и другие факторы, на основании которых происходит разделение пациентов на подгруппы, требующие разного лечебного подхода [113]. Основная причина, которая является препятствием для внедрения множества маркеров в клиническую практику, – корреляция между значениями маркера и результатами наблюдательных исследований в гетерогенной популяции, которая часто не становится полезной для клинического применения [113].

Прогностические маркеры используются для определения вероятности клинического события, рецидива или прогрессирования заболевания [140]. В онкологии термин прогноз используется безотносительно лечения (например, до хирургического лечения) либо в том случае, когда все пациенты получают один вариант стандартной терапии, но при этом могут иметь разные перспективы. Примером прогностического маркера служит наличие пораженных лимфатических узлов, выявленных после хирургического лечения, что определяет более высокую вероятность прогрессирования болезни. Больные РМЖ, являющиеся носителями мутаций генов *BRCA1* и *BRCA2*, имеют высокий риск повторного развития РМЖ и рака яичников [2]. В иных случаях применения понятия «прогноз», например, в случае применения таргетной терапии, либо в тех клинических ситуациях, когда имеются различные варианты терапии, прогностические маркеры могут быть и предиктивными. Хотя и потенциальные

мишени для новых препаратов часто сначала бывают открыты как прогностические маркеры. В том случае, если исследуемый препарат способен воздействовать на биомаркер, имеющий отрицательное прогностическое значение, новый метод лечения способен улучшить клинические результаты. Подобная ситуация сложилась с гиперэкспрессией HER2, который изначально был открыт как отрицательный прогностический фактор. Препараты, воздействующие на HER2, впоследствии существенно улучшили результаты лечения пациентов, нуждавшихся как в паллиативной, так и в адъювантной терапии [366].

Понятие предиктивного маркера используется в случаях, когда необходимо выявить группу пациентов, у которой, в отличие от пациентов с отсутствием данного маркера, отмечается значительный положительный или отрицательный эффект от ассоциированного с биомаркером вмешательства или воздействия [140]. О предиктивном маркере говорят в ситуации, когда осуществляется выбор между двумя вариантами лечения (например, в случае выбора адъювантной терапии при ранних стадиях РМЖ) с последующей оценкой общей и безрецидивной выживаемости. Синоним термина «предиктивный маркер» – «маркер для выбора терапии». Это означает, что эффективность определенного варианта лечения, в сравнении с эффективностью других, зависит от уровня биомаркера. Биомаркер может предсказывать эффект лечения, отсутствие эффекта лечения или даже потенциальный вред определенного воздействия. Самым очевидным примером предиктивного маркера является рецепторный статус больных РМЖ, используемый для назначения гормонотерапии [147].

Маркеры для наблюдения используют для оценки статуса заболевания, клинического состояния или для подтверждения экспозиции к фактору внешней среды или лекарственному препарату [140]. В онкологии маркеры сыворотки крови и инструментальные маркеры широко используются для мониторинга состояния пациентов, для выявления признаков стабилизации или прогрессирования заболевания. Такие сывороточные маркеры, как раковый

эмбриональный антиген, различные раковые антигены могут использоваться для выявления метастазов [352].

Внедрение таргетной терапии в рутинную клиническую практику, в которой современные режимы лечения назначаются на основании диагностических параметров, определяемых в опухоли, является значительным шагом в сторону индивидуализированного противоопухолевого лечения. Анализ генетического материала с помощью молекулярных методик позволил выявить новые прогностические и предиктивные маркеры, а также генные сигнатуры, которые превзошли по своей значимости стандартные рутинные методики [356]. Подобные открытия в достаточно короткие сроки формируют новые лечебные и диагностические подходы [366].

Руководство ASCO по использованию биомаркеров для выбора адъювантной терапии при раннем РМЖ было опубликовано в 2016 г. [150]. Эксперты проанализировали результаты 50 различных исследований биомаркеров при РМЖ в (среди них 3 метаанализа, 1 рандомизированное клиническое исследование), проведенных с 2006 по 2014 г. В дополнение к ЭР, ПР, HER2, по мнению авторов, убедительные доказательства клинического значения было получены для тестов Oncotype DX, EndoPredict, PAM50, BreastCancerIndex, а также для активатора урокиназы плазминогена и ингибитора активатора плазминогена I типа в различных подгруппах больных РМЖ. Ни один из биомаркеров, за исключением ЭР, ПР, HER2, не продемонстрировал своей значимости для выбора режима адъювантного лечения.

В 2019 г. были опубликованы обновления руководства ASCO, учитывающие результаты исследования TAILORx [28]. Для пациентов с рецептор-позитивным и без поражения подмышечных лимфатических узлов РМЖ, у которых балл рецидива по тесту Oncotype DX составляет менее 26, польза от химиотерапии, особенно среди пациенток старше 50 лет, была незначительной или отсутствовала. Авторы заключили, что клиницисты могут рекомендовать только гормонотерапию женщинам старше 50 лет. Для пациенток

в возрасте 50 лет и моложе с баллом рецидива от 16 до 25, может быть предложена гормоно- и химиотерапия. Пациентки с баллом рецидива выше 30 должны рассматриваться как кандидаты для гормоно- и химиотерапии. Для пациенток с баллом рецидива от 26 до 30 на основании неформального консенсуса была дана рекомендация о том, что онкологи могут предлагать гормоно- и химиотерапию.

Принципы персонализации терапии давно внедрены в лечение РМЖ и включают анализ клинических данных, морфологических характеристик опухоли и молекулярный анализ рецепторного статуса и HER2-статуса. Наличие положительного рецепторного статуса является индикатором потенциального эффекта гормонотерапии. Гиперэкспрессия HER2 – показание к применению анти-HER2-терапии. РМЖ при отсутствии экспрессии рецепторов стероидных гормонов и HER2 называется ТНРМЖ и требует назначения иных вариантов терапии [1, 283]. Таким образом, корректный морфологический диагноз и молекулярные характеристики опухоли служат важными критериями выбора наиболее эффективного режима лечения.

1.7. Прогностическое и предсказывающее значение рецепторов стероидных гормонов

Рецепторы стероидных гормонов играют одну из ключевых ролей в формировании как ткани молочной железы, так и РМЖ. Влияние эстрогенов при РМЖ было выявлено более 100 лет назад. Анализ экспрессии рецепторов применяется не только для классификации опухолей, но и для выбора лечения. Экспрессия ЭР и ПР в опухоли ассоциирована с благоприятным прогнозом и чувствительностью к гормонотерапии.

Методы оценки ЭР были впервые предложены еще в конце 70-х годов XX в. С 70-х до 90-х гг. методы исследования были основаны на связывании с лигандом эстрадиола, меченного радиоизотопом, в гомогенизированном свежемороженом образце опухолевой ткани. Позже для лабораторного использования стали доступны антитела к ЭР и ПР, что позволило оценивать

экспрессию рецепторов ГИХ методами в свежемороженых образцах опухолевой ткани. Данный анализ позволял получать более точные результаты по сравнению с первыми методиками. Существенный прорыв связан с внедрением моноклональных антител, позволяющих оценивать экспрессию ЭР и ПР на обычных срезах парафиновых блоков [151].

Считается, что около 20 % всех результатов анализа экспрессии ЭР и ПР являются неточными [147], хотя, с другой стороны, «золотого стандарта» не существует. Наиболее точным методом оценки экспрессии ЭР и ПР можно было бы считать клинический ответ на гормонотерапию, однако на практике это неприменимо. Ложноотрицательные и ложноположительные результаты могут быть обусловлены преаналитическими, аналитическим и постаналитическими факторами, которые требуют стандартизации для точной оценки рецепторного статуса опухоли. Такие рекомендации даны ASCO совместно с Коллегией американских патологов (College of American Pathologists, CAP) [147].

Заключения, описывающие рецепторный статус опухоли, должны включать как минимум информацию о количестве опухолевых клеток с окрашенными ядрами, об интенсивности окрашивания в сравнении с позитивным контролем. С целью исключения влияния холодовой ишемии на анализ необходимо минимизировать время от забора материала до фиксации, которое не должно превышать 1 ч. ASCO/CAP рекомендуют фиксировать в 10 %-ном буферном растворе формальдегида в течение 6–72 ч как материал трепанобиопсий, так и операционный материал. Для материала трепанобиопсии возможна и кратковременная фиксация (до 45 мин), которая не ухудшает результаты анализа экспрессии рецепторов по сравнению со стандартной фиксацией [175].

Хотя патолог дает оценку рецепторного статуса преимущественно субъективно, исследование по сравнению рутинной и экспертной оценки рецепторного статуса продемонстрировало высокую согласованность мнений различных исследователей. Дискордантность в оценке экспрессии ЭР и ПР рутинными специалистами и экспертами составила всего 1 и 6 % соответственно

[91]. Но трудности при интерпретации результата все же возникают при отсутствии установленных пороговых значений.

Уровень экспрессии ЭР и ПР измеряется в процентах как количество окрашенных ядер независимо от интенсивности окрашивания [147]. Альтернативный вариант – шкалы, учитывающие и количество окрашенных ядер, и интенсивность окрашивания, такие как шкала Allred и шкала H [147]. Шкала Allred суммирует оценку количества окрашенных клеток в баллах (от 0 до 5) и оценку интенсивности окрашивания в баллах (от 0 до 3). Диапазон значений по шкале – от 0 до 8 баллов. Шкала H основана на суммарной оценке от 0 до 300 баллов, вычисляемой в зависимости от доли слабо, умеренно и интенсивно окрашенных клеток [147].

Несмотря на то, что рецепторный статус оценивают в операционном материале по центральному участку опухоли, что позволяет судить подробно о гетерогенности опухоли и обеспечивает наилучшие условия для окрашивания, в случае применения неoadъювантной химиотерапии до лечения необходимо выполнение трепанобиопсии. Для ЭР конкордантность между оценкой операционного материала и биоптатов составляет 95–98 %. Конкордантность для ПР существенно меньше – 85–90 % [241].

1.8. Выбор порогового значения экспрессии рецептора эстрогенов

Существует 2 основных вида ЭР: ЭРа и ЭРβ. Наиболее изучены ЭРа. ЭРа кодируется геном *ESR1*, располагающимся на длинном плече 6-й хромосомы, ЭРβ кодируется геном *ESR2* на 14-й хромосоме. ЭРа и ЭРβ имеют гомологичную структуру, состоят из 6 доменов (A, B, C, D, E, F).

Не существует единого мнения о том, при каком количестве (%) окрашенных ядер клеток можно считать опухоль гормоноположительной. На данный момент общепризнанное пороговое значение – 10 % [147]. При использовании порогового значения в 1 % приблизительно в 70 % случаев первичный РМЖ является ЭР-положительным. Опухоли не менее чем с 1 % ЭР-положительных клеток демонстрируют значимый ответ на гормонотерапию

[147]. С учетом относительно благоприятного профиля токсичности данной группы препаратов ASCO и CAP рекомендуют рассматривать возможность назначения пациентам гормонотерапии при наличии как минимум 1 % ЭР-положительных клеток в опухоли. Уровень ЭР-положительных клеток – важный предиктор ответа на гормонотерапию и благоприятный прогностический фактор. У больных с высоким уровнем экспрессии ЭР больше вероятность ответа на гормонотерапию, длительность ответа и, как следствие, выживаемость без прогрессирования и общая выживаемость [147].

Для определения экспрессии ЭР α с помощью ИГХ методов применяют несколько видов антител. В рекомендациях ASCO/CAP упоминаются антитела 6F11, SP1 и 1D5 [147]. Дольковый, муцинозный, папиллярный, крибриформный, тубулярный, дуктолобулярный и высокодифференцированный протоковый РМЖ чаще всего сопровождается экспрессией ЭР α . При метапластическом, медулярном, BRCA1-ассоциированном, низкодифференцированном протоковом РМЖ, наоборот, экспрессия ЭР α наблюдается редко [200].

Экспрессию ЭР α можно также определять на уровне мРНК с помощью отдельного анализа или в рамках мультигенного тестирования [147]. Например, Oncotype DX (анализ 21 гена) включает исследование ЭР α . Однако в настоящее время нет данных о преимуществе измерения мРНК ЭР α по сравнению со стандартным ИГХ исследованием [105].

Значение амплификации при РМЖ впервые было описано в 2012 г. в работе F. Holst и соавт., которые установили, что в 36 % случаев РМЖ выявляется амплификация РНК ЭР α , выявляемая с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* и сопровождаемая благоприятным прогнозом и высокой частотой ответа на гормонотерапию [158].

В ретроспективное исследование M. Yi и соавт. было включено 9369 больных РМЖ, прошедших лечение в период с 1990 по 2011 г. Пациенты были распределены по 3 группам в зависимости от результата окрашивания антителами к ЭР: ≥ 10 % окрашенных клеток, 1–9 % окрашенных клеток, < 1 % окрашенных клеток. Группы сравнивались по характеристикам пациентов,

опухоли, лечения. Оценивалась общая и безрецидивная выживаемость, медиана времени до прогрессирования. С помощью многофакторного анализа проводилась оценка прогностических факторов. У 7764 (80,5 %) пациентов опухоль имела положительный ЭР-статус (≥ 10 %), у 250 (2,6 %) выявлено 1–9 % окрашенных клеток, у 1625 (16,9 %) ЭР-статус был отрицательным. Медиана возраста составила 55 лет (от 21 до 99 лет). У 50,5 % больных была I стадия заболевания, у 36,5 % – II стадия. У большинства пациентов в выборке выявлена II и III степень злокачественности (соответственно 48,2 и 38,4 %) [379].

Пациенты с 1–9 % положительно окрашенных клеток были моложе больных с положительным ЭР-статусом (медиана возраста 53 и 56 лет соответственно, $p < 0,0001$) и имели более распространенный опухолевый процесс – II или III клиническую стадию (в 61,6 % случаев против 43,7 %, $p < 0,0001$), а также чаще оказывались кандидатами на получение неoadьювантной химиотерапии (47,6 % против 29,2 %, $p < 0,0001$). У данной группы больных чаще выявлялся HER2-положительный РМЖ (27,6 % против 13,1 %, $p < 0,0001$) и III степень злокачественности (81,6 % против 27,9 %, $p < 0,0001$) [379].

При оценке выживаемости при медиане длительности наблюдения 5,1 года оказалось, что выживаемость пациентов с 1–9 % окрашенных клеток была ниже, чем у больных с их количеством ≥ 10 %. Результаты оценивали в том числе с поправкой на клиническую стадию болезни и степень злокачественности опухоли. Показатели выживаемости существенно не различались у пациентов с 1–9 % окрашенных клеток и отрицательным ЭР-статусом. Клинические и патоморфологические показатели отличались у пациентов с 1–9 % окрашенных клеток и их количеством ≥ 10 %. Гормонотерапия оказалась неэффективной в группе пациентов с 1–9 % окрашенных клеток, как и в группе пациентов с ЭР-отрицательным статусом [379].

Клинические и патоморфологические характеристики опухоли у пациентов с 1–9 % окрашенных клеток были более сходны с характеристиками ЭР-отрицательных опухолей [379].

G. Viale и соавт. сравнили результаты оценки уровня экспрессии ЭР, ПР и HER2 методом TargetPrint (анализ РНК с помощью микропанелей) и методом ИГХ/флюоресцентной гибридизации *in situ* в локальных лабораториях и центральной лаборатории у первых 800 пациентов, участвовавших в исследовании MINDACT (международном рандомизированном проспективном исследовании III фазы по изучению клинического применения панели Mammaprint в сравнении со стандартными клиничко-морфологическими критериями (Adjuvant! Online) отбора пациентов, нуждающихся в проведении адьювантной химиотерапии [355].

Частота совпадения положительных результатов (полученных ИГХ методами в центральной лаборатории и с помощью методики Target Print или методами ИГХ в локальной лаборатории) при анализе экспрессии ЭР составила 98 %, частота совпадения отрицательных результатов – 96 %. При анализе экспрессии ПР частота совпадения положительных результатов составила 83 %, отрицательных – 92 %. При анализе экспрессии HER2 частота совпадения положительных результатов составила 75 %, отрицательных результатов – 99 %. Результаты применения метода TargetPrint и локальной оценки экспрессии ЭР, ПР, HER2 в значительной степени совпадают с результатами централизованной оценки данных параметров. Таким образом, методика TargetPrint имеет важное практическое значение и является действительно надежной альтернативой оценке экспрессии ЭР с помощью рутинных локальных методик [355].

C. Park и соавт. провели ретроспективное исследование прогностического значения отрицательной экспрессии ЭР и ПР у больных HER2-негативным люминальным РМЖ подтипа В. В исследование было включено 183 случая РМЖ с экспрессией ЭР или ПР, Ki-67 >14 %. Все пациенты были разделены на 2 группы: 1) с экспрессией ЭР и ПР и 2) с отсутствием экспрессии ЭР или ПР. Были проанализированы клинические и морфологические параметры в зависимости от отсутствия экспрессии ЭР или ПР.

Статистически значимых различий между группами в стадии TNM и виде хирургического лечения не было. При этом в группе с отсутствием экспрессии

ЭР или ПР пациенты были старше (≥ 45 лет), наблюдалась более высокая степень злокачественности и Ki-67 (>50 %), более низкая экспрессия Vcl-2. Безрецидивная и общая выживаемость были существенно ниже в этой группе в сравнении с показателями группы с экспрессией ЭР и ПР ($p = 0,0038, p = 0,0071$).

В группе с отсутствием экспрессии ЭР или ПР прогноз был существенно менее благоприятным, чем в группе с экспрессией ЭР и ПР, что позволяет считать прогностическим маркером отсутствие экспрессии ЭР или ПР при HER2-негативном люминальном РМЖ подтипа В [255].

V. Sorik и соавт. изучили прогностическое значение экспрессии ЭР при РМЖ в зависимости от возраста. В ретроспективное исследование было включено 1910 больных РМЖ с I–III стадиями, прошедшими лечение в период с 1987 по 2000 г. Учитывались такие факторы, как размер первичной опухоли, статус аксиллярных лимфатических узлов, рецепторный статус, проведенное лечение, причина смерти. Оценка выживаемости при положительном и отрицательном статусе ЭР проводилась с помощью метода Каплана – Майера. Число пациентов с положительным ЭР-статусом составило 1347 (70,5 %), с отрицательным ЭР-статусом – 563 (29,5 %). Связанная с РМЖ 15-летняя выживаемость составила 77 % в группе с положительным ЭР-статусом, 70 % в группе с отрицательным ЭР-статусом (ОР 0,69; 95 % ДИ 0,56–0,85; $p = 0,00006$). Прогностическая значимость экспрессии ЭР менялась в зависимости от возраста. У 213 больных, у которых диагноз был установлен до 40 лет, выживаемость при ЭР-положительном статусе была ниже, чем при ЭР-отрицательном статусе (55 % против 61 %; скорректированное ОР 0,90; 95 % ДИ 0,57–1,41; $p = 0,64$). У 1697 пациентов в возрасте 40–75 лет 15-летняя выживаемость, связанная с РМЖ, была существенно выше при положительном ЭР-статусе, чем при отрицательном ЭР-статусе (78 % против 72 %; скорректированное ОР 0,60; 95 % ДИ 0,47–0,76; $p < 0,0001$). Положительный ЭР-статус является благоприятным прогностическим фактором при РМЖ у больных старше 40 лет [316].

1.9. Прогностическое значение рецепторов прогестерона

Существует 2 варианта ПР – ПР α и ПР β . Преимущественное значение при РМЖ имеет ПР α . Оба типа рецепторов кодируются геном *PGR*, располагающимся на 11-й хромосоме. ПР, подобно ЭР, имеет регуляторный домен, располагающийся на N-конце, ДНК-связывающий домен, домен, связывающий лиганд на C-конце.

Хотя большинство актуальных руководств рекомендуют исследовать уровень ПР у всех больных РМЖ, его клиническое значение до сих пор обсуждается. Исследования по сравнению значимости определения экспрессии ПР и ЭР дают противоречивые результаты. Ретроспективные данные 2 крупных баз данных позволяют полагать, что адъювантная гормонотерапия у больных РМЖ с экспрессией ЭР и ПР более эффективна, чем у больных ЭР-положительным ПР-отрицательным РМЖ [37]. С другой стороны, метаанализ Объединенной группы исследователей раннего РМЖ (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group) продемонстрировал, что ПР-статус не имеет предиктивного значения для оценки эффективности тамоксифена [107].

Согласно рекомендациям ASCO/CAP, положительной экспрессией ПР, определенной ИГХ методами, считается уровень $\geq 1\%$. В большинстве европейских стран пороговым уровнем считают 10 % (аналогично уровню ЭР) [147].

Существует ряд антител, используемых для определения экспрессии ПР. ASCO/CAP рекомендует клоны 1294 и 312. Также используются клоны 16, PgR 636, 1E2. Дольковый, муцинозный, папиллярный и тубулярный РМЖ преимущественно ПР-положительный. Угревидный и воспалительный РМЖ является ПР-положительным только в половине случаев.

ПР могут определяться на уровне мРНК с помощью индивидуальных тестов или в рамках мультигенного исследования [147]. Например, исследование 21-генной сигнатуры Oncotype DX включает в себя ПР. Но при сравнении результатов определения экспрессии ПР методом мРНК и методом полимеразной цепной реакции выявлен 12 %-ный уровень дискордантности

[147]. Таким образом, определение мРНК ПР не имеет преимуществ по сравнению с ИГХ методами и не рекомендуется к применению.

1.10. Прогностическое значение Ki-67

Ki-67 – антиген, впервые описанный J. Gerdes и соавт. в 1984 г. [132]. Ген, кодирующий Ki-67, находится на длинном плече 10-й хромосомы (10q25) и состоит из 15 экзонов и 14 интронов [118]. Локализация белка строго зависит от фазы клеточного цикла: во время интерфазы белок находится на мембране ядра, во время митоза белок находится на периферии конденсированного хроматина [169]. Белок фосфорилируется посредством серина и треонина, его ингибирование приводит к остановке клеточной пролиферации [152]. В течение клеточного цикла экспрессия Ki-67 вариабельна: уровень белка низкий во время фазы G1 и ранней S-фазы, максимальный уровень наблюдается во время митоза. Во время анафазы и телофазы наблюдается снижение экспрессии белка; во время фазы G0 экспрессии белка не наблюдается [44].

Основным методом оценки является подсчет окрашенных опухолевых клеток. Результаты ручного подсчета плохо воспроизводимы, поэтому для оценки большого количества образцов применяются автоматизированные методы. Однако при их применении также возникает погрешность в связи с возможностью подсчета сигналов от ядер доброкачественных клеток [354]. Метод тканевых матриц широко используется морфологическими лабораториями. Результаты его использования воспроизводимы даже при исследовании образца ткани размером 0,6 мм [296].

Уровень экспрессии Ki-67 в нормальной ткани молочной железы <3 % [149]. Экспрессия Ki-67 увеличивается при раке *in situ* и инвазивном РМЖ [24].

F. G. Wiesner и соавт. при попытке оценить прогностическую значимость Ki-67 в рутинной клинической практике у больных РМЖ установили, что при многофакторном анализе экспрессия Ki-67 оказалась статистически значимой для общей и безрецидивной выживаемости. Авторы пришли к выводу о независимой прогностической значимости Ki-67 [364]. E. Azambuja и соавт.

провели метаанализ 29 исследований (15 исследований с участием больных РМЖ без поражения аксиллярных лимфатических узлов, 8 исследований с участием больных с поражением аксиллярных лимфатических узлов). Авторы пришли к выводу, что уровень экспрессии Ki-67 отрицательно влияет на общую и безрецидивную выживаемость [32]. R. Stuart-Harris и соавт. провели метаанализ 43 исследований, в который было включено суммарно 15 790 случаев РМЖ, и выявили четкую корреляцию между индексом Ki-67 и общей выживаемостью [325]. M. Klintman и соавт. продемонстрировали, что Ki-67 является прогностическим фактором у больных ЭР-положительным РМЖ II степени злокачественности при отсутствии поражения аксиллярных лимфатических узлов опухолей [187]. A. E. Pinto и соавт. установили, что экспрессия Ki-67 не коррелирует с общей выживаемостью [272]. Прогностическая значимость Ki-67 отсутствовала при значении 1, 10 и 20 % в исследовании F. Renault-Llorca и соавт. [260].

Ki-67 повсеместно используется в качестве прогностического и предиктивного маркера при РМЖ.

S. Gandini и соавт. проанализировали данные 274 пациентов, которые не получали экспериментального лечения в 3 предоперационных исследованиях, проведенных в одном учреждении. Они оценили связь между изменением уровня экспрессии Ki-67 в операционном материале и в биоптатах и рядом различных факторов: возрастом, индексом массы тела, прогностическими и предиктивными факторами, в том числе молекулярными подтипами, длительностью периода от биопсии до хирургического лечения, уровнем инсулиноподобного фактора роста 1, глобулина, связывающего половые гормоны, С-реактивного белка. Было проанализировано 269 парных образцов опухоли, полученных при биопсии и при хирургическом вмешательстве. В среднем показатель изменился на $2,2 \pm 9,2$ % спустя 41 день (медиана интервала между измерениями, диапазон 33–48 сут). Единственным фактором, который был ассоциирован со значимым изменением уровня Ki-67 ($p = 0,004$), оказался молекулярный подтип РМЖ. Медиана увеличения уровня экспрессии Ki-67 составила 5,3 % (95 % ДИ 2,3–8,3 %;

$p = 0,0005$) в опухолях с положительной экспрессией HER2 ($n = 36$) и 5,4 % (95 % ДИ 2,9–7,9 %; $p < 0,0001$) при ТНРМЖ ($n = 78$) (Рисунок 2). Для люминального А ($n = 46$), люминального В ($n = 85$) и люминального В с экспрессией HER2 ($n = 24$) подтипов существенного изменения уровня Ki-67 не наблюдалось [127].

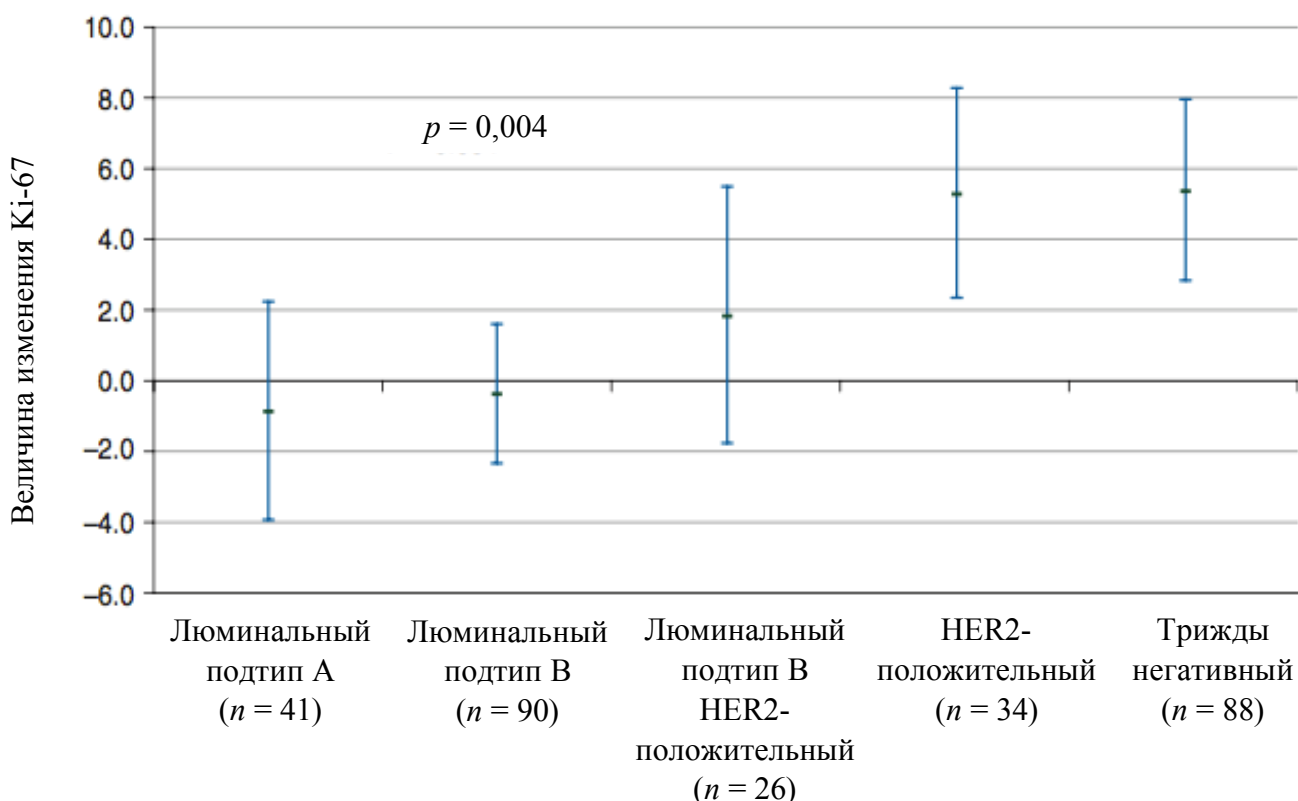


Рисунок 2 – Экспрессия Ki-67 при различных молекулярных подтипах рака молочной железы [127]

При HER2-положительном РМЖ и ТНРМЖ было установлено существенное повышение уровня экспрессии Ki-67 в операционном материале по сравнению с уровнем в биоптатах. Значимое изменение Ki-67, свидетельствующее об усилении пролиферации опухолевых клеток, может быть обусловлено заживлением раны после биопсии, что необходимо учитывать при анализе результатов предоперационных исследований [127].

1.11. Молекулярно-генетические подтипы рака молочной железы

Рак молочной железы представляет собой гетерогенную группу опухолей с различными гистологическими формами, молекулярными свойствами, клиническими особенностями и результатами лечения. Анализ этих параметров на индивидуальном уровне должен улучшать результаты лечения пациента, влияя тем самым на качество жизни и выживаемость [186, 197, 333, 334]. В настоящее время лечение РМЖ опирается лишь на ряд клинимоρφологических прогностических факторов и ограниченное число предиктивных биомаркеров. Клинимоρφологические характеристики опухоли были исторически основой самой ранней классификации, которая коррелировала с результатами лечения [111]. В дополнение к факторам стадирования заболевания степень злокачественности, которая является морфологическим суррогатом биологических свойств опухоли, определена рядом исследований как независимый прогностический фактор для РМЖ [282]. Степень злокачественности используется в ноттингемском прогностическом индексе и имеет такую же прогностическую значимость, как и статус аксиллярных лимфатических узлов [126]. Другие клинимоρφологические параметры – лимфоваскулярная инвазия, возраст, менопаузальный статус.

Имеется целый ряд доказательств того, что прогностических факторов, используемых в рутинной клинической практике, недостаточно для адекватного отражения биологической гетерогенности опухолей. Опухоли со сходными морфологическими свойствами могут существенно отличаться с точки зрения течения заболевания и ответа на лечение. К примеру, почти у 1/3 больных без поражения аксиллярных лимфатических узлов, т. е. у группы с формально благоприятным прогнозом, в будущем возникали рецидивы [74]. Примерно у такого же числа больных с поражением аксиллярных лимфатических узлов, т. е. у группы с формально неблагоприятным прогнозом, не наблюдались рецидивы [114]. Ввиду внедрения маммографического скрининга, более глубокого понимания биологии РМЖ, наличия современного спектра лечебных средств требуется более тщательное изучение прогностических и предиктивных

характеристик опухоли, что, в свою очередь, позволит индивидуализировать лечение.

Биологические свойства опухоли в рутинной практике могут оцениваться по таким морфологическим параметрам, как дифференцировка опухоли, пролиферативный статус, лимфоваскулярная инвазия. Однако существуют более точные молекулярные методики оценки генетического профиля опухоли, позволяющие изучить свойства опухоли индивидуально. Оценка статуса отдельных генов в рутинной практике может осуществляться ИГХ методами, с помощью гибридизации *in situ*, иммуносорбентного анализа с ферментной меткой. Современные достижения в исследовании генома позволяют исследовать сотни генов с помощью одного анализа.

Предиктивная и прогностическая ценность ЭР, ПР, HER2 уже доказана. Определение экспрессии ЭР, ПР, HER2 – неотъемлемая часть обследования больных РМЖ в соответствии со многими клиническими рекомендациями [147, 284]. Современный стандарт оценки ЭР – ИГХ исследование морфологического материала. Считается, что современные ИГХ методики имеют умеренную предиктивную ценность (30–60 %) в отношении эффективности гормонотерапии. Предиктивная отрицательного результата при оценке экспрессии ЭР достаточно высока (отрицательный результат ИГХ исследования, который получают в 20–30 % случаев, позволяет выявить пациентов, у которых гормонотерапия не будет эффективной) [107]. Около 40 % ЭР-положительных опухолей ПР-отрицательны. Отсутствие экспрессии ПР в ЭР-положительных опухолях может быть суррогатным маркером резистентности к тамоксифену (считается, что такие опухоли менее чувствительны к гормонотерапии) [37, 280]. ПР-статус может предсказать эффект гормонотерапии как при ее адьювантном проведении, так и при использовании по поводу метастатической болезни [288]. Многочисленны сообщения о прогностической и предиктивной важности ПР [77, 280, 290, 324].

Амплификация *HER2* встречается в 13–20 % случаев РМЖ, около 55 % из них случаев ЭР-отрицательны [85,310]. В ряде исследований

продемонстрировано, что гиперэкспрессия/амплификация *HER2* – предиктор неблагоприятного исхода и неудовлетворительного ответа на системную терапию [39, 179, 368]. После создания анти-HER2-терапии стало целесообразным рутинное исследование HER2.

В рутинной практике ЭР, ПР, HER2 оцениваются для прогнозирования эффекта гормонотерапии и анти-HER2-терапии. Кроме того, прогностическое и предиктивное значение данных маркеров может меняться в зависимости от их комбинации [285] и сочетания с индексом пролиферации Ki-67 [84]. Большинство исследований на основе ИГХ методов использует оценку ЭР, ПР, HER2 в качестве суррогатной методики для определения молекулярного подтипа, изначально выделенного на основе генного профиля экспрессии. Положительный результат определения ЭР, ПР использовался для диагностики люминальных подтипов, экспрессия HER2 – для определения HER2-положительного подтипа, отсутствие экспрессии ЭР, ПР, HER2 – для определения базальноподобного подтипа [60, 188]. Ряд авторов ЭР- и ПР-положительные опухоли с гиперэкспрессией HER2 расценивает как люминальный подтип В [60, 191]. В связи с этим определение экспрессии ЭР, ПР, HER2 рассматривается как доступный метод, имеющий прогностическую и предиктивную ценность.

Экспрессия гена – технический термин, обозначающий активность гена. Активность оценивается с помощью подсчета молекул мРНК в определенном типе клеток или ткани. Экспрессия всех генов в конкретном образце называется генетическим профилем (генной сигнатурой, генетическим портретом), большинство опухолей демонстрирует определенные профили экспрессии, связанные со специфическими биологическими свойствами [36, 47, 81, 157, 228, 326, 372].

Впервые молекулярно-генетические подтипы РМЖ на основании профиля экспрессии генов, принимающих участие в развитии РМЖ, были выделены в работе Т. Sørlie и соавт. в 2001 г. [317]. В исследование было изучено 78 образцов опухолей молочной железы, в которых была проанализирована экспрессия

1753 генов. На основании результатов статистического анализа кластерным методом было выделено 4 варианта опухолей: люминальный подтип А, люминальный подтип В, базальноподобный (ТНРМЖ), HER2-положительный подтип. Для создания молекулярной классификации был выбран ряд маркеров, позволявших разграничить подтипы:

- люминальный подтип А: гормонозависимые опухоли с низким злокачественным потенциалом. В опухоли экспрессируются ЭР, ПР, отсутствует экспрессия HER2. Кроме того, наблюдается экспрессия специфичных для люминального подтипа цитокератинов и маркеров: ЭР α , FOXA1, GATA3, XBP1, LIV1. В популяции подтип встречается в 30–45 % случаев [318];
- люминальный подтип В: гормонозависимые опухоли с высоким злокачественным потенциалом и агрессивным течением. Для подтипа характерна экспрессия маркеров, аналогичная люминальному подтипу А: ЭР, ПР; может присутствовать амплификация *HER2*. Кроме того, выражена экспрессия гена *ER*, экспрессия генов пролиферации *m-MYB*, *GGH*, *LAPTMB4*. В популяции подтип встречается в 14–18 % случаев [317];
- HER2-положительный подтип: гормононезависимые опухоли с наличием экспрессии и/или амплификацией *HER2*. В популяции встречается в 8–15 % случаев;
- базальноподобный подтип (ТНРМЖ): гормононезависимые HER2-отрицательные опухоли, характеризующиеся агрессивным течением и самыми неблагоприятными показателями выживаемости. В опухоли отмечается экспрессия цитокератинов 5 и 17, ламинина, EGFR, базальных эпителиальных генов. В популяции данный подтип встречается в 27–39 % случаев [374].

Молекулярная и иммуногистохимическая классификации совпадают лишь частично. Методики, позволяющие более точно определять принадлежность опухоли к тому или иному молекулярному подтипу, постоянно

совершенствуются как для фундаментальных исследований, так и для рутинных клинических потребностей.

Выделение молекулярных подтипов прежде всего имеет клиническое значение. Классификация используется как для формирования прогноза у каждого конкретного пациента, так и для выбора адъювантной терапии или метода лечения диссеминированной болезни.

Вследствие технических, экономических и иных трудностей некоторые исследователи изучали возможность использования ИГХ маркеров. Во множестве исследований использованы суррогатные ИГХ панели в качестве прогностических факторов и подтверждена эффективность данных методов и воспроизводимость результатов [51, 249, 283]. Для генетического профиля экспрессии и для ИГХ маркеров характерно изучение не отдельных маркеров (генов в первом методе и тканевых маркеров во втором методе), а их комбинаций, которые прогностически более информативны, нежели отдельные гены или маркеры. Выбор маркеров основан на том, что молекулярные подтипы, выделенные с помощью профиля генной экспрессии, являются отражением рецепторного статуса, HER2-статуса и пролиферативного статуса при РМЖ [281].

Ряд исследований был посвящен использованию ИГХ методов для разделения РМЖ на подтипы, отличающиеся прогнозом. Несколько групп исследований использовали ИГХ экспрессию ЭР, ПР, HER2, базальных цитокератинов для создания молекулярной классификации РМЖ, удобной для применения в рутинной практике. Таким образом были выделены люминальный, HER2-положительный и ТНРМЖ/базальноподобный подтипы. Люминальный подтип был разделен на подтипы А и В, однако критерием для их разграничения по-прежнему служит индекс Ki-67, экспрессия ПР и/или экспрессия HER2 [70]. В 2017 г. экспертный совет конференции в Санкт-Галлене (St. Gallen Symposium) в связи с низкой воспроизводимостью результатов определения Ki-67 рекомендовал оценивать параметр, исходя из локальных критериев патоморфологической лаборатории, в соответствии со следующим правилом:

при медиане значений 20 % в локальной лаборатории считать уровень ≤ 10 % низким, уровень ≥ 30 % высоким [240].

HER2-положительный РМЖ характеризуется экспрессией при ИГХ исследовании либо амплификацией при гибридизации *in situ*. В связи с тем, что HER2 – это онкоген с известным клиническим прогнозом, ряд авторов счел необходимым при экспрессии HER2 относить опухоль к HER2-положительному подтипу РМЖ независимо от рецепторного статуса [283]. Позже мнения сошлись в том, что люминальный подтип В характеризуется высокой пролиферативной активностью, которая оценивается по определенному значению Ki-67. В соответствии с данным определением прогноз у пациентов с люминальным подтипом В менее благоприятен, и они нуждаются в адъювантной химиотерапии [22].

Наиболее остро в рамках определения подтипов РМЖ с помощью ИГХ методов стоит вопрос о базальноподобном РМЖ. Несмотря на то, что ТНРМЖ характеризуется отсутствием экспрессии ЭР, ПР, HER2, консенсус по вопросу об использовании суррогатных ИГХ маркеров для диагностики базальноподобного рака не достигнут. ТНРМЖ и базальноподобный РМЖ характеризуются неблагоприятным прогнозом, и выбор вариантов лечения невелик [48, 54, 96, 129, 160, 182, 183, 190, 192, 218, 327, 375, 380]. Различные ИГХ маркеры использовались для определения базального фенотипа: отсутствие экспрессии ЭР, ПР, HER2, экспрессия одного базального цитокератина или более (СК5/6, СК14, СК17); для ТНРМЖ – экспрессия СК5/6 и/или EGFR [70, 211, 249]. Сравнительных исследований базальноподобного подтипа на основании генетического профиля экспрессии и ТНРМЖ, подтвержденного ИГХ методами, недостаточно. Базальноподобный подтип встречается в 15–20 % случаев во всех исследованиях. Таким образом, относительно редкая частота затрудняет достижение консенсуса. F. M. Blows и соавт. провели метаанализ более чем 10 000 случаев РМЖ и продемонстрировали наибольшую эффективность использования 5 маркеров для определения молекулярных подтипов РМЖ, включая базальноподобный [51]. В ряде исследований продемонстрирован более

неблагоприятный прогноз при базальноподобном подтипе, чем при ТНРМЖ [70, 249, 283].

G. Viale и соавт. оценили корреляцию между результатами определения мРНК ЭР, ПР, HER2 с помощью методики TargetPrint, результатами стандартного ИГХ исследования и флюоресцентной гибридизации *in situ* у 800 пациентов, принявших участие в исследовании MINDACT [355]. В исследование были включены пациенты со стадией T1–2 или резектабельной стадией T3, количеством пораженных лимфатических узлов от 0 до 3. Для ЭР частота совпадения положительных результатов, полученных с помощью теста TargetPrint и при стандартной оценке, составила 98 %, частота совпадения отрицательных результатов – 96 %. При оценке ПР частота совпадения положительных результатов составила 83 %, отрицательных результатов – 92 %. При оценке HER2 частота совпадения положительных результатов составила 75 %, отрицательных результатов – 99 %. Частота несовпадения результатов составила 6,7 % для ЭР, 12,9 % для ПР, 4,3 % для HER2. Результаты оценки с помощью микрочипа TargetPrint в значительной степени совпадают с результатами стандартного ИГХ исследования и флюоресцентной гибридизации *in situ* в исследовании MINDACT. Следовательно, методика TargetPrint является надежным методом анализа экспрессии данного рецептора и может повышать надежность результатов определения экспрессии ЭР, ПР, HER2 [355].

1.12. Мультигенные сигнатуры

Помимо молекулярных подтипов, при статистическом анализе данных генетического исследования опухолей выявлен ряд мультигенных сигнатур. Сигнатуры были выделены на основании экспрессии определенных генов в отдельных подгруппах опухолей. При анализе экспрессии комбинаций этих генов были определены исходы лечения. Мультигенные сигнатуры включают профили генов, которые позволяют прогнозировать отдаленные результаты. Другие генные сигнатуры были выделены при прогнозировании эффекта лечения и используются в качестве предиктивных маркеров [14].

Прогностические сигнатуры – 70-генная сигнатура Mammairprint [55], 76-генная сигнатура [360], геномный индекс степени злокачественности (Genomic Grade Index, GGI) [318], шкалу оценки вероятности рецидива из Oncotype DX [254]. Общая черта всех генных сигнатур – комбинации генов, позволяющие сделать прогноз, поскольку, по-видимому, биологическое поведение опухоли имеет генетические предпосылки [387]. Описание наиболее распространенных мультигенных сигнатур приведено в Таблице 1.

Таблица 1 – Мультигенные сигнатуры

Mammairprint (66 генов)		PAM 50 (50 генов)		Oncotype (16 генов)	Endopredict (8 генов)
<i>AA555029_RC</i>	<i>LOC100288906</i>	<i>ACTR3B</i>	<i>KRT17</i>	<i>AURKA</i>	<i>AZGP1</i>
<i>ALDH4A1</i>	<i>LOC730018</i>	<i>ANLN</i>	<i>KRT5</i>	<i>BAG1</i>	<i>BIRC5</i>
<i>AP2B1</i>	<i>LPCAT1</i>	<i>BAG1</i>	<i>MAPT</i>	<i>BCL2</i>	<i>DHCR7</i>
<i>BBC3</i>	<i>MCM6</i>	<i>BCL2</i>	<i>MDM2</i>	<i>BIRC5</i>	<i>IL6ST</i>
<i>C16orf61</i>	<i>MELK</i>	<i>BIRC5</i>	<i>MELK</i>	<i>CCNB1</i>	<i>MGP</i>
<i>C20orf46</i>	<i>MMP9</i>	<i>BLVRA</i>	<i>MIA</i>	<i>CD68</i>	<i>RBBP8</i>
<i>C9orf30</i>	<i>MS4A7</i>	<i>CCNB1</i>	<i>MKI67</i>	<i>CTSL2</i>	<i>STC2</i>
<i>CCNE2</i>	<i>MTDH</i>	<i>CCNE1</i>	<i>MLPH</i>	<i>ERBB2</i>	<i>UBE2C</i>
<i>CDC42BPA</i>	<i>NDC80</i>	<i>CDC20</i>	<i>MMP11</i>	<i>ESR1</i>	
<i>CDCA7</i>	<i>NMU</i>	<i>CDC6</i>	<i>MYBL2</i>	<i>GRB7</i>	
<i>CENPA</i>	<i>NUSAP1</i>	<i>CDH3</i>	<i>MYC</i>	<i>GSTM1</i>	
<i>COL4A2</i>	<i>ORC6L</i>	<i>CENPF</i>	<i>NAT1</i>	<i>MKI67</i>	
<i>DCK</i>	<i>OXCT1</i>	<i>CEP55</i>	<i>NDC80</i>	<i>MMP11</i>	
<i>DHX58</i>	<i>PALM2</i>	<i>CXXC5</i>	<i>NUF2</i>	<i>MYBL2</i>	
<i>DIAPH3</i>	<i>PEC1</i>	<i>EGFR</i>	<i>ORC6L</i>	<i>PGR</i>	
<i>DTL</i>	<i>PITRM1</i>	<i>ERBB2</i>	<i>PGR</i>	<i>SCUBE2</i>	
<i>EBF4</i>	<i>PRC1</i>	<i>ESR1</i>	<i>PHGDH</i>		
<i>ECT2</i>	<i>QSOX2</i>	<i>EXO1</i>	<i>PTTG1</i>		
<i>EGLN1</i>	<i>RAB6B</i>	<i>FGFR4</i>	<i>RRM2</i>		
<i>ESM1</i>	<i>RASSF7</i>	<i>FOXA1</i>	<i>SFRP1</i>		
<i>EXT1</i>	<i>RECQL5</i>	<i>FOXC1</i>	<i>SLC39A6</i>		
<i>FGF18</i>	<i>RFC4</i>	<i>GPR160</i>	<i>TMEM45B</i>		
<i>FLT1</i>	<i>RTN4RL1</i>	<i>GRB7</i>	<i>TYMS</i>		
<i>GMPS</i>	<i>RUNDC1</i>	<i>KIF2C</i>	<i>UBE2C</i>		
<i>GNAZ</i>	<i>SCUBE2</i>	<i>KRT14</i>	<i>UBE2T</i>		
<i>GPR126</i>	<i>SERF1A</i>				
<i>GPR180</i>	<i>SLC2A3</i>				
<i>GSTM3</i>	<i>STK32B</i>				
<i>HRASLS</i>	<i>TGFB3</i>				
<i>IGFBP5</i>	<i>TSPYL5</i>				
<i>JHDM1D</i>	<i>UCHL5</i>				
<i>LIN9</i>	<i>WISP1</i>				
<i>LOC100131053</i>	<i>ZNF385B</i>				

Профессиональное сообщество единодушно считает, что мультигенные прогностические тесты обеспечивают полезной информацией, дополняющей традиционные клинико-морфологические характеристики. Преимущественно

данные методики опираются на оценку ЭР и пролиферативных генов, и комбинируют их в мультифакторные предиктивные модели. Вследствие более высокой пролиферативной активности ЭР-отрицательных опухолей прогностическая ценность этих методик при них ограничена. Неудивительно, что до сих пор не существует клинических прогностических сигнатур для ЭР-отрицательных опухолей [145]. В том числе и по этой причине мультигенные сигнатуры в настоящее время не способны заменить рутинные прогностические и предиктивные маркеры при лечении РМЖ.

W. Eiermann и соавт. провели многоцентровое проспективное исследование, в котором с помощью теста Oncotype DX оценили влияние риска рецидива заболевания на тактику лечения ранних стадий РМЖ. В исследование было включено 366 пациентов с ранними стадиями РМЖ, с ЭР-положительным статусом, отсутствием экспрессии HER2, поражением 0–3 лимфатических узлов. Целью исследования была оценка влияния теста для определения риска рецидива на решение клиницистов о необходимости адъювантной химиотерапии. Дополнительными задачами были оценка влияния риска рецидива на сомнения пациентов в назначенной терапии, степень уверенности клиницистов в рекомендованной терапии, оценка фармакоэкономических последствий использования теста. В исследование включались пациенты с резектабельными первичными опухолями T1–3 размером ≥ 1 см (либо < 1 см при наличии как минимум 1 неблагоприятного фактора: высокой степени злокачественности, лимфоваскулярной инвазии, положительного p53-статуса). У 244 больных отсутствовало поражение лимфатических узлов, у 122 лимфатические узлы были поражены. Тактика адъювантного лечения была изменена у 33 % пациентов в общей выборке (N0 у 30 %, N+ у 39 %). После оценки риска рецидива у 38 % пациентов (N0 у 39 %, N+ у 37 %) в общей выборке, которым была назначена адъювантная химиотерапия с последующей адъювантной гормонотерапией, вид лечения был заменен на адъювантную гормонотерапию. У 25 % пациентов (N0 у 22 %, N+ у 39 %), которым изначально была рекомендована только адъювантная гормонотерапия, тактика лечения была заменена на адъювантную химиотерапию

с последующей адъювантной гормонотерапией. Частота сомнений пациентов снизилась на 6 % ($p = 0,028$), уверенность клиницистов возросла на 45 % ($p < 0,001$) во всех случаях. В конечном итоге число пациентов, прошедших химиотерапию, в сравнении с числом пациентов, которым химиотерапия была рекомендована до тестирования, оказалось на 33 % меньше (N0 у 29 %, N+ у 38 %). Предполагалось, что тестирование экспрессии 21 гена повысит среднюю выживаемость на 0,06 года за 30-летний промежуток времени. Применение тестирования в перспективе приведет к уменьшению затрат в сравнении со стандартной клинической практикой [108].

1.13. Прогностическое значение циклина D1

Циклин D1 играет важнейшую роль в регуляции клеточного цикла: переход от фазы G1 в S-фазу клеточного цикла осуществляется путем образования активных ферментных комплексов с циклинзависимыми киназами CDK4 и CDK6 [307]. Комплексы циклин D1 – CDK фосфорилируют и инактивируют белок-супрессор опухолевого роста – белок ретинобластомы pRb. Фосфорилирование pRb посредством CDK4/6 приводит в дальнейшем к инактивации генов *E2F*, включая гены циклинов типа E, регулирующих прохождение G1-фазы клеточного цикла [307].

Как ключевой регулятор клеточного цикла, циклин D1 необходим для формирования определенных тканей. Нарушение экспрессии или функции гена циклина D1 приводит к нарушению контроля над нормальным клеточным циклом при канцерогенезе. Клинические исследования свидетельствуют о том, что гиперэкспрессия циклина D1 наблюдается более чем в 50 % случаев РМЖ. Избыток циклина D1 негативно влияет на общую и безрецидивную выживаемость у больных РМЖ. В большинстве случаев опухоли, экспрессирующие циклин D1, ЭР-положительны. Экспрессия ЭР в опухолях с гиперэкспрессией циклина D1 уменьшает выживаемость и увеличивает частоту рецидивов в сравнении с таковыми при ЭР-положительном РМЖ без гиперэкспрессии циклина D1 [295, 351].

1.14. Прогностическое значение CDK4, CDK6

Одна из ключевых особенностей злокачественного новообразования – способность к неконтрольному росту, обусловленному гиперэкспрессией пролиферативных сигнальных путей и утратой контрольных точек клеточного цикла [195]. Белок ретинобластомы (pRb) является регулятором контрольных точек в клетках млекопитающих. В дефосфорилированном состоянии он подавляет экспрессию белков, необходимых для перехода клетки в S-фазу, и прохождения клетки через клеточный цикл. В норме это строго регулируемый процесс, но в случае злокачественной опухоли регуляция перехода контрольной точки нарушается, и клетка приобретает способность к неконтрольной пролиферации. Циклинзависимые киназы CDK 4 и CDK6, которые функционируют совместно с циклинами типа D, инициируют экспрессию и фосфорилируют pRb, преодолевая его супрессорное влияние на клеточный цикл [116]. Таким образом, комплекс циклин D – CDK4/6 является ключевым регулятором pRb.

При РМЖ в циклин-CDK-Rb-регуляторном пути возникают отклонения. В частности, циклин D1, кодируемый геном *CCDN1*, играет ключевую роль в развитии опухоли. Амплификация гена *CCDN1* встречается в 15–20 % всех случаев РМЖ, а гиперэкспрессия циклина D1 – почти в 50 % [21].

Е. Peurala и соавт. оценили экспрессию циклина D1, CDK4 и p16 ИГХ методом в 102 образцах РМЖ. Высокий уровень экспрессии циклина D1 статистически значимо коррелировал с низкой степенью злокачественности, уровнем экспрессии ЭР и ПР, низкой пролиферативной активностью и увеличивал общую выживаемость (Рисунок 3, Рисунок 4). В опухолях с высоким уровнем циклина D1 уровень экспрессии мРНК циклина D1 в 1,8 раза выше. Уровень CDK4 не коррелировал с уровнем экспрессии циклина D1 или выживаемостью. Экспрессия p16 была ассоциирована с отсутствием экспрессии HER2 и высокой безрецидивной выживаемостью [268].

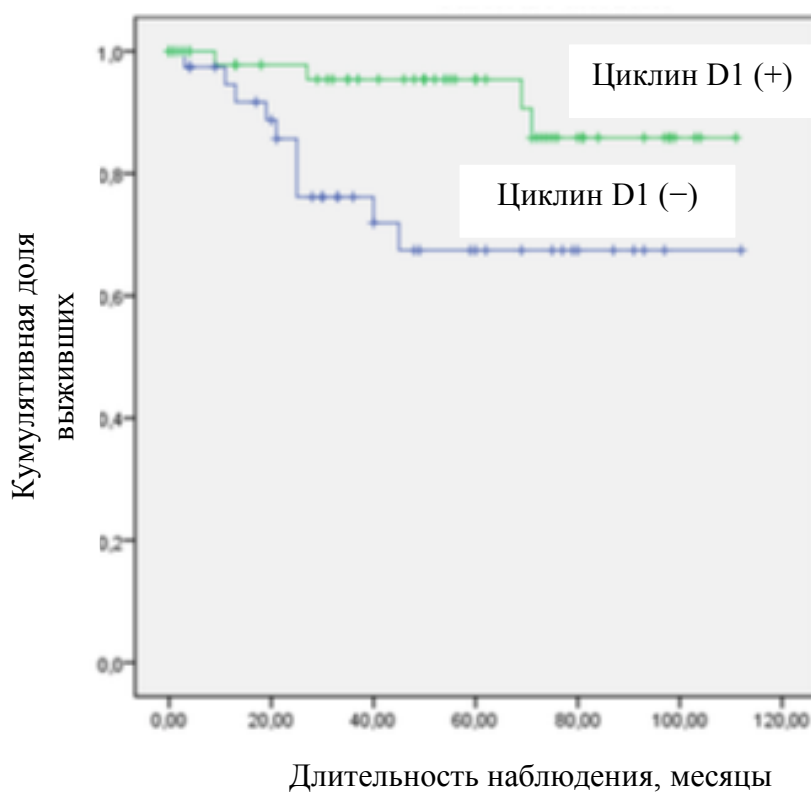


Рисунок 3 – Кривые Каплана – Майера, отражающие специфическую выживаемость, связанную с РМЖ, при экспрессии и отсутствии экспрессии циклина D1 [268]

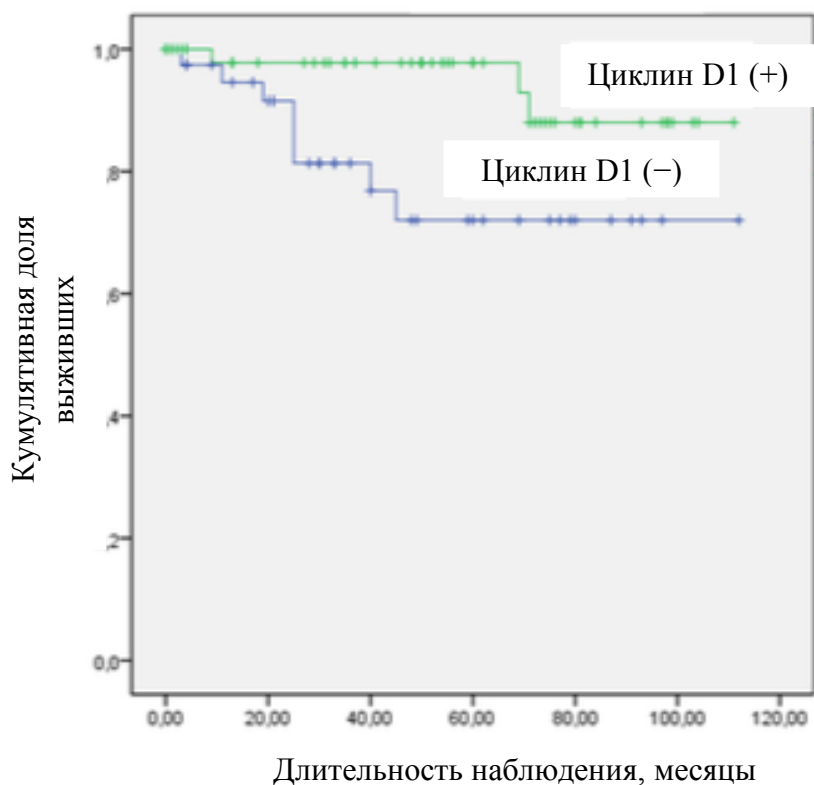


Рисунок 4 – Кривые Каплана – Майера, отражающие общую выживаемость при экспрессии и отсутствии экспрессии циклина D1 [268]

1.15. Прогностическое значение CDK 8/19

Циклинзависимая киназа CDK8 и ее паралог, CDK19, являются регуляторами транскрипции, но, в отличие от других представителей семейства киназ, не участвуют в регуляции клеточного цикла [114]. Низкая экспрессия CDK8 не приводит к подавлению роста нормальных клеток [363]. CDK8 и CDK19 – субъединицы циклинкиназного модуля медиаторного комплекса, связывающего факторы, которые иницируют транскрипцию с РНК-полимеразой II. Изначально считалось, что циклинкиназный модуль участвует в подавлении транскрипции [386]. Однако последние данные свидетельствуют о наличии у циклинкиназного модуля свойств стимулятора транскрипции, иницируемой различными сигналами [125]. Циклинкиназный модуль способен фосфорилировать С-терминальный домен РНК-полимеразы II, что способствует элонгации транскрипции [268]. CDK8 необходим для фосфорилирования РНК-полимеразы II только в определенных случаях – когда происходит активация спящих генов сигналами, иницирующими транскрипцию [386]. В результате такой селективной активности ингибирование CDK8/19 не приводит практически ни к чему в гомеостатических условиях [274], но может препятствовать транскрипции, иницированной активацией определенных сигнальных путей в опухолевых клетках [386]. CDK8/19 – регулятор транскрипции в ряде сигнальных путей, участвующих в канцерогенезе [104, 125].

Е. V. Broude и соавт. выполнили метаанализ, в котором продемонстрировано, что высокая экспрессия CDK8 ассоциирована с меньшей безрецидивной выживаемостью при всех молекулярных подтипах РМЖ. Подобная корреляция была особенно сильной у пациентов, получавших адъювантную терапию; это позволяет предположить, что экспрессия CDK8 имеет значительное влияние на эффект адъювантной химиотерапии [56].

1.16. Прогностическое значение РНЗ

Фосфогистон H3 (РНН3) – ядерный белок, который в фосфорилированном состоянии является важной составляющей хроматина у эукариотов и участвует в переходе клетки из поздней G2-фазы клеточного цикла в M-фазу. Белок экспрессируется клетками в митотическую фазу. Фосфорилирование РНН3 серина-10 и серина-38 – механизм, задействованный в конденсации хроматина и прохождении по клеточному циклу во время митоза или мейоза [198]. Фосфорилирование происходит с поздней G2-фазы до ранней профазы, дефосфорилирование осуществляется медленно с поздней анафазы до ранней телофазы. Таким образом, во время метафазы гистон H3 всегда фосфорилирован и наблюдается экспрессия РНН3, в то время как в интерфазу экспрессии РНН3 не наблюдается. За счет этого свойства РНН3 позволяет выделять только митотически активные клетки, что делает РНН3 маркером пролиферации [198].

Диагностическая ценность РНН3 была подтверждена в ряде исследований при разных опухолях: он зарекомендовал себя как чувствительный и специфичный маркер фигур митоза, а его уровень точно коррелировал с клиническими результатами [63, 344]. В работе X. Cui и соавт. при РМЖ уровень РНН3 также коррелировал с индексом митотической активности [83]. Авторы предположили, что РНН3 может быть использован для определения степени злокачественности опухоли, потому что позволяет более точно определять фигуры митоза в сравнении с индексом митотической активности.

Z. Gerring и соавт. в микромассивах опухолевой ткани 108 пациентов с РМЖ выполняли ИГХ исследование уровня Ki-67 и РНН3. Они продемонстрировали, что РНН3 является более точным предиктором 5-летней выживаемости в сравнении с Ki-67 после постановки диагноза (ОР 4,35; $p < 10^{-5}$ и ОР 2,44; $p = 0,004$) [134].

J.-Y. Kim и соавт. сравнили уровень Ki-67 и РНН3 ИГХ методом у 218 больных резектабельным РМЖ, получавших лечение в период с 2012 по 2013 г. РНН3 позволил обнаружить митозы, которые не были выявлены с помощью индекса митотической активности, что повысило значение показателя M при оценке степени злокачественности опухоли с помощью НГС ($n = 29$).

Результаты выявления РННЗ оказались более воспроизводимыми в сравнении с результатами определения Ki-67 ($0,904 > 0,712$; $p = 0,008$). Кроме того, уровень РННЗ был единственным параметром, коррелировавшим с безрецидивной выживаемостью ($p = 0,043$) [185].

Q. Нао и соавт. провели метаанализ, в котором изучили прогностическую роль экспрессии РННЗ у больных различными злокачественными новообразованиями. В исследование было включено 4803 пациента. Результаты свидетельствуют о том, что высокая экспрессия РННЗ может обладать предиктивным значением в отношении низкой общей выживаемости. Подгрупповой анализ показал, что при РМЖ наблюдается высокая экспрессия РННЗ (ОР 5,66; 95 % ДИ 2,72–11,78; $p < 0,001$) [155].

1.17. Определение чувствительности к гормональной терапии ESR1

При РМЖ порядка 70 % опухолей экспрессируют ЭР, что обуславливает их чувствительность к гормональному воздействию. Гормонотерапия – важный метод лечения как резектабельного, так и диссеминированного РМЖ. Существует ряд механизмов развития резистентности к гормонотерапии. Актуальные исследования свидетельствуют о том, что ключевую роль в развитии резистентности играет мутация гена рецептора эстрогенов *ESR1*. Большинство мутаций этого гена (80 %) располагаются в зоне лигандсвязывающего домена, включающего кодоны 534–538: D538G, Y537N/C/S, E380Q [172]. Данные мутации являются приобретенными, практически полностью отсутствуют при первичном РМЖ (<2 % случаев) и возникают в метастатических опухолях у 25–30 % пациентов на фоне терапии ингибиторами ароматазы [173]. На первый взгляд, данная мутация может быть маркером резистентности к ингибиторам ароматазы. Однако результаты исследований свидетельствуют о том, что выявление мутации *ESR1* является независимым фактором неблагоприятного прогноза в отношении как безрецидивной [66, 123], так и общей выживаемости [66, 73].

Итак, резистентность к гормонотерапии остается серьезной клинической проблемой [365]. Она развивается примерно у 20 % пациентов с ранними стадиями РМЖ, что приведет к прогрессированию заболевания уже на фоне адъювантной гормонотерапии или после ее завершения.

Масштабные генетические исследования, такие как «Атлас ракового генома» (The Cancer Genome Atlas), привели к обновлению представлений о генетической основе РМЖ [58]. Несмотря на ключевую роль ЭР в развитии люминального РМЖ, мутации гена *ESR1* возникают только лишь в 0,5 % случаев, амплификации гена *ESR1* встречаются в 2,6 % случаев [58]. Методом цифровой полимеразной цепной реакции при исследовании 270 случаев раннего РМЖ Т. Takeshita и соавт. установили, что частота мутации *ESR1* составляет 2,5 % [335]. Р. Wang и соавт. заявили о более высокой частоте – 7 % [358].

Р. Jeselsohn и соавт. сравнили частоту мутаций при метастатическом РМЖ и при ЭР-положительном раннем РМЖ. Частота мутаций всех исследованных генов при метастатическом РМЖ и при раннем РМЖ была одинаковой, за исключением гена *ESR1*. Это позволяет предположить, что данная мутация играет важную роль в развитии метастатической болезни [172].

1.18. Прогностическое значение рецепторов андрогенов

Прогностическая роль рецепторов стероидных гормонов при РМЖ известна давно. Однако роль РА и его терапевтическая значимость изучены недостаточно, и большинство исследований по этой теме были проведены относительно недавно [155, 237, 257, 385]. Экспрессия РА наблюдается при 70 % РМЖ, а наличие положительных РА в опухоли статистически значимо сопряжено с низким риском рецидива болезни и смерти [154, 266, 303]. В исследованиях *in vitro* продемонстрировано значимое влияние экспрессии ЭР на андрогензависимую стимуляцию роста клеток [141, 154]: андрогены ингибируют рост РА-положительных и ЭР-положительных клеток РМЖ, при этом стимулируют рост РА-положительных и ЭР-отрицательных клеток. При ЭР-положительном люминальном РМЖ РА действуют как ингибитор, но при этом

экспрессия РА может способствовать росту ЭР-отрицательных и РА-положительных клонов клеток РМЖ [248, 258]. На основе этих данных был инициирован ряд клинических исследований по изучению РА при ЭР-отрицательном РМЖ (например, ТНРМЖ) [141, 329].

Трижды негативный РМЖ характеризуется отсутствием экспрессии ЭР, ПР, амплификации и/или гиперэкспрессии HER2 [62, 143]. Данный молекулярный подтип встречается в 15–20 % всех случаев РМЖ [120]. В общих чертах подтип характеризуется более крупными размерами первичной опухоли, более высокой степенью злокачественности, большим количеством пораженных аксиллярных лимфатических узлов, относительно более низкой выживаемостью по сравнению с другими подтипами РМЖ [35, 90, 201, 202, 219, 233, 359, 373]. Появляется все больше свидетельств того, что на молекулярном уровне ТНРМЖ является гетерогенным заболеванием [30, 62, 94, 251, 321].

Наличие РА наблюдается в 25–35 % случаев ТНРМЖ [143, 162, 329]. РА-отрицательный ТНРМЖ характеризуется меньшей безрецидивной и общей выживаемостью в сравнении с таковой при РА-положительном ТНРМЖ [133, 231, 232]. Снижение экспрессии РА было ассоциировано с возникновением отдаленных метастазов [230, 329].

Распределение гетерогенного ТНРМЖ на различные подтипы в зависимости от уровня маркеров в перспективе может позволить разработать новые методики скрининга, прогностические модели, а также выявить потенциальные терапевтические мишени. Для подразделения ТНРМЖ на 2 основных прогностических класса используется иммуногистохимическая панель из 5 маркеров: ЭР, ПР, HER2, EGFR, CK5/6. Выделяют базальный тип (EGFR-и/или CK5/6-положительный) и 5-негативный тип [69]. Данных об уровне экспрессии РА при этих вариантах ТНРМЖ относительно немного [227, 345].

В исследовании P. Gasparini и соавт. экспрессия РА изучалась ИГХ методами в 678 случаях РМЖ (в 396 случаях ТНРМЖ). Изучалась корреляция экспрессии РА с течением заболевания, выживаемостью, подтипами ТНРМЖ, стадией заболевания, степенью злокачественности опухоли. Отдельно в 160

случаях ТНРМЖ было проведено профилирование экспрессии мРНК методом микроматричного анализа, проанализированы различия, связанные с экспрессией РА. ТНРМЖ был разделен на подтипы на основании иммуногистохимического профиля: базальный ТНРМЖ (ЭР-, ПР-, HER2-отрицательный CK5/6- и/или EGFR-положительный) и 5-негативный (ЭР-, ПР-, HER2-, CK5/6-, EGFR-отрицательный). Морфологические результаты оценивали 3 патолога независимо друг от друга. Из образцов опухоли была выделена РНК. Для анализа были взяты 160 образцов ТНРМЖ, 59 образцов тканей опухоли, соседствующих со здоровыми тканями, 54 образца с поражением аксиллярных лимфатических узлов. С помощью ИГХ метода, помимо ЭР, ПР, HER2, во всех образцах опухолей определяли экспрессию CK5/6, EGFR, p53 и РА. При анализе была изучена степень экспрессии РА в различных подтипах РМЖ. Проанализировано 678 образцов морфологического материала больных РМЖ (506 – протоковый рак, 44 – дольковый рак, 128 – иной или неопределенный гистологический вариант). При определении иммуногистохимического профиля было выявлено 396 случаев ТНРМЖ, 276 опухолей других подтипов (в 6 случаях данные об экспрессии HER2 отсутствовали) [130].

Более высокая встречаемость РА наблюдалась при HER2-, ЭР-, ПР-положительных опухолях. Распространенность РА-положительных опухолей была ниже при высокой степени злокачественности ($p < 0,01$) и равномерно распределена при всех остальных вариантах опухолей; в 300 (98,4 %) из 305 РА-положительных образцов (97,8 % при ТНРМЖ и 98,6 % при остальных подтипах) экспрессия РА составила ≥ 10 % [130].

Дополнительно был изучен статус РА в метастатически пораженных лимфатических узлах при ТНРМЖ путем анализа мРНК и экспрессии белка. Экспрессия мРНК РА при ТНРМЖ была существенно снижена как в первичной опухоли, так и в пораженных лимфатических узлах по сравнению со здоровой тканью молочной железы ($p < 0,001$ для обеих оценок). При этом уровень экспрессии мРНК был существенно выше в метастатических лимфатических узлах по сравнению с первичными опухолями ($p = 0,02$) [130].

Для определения прогностической значимости определения экспрессии РА с помощью ИГХ метода была проанализирована общая выживаемость 173 пациентов с ТНРМЖ. Положительная экспрессия РА была связана с улучшением общей выживаемости ($p = 0,032$) при ТНРМЖ ($n = 153$); общая выживаемость не менялась в группе опухолей базального типа ($p = ns$ [незначимо]; $n = 86$); экспрессия РА позволяла выделить подтип с наилучшей общей выживаемостью среди 5-негативных опухолей ($n = 69$; $p = 0,026$) (Рисунок 5, Рисунок 6, Рисунок 7). При проведении многофакторного анализа не наблюдалось никакой связи между положительной экспрессией РА и благоприятным прогнозом в зависимости от категории TNM, степени гистологической злокачественности, гистологического типа и молекулярного подтипа [130].

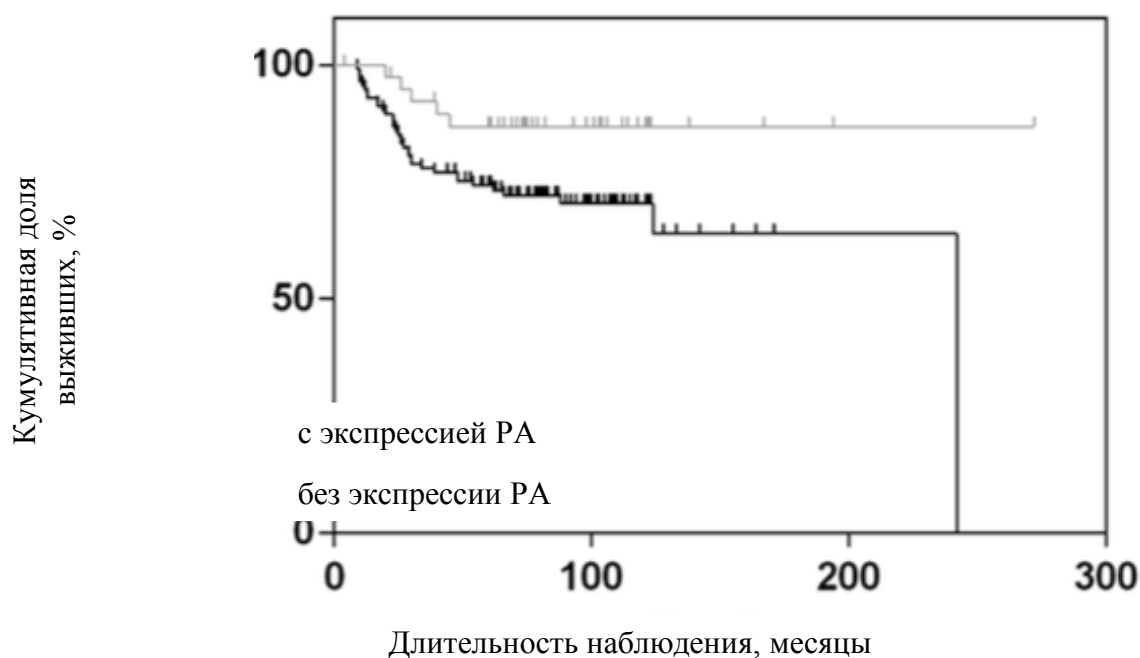


Рисунок 5 – Кривые Каплана – Майера, отражающие общую выживаемость в зависимости от уровня экспрессии рецептора андрогенов (РА) при трижды негативном раке молочной железы [130]

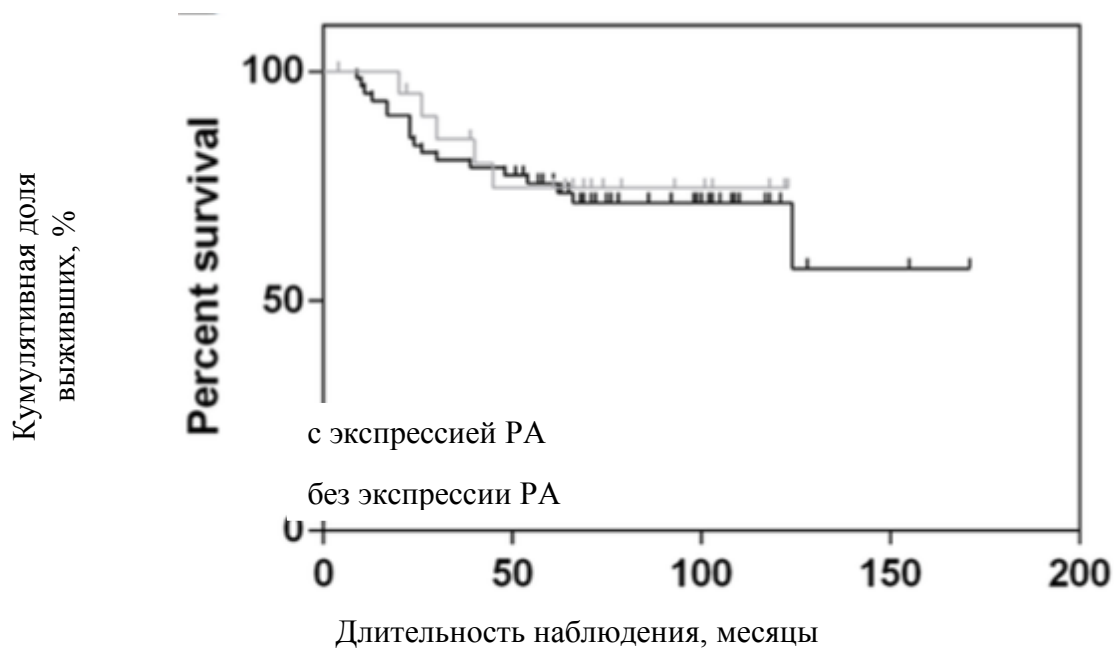


Рисунок 6 – Кривые Каплана – Майера, отражающие общую выживаемость в зависимости от уровня экспрессии рецептора андрогенов (РА) при базальном раке молочной железы [130]

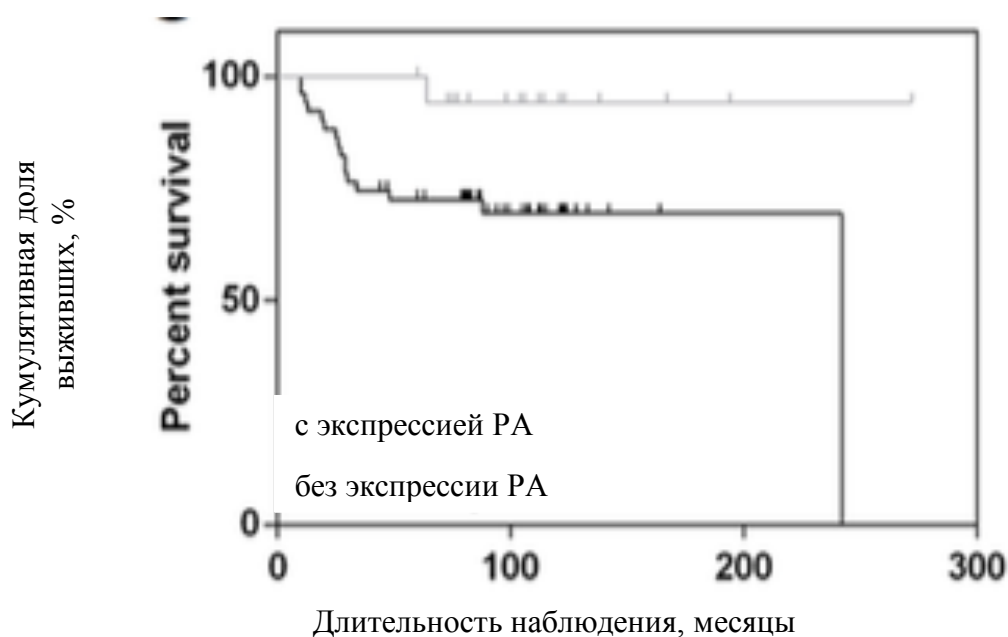


Рисунок 7 – Кривые Каплана – Майера, отражающие общую выживаемость в зависимости от уровня экспрессии рецептора андрогенов (РА) при 5-негативном раке молочной железы [130]

Профили экспрессии мРНК в 160 случаях ТНРМЖ были стратифицированы в соответствии с ИГХ статусом РА (отрицательный/положительный). Как и ожидалось, экспрессия мРНК РА была

существенно более высокой при РА-положительных опухолях ($\log FC$ 2,33; $p < 0,01$) [130].

Определение профиля экспрессии генов позволило дополнительно выделить различные прогностические классы ТНРМЖ [116]. Иммуногистохимическая панель из 5 маркеров, которая включает ЭР, ПР, HER2, EGFR и CK5/6, является наиболее широко применяемой и позволяет выделять на базальный и 5-негативный варианты ТНРМЖ [69].

Значимой разницы в экспрессии РА в первичной опухоли и метастазах отмечено не было. Тем не менее наличие 11 случаев РА-отрицательных лимфатических узлов и РА-положительных первичных опухолей позволяет предположить, что утрата экспрессии РА может связана с процессом метастазирования. Эту гипотезу подтверждает тот факт, что экспрессия p53 была одинаковой в первичной опухоли и метастазах во всех 11 случаях.

С прогностической точки зрения экспрессия РА была связана с улучшением общей выживаемости ($p = 0,032$), но при многофакторном анализе данный вывод не был подтвержден. Это может быть обусловлено относительно небольшим количеством проанализированных случаев ($n = 153$). Данные других исследований указывают на то, что наличие РА в опухоли также улучшает общую выживаемость [345].

Вышеуказанные данные свидетельствуют в пользу прогностической значимости экспрессии РА при ТНРМЖ. Различный уровень экспрессии при подтипах ТНРМЖ подчеркивает их фенотипическую и молекулярную гетерогенность.

1.19. Прогностическое значение FOXA1

Одним из актуальных прогностических маркеров и новой терапевтической мишенью является белок FOXA1. В целом ряде исследований установлено, что экспрессия FOXA1 наблюдается при многих видах злокачественных опухолей, включая РМЖ [156, 167, 180, 210]. Высокая экспрессия FOXA1 ассоциирована с благоприятным прогнозом [156, 167, 180, 210]. Кроме того, экспрессия FOXA1

коррелирует с наличием экспрессии ЭР в опухоли, в особенности при люминальном подтипе А.

FOXA1, известный также как ядерный фактор гепатоцитов 3 α , изначально был выделен как транскрипционный фактор регуляции специфических для печени генов транстретина (*Ttr*) и α_1 -антитрипсина (*Serpina1*) [80]. FOXA1 как член семейства транскрипционных факторов FOX экспрессируется не только в ткани печени, но и в тканях молочной железы, поджелудочной железы, мочевого пузыря, простаты, толстой кишки и легкого. Белок способен соединяться с промоторами более ста генов, участвующих в регуляции клеточных сигналов и клеточного цикла [367]. FOXA1 содержит ДНК-связывающий домен (winged-helix DNA-binding domain). Уникальный ДНК-связывающий домен находится в центре белка и состоит из 3 α -цепей и 2 крупных петель, или «крыльев» (похожих на крылья бабочки). FOXA1 содержит ядерные последовательности, гомологичные N- и C-концевым доменам. Таким образом, присоединение FOXA1 к нуклеосомам индуцирует формирование интерхроматина, что обеспечивает вовлечение других транскрипционных факторов [46].

Способность FOXA1 к ремоделированию гетерохроматина обеспечивает механизм запуска им транскрипционных каскадов, участвующих как в обычной, так и в патологической пролиферации. FOXA1 необходим для формирования ткани молочной железы и ЭР-положительных клеток, для экспрессии 50 % ЭР-ассоциированных генов [61]. В том случае, когда FOXA1 находится в неактивном состоянии в клетках ЭР-положительного РМЖ, возникает существенное снижение доступности хроматина вместе с нарушением связывания ЭР с более чем 90 % ЭР-ассоциированных факторов.

Продемонстрировано, что FOXA1 может функционировать и как индуктор, и как супрессор роста.

В первом случае FOXA1 функционирует как иницирующий фактор, соединяющийся с хроматином, деконъюгирующий хроматин и способствующий присоединению ЭР α к своим таргетным генам, таким как *TFF1* [42]. В дополнение к активности, модулирующей ЭР, FOXA1 также непосредственно

связывается с промотором рецептора ЭР1 и необходим для экспрессии мРНК ЭР в клетках РМЖ [45]. В сумме данные результаты свидетельствуют о том, что FOXA1 необходим не только для активности ЭР, но и для их экспрессии.

Во втором случае для FOXA1 были обнаружены 2 механизма подавления роста: подавление метастатической прогрессии и дифференциальная регуляция ЭР-зависимого сигнального пути [367]. Продемонстрировано, что гиперэкспрессия FOXA1 может подавлять метастатическое прогрессирование за счет влияния на BRCA-ассоциированный регулятор клеточного цикла, белок p27 и усиления экспрессии E-кадгерина. FOXA1 связывается с промотором p27 и содействует BRCA1. Аналогично этому FOXA1 непосредственно стимулирует транскрипцию гена E-кадгерина, индукция экспрессии которого снижает миграционную способность опухолевых клеток. Активация CDH1 обнаруживается и при отсутствии экспрессии ЭР, что поддерживает версию о том, что FOXA1 имеет ЭР-независимую роль в формировании более дифференцированного люминального клеточного фенотипа. С другой стороны, FOXA1 ингибирует ЭР-зависимый сигнальный путь в ЭР α -положительных клетках и подавляет клеточный рост.

Итак, роль FOXA1 при РМЖ двойственна: белок имеет свойство опухолевого промотора на начальных стадиях заболевания и опухолевого супрессора при более поздних стадиях. Хотя все факторы, способствующие повышению активности ЭР α , могут считаться негативными для опухолевого роста, FOXA1 не попадает в данную категорию [245]. В связи со сложным взаимодействием между ЭР и ассоциированными сигнальными путями пересечение между FOXA1 и ЭР способствует в большей степени экспрессии генов, ассоциированных с дифференцировкой, нежели экспрессии генов, ассоциированных с пролиферацией [245]. Таким образом, FOXA1 может способствовать возникновению высокодифференцированного РМЖ с высокой экспрессией ЭР, что является положительным прогностическим фактором при РМЖ. В дополнение к этому экспрессия FOXA1 является обязательным

фактором ответа на тамоксифен даже в тех случаях, когда имеется резистентность [163].

Экспертный совет конференции в Санкт-Галлене (St. Gallen Symposium) рекомендовал исследование маркеров пролиферации или определение генетических профилей для определения прогноза и выбора системного лечения в дополнение к традиционным стандартным параметрам, таким как стадия заболевания, степень злокачественности, рецепторный статус, HER2-статус [136]. Несмотря на превосходные результаты использования для оценки генетического профиля таких панелей, как Oncotype DX и MammaPrint, оно является дорогостоящей и невалидизированной процедурой для рутинной практики [184]. На основании того, что наблюдалась негативная корреляция экспрессии FOXA1 с частотой рецидивов, авторы предположили, что этот белок может быть более экономически эффективным маркером, нежели Oncotype DX [34].

Клиническая значимость экспрессии белка FOXA1 изучалась в различных когортах пациентов. В здоровой ткани молочной железы экспрессия FOXA1 наблюдается в ядрах небольшого количества люминальных клеток и отсутствует в цитоплазме. Экспрессия в опухолевых клетках варьирует от низкой (11,5 %) до высокой (55,1 %). Частота выявления экспрессии FOXA1 в опухоли находится в диапазоне 41,51–85,90 %, медиана частоты составляет 77,97 % [34].

По данным исследований, экспрессия FOXA1 тесно связана с экспрессией ЭР. Кроме того, имеется положительная корреляция экспрессии FOXA1 с люминальным подтипом и отрицательная корреляция с базальным подтипом. Фактически экспрессия FOXA1 оказалась важным предиктором выживаемости в дополнение к очевидной связи с клинико-морфологическими характеристиками опухоли. Однофакторный анализ продемонстрировал, что определение уровня экспрессии FOXA1 важно при оценке прогностического риска у больных РМЖ с тенденцией к ассоциации подобной при стандартных прогностических факторах, таких как размер первичной опухоли, статус аксиллярных лимфатических узлов, степень злокачественности, экспрессия ЭР и HER2. Тем

не менее является ли экспрессия FOXA1 независимым прогностическим фактором при многофакторном анализе, на данный момент не ясно [21, 234].

Высокая экспрессия FOXA1 значимо коррелирует с благоприятным прогнозом независимо от уровня Ki-67 при гормоноположительном РМЖ. Любопытно, что в когорте больных гормоноположительным HER2-отрицательным РМЖ с высокой экспрессией FOXA1 не наблюдалось статистически значимых различий в безрецидивной выживаемости между теми больными, кто проходил адъювантную гормонотерапию, и теми, кто проходил адъювантную химиотерапию с последующей гормонотерапией [378]. Такие результаты позволяют предположить, что FOXA1 служит полезным маркером для выявления пациентов с благоприятным прогнозом при гормоноположительном HER2-отрицательном РМЖ, которые не нуждаются в проведении адъювантной химиотерапии.

В исследовании М. Kawase и соавт. была проанализирована экспрессия FOXA1 наряду с другими прогностическими факторами, такими как ЭР и Ki-67, до и после лечения с целью изучения прогностической и предиктивной значимости у больных ЭР-положительным HER2-отрицательным ранним РМЖ, проходивших неадъювантную химиотерапию в антрациклин- и таксансодержащих режимах. Значимого снижения экспрессии FOXA1 на фоне неадъювантной химиотерапии, в отличие от остальных параметров, не наблюдалось. Высокая экспрессия FOXA1 в постнеоадъювантных образцах опухоли демонстрировала значимую корреляцию с увеличением безрецидивной выживаемости [180].

В большинстве исследований не обнаружено корреляции между экспрессией FOXA1 и такими клиничко-морфологическими параметрами, как возраст, размер первичной опухоли, статус аксиллярных лимфатических узлов, экспрессия HER2 [156, 167, 210]. При этом была выявлена положительная корреляция между экспрессией FOXA1 и ЭР, ПР и отрицательная корреляция со степенью злокачественности, экспрессией Ki-67, CK5/6, CK15 [156, 167, 210, 234]. Анализ выживаемости в прошлом продемонстрировал, что экспрессия ЭР

и ПР в опухоли ассоциирована с улучшением выживаемости. Более высокая степень злокачественности, больший размер опухоли, поражение аксиллярных лимфатических узлов, высокий уровень Ki-67, CK5/6 и CK14 значимо коррелировали с низкой выживаемостью при РМЖ [265]. В дополнение к этому экспрессия FOXA1 отрицательно коррелировала с другими клинико-морфологическими параметрами, такими как экспрессия CK17, Е-кадгерина и ноттингемский прогностический индекс, которые свидетельствуют о неблагоприятном прогнозе. На основании упомянутой корреляции можно предполагать, что высокий уровень экспрессии свидетельствует о самостоятельной предиктивной роли FOXA1 при РМЖ.

Гиперэкспрессия FOXA1 изучалась при различных новообразованиях, установлена корреляция с благоприятным прогнозом. Во всех исследованиях период наблюдения длился 44–185 мес. В ряде исследований FOXA1 оказался значимым предиктором общей выживаемости [156, 167, 210]. В других исследованиях продемонстрирована роль FOXA1 как важного предиктора безрецидивной выживаемости [156, 167, 234].

С. Хи и соавт. провели ретроспективное исследование оценки предиктивной значимости FOXA1 для определения чувствительности опухоли к химиотерапии у больных РМЖ, нуждавшихся в проведении неоадьювантной лечения. Исследователи изучили 123 случая ЭР-положительного РМЖ за период с 2002 по 2012 гг., где больным проводилась биопсия опухоли до начала лечения, неоадьювантная химиотерапия, а в последующем оценивался морфологический ответ.

Экспрессия FOXA1 до проведения неоадьювантной химиотерапии коррелировала с низкой чувствительностью опухоли к ней при ЭР-положительном РМЖ, люминальном подтипе А и люминальном подтипе В ($p = 0,002$; $0,001$ и $0,049$ соответственно). Выявлена значимая взаимосвязь между изменением экспрессии FOXA1 после неоадьювантной химиотерапии и химиочувствительностью ($p = 0,024$). При многофакторном анализе продемонстрировано, что экспрессия FOXA1 до проведения неоадьювантной

химиотерапии является независимым предиктором химиочувствительности при ЭР-положительном люминальном РМЖ подтипа А ($p = 0,002$; ОР 0,163; 95 % ДИ 0,053–0,500 и $p = 0,002$; ОР 0,055; 95 % ДИ 0,008–0,353 соответственно). Кроме того, изменение экспрессии FOXA1 после неоадьювантной химиотерапии оказалось независимым предиктором химиочувствительности при люминальном подтипе В ($p = 0,012$; ОР 0,153; 95 % ДИ 0,035–0,665). Таким образом, уровень экспрессии FOXA1 может быть независимым предиктором ответа [371].

J. Shou и соавт. выполнили крупный метаанализ для оценки прогностической значимости FOXA1 при РМЖ. Было изучено 9 крупных исследований, суммарно включавших 6386 больных РМЖ. В 5 исследованиях изучена безрецидивная выживаемость, в остальных – общая выживаемость. Метаанализ продемонстрировал, что высокая экспрессия FOXA1 положительно коррелировала с безрецидивной выживаемостью (ОР 0,43; 95 % ДИ 0,23–0,81; $p < 0,05$) и общей выживаемостью (ОР 0,39; 95 % ДИ 0,26–0,60; $p < 0,05$) у больных РМЖ. Метаанализ продемонстрировал, что экспрессия FOXA1 отрицательно коррелирует со статусом HER2. Результаты свидетельствуют о том, что высокая экспрессия FOXA1 связана с благоприятным результатом лечения РМЖ [308].

S. Guin и соавт. ретроспективно оценили прогностическую значимость FOXA1 и PA при нематастатическом РМЖ. Экспрессию PA и FOXA1 оценивали с помощью ИГХ методов в 333 случаях нематастатического ТНРМЖ. За положительный уровень экспрессии принимали значение ≥ 1 %. Дополнительно определяли лимфоцитарную инфильтрацию, экспрессию PD-L1, мутации *PIK3CA*, дефекты гена *PTEN* и метилирование промотора *BRCA1*.

У наибольшего числа пациентов (42,4 %) отмечалась экспрессия PA и FOXA1. Для этой когорты больных был характерен более зрелый возраст, высокая степень злокачественности, высокая частота мутаций *PIK3CA*. Также в данной когорте больных реже наблюдалось метилирование промотора *BRCA1*, дефекты гена *PTEN*, экспрессия PD-L1. Безрецидивная и общая выживаемость при PA- и FOXA1-положительном ТНРМЖ при медиане наблюдения 7,8 года в

сравнении с РА-положительным FOXA1-отрицательным и РА-отрицательным РМЖ была значительно ниже: 66,8; 79,1 и 79,7 % соответственно ($p = 0,020$) и 76,6; 76,4; 84,8 % соответственно ($p = 0,024$).

Наличие экспрессии РА и FOXA1 при ТНРМЖ свидетельствует о неблагоприятном течении заболевания, характеризующемся снижением безрецидивной и общей выживаемости [142].

1.20. Прогностическое значение *p53*

Ген *p53* был первым обнаруженным геном-супрессором опухолевого роста. Функция гена *p53* заключается в подавлении пролиферации и уничтожении атипичных клеток. В условиях нормального функционирования клеток ген находится в неактивном состоянии. Активация гена происходит в условиях клеточного стресса, несколько независимых сигнальных путей активации гена *p53* зависят от регуляторных киназ. Активация гена приводит к увеличению уровня белка *p53*, связывающей ДНК активности, усилению транскрипции ряда генов.

Герминальные мутации *p53* часто встречаются при наследственном синдроме Ли – Фраумени, который приводит к увеличению риска развития РМЖ [221]. Это свидетельствует о значительной роли инактивации гена *p53* в возникновении РМЖ и является основанием для изучения данного гена [12]. Потеря гомозиготности гена *p53* распространена при РМЖ [87]. Р. D. Pharoah и соавт. провели подробный метаанализ, позволивший установить, что только в 20 % случаев РМЖ экспрессирует мутантный *p53* [269]. Т. Sørli и соавт. сообщают, что мутация *p53* встречается в 30 % случаев в популяции больных РМЖ [317]. Хотя общая частота мутаций гена *p53* составляет 20–30 %, отдельные варианты РМЖ сопровождаются более высокой частотой мутаций. Ряд исследований свидетельствует о более высокой частоте мутации гена *p53* у носителей герминальной мутации генов *BRCA1* и *BRCA2* [270, 226]. При медуллярном РМЖ мутация *p53* встречается в 100 % случаев [82].

Несмотря на детальное изучение гена, абсолютное число его мутаций при РМЖ значительно ниже, чем при других злокачественных опухолях. Имеются данные о том, что при диком типе гена *p53* в части случаев окрашивается только цитоплазма [238]. Отсутствие белка *p53* в ядре клетки является следствием механизма инактивации гена *p53*, независимого от мутации. Инактивация гена может происходить как на уровне регуляторных белков, подавляющих транскрипцию гена, так и на уровне белков, стимулирующих транскрипцию гена. Одним из таких механизмов может быть мутация гена *ATM*, которая приводит к возникновению синдрома атаксии-телеангиэктазии. Мутация гена *ATM* часто встречается при злокачественных опухолях, в том числе при РМЖ [322]. Существуют свидетельства того, что низкая экспрессия гена *ATM* или ее отсутствие часто встречается при спорадическом РМЖ, а в небольшой части случаев наблюдается как низкая экспрессия *ATM*, так и мутация гена *p53* [29]. Уровень экспрессии мРНК гена *p53* при РМЖ значительно ниже, чем в нормальных клетках эпителия молочной железы. Детальный анализ промотора *p53* выявил наличие нескольких гомеодоменов для белка-гомеобокса НохА5, регулирующего экспрессию гена *p53*. В значительной части случаев РМЖ экспрессия НохА5 существенно снижена. Ослабление активности НохА5, приводящее к снижению экспрессии *p53*, служит еще одним механизмом подавления функции гена [287].

Взаимосвязь нарушения функции *p53* и клинических результатов при РМЖ – предмет множества исследований. Способность *p53* влиять на биологические особенности заболевания была описана R. Mazars и соавт. в 1992 г. Они выявили наличие мутации *p53* при агрессивном течении РМЖ [229]. Данная взаимосвязь была также подтверждена в крупном метаанализе P. D. Pharoah и соавт., посвященном влиянию соматических мутаций *p53* на прогноз при РМЖ [269].

Описана возможная корреляция между вариантами мутации гена *p53* и вариантами клинического течения РМЖ. В исследовании J. Alsner и соавт. продемонстрировано, что мутации, затрагивающие аминокислоты, необходимые

для связывания ДНК, ассоциированы с крайне агрессивным течением заболевания, в то время как нулевые или миссенс-мутации не были ассоциированы с каким-то определенным течением заболевания [25].

Исследования влияния *p53* на чувствительность опухоли к химиотерапии дали противоречивые результаты. Известно, что определенные мутации при РМЖ коррелируют с первичной резистентностью к антрациклинам и, соответственно, могут быть предиктивным фактором раннего прогрессирования заболевания [15]. Данная гипотеза была подтверждена в работе S. Geisler и соавт. [131]. В исследовании D. Kandioler-Eckersberger и соавт. опухоли с наличием мутации *p53* лучше отвечали на химиотерапию паклитакселом [177].

A. Dumaу и соавт. изучили статус мутации гена *p53* в 572 опухолях, разделенных на люминальную, базальную и молекулярную апокринную группы. Наименьшая частота мутаций (26 %) наблюдалась в группе люминальных опухолей, а наибольшая – в подгруппе базальных опухолей (88 %). При люминальных опухолях наблюдалась существенно высокая частота замен (82 % против 65 %), преимущественно А/Т на G/C (31 % против 15 %), тогда как при апокринных и базальных опухолях наблюдалась гораздо более высокая частота сложных мутаций (делеций, инсерций) (36 и 33 % против 18 %). При люминальных опухолях встречались чаще миссенс-мутации (75 % против 54 %), в то время как при базальных опухолях – мутации с иссечением (43 % против 25 %), приводящие к потере функции или экспрессии [106].

T. Maeda и соавт. ИГХ методами оценили экспрессию СК5/6, РА и *p53* в качестве потенциальных прогностических маркеров для выбора адьювантной химиотерапии при ТНРМЖ. Низкая экспрессия РА коррелировала с поздними стадиями заболевания ($p < 0,05$) и низкой степенью дифференцировки ($p < 0,05$). Экспрессия СК5/6 и *p53* не коррелировала с клинико-морфологическими характеристиками опухоли. При ИГХ профиле экспрессии СК5/6 (–), РА (–), *p53* (+) безрецидивная выживаемость и общая выживаемость были наихудшими. И наоборот, при РА (+) и *p53* (–) наблюдался благоприятный прогноз ТНРМЖ. Анализ экспрессии показал, что не было ни одного образца, где бы наблюдалась

экспрессия РА и СК5/6 одновременно. Экспрессия p53 была выше у пациентов с РА-отрицательным ТНPMЖ ($p < 0,05$) в сравнении с другими когортами. Результаты исследования позволяют предположить, что гиперэкспрессия p53 коррелирует с неблагоприятным прогнозом [220].

L. Peng и соавт. провели метаанализ, включавший 4288 больных PMЖ из 16 различных исследований, среди которых был 681 носитель мутации гена *BRCA1*, 336 носителей мутации гена *BRCA2*. Мутация *BRCA1* была значимо ассоциирована с гиперэкспрессией гена *p53*, в отличие от *BRCA2* (ОР 1,851; 95 % ДИ 1,393–2,458), или с отсутствием мутаций (ОР 2,503; 95 % ДИ 0,670–1,158). Значимых различий в экспрессии p53 между группой с мутациями *BRCA2* и группой без мутаций не установлено (ОР 0,881; 95 % ДИ 0,670–1,158) [261].

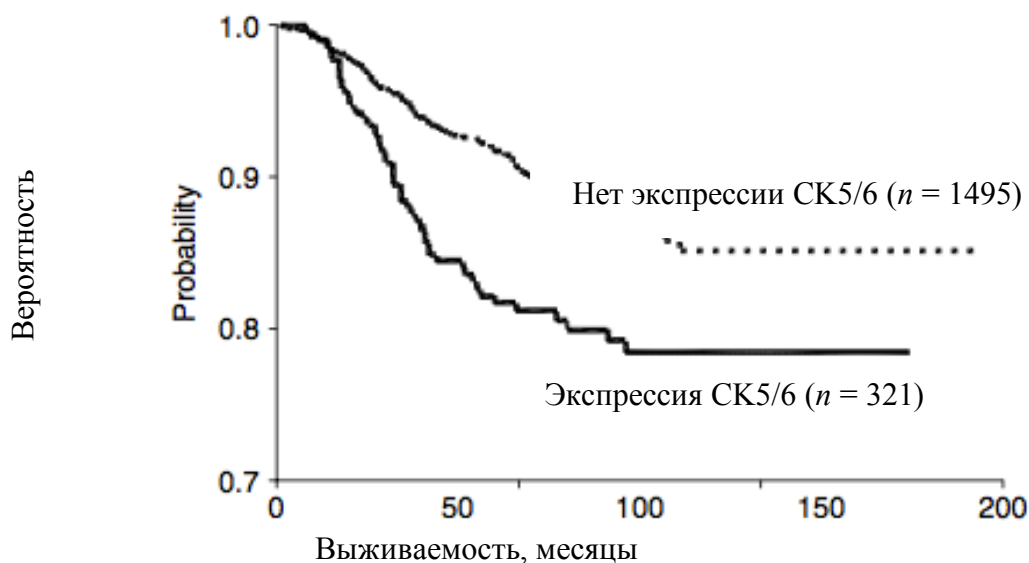
1.21. Прогностическое значение

маркеров базального рака молочной железы СК5/6, СК14, EGFR, p63

СК5/6. Цитоскелет клеток молочной железы состоит из 3 типов филаментов: актиновые микрофиламенты, промежуточные филаменты и микротрубочки [342]. Экспрессия белков промежуточных филаментов, в частности цитокератинов, характерна для клеток эпителиального типа.

В здоровой ткани молочной железы в люминальных эпителиальных и в миоэпителиальных клетках встречаются различные типы цитокератинов. В миоэпителиальных/базальных клетках встречается SMA, СК5, СК14 и СК17 [342]. В нормальной ткани молочной железы встречается небольшое количество клеток с экспрессией СК5/6 и отсутствием экспрессии СК8, СК18, СК19, SMA. Эти клетки располагаются в люминальном слое и имеют морфологические признаки стволовых клеток, которые обладают способностью дифференцироваться в клетки с железистым или базальным фенотипом. Современные технологии анализа генома позволили выделить 4 подтипа PMЖ. Генетический профиль 2 подтипов характерен для базального и люминального фенотипов [265]. В других исследованиях была выявлена статистически значимая связь подтипа PMЖ с общей и безрецидивной выживаемостью [317].

С целью изучения экспрессии базальных и люминальных цитокератинов D.M. Abd El-Rehim и соавт. провели ретроспективное иммуногистохимическое исследование 1994 случаев инвазивного РМЖ. Целью исследования была оценка частоты экспрессии каждого подтипа кератинов, связи с другими факторами, прогностической значимости. Дополнительно оценивали экспрессию SMA и ЭР. В большинстве случаев при экспрессии в опухоли СК7/8, СК18 и СК19, характерной для дифференцированного железистого фенотипа, наблюдались благоприятный прогноз, экспрессия ЭР и более пожилой возраст пациента. Экспрессия базальных маркеров, наоборот, была связана с неблагоприятным прогнозом, отрицательными ЭР, более молодым возрастом пациентов. Многофакторный анализ продемонстрировал, что экспрессия СК5/6 – независимый предиктор уменьшения безрецидивной и общей выживаемости (Рисунок 8) [16].



Log Rank $p = 0,0001$

Рисунок 8 – Вероятная выживаемость в зависимости от наличия экспрессии СК5/6 [6]

М. Kayahan и соавт. провели ретроспективное исследование экспрессии RA, СК5/6, Ki-67 в 86 случаях инвазивного РМЖ I/IIa/IIb стадий: люминальный подтип А – 41 случай, люминальный подтип В – 14, HER2-положительный – 14, ТНРМЖ – 17. Средняя длительность наблюдения составила $17,46 \pm 11,7$ мес.

Положительная экспрессия СК5/6 чаще встречалась в HER2-положительных опухолях и ТНРМЖ ($p = 0,001$). Влияния экспрессии СК5/6 на выживаемость в исследуемой когорте выявлено не было [181].

Y. Yue и соавт. провели проспективное исследование 192 случаев резектабельного ТНРМЖ у пациентов, получавших хирургическое лечение в период с 2008 по 2012 г. Оценивалась взаимосвязь безрецидивной и общей выживаемости с экспрессией таких факторов, как p53, Ki-67, СК5/6 и EGFR. А также учитывался ряд клинико-морфологических параметров: возраст, размер опухоли, степень злокачественности, статус аксиллярных лимфатических узлов, стадия заболевания. Медиана возраста составила 57 лет (28–92 года). EGFR и СК5/6 были значимыми прогностическими параметрами при пороговых значениях 15 % ($p = 0,001$, AUC 0,723) и 50 % ($p = 0,006$, AUC 0,675) соответственно. В соответствии с этим когорта была разделена на 2 группы: EGFR \leq 15 %, СК5/6 \leq 50 % и EGFR $>$ 15 %, СК5/6 $>$ 50 %. В группе пациентов с высокой экспрессией обоих маркеров наблюдалась более низкая выживаемость (средняя безрецидивная выживаемость – 25 мес, частота события – 41,7 %), чем в группе пациентов с высокой экспрессией одного из маркеров (средняя безрецидивная выживаемость – 34 мес, частота события – 25,5 %) [381].

A. E. Abdelrahman и соавт. провели исследование экспрессии EGFR и СК5/6 и оценку влияния уровня экспрессии на эффект неоадьювантной химиотерапии и выживаемость у больных ТНРМЖ. Была проанализирована экспрессия EGFR и СК5/6 у 35 больных ТНРМЖ с помощью ИГХ метода. В 57,1 % случаев ТНРМЖ был СК5/6-положительным. Установлена статистически значимая корреляция экспрессии СК5/6 со степенью злокачественности опухоли, низкой эффективностью неоадьювантной химиотерапии, низкой безрецидивной и общей выживаемостью ($p = 0,07$, $p = 0,048$, $p = 0,043$, $p < 0,001$ соответственно) [18].

V. Adamo и соавт. провели ретроспективное исследование прогностической роли 4 молекулярных факторов: РА, Е-кадгерина, Ki-67 и СК5/6. В исследование было включено 99 больных ТНРМЖ, получивших

неoadьювантную или адьювантную химиотерапию. Экспрессия факторов оценена с помощью ИГХ метода. У пациентов с отсутствием экспрессии СК5/6 при однофакторном и многофакторном анализах отмечалось уменьшение безрецидивной выживаемости ($p = 0,2$ и $p = 0,002$ соответственно) [381].

Экспрессия СК5/6 может служить маркером для выявления больных ТНРМЖ с низкой ожидаемой выживаемостью и неэффективностью неoadьювантной химиотерапии.

1.22. Прогностическое значение SMA

Существует мнение, что процесс заживления ран имеет много общего с процессом метастазирования. Н. Y. Chang и соавт. опубликовали данные о том, что у пациентов, которым свойственна «сигнатура ответа раны», прогноз заболевания был менее благоприятным [67, 68].

Актуальные данные свидетельствуют о том, что опухолево-ассоциированные фибробласты могут играть важную роль в биологии солидных эпителиальных опухолей [235]. Миофибробласты – это ключевые клетки для перестройки соединительной ткани, которая происходит во время заживления тканей, формирования фиброза [81]. Десмопластическая реакция происходит при прогрессировании опухоли и процессе метастазирования. Изменения стромы на границе инвазии опухоли включают экспрессию SMA фибробластами и миофибробластами, что в конечном итоге формирует десмопластическую реакцию. Эти фибробласты принимают участие в процессе инвазивного роста [377]. Хотя стромальные фибробласты связаны с некоторыми стандартными морфологическими факторами неблагоприятного прогноза при инвазивном РМЖ, специальных исследований влияния на прогноз не было инициировано. М. Yamashita и соавт. провели исследование, в котором участвовало 60 больных РМЖ. В образцах опухоли оценивалась экспрессия α -SMA. Диапазон экспрессии α -SMA оказался достаточно широк: от 0,68 до 28,15 % (медиана $8,48 \pm 5,40$ %). В когорте пациентов с наличием метастазов экспрессия α -SMA была гораздо выше, чем в группе пациентов без метастазов ($p < 0,001$). После распределения

пациентов на 2 группы в зависимости от экспрессии α -SMA (пороговое значение 8,48 %) выживаемость оказалась существенно более низкой в группе пациентов с высокой экспрессией α -SMA ($P < 0,001$). Многофакторный анализ показал, что α -SMA и метастазы в аксиллярных лимфатических узлах – независимые предиктивные факторы возникновения метастазов [376].

1.23. Прогностическое значение EGFR

EGFR и HER2 – рецепторы тирозинкиназ из семейства ErbB, наиболее часто участвующие в канцерогенезе. EGFR – трансмембранный рецептор, состоящий из экстрацеллюлярного лигандсвязывающего домена и внутриклеточного домена, обладающего тирозинкиназной активностью. EGFR активируется посредством присоединения его лигандов: эпидермального фактора роста (EGF) и трансформирующего фактора роста альфа (TGF- α). Гиперэкспрессия EGFR при РМЖ наблюдается в 14–91 % случаев [121]. Чаще всего EGFR встречается при ТНРМЖ и воспалительном РМЖ [279].

Гиперэкспрессия EGFR при РМЖ ассоциирована с исходно большим размером первичной опухоли, низкой дифференцировкой и неблагоприятным прогнозом [299]. Хотя гиперэкспрессия EGFR встречается при всех подтипах РМЖ, наибольшая частота гиперэкспрессии наблюдается при ТНРМЖ и первичном отечно-инфильтративном РМЖ [57].

G. A. Gonzalez-Conchas и соавт. провели метаанализ с целью оценки влияния EGFR на безрецидивную и общую выживаемость у больных ранним РМЖ. Всего было отобрано 53 исследования, включено 21 418 случаев РМЖ. Гиперэкспрессия EGFR была обнаружена у 27 % пациентов. В основной анализ было включено 10 исследований с участием 4587 пациентов, имеющих результаты оценки ОР для общей выживаемости, и 17 исследований с участием 8747 пациентов, имеющих данные ОР для безрецидивной выживаемости. Гиперэкспрессия EGFR была ассоциирована со снижением общей выживаемости (ОР 1,98; 95 % ДИ 1,59–2,47; $p < 0,001$) и безрецидивной выживаемости (ОР 1,59; 95 % ДИ 1,30–1,95; $p < 0,001$). Негативное влияние гиперэкспрессии EGFR на

безрецидивную выживаемость было наибольшим у больных ТНРМЖ (ОР 2,35 против 1,45 соответственно; $p = 0,01$) [137].

Гиперэкспрессия EGFR ассоциирована со снижением безрецидивной и общей выживаемости при раннем РМЖ. У больных ТНРМЖ с гиперэкспрессией EGFR показатели безрецидивной и общей выживаемости существенно ниже в сравнении с ТНРМЖ без гиперэкспрессии EGFR.

1.24. Прогностическое значение иммунологических маркеров, связанных с TILs CD4, CD8, PD-L1, FOXP3

Лейкоциты, инфильтрирующие опухоль (TILs), детально изучены при различных злокачественных новообразованиях. TILs – следствие реакции иммунной системы на злокачественную опухоль. TILs представляют собой гетерогенную популяцию мононуклеарных клеток: CD8 и CD4-клеток, В-клеток, миелодных супрессорных клеток, макрофагов и пр. Иммуносупрессивные факторы микроокружения опухоли, ингибирующие функцию TILs, включают иммуносупрессивные клетки, цитокины, продуцируемые опухолевыми и мезенхимальными клетками, коингибирующие лиганды, продуцируемые опухолевыми клетками. Высокая плотность TILs связана с благоприятным прогнозом при некоторых подтипах РМЖ, включая HER2-положительный подтип, ТНРМЖ. Стромальные TILs ассоциированы с большей частотой полного морфологического ответа на неоадьювантную химиотерапию, уменьшением риска рецидива болезни, увеличением общей выживаемости при ранних стадиях ТНРМЖ и HER2-положительного РМЖ у пациентов, получающих системную адьювантную терапию.

Впервые TILs были описаны при медулярном РМЖ – гистологическом варианте РМЖ, характеризующемся лимфоцитарной инфильтрацией, отсутствием экспрессии ЭР, экспрессией ПР, гиперэкспрессией HER2 и относительно благоприятным прогнозом [50]. Лимфоцитарная инфильтрация наиболее характерна для HER2-положительного РМЖ и ТНРМЖ. Выделяют внутриопухолевую и стромальную лимфоцитарную инфильтрацию [212]. Ряд

фактов свидетельствует о значимой взаимосвязи TILs (в особенности стромальных) со снижением риска рецидива заболевания и смертности как при HER2-положительном РМЖ [102], так и при ТНРМЖ [212]. Также имеются данные о связи TILs в остаточной опухоли после проведения неoadьювантной химиотерапии с прогнозом [100]. Более высокая плотность TILs в материале трепанобиопсии до начала лечения тоже является прогностическим маркером полного морфологического ответа при проведении неoadьювантной химиотерапии [95]. Очевидная связь между высокой плотностью TILs и благоприятными клиническими результатами побудила экспертную группу сформулировать рекомендации по оценке TILs при РМЖ, которые позволяют тщательно собрать данные для анализа и их последующего клинического применения [274].

Хотя TILs названы лимфоцитами, морфологически они являются мононуклеарными клетками и фактически представляют собой смешанную популяцию клеток, включающую не только цитотоксические и супрессорные Т- и В-лимфоциты, но и НК-клетки, плазматические клетки, макрофаги, дендритные клетки и миелоидные клетки-предшественники. С момента появления ингибиторов контрольных точек приобрели особую актуальность работы по более точному определению состава популяции TILs с целью выявления предиктивных маркеров, которые позволят идентифицировать опухоли, наиболее восприимчивые к терапии, с помощью ингибиторов контрольных точек.

Международная рабочая группа по изучению TILs выпустила рекомендации по их оценке при РМЖ [297]. Прежде всего группа рекомендует идентифицировать все мононуклеарные клетки в пределах первичной опухоли как TILs, за исключением областей некроза, артефактов или гиалиноза. Трепанобиопсия может быть использована для оценки TILs до проведения неoadьювантной химиотерапии. Убедительных данных о значимости оценки TILs в остаточной опухоли после неoadьювантной химиотерапии нет. Кроме того, рабочая группа рекомендует различать внутриопухолевые TILs и

стромальные TILs и для оценки плотности TILs изучать в первую очередь строму. Стромальные TILs – это лимфоциты, располагающиеся в строме между опухолевыми клетками и не контактирующие с ними непосредственно. Количество их оценивается в процентах как доля стромы, занятой TILs. Рабочая группа указывает на то, что передвижение клеток между опухолью и микросредой стромы является динамическим процессом, запечатленным в статике в гистологическом препарате, поэтому различия между количеством внутриопухолевых TILs и стромальных TILs являются условными.

Определение стромальных TILs является практически более обоснованно из-за преобладания стромальных TILs над внутриопухолевыми, относительной легкости подсчета, а также ввиду прогностической значимости именно стромальных TILs. В качестве единицы измерения стромальных TILs рабочая группа рекомендует использовать полуквантили (например, <10 %, 10–20 % и т. д.), а не определенное количество процентов.

Несмотря на наличие убедительных доказательств связи между количеством стромальных TILs и прогнозом при ранних стадиях РМЖ, требующих адъювантной химиотерапии, и ТНРМЖ, требующего неoadъювантной химиотерапии, возможность клинического применения данного показателя остается неопределенной. В настоящий момент не накоплены достаточно убедительные доказательства для того, чтобы рекомендовать применение этого параметра в качестве показания к определенному виду лечения (например, адъювантной химиотерапии).

При опухолях, возникающих у пациентов с герминальной мутацией гена *BRCA1*, наблюдается большее количество TILs, чем при спорадическом РМЖ [193]. BRCA-ассоциированный РМЖ имеет более высокую мутационную нагрузку в сравнении со спорадическим раком в связи с нарушением гомологичной рекомбинации и, как следствие, репарации ДНК. Это приводит к большей неоантигенной нагрузке, что индуцирует иммунный ответ. Для BRCA-неассоциированного ТНРМЖ также характерно нарушение механизмов репарации ДНК из-за дефектов в других путях репарации (*PALB2*, *RAD51*) и

повышенного уровня метилирования промотора BRCA1. Для опухолей с такими геномными дефектами характерна высокая плотность TILs, что является лишним подтверждением связи мутационной нагрузки и иммунного ответа [343]. С другой стороны, опухоли, которым свойственен дефект механизмов репарации ДНК вследствие герминальной или соматической мутации, более чувствительны к агентам, разрушающим ДНК (таким как препараты платины, алкилирующие агенты и антрациклины). Поэтому в настоящее время неясно, обусловлен ли более благоприятный прогноз заболевания, связанный с TILs, эффективным иммунным ответом, большей чувствительностью опухоли к цитотоксическим агентам или обоими этими факторами одновременно.

Несмотря на то, что возникновение злокачественного новообразования происходит по причине ускользания опухоли от иммунной системы, связь между количеством TILs и прогнозом заболевания свидетельствует о том, что иммунитет хозяина не перестает играть определенную роль даже после возникновения злокачественного новообразования. TILs состоят из гетерогенной популяции клеток, которые обладают как иммуностимулирующими, так и иммуносупрессивными свойствами; определенный баланс данных эффектов способствует устойчивости опухоли [278].

Некоторые клетки популяции TILs подавляют прогрессирование опухоли: CD8-клетки, клетки-хелперы CD4+ (TH1), NK-клетки. Другая часть популяции способствует прогрессированию опухоли: Th2, стволовые клетки, регуляторные T-клетки. Субпопуляции макрофагов и дендритных клеток могут обладать подавляющим (M1, DC1) или стимулирующим действием (M2, DC2), в то время как популяции других клеток могут обладать или подавляющим, или стимулирующим действием, включая B-клетки и клетки Th17 [297].

Субпопуляции TILs могут оцениваться с помощью различных методов, таких как ИГХ, гибридизация РНК *in situ*, проточная цитофлюориметрия. Анализ уровня экспрессии генов позволяет идентифицировать иммунные сигнатуры, отражающие состав популяции. К настоящему времени для классификации субпопуляций используется в основном иммуногистохимия (в первую очередь,

антитела к CD4, CD8, CD25, FOXP3+). На основании этой методологии основными типами иммуносупрессивных клеток, входящих в состав TILs, являются регуляторные Т-клетки (CD4+, CD25+, FOXP3) и миелоидные супрессорные клетки [174]. Регуляторные Т-клетки продуцируют RANK-лиганд, который связывается рецептором активатора фактора транскрипции каппа (RANK) [336]. Миелоидные супрессорные клетки подавляют пролиферацию Т-клеток путем продукции активных форм кислорода, нарушают связывание антиген-специфических белков с CD8Т-клетками путем инактивации тирозинкиназ в CD8 рецепторах Т-клеток и ингибируют представление антигена опухолевыми клетками путем подавления экспрессии опухолевого главного комплекса гистосовместимости [174].

TILs – это только один из компонентов микроокружения опухоли, помимо мезенхимальных клеток и внеклеточного матрикса. Внеклеточный матрикс функционирует как структурный каркас, обеспечивает передачу биохимических и биомеханических сигналов, влияющих на рост, выживание, миграцию, дифференцировку клеток [271]. Взаимное влияние субпопуляций TILs и других компонентов микроокружения опухоли за счет цитокинов и хемокинов приводит к сложному взаимодействию, способному влиять как на стимуляцию, так и на подавление роста опухоли:

1. Цитокины и хемокины: клетки стромы и иммунной системы продуцируют различные цитокины, оказывающие регуляторное влияние на различные субпопуляции иммунных клеток. Например, трансформирующий ростовой фактор бета подавляет транскрипцию генов в CD8-клетках, что приводит к нарушению цитолитической активности [346]. Опухолевые клетки выделяют лиганды, такие как полипептидная последовательность главного комплекса гистосовместимости, которые приводят к истощению рецепторов Т-клеток и ослабляют реакции специфических эффекторных клеток в ответ на опухолевые антигены [139]. Таким образом, цитокины, секретируемые в микроокружении опухоли, препятствуют презентации антигенов Т-клеткам и способны подавлять ответ Т-клеток на опухоль.

2. Коингибирующие и костимулирующие рецепторы и лиганды: активация Т-клеток зависит от распознавания антигенпредставляющих клеток хозяина и наличия коингибирующего или костимулирующего сигнала семейства CD28-B7 путем взаимодействия рецепторов и лигандов между Т-клетками, антигенпредставляющими клетками или злокачественными клетками. Ряд B7-лигандов (PD-L1, B7-H3, B7х, HHLA2) ингибирует ответ Т-клеток в отношении опухолевых клеток. Экспрессия данных лигандов при РМЖ ассоциирована с неблагоприятными клиническими признаками [170]. Например, доказано, что экспрессия коингибирующего рецептора PD-1 связана с уменьшением общей выживаемости при РМЖ [328].

На стимуляцию и функцию TILs влияет сложное взаимодействие неоантигенов, коингибирующих лигандов для опухоли, коингибиторных рецепторов для TILs, субпопуляций клеток в микроокружении опухоли [214, 309].

Взаимосвязь количества TILs и прогноза заболевания оценена ретроспективно в работе M. V. Dieci и соавт. Было проанализировано 817 случаев РМЖ с поражением или без поражения аксиллярных лимфатических узлов. Данные были получены в рамках 2 крупных рандомизированных исследований. В группе ТНРМЖ увеличение количества внутриопухолевых и стромальных TILs было ассоциировано с увеличением безрецидивной выживаемости. Увеличение количества TILs на 10 % было значимо связано с уменьшением риска рецидива болезни на 14 и 13 % (ОР 0,86; 95 % ДИ 0,78–0,94 и ОР 0,87; 95 % ДИ 0,80–0,94) соответственно. TILs оказались прогностически благоприятным фактором как при проведении адьювантной химиотерапии, так и при ее отсутствии [100]. В другом многоцентровом исследовании III фазы FinHER, посвященном оценке адьювантной химиотерапии, было включено 1010 больных РМЖ высокого риска с поражением или без поражения аксиллярных лимфатических узлов. В анализируемой группе пациентов с ТНРМЖ ($n = 134$) повышение количества TILs на каждые 10 % сопровождалось снижением риска рецидива болезни на 13 % (ОР 0,77; 95 % ДИ 0,61–0,98, $p = 0,02$). Таким образом,

в независимых исследованиях подтверждена прогностическая роль TILs при резектабельном ТНРМЖ.

Влияние TILs на прогноз при HER2-положительном подтипе РМЖ продемонстрировано в ряде работ. В упомянутое рандомизированное многоцентровое исследование III фазы FinHER было включено 209 пациентов с HER2-положительным РМЖ. Увеличение количества стромальных TILs на каждые 10 % сопровождалось улучшением безрецидивной выживаемости (ОР 0,77; 95 % ДИ 0,61–0,98) [214]. Также связь между количеством стромальных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов и прогнозом заболевания была проанализирована в исследовании № 9831, в котором оценена эффективность адъювантной химиотерапии отдельно или в сочетании с трастузумабом при HER2-положительном РМЖ [263]. Высокая (>60 %) плотность стромальных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, частота которой составила 9,9 % ($n = 94$), была независимо связана с улучшением безрецидивной выживаемости у пациентов, получивших только химиотерапию, но не у пациентов, получивших химиотерапию в сочетании с трастузумабом. У пациентов, получивших только химиотерапию, 10-летняя безрецидивная выживаемость составила 90 % и 64,5 % при высокой и низкой плотности опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, соответственно (ОР 0,23; 95 % ДИ 0,073–0,73). Анализ подгруппы больных HER2-положительным РМЖ с поражением аксиллярных лимфатических узлов в исследовании III фазы BIG-02-98 продемонстрировал значимое положительное влияние увеличения плотности TILs (с шагом 10 %) в группе больных HER2-положительным РМЖ, получивших адъювантную химиотерапию антрациклинами без добавления трастузумаба. В группе пациентов, прошедших лечение антрациклинами и доцетакселом, такого результата не наблюдалось. На основании этих данных можно сделать вывод о том, что высокая плотность TILs является прогностически благоприятным фактором при HER2-положительном РМЖ.

Данные о том, что TILs можно рассматривать как благоприятный фактор у пациентов с ЭР-положительным HER2-отрицательным РМЖ, ограничены.

Опубликованные результаты рандомизированного исследования M. V. Dieci и соавт. свидетельствуют об отсутствии положительного прогностического влияния TILs у больных с ЭР-положительным HER2-отрицательным РМЖ [101].

Неoadьювантная химиотерапия местнораспространенного РМЖ сопровождается высокой частотой клинического ответа (70–90 %). Несмотря на это, ПМР (полное отсутствие резидуальной опухоли) наблюдается лишь у 10–25 % пациентов [311]. ПМР – показатель, связанный с долгосрочным благоприятным прогнозом, в особенности при HER2-положительном РМЖ и ТНРМЖ [78]. В связи со своей прогностической значимостью показатель разрешен американским Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration) к применению при ускоренном одобрении новых препаратов для лечения местнораспространенного РМЖ, нуждающихся в неoadьювантной химиотерапии [276]. Пациенты с резидуальной болезнью имеют различный прогноз, однако известно, что наличие резидуальной опухоли при ТНРМЖ и HER2-положительном РМЖ обуславливает высокий риск рецидива [330].

C. Denkert и соавт. проанализировали количество TILs в 1058 образцах опухолевой ткани, полученной до начала лечения у пациентов, участвовавших в исследованиях Gepar-Duo и Gepar-Trio (III фаза клинических исследований эффективности неoadьювантной химиотерапии). Количество стромальных TILs >10 % оказалось независимым предиктивным фактором для ПМР в обеих группах [92]. Частота ПМР составила 42 и 40 % соответственно. При опухолях с низким уровнем TILs частота ПМР составила 3 и 7 % соответственно. В другом исследовании эффективности неoadьювантного режима химиотерапии с добавлением карбоплатина к комбинации таксанов и антрациклинов Gepar-Sixto у 580 пациентов частота ПМР составила 76,2 % при ЛДРМЖ (>60 % внутри-опухолевых и стромальных TILs) по сравнению с 52,2 % при случаях без ЛДРМЖ ($p = 0,01$) у больных ТНРМЖ [95].

Y. Мао и соавт. провели метаанализ 13 исследований эффективности неoadьювантной химиотерапии (всего 3251 случай ТНРМЖ).

Продемонстрирована более высокая частота ПМР при высоком уровне TILs в морфологическом материале, полученном до начала терапии [223]. Более высокая плотность TILs была связана с увеличением частоты ПМР при неoadьювантной химиотерапии (отношение шансов (ОШ) 3,93; 95 % ДИ 3,26–4,73, $p < 0,001$; для внутриопухолевых TILs ОШ 4,15; 95 % ДИ 2,95–5,84; $p < 0,001$; для стромальных TILs ОШ 3,58; 95 % ДИ 2,50–5,13; $p < 0,001$). Уровень TILs имел прогностическое значение для ТНРМЖ, HER2-отрицательного РМЖ.

В исследовании N. Oda и соавт. при РМЖ II–III стадий ($n = 180$) наличие в опухоли FOXP3 и CD8 было связано с высокой частотой ПМР ($p < 0,001$ и $p = 0,007$ соответственно) [253]. Инфильтрация FOXP3 оказалась значимым независимым предиктивным фактором для ПМР ($p = 0,014$), а при инфильтрации CD8-клетками такой взаимосвязи не обнаружено. A. N. Seo и соавт. при изучении 153 образцов опухолевой ткани установили, что высокий уровень TILs CD8+ в материале биопсии до начала лечения являлся независимым прогностическим фактором эффективности неoadьювантной химиотерапии [304].

В исследовании Gepar-Quattro изучалась связь ответа на неoadьювантное лечение трастузумабом в комбинации с химиотерапией и количества TILs у 156 больных HER2-положительным РМЖ. Увеличение уровня TILs на каждые 10 % сопровождалось увеличением частоты ПМР (ОШ: 1,14; 95 % ДИ 1,01–1,29) [213]. В исследовании Gepar-Sixto изучалось влияние добавления карбоплатина к комбинации таксанов и антрациклинов у 580 больных ТНРМЖ и HER2-положительным РМЖ [95]. Частота ПМР была значительно выше в группе пациентов с лимфоцит-доминирующим РМЖ (ЛДРМЖ) в сравнении с группой без ЛДРМЖ (59,9 против 33,8 %, $p = 0,001$). ПМР была значительно выше в группе с ЛДРМЖ как при использовании карбоплатина, так и без него (46,6 % против 33,5 %; $p = 0,05$; >75 % против 38,1 %; $p = 0,05$) [298].

Крупный метаанализ, в который было включено 13 клинических исследований (3555 случаев РМЖ), продемонстрировал, что высокий уровень

TILs в материале биопсии до начала неoadъювантной химиотерапии при ТНРМЖ и HER2-положительном РМЖ был ассоциирован с высокой частотой ПМР. Корреляции между частотой ПМР и уровнем TILs не наблюдалось при ЭР-положительном HER2-отрицательном РМЖ [223]. Высокий уровень Т-лимфоцитов CD8⁺ в опухоли до начала лечения (ОШ 3,36; 95 % ДИ 1,15–9,85) и после неoadъювантной терапии (ОШ 4,71; 95 % ДИ 1,29–17,27) был ассоциирован с высокой частотой ПМР. При HER2-положительном РМЖ высокий уровень TILs позволяет предсказывать эффективность не только неoadъювантного лечения трастузумабом, но и неoadъювантной химиотерапии [223]. N. R. West и соавт. также изучили влияние количества TILs на эффективность химиотерапии. Исследованы 368 образцов ткани опухоли, взятых до начала лечения в 2 группах с ЭР-отрицательным РМЖ (исследования EORTC 10994 и BIG 00-01), высокий уровень TILs CD8⁺ оказался независимым предиктивным фактором эффективности антрациклинов [362].

Влияние TILs на прогноз эффективности эндокринотерапии изучено недостаточно. По данным M. S. Chan и соавт., у больных ЭР-положительным РМЖ, получавших неoadъювантную гормонотерапию ингибиторами ароматазы, изменение отношения количества Т-клеток CD8⁺ к количеству FOXP3⁺ или регуляторных Т-клеток до и после терапии коррелировало с ответом на гормонотерапию. Значимое увеличение соотношения CD8⁺ и регуляторных Т-клеток наблюдалось при эффективности гормонотерапии ($p = 0,028$) и отсутствовало при ее неэффективности [65]. Таким образом, данное соотношение может служить суррогатным предиктивным маркером эффективности неoadъювантной гормонотерапии.

M. V. Diesti и соавт. ретроспективно проанализировали 304 случая ТНРМЖ с наличием резидуальной опухоли после неoadъювантной химиотерапии и установили, что наличие TILs в опухоли было связано с более благоприятным прогнозом. Плотность стромальных TILs, как и внутриопухолевых TILs, оказалась фактором благоприятного прогноза в отношении безрецидивной и общей выживаемости. Пятилетняя общая выживаемость составила 91 % в

подгруппе с высокой плотностью TILs и 55 % в подгруппе с низкой плотностью TILs (OR 0,19; 95 % ДИ 0,06–0,61). Прогностическое влияние TILs было наиболее значимым для пациентов с размером первичной опухоли >2 см или наличием метастазов в аксиллярных лимфатических узлах [100].

На основании представленных выше данных можно сделать вывод о том, что плотность TILs является достоверным прогностическим, а также предиктивным биомаркером эффективности неoadьювантного лечения ТНРМЖ и HER2-положительного РМЖ. Оценка плотности стромальных TILs в сравнении с оценкой внутриопухолевых TILs является более удобным методом с более воспроизводимыми результатами.

Таким образом, данные литературы свидетельствуют об актуальности изучения молекулярно-генетических и биологических маркеров РМЖ, альтернативных стандартным маркерам, широко вошедшим в рутинную клиническую практику. Индивидуализация лечения РМЖ на основе анализа прогностических и/или предиктивных маркеров, является важным и активно развивающимся направлением современной онкологии. Персонализированный подход позволяет повысить эффективность лечения и качество жизни пациента, а также снизить затраты на оказание медицинской помощи за счет выбора оптимальной схемы лечения. Вместе с тем, в мире в практическом здравоохранении исследования биомаркеров при РМЖ до сих пор не имеют широкого применения из-за высокой стоимости, сложности проведения и отсутствия достаточного объема данных, доказывающих их прогностическую и предиктивную ценность при планировании и проведении системной химиотерапии. Необходимость в новых научных данных, практических рекомендациях и разработках в данной области определило актуальность проведения настоящего исследования.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. План работы и общее описание дизайна исследования

Для проведения комплексных многоплановых исследований была разработана программа, которая включала следующие этапы:

1. Сбор первичной информации, анализ данных литературы по клиническим, патоморфологическим, прогностическим и предиктивным факторам при РМЖ.
2. Выбор исследуемой группы, сбор и обработка данных для оценки изучаемых анамнестических, клинических, патоморфологических и иммуногистохимических параметров (ретроспективное когортное исследование данных канцер-регистра).
3. Гистологические, иммуногистохимические и молекулярно-генетические исследования образцов ткани пациенток с РМЖ (ретроспективное когортное исследование).
4. Статистический анализ данных и интерпретация полученных результатов.
5. Разработка и внедрение способа многофакторного прогноза РМЖ.

Дизайн исследования представлен на Рисунке 9 и Рисунке 10.

Исследование было одобрено Комитетом по этике ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (выписка №6/145 от 24.09.2019, выписка №51/283 от 22.10.2020, выписка №6/35 от 26.02.2021).

2.2. Ретроспективный анализ данных канцер-регистра

Проведено ретроспективное исследование, в рамках которого были проанализированы данные, полученные из объединенного канцер-регистра ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия) за 2000–2012 гг. (авторы идеи создания данного канцер-регистра – член-корр. РАМН, д.м.н., проф. В.Ф. Семиглазов, к.м.н. Р.М. Палтуев). В регистре содержалась информация о диагностике, лечении и выживаемости нескольких тысяч больных РМЖ, внесенная по 32 параметрам:

Ретроспективное когортное одноцентровое исследование с проспективным пересмотром блоков опухоли

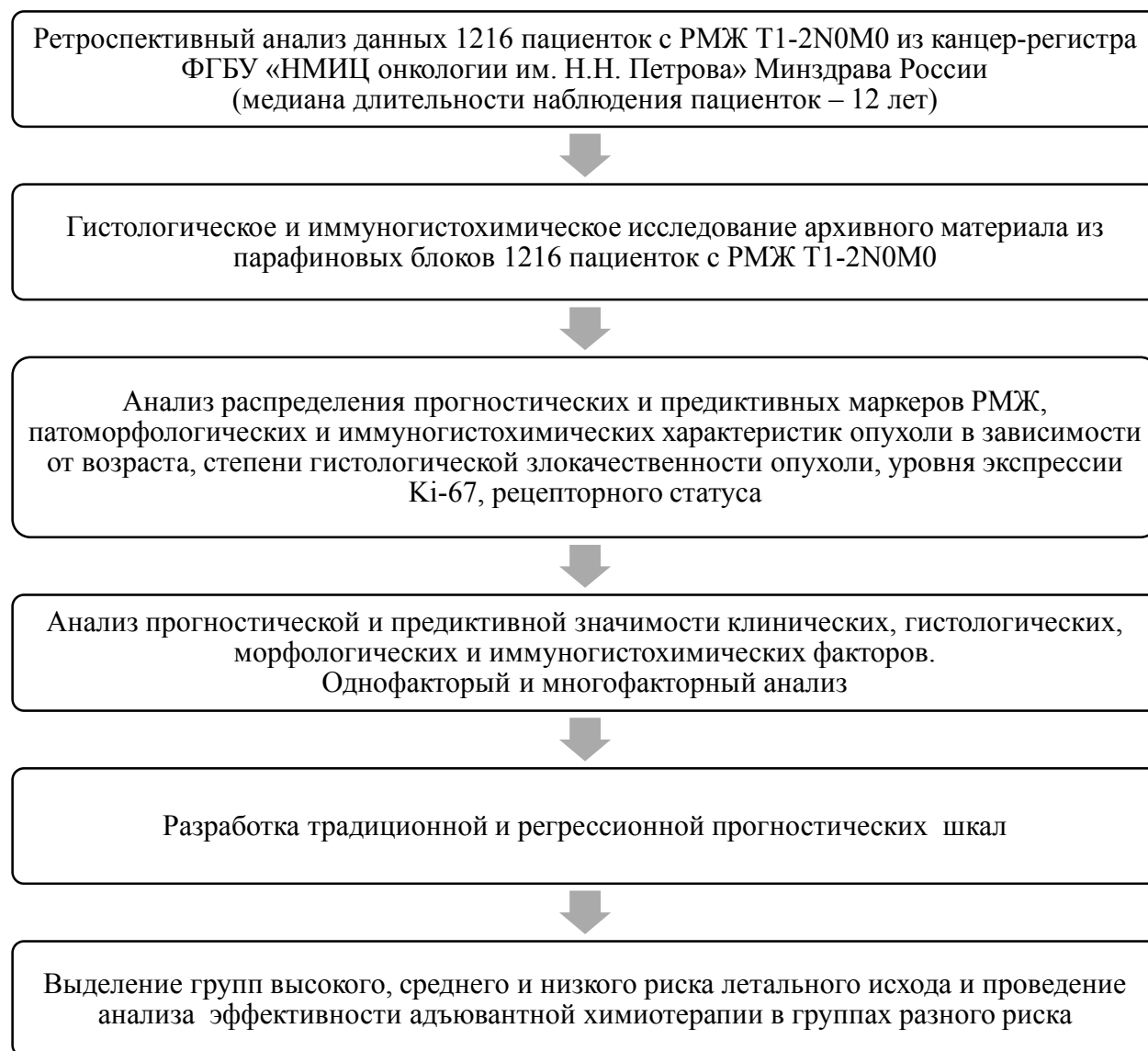


Рисунок 9 – Дизайн исследования в популяции пациенток с РМЖ T1-2N0M0

Проспективное когортное многоцентровое исследование

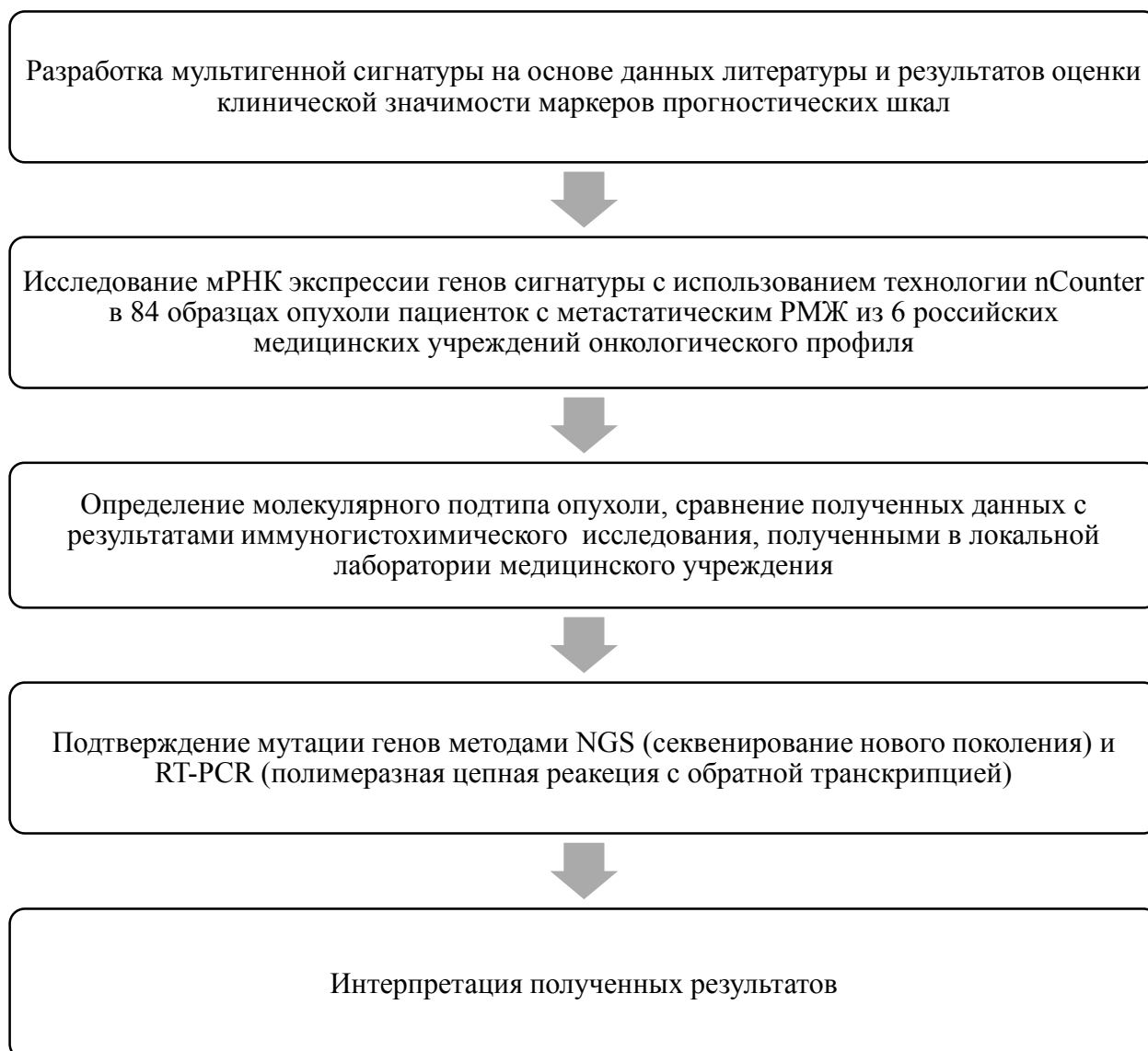


Рисунок 10 – Дизайн исследования в популяции пациенток с метастатическим РМЖ

1) Паспортные данные и контакты: ФИО, возраст, номер паспорта, адрес проживания, номер телефона.

2) Оперативное лечение и патоморфологическое исследование: объем оперативного лечения; размеры опухоли; состояние подмышечных лимфатических узлов мультифокальность или мультицентричность опухоли; ее гистологический тип; стадии заболевания (сTNM и pTNM); степень гистологической злокачественности по шкале Элстона–Эллиса; наличие инвазии лимфатических сосудов и выраженного внутрипротокового компонента; уровень экспрессии эстрогеновых и прогестероновых рецепторов (ЭР и ПР), эпидермального фактора роста HER2.

3) Предоперационное лечение: схема системного лечения; размеры опухоли до и после неoadъювантного лечения, определяемые клинически, маммографически и по данным ультразвукового исследования; степень патоморфологического регресса по классификации Миллера–Пэйна (Miller–Payne).

4) Послеоперационное лечение: вид адъювантного лечения – схемы, дозы препаратов, количество циклов.

5) Данные о выживаемости: местно-регионарный рецидив (дата); отдаленные метастазы (дата, локализация); жизненный статус на протяжении 10-летнего периода наблюдения (жива, умерла, причины смерти).

Данные для расчета показателей безрецидивной и общей выживаемости были получены путем приглашения больных на периодические обследования, посредством прямых телефонных контактов с больными или их родственниками, путем выкопировки из амбулаторных карт, а также извлечены из базы данных о льготных категориях населения, баз данных ЗАГСов и МВД г. Санкт-Петербурга. Информация о выживаемости была получена в 85–92 % случаев в зависимости от года лечения пациента.

Для целей настоящего исследования был проведен ретроспективный анализ данных пациенток из канцер-регистра, имеющих T1-2N0M0 стадию на момент операции. Общая численность исследуемой популяции составила 1216

женщин. План анализа включал оценку следующих анамнестических, клинических, патоморфологических и иммуногистохимических данных канцер-регистра у пациенток исследуемой популяции: возраст на момент операции, стадия pTNM, размеры опухоли до лечения, вид неoadъювантной и адъювантной терапии, длительность наблюдения после операции, данные о рецидиве и выживаемости, степень гистологической злокачественности по Elston–Ellis, уровень экспрессии ЭР, ПР, HER2 (в случае отсутствия результатов лабораторных исследований, в регистр вносились и затем анализировались данные, полученные по результатам анализа архивных материалов, описанных в Разделе 2.2).

Основные характеристики исследуемой популяции приведены в Таблице 2. Представленные результаты демонстрируют, что средний (\pm SD) возраст пациенток на момент операции составлял 55,66 (\pm 10,90) лет (размах: 24–84), средний размер опухоли до лечения – 2,24 (\pm 0,87) см (размах: 0,5–6,0), максимальный размер – 2,33 (\pm 1,00) см (размах: 0,30–15,00).

Средние (\pm SD) значения оцениваемых маркеров составили: клеточная плотность – 5887,61 (\pm 3 192,83) клеток/мм², ЭР – 3,80 (\pm 3,94) баллов, ПР – 3,21 (\pm 3,79) баллов, Ki-67 – 20,02 (\pm 20,96) %. Отмечалась высокая вариабельность данных по уровню экспрессии ЭР ($V = 104,0$ %), экспрессии ПР ($V = 118,0$ %) и активности гена Ki-67 ($V = 105,0$ %).

Медиана длительности наблюдения пациенток после операции составила 12 лет.

Летальный исход был зарегистрирован у 206 из 1216 пациенток (16,9%).

Обобщенные данные об адъювантной (послеоперационной) терапии пациенток исследуемой популяции приведены в Таблице 3. Данную терапию получили 1034 (85,0 %) женщин исследуемой популяции. Остальные 182 пациентки (15,0 %) находились под наблюдением.

Таблица 2 – Возраст больных и клиничко-морфологические характеристики опухоли пациенток исследуемой популяции

Показатель	N (%)*	M ± SD	V, %	Me [LQ; UQ]	Min; Max
Возраст на момент операции, лет	1175 (96,63)	55,66 ± 10,90	20,00	55,00 [48,00; 63,00]	24,00; 84,00
Маркеры					
Клеточная плотность, клеток/мм ²	723 (59,46)	5 887,61 ± 3 192,83	54,00	5 329,80 [4 276,00; 6 826,86]	940,84; 48 521,89
ЭР, баллы по шкале Allred	741 (60,94)	3,80 ± 3,94	104,00	0,00 [0,00; 8,00]	0,00; 8,00
РП, баллы по шкале Allred	741 (60,94)	3,21 ± 3,79	118,00	0,00 [0,00; 8,00]	0,00; 10,00
Ki-67, %	732 (60,20)	20,02 ± 20,96	105,00	11,92 [5,35; 26,10]	0,00; 96,76
Размер опухоли					
Размеры опухоли до лечения, см	1109 (91,20)	2,24 ± 0,87	39,00	2,00 [1,50; 2,80]	0,50; 6,00
Максимальный размер опухоли, см	1133 (93,17)	2,33 ± 1,00	43,00	2,20 [1,50;3,00]	0,30; 15,00
Длительность наблюдения после операции, лет	1191 (97,94)	12,27 ± 3,60	29,00	12,00 [10,00;16,00]	0,00; 18,00

Примечание: *Представлено N, абсолютное число (процент, %) пациенток исследуемой популяции (n=1216) с имеющимися данными по соответствующему параметру.

Таблица 3 – Данные об адъювантной терапии пациенток исследуемой популяции

Вид терапии	n/N (%)*
Гормонотерапия	477/1034 (46,1)
Химиотерапия	334/1034 (32,3)
Гормоно- и химиотерапия	215/1034 (20,8)
Гормонотерапия, химиотерапия, таргетная терапия	6/1034 (0,6)
Химиотерапия, таргетная терапия	2/1034 (0,2)

Примечание: *Представлено n, число пациенток в соответствующей категории / N, число пациенток с имеющимися данными по параметру (процент, %)

2.3. Гистологические и иммуногистохимические исследования образцов ткани рака молочной железы

Гистологические и иммуногистохимические исследования были проведены в лаборатории ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России.

В рамках настоящей работы был проведен анализ архивного материала из парафиновых блоков опухолей исследуемой популяции 1216 больных с T1–2N0M0 РМЖ.

Образцами опухолевой ткани могли быть биоптаты и операционный материал. Предпочтительным считали исследование гистологических препаратов, приготовленных в виде тонких срезов 3–4 мкм, фиксированных в парафине образцов опухолевой ткани (парафиновых блоков), которые были окрашены гематоксилином и эозином.

Для оценки степени злокачественности опухоли использовали классификацию Elston–Ellis: G1 – низкая (высокодифференцированная), G2 – умеренная (умеренно дифференцированная), G3 – высокая (низкодифференцированная).

Для оценки клеточной плотности с помощью компьютерного оборудования, снабженного пакетом специализированных программ, получали

сканированное цифровое изображение исследуемого гистологического препарата, выделяли на нем множество цифровых полей зрения в областях, где присутствуют клеточные структуры РМЖ, при этом целесообразным считали, чтобы суммарная площадь цифровых полей зрения составляла не менее 1 мм² площади гистологического препарата. Затем автоматически с помощью специальных программ рассчитывали площадь каждого цифрового поля зрения и подсчитывали в нем количество опухолевых клеток. На основании полученных данных определяли среднее значение клеточной плотности, приведенное к 1 мм² площади исследуемого гистологического препарата.

Для иммуногистохимических исследований архивный материал был окрашен антителами как к широко используемым в настоящее время маркерам (ЭР, ПР, HER2, Ki-67), так и к малоизученным маркерам (СК 14, FOXA1, FOXP3, PDL1, P53, актин гладкомышечный (SMA), андрогена рецепторы (AR), E-кадгерин (E-cadherin), CD4, CD8, СК 5\6, EGFR). Анализ образцов ткани проводился с использованием метода тканевых матриц. Характеристики используемых методик для каждого вида маркера приведены в Таблице 4 ниже.

Иммуногистохимическая картина положительного и отрицательного результатов по различным видам маркеров представлена на Рисунке 11.

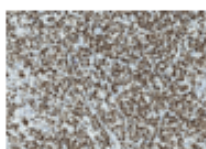
Таблица 4 – Методы иммуногистохимических исследований образцов ткани опухоли

Антитело	Клон	Производитель	Время инкубации	Титр	Система визуализации	Обработка
СК 14	LL002	Leika	30 мин	1:50	EnVision Flex	TRS 9,0
FOXA1	SP133	CMQ	30 мин	1:100	EnVision Flex	TRS 9,0
FOXP3	EP 340	Epitomix	о/н	1:50	EnVision Flex	TRS 9,0
PDL1	rmAb ZR3	GeneTech	50 мин	1:100	EnVisionFlex	TRS9,0
P53	клон DO7	DAKO	30 мин	1:100	EnVision Flex	TRS 6,0
Актин гладкомышечный	1A4	CMQ	30 мин.	1:100	EnVision Flex	TRS 9,0

Антитело	Клон	Производитель	Время инкубации	Титр	Система визуализации	Обработка
Андрогена рецепторы	AR441	ДАКО	30 мин.	1:100	EnVision Flex	TRS 9,0
Е-кадхерин	М	DBS	30 мин.	1:40	EnVision Flex	TRS 9,0
Вентана						
CD4	SP35		32 мин.	RTU	UltraView	CCI/96°C/S
CD8	SP57		32 мин.	RTU	UltraView	CCI/96°C
СК 5\6	D5/16B4		32 мин.	RTU	UltraView	CCI/96°C/S64
EGFR	3C6		36 мин	RTU	UltraView	Protease1/8мин
ER	SP1		36 мин	RTU	UltraView	CCI/98°C/S64
HER2	4B5		36 мин	RTU	UltraView	CCI/96°C/S36
Ki-67	30.9		32 мин	RTU	UltraView	CCI/96°C/S64
PROGESTERON (PR)	1E2		24 мин	RTU	UltraView DAB	CCI/96°C/S64
PDL1	22C3	ДАКО	По протоколу стейнера			



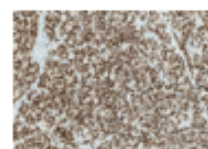
Ki 67-8%



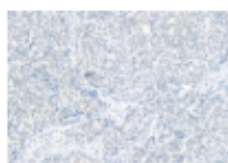
Ki 67-80%



P53 - отсутствует



P53 - позитив



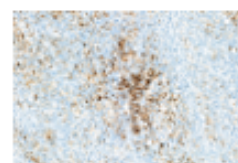
FOX P3 отсутствует



FOX P3 Положит



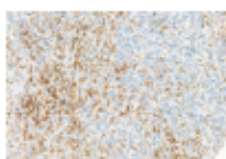
PDL1-отрицат



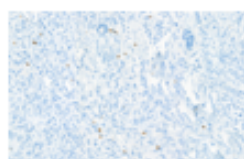
PDL1 - позитив



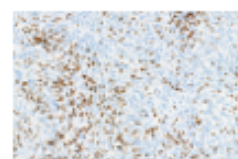
CD4 отсутствует



CD4 положит



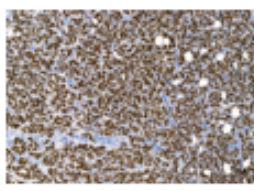
CD8 отсутствует



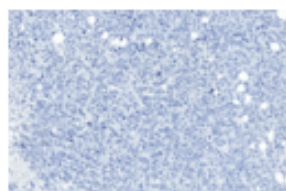
CD8 положит



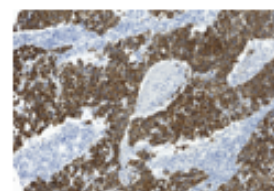
FOX A1 негатив



FOX A1 позитив



СК 5 негатив



СК 5 позитив

Рисунок 11 – Иммуногистохимическая картина биоптатов опухоли

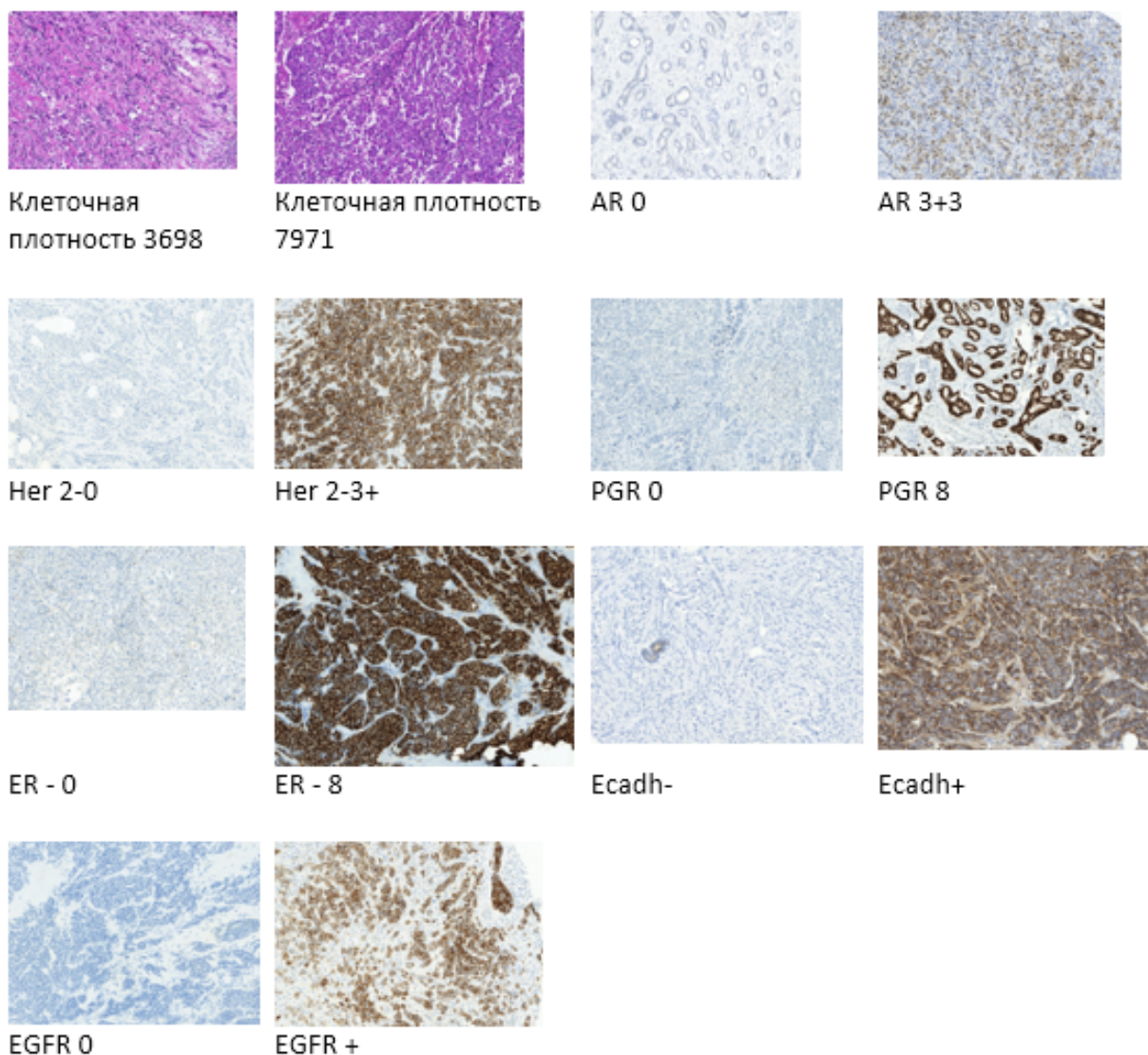


Рисунок 11 – Иммуногистохимическая картина биоптатов опухоли (продолжение)

2.4. Молекулярно-генетические исследования образцов ткани рака молочной железы

В рамках данной части исследования в образцах опухолевой ткани пациенток с метастатическим РМЖ изучали мРНК экспрессию 100 генов, участвующих в развитии РМЖ.

Образцы опухолей были предоставлены ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, ГБУЗ НО «Нижегородский областной клинический онкологический диспансер», КГБУЗ «Алтайский краевой

онкологический диспансер», ОБУЗ «Ивановский областной онкологический диспансер», ГБУЗ СК «Пятигорский межрайонный онкологический диспансер», ГБУЗ СК «Ставропольский краевой клинический онкологический диспансер» (всего 84 образца). У всех пациенток было получено письменное согласие на исследование образцов опухолевой ткани. Назначение лекарственной терапии проводилось лечащим врачом по данным ИГХ на основании Клинических рекомендаций Министерства здравоохранения Российской Федерации «Рак молочной железы» [8].

Предварительно в качестве тестового исследования был проведен анализ архивного материала из парафиновых блоков опухолей 12 женщин из 1216 больных с T1–2N0M0 РМЖ, включенных в ретроспективный анализ (Глава 2.1).

Анализ экспрессии генов проводили с использованием технологии nCounter, основанной на прямой цифровой детекции мишеней с помощью флуоресцентных штрих-кодов (nCounter Analysis System компании NanoString). Исследуемым материалом являлись образцы опухолевой ткани (биоптаты или операционный материал). Основные этапы технологии nCounter включают гибридизацию, пробоподготовку (отмывка не связавшихся проб, иммобилизация проб на картридже, выравнивание в электромагнитном поле), цифровой подсчет штрих-кодов. К преимуществам данной технологии относятся: анализ до 800 мишеней в одной пробе; не требуется предварительная обратная транскрипция и амплификация; высокая воспроизводимость результатов; автоматизированный рабочий процесс; простая обработка данных; низкая чувствительность к качеству образца. Продемонстрирована сопоставимость результатов технологии nCounter с данными количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (qRT-PCR), иммуногистохимии (ИГХ) и флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) [164].

Для очистки РНК из залитых парафином образцов ткани использовали набор компании Norgen (Канада). Технология очистки основана на хроматографии со спин-колонкой с использованием в качестве сепарационной матрицы патентованной смолы Norgen. РНК очищалась от других клеточных

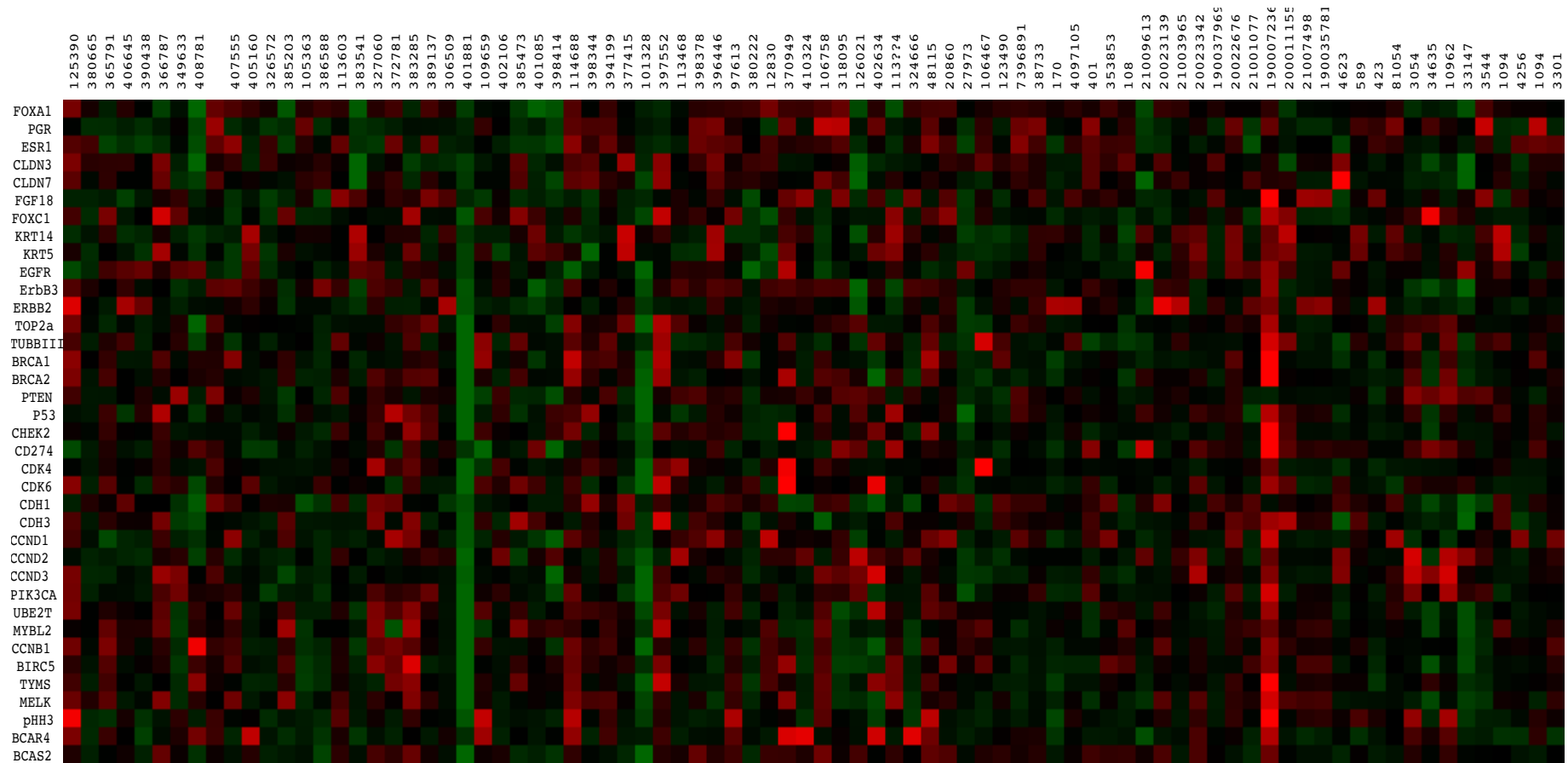
компонентов без использования фенола или хлороформа. Сначала процесс включал депарафинизацию образцов ткани посредством серии промываний ксилолом и этанолом. Затем образцы ткани гидролизовали протеиназой К и буферным раствором для гидролиза А. Затем к лизату добавляли буферный раствор RL и этанол, и раствор загружали на спин-колонку. Смола Norgen связывает нуклеиновые кислоты способом, который зависит от концентраций ионов, таким образом с колонкой связывалась только РНК, в то время как другие контаминанты удалялись с потоком или задерживались наверху смолы. В этот момент любые оставшиеся следы геномной ДНК могли быть гидролизованы, используя протокол по выбору, что позволяло выделить образцы чистой РНК. Затем связанную РНК промывали прилагаемым раствором для промывания РНК А для удаления каких-либо примесей, и очищенную общую РНК элюировали раствором для элюирования А.

Состав изучаемой мультигенной сигнатуры приведен в Таблице 5 и на Рисунке 12. Выбор генов основывался на результатах изучения данных литературы и опыта разработки других мультигенных структур (Глава 1), а также клинической значимости маркеров прогностических шкал (Глава 3).

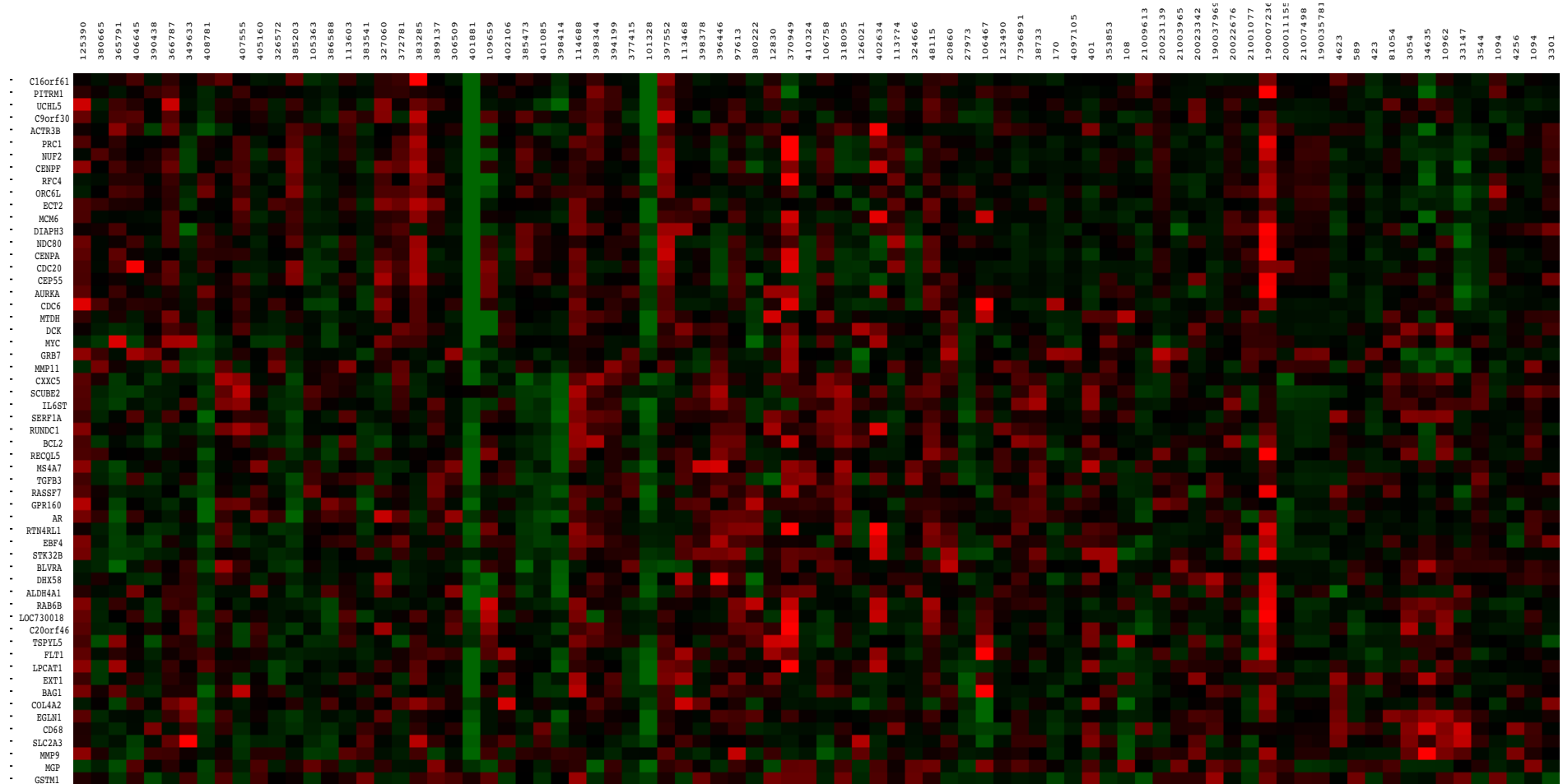
Исследования с целью подтверждения мутации генов проводили методами NGS (секвенирование нового поколения) и RT-PCR (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией) в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (научный отдел биологии опухолевого роста, руководитель: д.м.н., профессор Имянитов Е.Н.).

Таблица 5 – Исследуемая 100-генная сигнатура для РМЖ

Пролиферативно-референсная часть				Лечебно-ориентированная часть		Референс
Ген	Ссылка	Ген	Ссылка	Ген	Ссылка	
<i>ACTR3B</i>	PAM50	<i>MYC</i>	PAM50	<i>BCAR4</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000262117	<i>ACTB</i>
<i>ALDH4A1</i>	Mammaprint	<i>NDC80</i>		<i>BCAS2</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000116752	<i>GAPDH</i>
<i>AR</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000169083	<i>NUF2</i>	PAM50	<i>BIRC5</i>	Oncotype, PAM50, Endopredict	<i>GUS</i>
<i>AURKA</i>	Oncotype	<i>ORC6L</i>	Mammaprint, PAM50	<i>BRCA1</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000012048	<i>RPLPO</i>
<i>BAG1</i>	Oncotype, PAM50	<i>PITRM1</i>	Mammaprint	<i>BRCA2</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000139618	<i>TRFC</i>
<i>BCL2</i>	Oncotype, PAM50	<i>PRC1</i>	Mammaprint	<i>CCNB1</i>	Oncotype, PAM50	
<i>BLVRA</i>	PAM 50	<i>QSOX2</i>	Mammaprint	<i>CCND1</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000110092	
<i>CD68</i>	Oncotype	<i>RAB6B</i>	Mammaprint	<i>CCND2</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000118971	
<i>CDC20</i>	PAM 50	<i>RASSF7</i>	Mammaprint	<i>CCND3</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000112576	
<i>CDC6</i>	PAM 50	<i>RECQL5</i>	Mammaprint	<i>CD274</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000120217	
<i>CENPA</i>	Mammaprint	<i>RFC4</i>	Mammaprint	<i>CDH1</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000039068	
<i>CENPF</i>	PAM 50	<i>RTN4RL1</i>	Mammaprint	<i>CDH3</i>	PAM50	
<i>CEP55</i>	PAM 50	<i>RUNDC1</i>	Mammaprint	<i>CDK4</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000135446	
<i>C16orf61</i>	Mammaprint	<i>SCUBE2</i>	Mammaprint, Oncotype	<i>CDK6</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000105810	
<i>COL4A2</i>	Mammaprint	<i>SERF1A</i>	Mammaprint	<i>CHEK2</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000183765	
<i>CXXC5</i>	PAM 50	<i>SLC2A3</i>	Mammaprint	<i>uCLDN3</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000165215	
<i>DCK</i>	Mammaprint	<i>STK32B</i>	Mammaprint	<i>CLDN7</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000181885	
<i>DHX58</i>	Mammaprint	<i>TGFB3</i>	Mammaprint	<i>EGFR</i>	PAM50	
<i>DIAPH3</i>	Mammaprint	<i>C20orf46</i>	Mammaprint	<i>ERBB2</i>	Oncotype, PAM50	
<i>EBF4</i>	Mammaprint	<i>TSPYL5</i>	Mammaprint	<i>ErbB3</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000065361	
<i>ECT2</i>	Mammaprint	<i>UCHL5</i>	Mammaprint	<i>ESR1</i>	Oncotype, PAM50	
<i>EGLN1</i>	Mammaprint			<i>FGF18</i>	Mammaprint	
<i>EXT1</i>	Mammaprint			<i>FOXA1</i>	PAM50	
<i>FLT1</i>	Mammaprint			<i>FOXC1</i>	PAM50	
<i>GPR160</i>	PAM50			<i>pHH3</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000275714	
<i>GRB7</i>	Oncotype, PAM50			<i>KRT14</i>	PAM50	
<i>GSTM1</i>	Oncotype			<i>KRT5</i>	PAM50	
<i>IL6ST</i>	Endopredict			<i>MELK</i>	Mammaprint, PAM50	
<i>LOC730018</i>	Mammaprint			<i>MYBL2</i>	Oncotype, PAM50	
<i>LPCAT1</i>	Mammaprint			<i>PGR</i>	Oncotype, PAM50	
<i>MCM6</i>	Mammaprint			<i>PIK3CA</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000121879	
<i>MGP</i>	Mammaprint			<i>PTEN</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000171862	
<i>MMP11</i>	Oncotype, PAM50			<i>TOP2a</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000131747	
<i>MMP9</i>	Mammaprint			<i>P53</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000141510	
<i>MS4A7</i>	Mammaprint			<i>TUBBIII</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000198211	
<i>C9orf30</i>	Mammaprint			<i>TYMS</i>	PAM50	
<i>MTDH</i>	Mammaprint			<i>UBE2T</i>	PAM50	



(A) Лечебно-ориентированная часть



(Б) Пролiferативно-референсная часть

Рисунок 12 – Исследуемая 100-генная сигнатура для РМЖ (тепловая карта)

2.5. Методы статистического анализа

Для описания количественных показателей применялись среднее значение и стандартное отклонение в формате $M \pm SD$. На всех графиках для числовых показателей среднее арифметическое обозначено точкой, медиана обозначена горизонтальным отрезком, межквартильный размах представлен прямоугольником, минимальные и максимальные значения представлены вертикальными отрезками. Качественные показатели представлены в виде частот и долей в процентах. 95 % доверительные интервалы вокруг точечной оценки также представлены (где применимо).

Характеристики исследуемой популяции представлены дескриптивно для всей выборки без деления на группы. Анализ полноты данных производился на основе количества непропущенных данных и их доли в полном объеме в формате $N (\%)$. Для обозначения центрального положения и абсолютного разброса данных использовались среднее значение и стандартное отклонение в формате $M \pm SD$, а для оценки относительного разброса применялся коэффициент вариации V , который описывает однородность показателя и позволяет сопоставлять однородность разных переменных, независимо от их масштаба и единиц измерения. Принято считать, что, если уровень вариации $<10 \%$, то степень разброса данных незначительная, от 10 до 20% – средняя, $>20 \%$ и $\leq 33 \%$ – значительная; если значение коэффициента вариации не превышает 33% , то совокупность считается однородной, если больше 33% , то неоднородной. Для исследования структуры данных по каждому показателю применялись медиана и квартили в формате $Me [LQ; UQ]$, и минимум и максимум для оценки диапазона разброса значений показателя в формате $(min; max)$. Анализ соответствия распределения значений переменной закону нормального распределения производился на основе критерия Шапиро – Уилка (если $p > 0,05$, то распределение считается соответствующим нормальному закону; если $p \leq 0,05$, то распределение считается не соответствующим нормальному закону). Для бинарных и номинальных показателей проводился частотный анализ с

оценкой доли каждого значения в общей совокупности данных, а также исследование гипотезы об однородности встречаемости категорий признаков с помощью критерия χ^2 Пирсона. С помощью таблиц сопряженности, критерия χ^2 или точного критерия Фишера, а также мозаичных графиков было проверено наличие связей качественных показателей.

Сравнения двух групп по количественным шкалам проводились с помощью непараметрического критерия Манна – Уитни. Сравнения трех и более групп по количественным показателям проводились на основе непараметрического критерия Краскела – Уоллеса. Статистическая значимость различий групп для бинарных и категориальных шкал осуществлялась при помощи критерия χ^2 Пирсона.

Для анализа влияния сразу нескольких независимых факторов на зависимую применялся многофакторный дисперсионный анализ (MANOVA) – метод, который дает оценить не только влияние каждой независимой показателя на зависимую переменную, но и определить статистическую значимость взаимодействия этих независимых переменных. Структура показывает, зависит ли величина воздействия показателя от уровней других переменных.

Показатели общей выживаемости рассчитывали по методу Каплана – Майера, позволяющему оценить кумулятивную долю выживших при динамическом наблюдении. Различия между сравниваемыми группами выявляли с помощью непараметрических статистических критериев (логарифмического рангового критерия). Отношение рисков (hazard ratio) оценивали с помощью регрессионной модели Кокса.

Для построения прогностической модели использовали метод логистической регрессии.

Уровень значимости устанавливался как двусторонний 0,05 для всех статистических тестов.

Корреляцию между уровнем экспрессии *ESR1* и *ERB2* и результатами ИГХ исследования ЭР и HER2 статуса оценивали с помощью критерия Краскела – Уоллеса.

Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью пакетов прикладных программ Statistica 10 и SAS JMP 11. Отдельные виды анализа были выполнены совместно с независимым биостатистиком (Центр Статистических Исследований STAT Research).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Анализ распределения прогностических и предиктивных маркеров рака молочной железы

Для целей настоящего исследования были проанализированы данные 1216 пациенток с T1-2N0M0 РМЖ.

Результаты анализа распределения прогностических и предиктивных маркеров РМЖ в исследуемой популяции обобщены в Таблице 6.

В исследуемой популяции преобладали женщины в возрасте ≥ 50 лет (69,1 %).

Оценка по системе TNM продемонстрировала преобладание стадии T1N0M0 (55,2 %). T2N0M0 была верифицирована у 44,8 % когорты.

У 52,0 % пациенток размер опухоли составлял более 2 см, у 46,2 % – от 1 до 2 см, у 1,8 % – менее 1 см.

При анализе гистологической злокачественности новообразований было установлено преобладание прогностически неблагоприятных степеней G2 (47,5 %) и G3 (36,9 %) опухолевого процесса, доля начальной степени формирования опухоли G1 была наименьшей (15,6 %).

Положительный HER2-статус наблюдался у 8,7 % женщин (ИГХ категория 3+), отрицательный HER2-статус – у 91,3 %, из них категория 0 была установлена у 70,6 %, категория 1+ – у 11,5 %, категория 2+ – у 9,2 % женщин.

В данном исследовании у 45,7 % женщин степень положительного окрашивания на ЭР достигла 7–8 баллов. Максимальная экспрессия ПР была установлена в 35,4 % случаев.

Уровень Ki-67 был 5 % и более у 76,9 % женщин, при этом приблизительно у половины пациенток (47,7 %) Ki-67 превысил 13 %.

Таким образом, внутри когорты с исходно сопоставимыми клиническими критериями опухоли (T1-2N0M0) регистрировался значительный разброс в распределении прогностических и предиктивных маркеров.

Таблица 6 – Распределение прогностических и предиктивных маркеров рака молочной железы в исследуемой популяции

Маркер	n/N (%)*
Возраст на момент операции:	
≥50 лет	812/1175 (69,1)
<50 лет	363/1175 (30,9)
Степень дифференцировки G:	
G2	479/1008 (47,5)
G3	372/1008 (36,9)
G1	157/1008 (15,6)
Экспрессия ЭР, баллы по шкале Allred:	
0	381/741 (51,4)
4–6	21/741 (2,8)
7–8	339/741 (45,7)
Экспрессия ПР, баллы по шкале Allred:	
0	424/741 (57,2)
3–6	55/741 (7,4)
7–8	262/741 (35,4)
Клинико-морфологические критерии опухоли по pTNM:	
T1N0M0	671/1216 (55,2)
T2N0M0	545/1216 (44,8)
Уровень экспрессии HER2, баллы:	
0	544/771 (70,6)
1	89/771 (11,5)
2	71/771 (9,2)
3	67/771 (8,7)
Уровень экспрессии Ki-67:	
≥5 %	563/732 (76,9)
<5 %	169/732 (23,1)
Уровень экспрессии Ki-67 с пограничным значением 13 %:	
<13 %	385/732 (52,6)
≥13 %	347/732 (47,4)

Маркер	n/N (%)*
Размер опухоли:	
<1 см	20/1133 (1,8)
1–2 см	524/1133 (46,2)
>2 см	589/1133 (52,0)

Примечание: *Представлено n, число пациенток в соответствующей категории / N, число пациенток с имеющимися данными по параметру (процент, %)

Данные о положительных маркерах CK 14, FOXA1, FOXP3, PDL1, P53, SMA, AR, E-cadherin, CD4, CD8, CK 5\6, EGFR у пациенток исследуемой популяции приведены в Таблице 7.

Таблица 7 – Распределение маркеров CK14, FOXA1, FOXP3, PDL1, P53, SMA, AR, E-cadherin, CD4, CD8, CK5\6, EGFR в исследуемой популяции

Маркер	n/N (%)
FOXA1	632/691 (91,5)
CD4	755/895 (84,4)
E-cadherin	613/784 (78,2)
CD8	579/849 (68,2)
AR	598/923 (64,8)
FOXP3	201/354 (56,8)
PDL	44/358 (12,3)
CK5	80/709 (11,3)
EGFR	99/912 (10,9)
CK14	32/449 (7,1)
P53	12/259 (4,6)
SMA	10/265 (3,8)

Примечание: *Представлено n, число пациенток в соответствующей категории / N, число пациенток с имеющимися данными по параметру (процент, %)

3.2. Анализ патоморфологических, иммуногистохимических характеристик опухоли в возрастных подгруппах <50 лет и ≥50 лет

Одним из рутинно используемых прогностических и предиктивных маркеров РМЖ на современном этапе признается возраст пациентки. Вместе с тем противоречивые данные о влиянии возраста на прогноз РМЖ при определенных молекулярных подтипах опухоли актуализируют дополнительные исследования в

этом направлении. В рамках настоящего исследования с целью повысить практическую значимость данного маркера был проведен сравнительный анализ рутинных критериев злокачественности опухоли в двух возрастных группах женщин (<50 лет и ≥ 50 лет).

Как следует из данных, представленных в Разделе 3.1, доля женщин старше 50 лет в 2 раза превышала число участниц более молодого возраста (69,1 % против 30,9 %).

Средний (\pm SD) возраст пациенток в пременопаузальной группе составил $43,21 \pm 4,95$ года, в постменопаузальной группе – $61,22 \pm 7,80$ года ($p < 0,0001$) (Таблица 8, Рисунок 13).

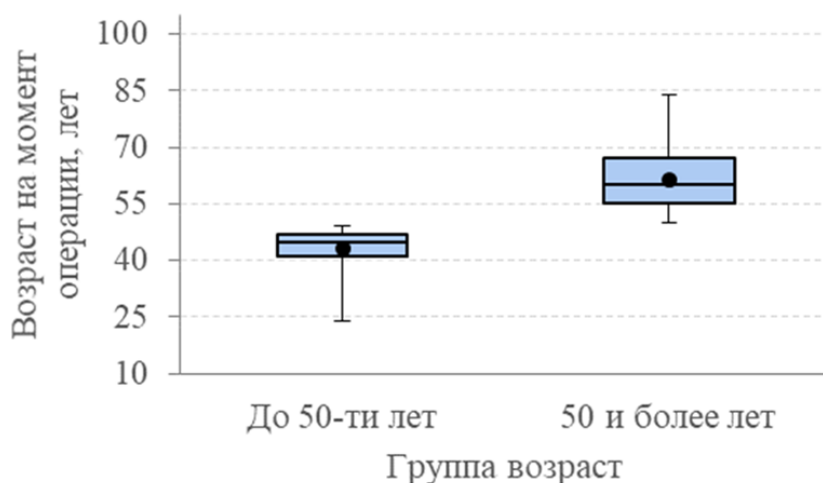


Рисунок 13 – Распределение женщин по возрастным группам

Сравнительный межгрупповой анализ не выявил статистически значимых различий по уровням экспрессии ЭР, ПР и Ki-67 у женщин двух сравниваемых возрастных групп ($p > 0,05$) (Таблица 8).

Таблица 8 – Характеристики опухоли в возрастных группах <50 лет и ≥50 лет

Показатель	Возрастная группа		Уровень <i>p</i>
	<50 лет (N=363)	≥50 лет (N=812)	
Личные данные			
Возраст на момент операции, лет	43,21 ± 4,95	61,22 ± 7,80	<0,0001
Рецепторный статус			
ЭР, баллы по шкале Allred	3,55 ± 3,95	3,85 ± 3,93	0,4048
ПР, баллы по шкале Allred	3,52 ± 3,90	3,09 ± 3,73	0,1270
Маркеры			
Ki-67, %	21,87 ± 23,28	18,90 ± 19,60	0,4948
Опухоль			
Максимальный размер опухоли	2,34 ± 1,13	2,31 ± 0,94	0,9805

Примечание: Данные представлены как M (±SD)

Оценка статистической значимости различий проведена с использованием критерия Манна - Уитни.

В анализируемых возрастных группах доли опухолей с соответствующими степенями дифференцировки были сопоставимы (Таблица 9). При этом преобладающей была степень G₂, которая была диагностирована у 46,26 % женщин пременопаузального возраста и у 48,39 % пациенток старше 50 лет. Степень G₁, занимая последнюю позицию, была верифицирована у 18,03 и 13,93 % женщин соответственно в возрасте моложе и старше 50 лет. При этом, несмотря на отсутствие статистически значимых различий, отмечена тенденция к преобладанию степени G₁ в когорте более молодых женщин.

Последующий анализ не выявил статистически значимых различий между сравниваемыми группами женщин по степени экспрессии генов-маркеров РМЖ (Таблица 9).

Таблица 9 – Рутинные опухолевые маркеры в возрастных группах <50 лет и ≥50 лет

Параметр	Возрастная группа		Уровень <i>p</i>
	<50 лет	≥50 лет	
Степень дифференцировки G:			
G ₂	136/294 (46,26)	330/682 (48,39)	0,2613
G ₃	105/294 (35,71)	257/682 (37,68)	
G ₁	53/294 (18,03)	95/682 (13,93)	
Группа ЭР:			
0	122/222 (54,95)	245/485 (50,52)	0,3137
4–6	4/222 (1,80)	17/485 (3,51)	
7–8	96/222 (43,24)	223/485 (45,98)	
Группа ПР:			
0	121/222 (54,50)	282/485 (58,14)	0,1047
3–6	12/222 (5,41)	42/485 (8,66)	
7–8	89/222 (40,09)	161/485 (33,20)	
HER2:			
0	154/224 (68,75)	376/522 (72,03)	0,7604
1	30/224 (13,39)	58/522 (11,11)	
3	19/224 (8,48)	45/522 (8,62)	
2	21/224 (9,38)	43/522 (8,24)	
Уровень Ki-67:			
≥5 % и более	161/212 (75,94)	380/493 (77,08)	0,7434
<5 %	51/212 (24,06)	113/493 (22,92)	
Уровень Ki-67:			
<13 %	115/212 (54,25)	259/493 (52,54)	0,6766
≥13 %	97/212 (45,75)	234/493 (47,46)	

Примечание: Представлено n, число пациенток в соответствующей категории / N, число пациенток с имеющимися данными по параметру (процент, %).

Оценка статистической значимости различий проведена с использованием критерия Хи-квадрат Пирсона.

Распределение по ПР-статусу значимо не различалось в сравниваемых возрастных группах женщин (Таблица 9). Однако у женщин в возрасте до 50 лет доля ПР-позитивных опухолей со степенью окрашивания 7–8 баллов была несколько выше (40,09 % против 33,20 %), но различия с аналогичным показателем женщин старше 50 лет не достигали порога статистической значимости. Напротив, в более старшей возрастной группе отмечалась тенденция к превалированию ПР-резистентных новообразований (58,14 % против 54,50 %).

Как следует из Таблицы 9, статистически значимых различий между возрастными группами по параметрам HER2 статуса и уровню Ki-67 выявлено не было. Вместе с тем, у женщин молодого возраста отмечалась тенденция к более частым случаям уровня Ki-67 <5 % (24,06 % против 22,92%). Ожидаемо, что у пациенток старше 50 лет отмечалась тенденция к превалированию уровня Ki-67 «13 % и более» (47,46 % против 45,75 %).

Критерии злокачественности опухоли у женщин разных возрастных групп также были сопоставимы, статистически значимых различий выявлено не было (Таблица 10). Вместе с тем, отмечалась тенденция к большей частоте встречаемости T2N0M0 в пременопаузальном периоде по сравнению с частотой в группе женщин старше 50 лет: 46,3 % против 44,0 % соответственно.

Структуризация маркеров РМЖ по уровню злокачественности в когортах женщин разного возраста также не выявила значимых различий (Таблица 11, Таблица 12).

Анализ распределения редких маркеров также не выявил статистически значимых различий (Таблица 13).

Таким образом, сравнение возрастных подгрупп <50 лет ≥50 лет исследуемой популяции по степени дифференцировки опухолевого процесса, уровням экспрессии ЭР, ПР, Ki-67, HER2, редким маркерам РМЖ, размеру опухоли и pTNM классификации не выявило статистически значимых различий.

Таблица 10 – Критерии злокачественности опухоли в возрастных группах <50 лет и ≥50 лет

Группа	Возрастная группа		Уровень <i>p</i>
	моложе 50 лет	50 лет и старше	
ЭР- и ПР-негативный статус	111/201 (55,22)	230/412 (55,83)	0,8881
ЭР- и ПР-позитивный статус	90/201 (44,78)	182/412 (44,17)	
Размер опухоли:			0,5676
<1 см	4/333 (1,20)	16/765 (2,09)	
1–2 см	159/333 (47,75)	354/765 (46,27)	
>2 см	170/333 (51,05)	395/765 (51,63)	
pTNM:			0,4607
T1N0M0	195/363 (53,72)	455/812 (56,03)	
T2N0M0	168/363 (46,28)	357/812 (43,97)	

Примечание: Представлено *n*, число пациенток в соответствующей категории / *N*, число пациенток с имеющимися данными по параметру (процент, %).

Оценка статистической значимости различий проведена с использованием критерия Хи-квадрат Пирсона.

Таблица 11 – Возраст женщин в когортах с различным уровнем злокачественности рака молочной железы

Группа	Возраст, лет	Уровень <i>p</i>
Степень дифференцировки G:		0,3028
G ₁	55,72 ± 11,03	
G ₂	56,30 ± 10,79	
G ₃	55,09 ± 10,81	
Уровень экспрессии ЭР:		0,4272
а) 0	55,11 ± 11,03	
б) 4–6	57,19 ± 10,51	
в) 7–8	55,92 ± 10,67	
Уровень Ki-67:		0,2490
<13 %	56,29 ± 11,17	
13 % и более	55,22 ± 10,37	

Примечание: Данные представлены как *M* (±*SD*)

Оценка статистической значимости различий проведена с использованием критерия Манна - Уитни.

Таблица 12 – Множественные попарные сравнения степеней злокачественности рака молочной железы и уровней экспрессии ЭР в зависимости от возраста на момент операции

Сравниваемые показатели	Уровень <i>p</i>
Степень дифференцировки G:	
G ₁ против G ₂	0,6302
G ₁ против G ₃	0,9932
G ₂ против G ₃	0,3463
Уровень экспрессии ЭР:	
а) 0 против б) 4–6	0,7412
а) 0 против в) 7–8	0,5111
б) 4–6 против в) 7–8	0,9314

Оценка статистической значимости различий проведена с использованием критерия Хи-квадрат Пирсона.

Таблица 13 – Распределение маркеров CK14, FOXA1, FOXP3, PDL1, P53, SMA, AR, E-cadherin, CD4, CD8, CK5\6, EGFR в возрастных группах <50 лет и ≥50 лет

Маркер	Возрастная подгруппа		Уровень <i>p</i>
	моложе 50 лет	50 лет и старше	
CK5	21/199 (10,6%)	55/483 (11,4%)	0,7529
SMA	3/70 (4,3%)	6/176 (3,4%)	0,7411
CK14	7/129 (5,4%)	25/319 (7,8%)	0,3697
P53	3/69 (4,3%)	7/175 (4%)	0,9018
E-cadherin	170/220 (77,3%)	417/536 (77,8%)	0,8748
EGFR	27/272 (9,9%)	68/606 (11,2%)	0,5680
CD4	237/266 (89,1%)	482/591 (81,6%)	0,0055
CD8	180/257 (70%)	375/556 (67,4%)	0,4602
FOXP3	67/111 (60,4%)	106/213 (49,8%)	0,0696
FOXA1	192/210 (91,4%)	413/453 (91,2%)	0,9127
AR	185/286 (64,7%)	392/599 (65,4%)	0,8250
PDL	11/112 (9,8%)	30/216 (13,9%)	0,2909

Примечание: Представлено *n*, число пациенток в соответствующей категории / *N*, число пациенток с имеющимися данными по параметру (процент, %).

Оценка статистической значимости различий проведена с использованием критерия Хи-квадрат Пирсона.

3.3. Анализ патоморфологических и иммуногистохимических характеристик опухоли в зависимости от степени гистологической злокачественности

Данные о распределении степеней гистологической злокачественности новообразований в исследуемой популяции приведены Разделе 3.1, Таблица 6.

Было установлено преобладание прогностически неблагоприятных степеней G₂ и G₃ опухолевого процесса, доли которых достигли 47,5 и 36,9 % соответственно. Частота верификации стадии формирования опухоли G₁ составила 15,6 %.

Значительные изменения касались рецепторного статуса опухоли, который снижался по мере увеличения степени злокачественности опухоли (Рисунок 14). Средний (\pm SD) уровень экспрессии ЭР составил $4,51 \pm 3,91$ и $2,59 \pm 3,69$ при степени злокачественности опухоли G₂ и G₃ соответственно ($p < 0,0001$). Аналогичная тенденция наблюдалась для уровня экспрессии ПР: средние (\pm SD) значения составили $3,96 \pm 3,86$ и $2,15 \pm 3,40$ при G₂ и G₃ опухоли соответственно ($p < 0,0001$).

Уровень экспрессии Ki-67-антигена последовательно возрастал по мере увеличения степени злокачественности опухоли (Рисунок 14). В среднем процент окрашенных Ki-67 опухолевых клеток при максимальной степени злокачественности опухоли (G₃) был более чем в 2,5 раза выше такового при степени G₁ ($31,58 \pm 24,50$ против $12,20 \pm 18,44$) ($p < 0,0001$).

Результаты дополнительного анализа соотношений гистологической злокачественности рака молочной железы (G₁–G₃) и экспрессии гена Ki-67 (подгруппы $<5\%$ и $\geq 5\%$) приведены на Рисунке 15. По мере увеличения степени злокачественности РМЖ прогрессивно увеличивалась доля пациенток с экспрессией гена Ki-67 $>5\%$ (с $56,86\%$ до $88,37\%$) ($p < 0,0001$). Для гистологической злокачественности РМЖ G₃ высокая экспрессия гена Ki-67 была значимо преобладающей ($88,37\%$ против $11,6\%$ низкой экспрессии гена Ki-67).

Ожидается, что прогрессивное усиление гистологической злокачественности РМЖ сопровождалось последовательным увеличением максимального размера опухоли (Рисунок 14). Так, при клинико-морфологической оценке новообразования минимальный размер опухоли соответствовал степени дифференцировки G1 ($2,08 \pm 0,90$ см), а максимальный – G3 ($2,58 \pm 0,92$ см) ($p < 0,0001$).

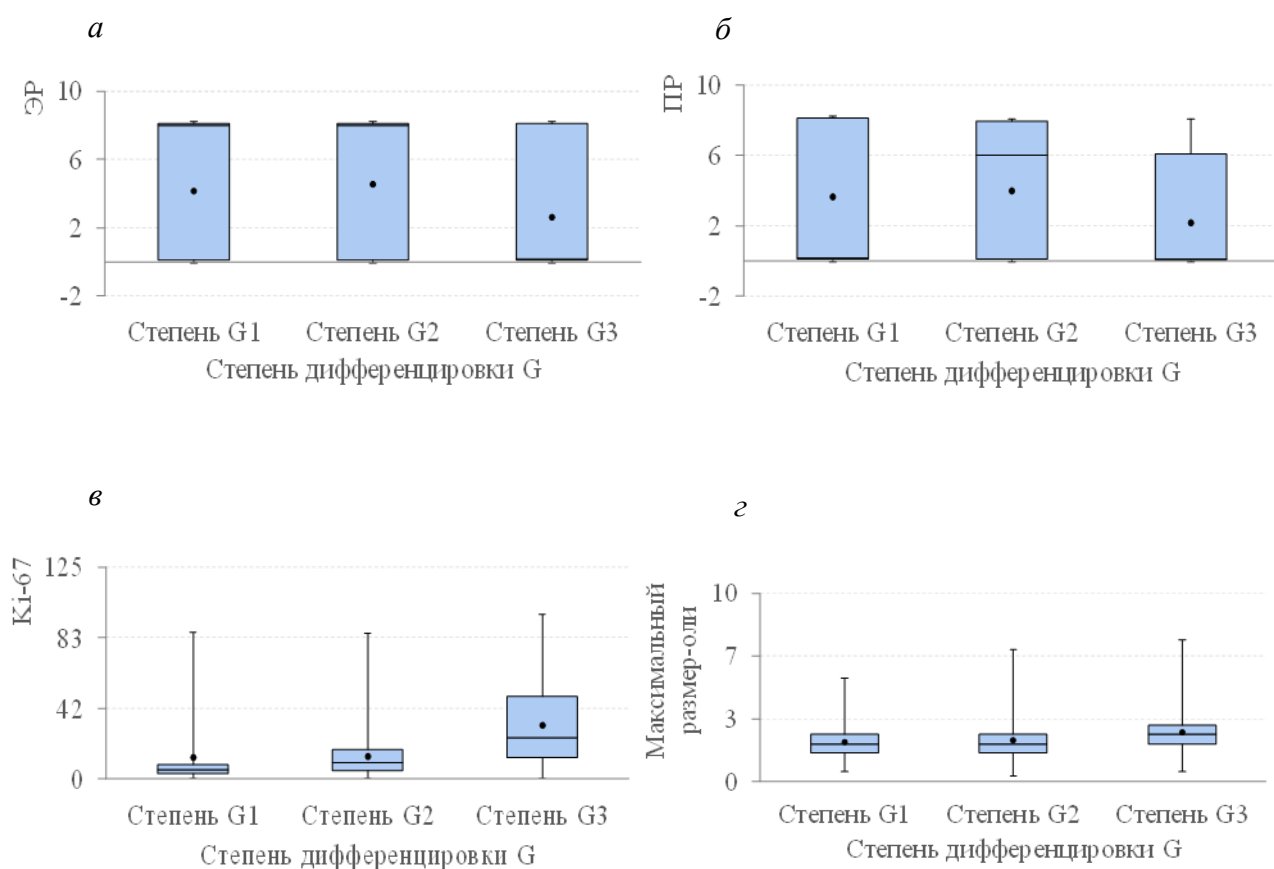


Рисунок 14 – Диаграммы размаха экспрессии ЭР (а), ПР (б), Ki-67-антигена (в) и максимального размера новообразования (г) в зависимости от степени дифференцировки опухоли G

Уровень Ki-67

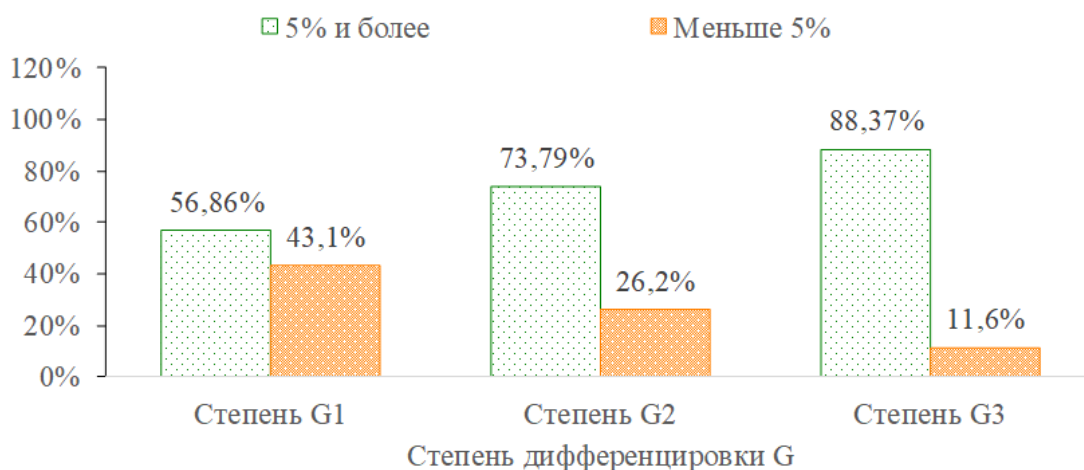


Рисунок 15 – Структура соотношений гистологической злокачественности рака молочной железы (G_1 – G_3) и экспрессии гена Ki-67

Анализ распределения редких маркеров в подгруппах G1, G2, G3 степени гистологической злокачественности опухоли выявил прогностически значимые закономерности (Таблица 14). Так, по мере увеличения степени злокачественности новообразования последовательно возрастала экспрессия таких предикторов, как CK5, CK14, EGFR, PDL, и снижалась экспрессия FOXA1 ($p < 0,05$).

Таблица 14 – Распределение маркеров CK14, FOXA1, FOXP3, PDL1, P53, SMA, AR, E-cadherin, CD4, CD8, CK5/6, EGFR в подгруппах G1, G2, G3 степени гистологической злокачественности опухоли

Маркер	Степень дифференцировки G			Уровень p
	Степень G1	Степень G2	Степень G3	
CK5	9/95 (9,5%)	12/309 (3,9%)	50/242 (20,7%)	<0,0001
SMA	2/30 (6,7%)	3/119 (2,5%)	3/85 (3,5%)	0,5347
CK14	1/64 (1,6%)	4/191 (2,1%)	23/165 (13,9%)	<0,0001
P53	2/29 (6,9%)	2/116 (1,7%)	7/87 (8%)	0,0935
E-cadherin	87/111 (78,4%)	256/336 (76,2%)	214/264 (81,1%)	0,3558
EGFR	8/129 (6,2%)	23/395 (5,8%)	48/290 (16,6%)	<0,0001
CD4	89/110 (80,9%)	306/368 (83,2%)	250/285 (87,7%)	0,1455
CD8	64/106 (60,4%)	235/340 (69,1%)	201/281 (71,5%)	0,1058
FOXP3	26/42 (61,9%)	85/146 (58,2%)	63/104 (60,6%)	0,8827
FOXA1	94/97 (96,9%)	274/279 (98,2%)	171/218 (78,4%)	<0,0001

Маркер	Степень дифференцировки G			Уровень <i>p</i>
	Степень G1	Степень G2	Степень G3	
AR	76/122 (62,3%)	261/371 (70,4%)	161/285 (56,5%)	0,0011
PDL	4/38 (10,5%)	10/145 (6,9%)	20/111 (18%)	0,0218

Примечание: Представлено n, число пациенток в соответствующей категории / N, число пациенток с имеющимися данными по параметру (процент, %). Оценка статистической значимости различий проведена с использованием критерия Хи-квадрат Пирсона.

3.4. Анализ патоморфологических и иммуногистохимических характеристик опухоли в зависимости от уровня экспрессии Ki-67

Верификация прогностических критериев РМЖ, соответствующих альтернативной статистической гипотезе о неравномерности распределения маркеров опухоли в популяции женщин с новообразованием, включала анализ двух когорт в зависимости от уровня экспрессии гена Ki-67 с пограничным значением 13 %. В одну из когорт были стратифицированы женщины с низкой активностью гена Ki-67 (<13 %), а в другую когорту вошли пациентки с высоким показателем Ki-67 (>13 %). Число женщин в подгруппах с низкой и высокой экспрессией гена Ki-67 было сопоставимым – 52,6 и 47,4 % соответственно (Таблица 6). Возраст пациенток на момент операции в обеих сравниваемых когортах был сопоставим – $56,29 \pm 11,17$ года (Ki-67 <13 %) и $55,22 \pm 10,37$ года (Ki-67 >13 %, $p = 0,2490$) (Таблица 11).

В ходе исследования было установлено, что рецепторный статус опухоли, оцениваемый по показателям ЭР и ПР, и уровень экспрессии гена Ki-67 носили разнонаправленный характер (Рисунок 16). Выяснилось, что при низкой активности гена Ki-67 экспрессия ЭР и ПР была выше в среднем более чем в 1,5 раза, чем при значениях Ki-67 >13 %: среднее (\pm SD) значение уровня экспрессии ЭР составляло $6,10 \pm 3,32$ против $3,79 \pm 3,97$, уровня экспрессии ПР – $5,19 \pm 3,59$ против $3,10 \pm 3,77$ ($p < 0,0001$).

Среднее (\pm SD) уровня экспрессии гена Ki-67 составило $5,84 \pm 3,40$ и $35,75 \pm 21,06$ в подгруппах Ki-67 <13 % и Ki-67 >13 % соответственно ($p < 0,0001$).

Максимальный размер опухоли, последовательно возрастая по мере увеличения продукции Ki-67, составил $2,25 \pm 1,09$ и $2,52 \pm 0,90$ см ($p < 0,0001$).

Анализ распространенности опухолей различной степени злокачественности в когортах с низким и высоким уровнем экспрессии гена Ki-67 выявил наличие статистически значимой взаимосвязи ($p < 0,0001$). При уровне Ki-67 $< 13\%$ отмечалось преобладание степени дифференцировки клеток G₂ (56,70%). Активация гена Ki-67 сопровождалась увеличением частоты степени гистологической злокачественности ткани G₃ (с 19,7% до 59,4%). Ожидается, что степень G₁ почти в 4 раза чаще регистрировалась в когорте с низкой экспрессией Ki-67 (Рисунок 17).

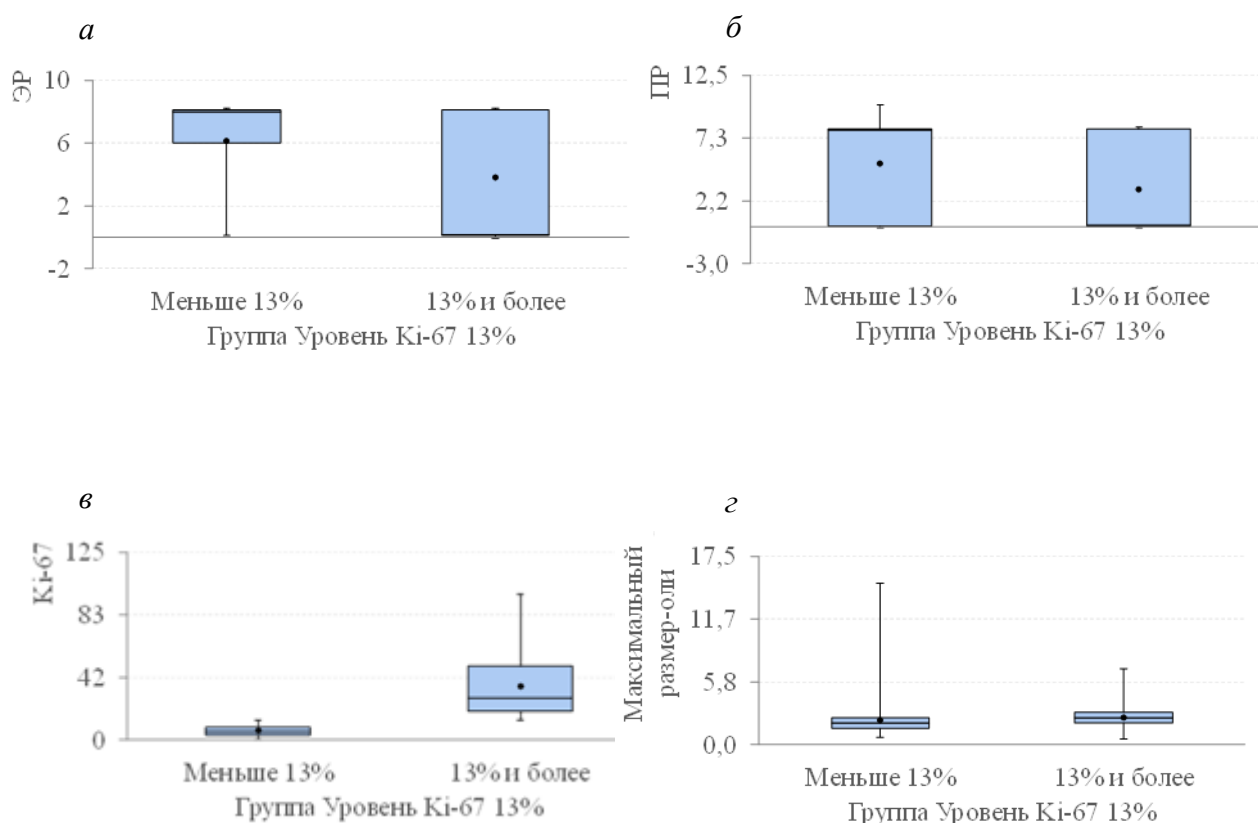


Рисунок 16 – Диаграммы размаха экспрессии ЭР (а), ПР (б), Ki-67-антигена (в) и максимального размера новообразования (г) в зависимости от уровня экспрессии гена Ki-67 (с пограничным значением 13%)

Степень дифференцировки G

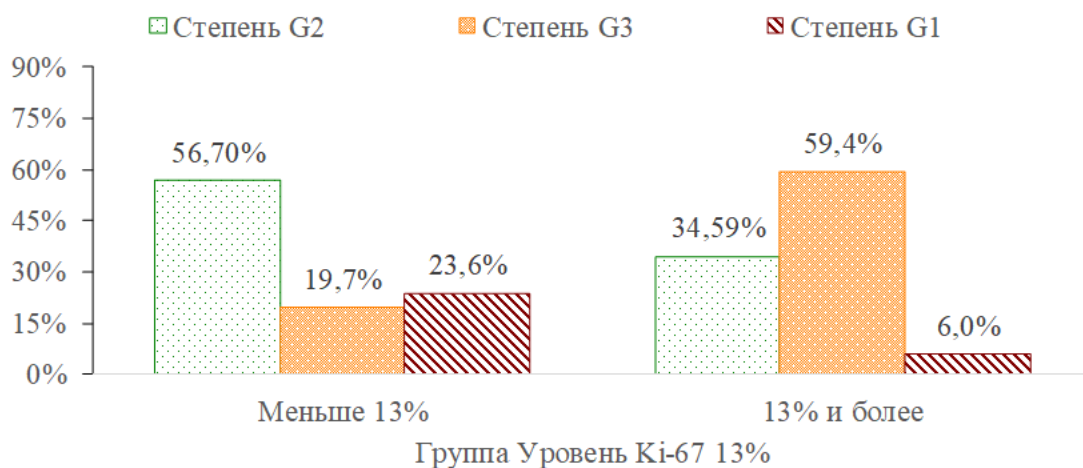


Рисунок 17 – Распространенность опухолей различной степени гистологической злокачественности (G_1 – G_3) в когортах с низкой и высокой экспрессией гена Ki-67

Интересно, что только у половины женщин с высоким уровнем Ki-67 была верифицирована низкая чувствительность к эстрогенам (0 баллов) (Рисунок 18). В данной когорте у 46,73 % пациенток экспрессия ЭР регистрировалась на максимальном уровне 7–8 баллов. ЭР-позитивный статус с максимальным значением 7–8 баллов в когорте с низкой активностью гена Ki-67 диагностировался в 3 раза чаще, чем опухоли с минимальной экспрессией ЭР ($p < 0,0001$).

При значениях Ki-67 >13 % экспрессия ПР была минимальной у 58,88 % женщин, а максимальная чувствительность опухоли к прогестерону встречалась почти в 2 раза реже (Рисунок 19). Для когорты с низким уровнем Ki-67 было характерно преобладание опухолей с максимальной экспрессией ПР (7–8 баллов, $p < 0,0001$).

Оценка чувствительности РМЖ к стероидным гормонам показала, что распространенность ЭР- и ПР-позитивного и негативного статусов в когорте с уровнем Ki-67 >13 %, составив 43,85 и 56,15 %, была сопоставимой (Рисунок 20). Параллельно со снижением активности гена Ki-67 существенно возрастала доля РМЖ, чувствительного к стероидным гормонам ($p < 0,0001$).

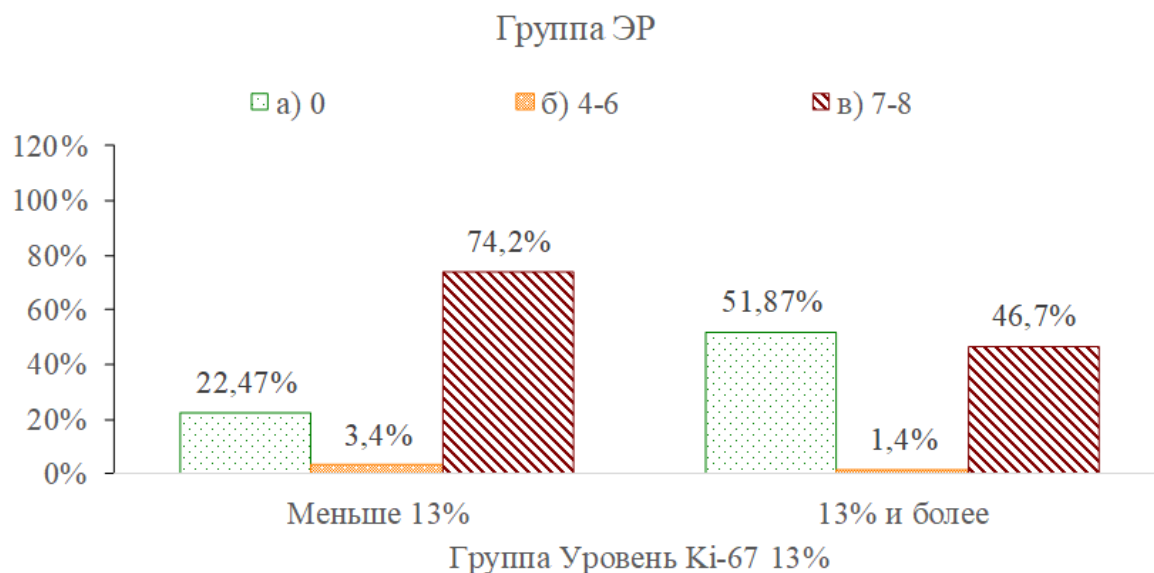


Рисунок 18 – Распространенность опухолей с различной экспрессией эстрогеновых рецепторов (ЭР) в когортах с низкой и высокой экспрессией гена Ki-67

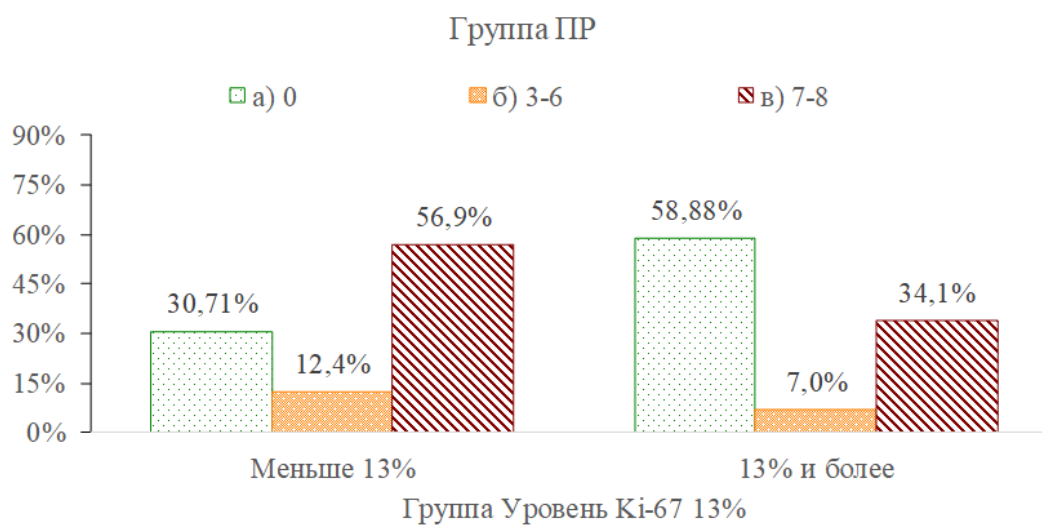


Рисунок 19 – Распространенность опухолей с различной экспрессией прогестероновых рецепторов (ПР) в когортах с низкой и высокой экспрессией гена Ki-67

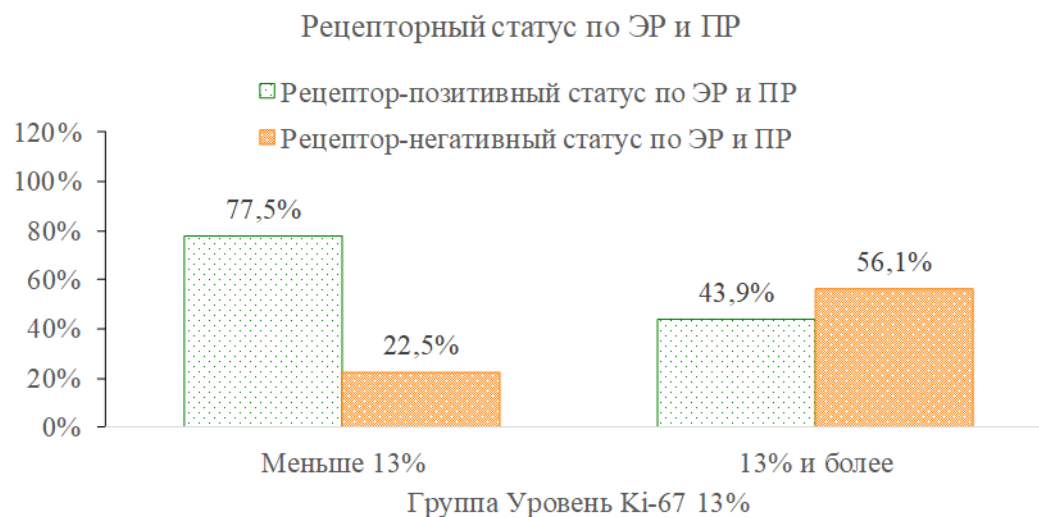


Рисунок 20 – Характеристика когорт с низким и высоким уровнем Ki-67 в зависимости от рецепторного статуса по ЭР и ПР

Приведенные на Рисунке 21 результаты распределения экспрессии HER2 демонстрируют, что при низкой активности гена Ki-67 частота встречаемости HER2-негативных форм опухоли была на 10 % выше таковой в группе со значением Ki-67 >13 % ($p = 0,0007$). Закономерно, что максимальный уровень экспрессии HER2 встречался в среднем в 3 раза чаще в опухолях с максимальной экспрессией Ki-67.

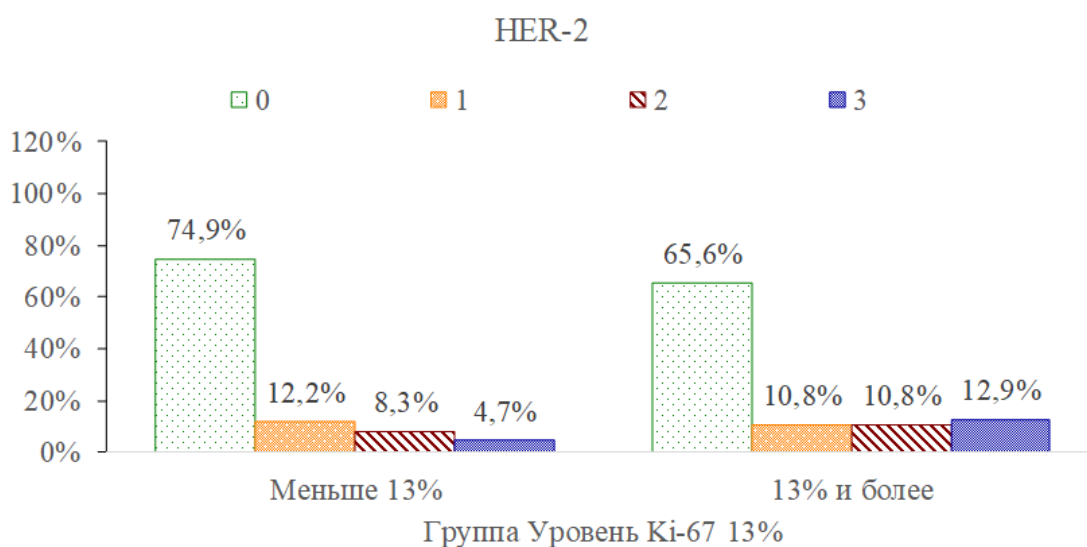


Рисунок 21 – Распространенность опухолей с различным уровнем продукции HER2 в когортах с низкой и высокой экспрессией гена Ki-67

Наконец, анализ прогностической значимости клинико-морфологических характеристик опухоли по классификации pTNM показал преобладание стадии T1N0M0 в когорте со значением Ki-67 <13 % (Рисунок 22). Увеличение экспрессии Ki-67 сопровождалось ростом злокачественности опухоли ($p < 0,0001$).

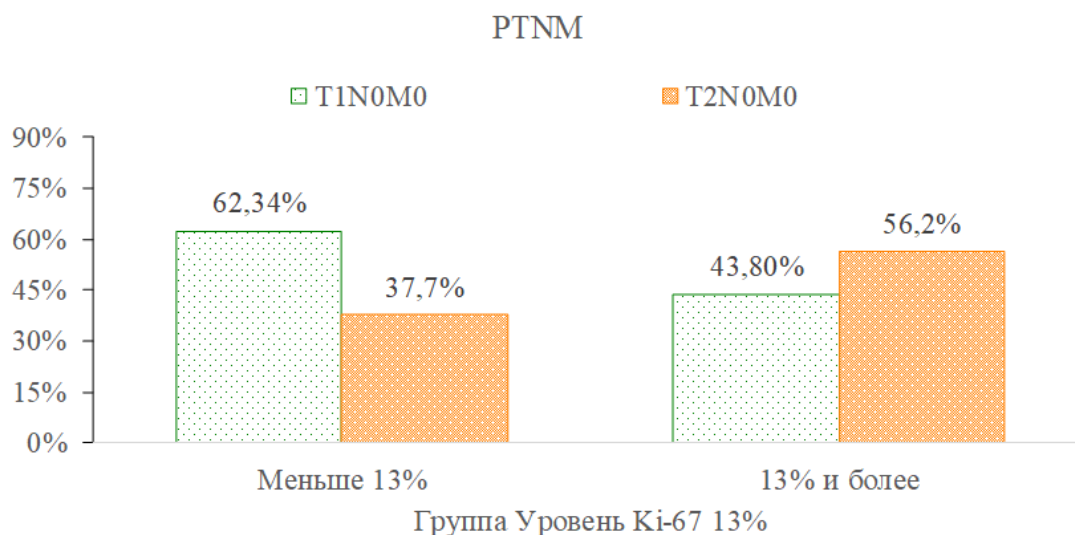


Рисунок 22 – Характеристика когорт с низким и высоким уровнем Ki-67 в зависимости от клинико-морфологических критериев злокачественности по классификации pTNM

Таким образом, проведенный анализ выявил взаимосвязь между уровнем экспрессии гена Ki-67 и уровнями экспрессии ЭР, ПР, HER2, размером опухоли и степенью злокачественности РМЖ.

3.5. Анализ патоморфологических и иммуногистохимических характеристик опухоли в зависимости от рецепторного статуса

Данные о распределении уровня экспрессии эстрогеновых рецепторов в исследуемой популяции приведены Разделе 3.1, Таблица 6. Доля пациенток с максимальной экспрессией ЭР (7–8 баллов) составила 45,7 %, средним уровнем экспрессии ЭР (4–6 баллов) – 2,8 %, а ЭР-негативный РМЖ (0 баллов) был верифицирован у 51,4 % женщин. Сравнимые когорты были сопоставимы по возрасту ($p = 0,4272$) (Таблица 11).

Анализ прогностической значимости рецепторного статуса эстрогенов продемонстрировал последовательный рост критериев по мере увеличения

уровня экспрессии ЭР (Рисунок 23, $p < 0,0001$). Полученная закономерность, вероятно, отражает степень дифференцировки новообразования. В таком случае ожидаемо, что увеличение уровня ЭР и экспрессии гена Ki-67 описывает обратная зависимость: средний (\pm SD) уровень экспрессии гена Ki-67 в когортах ЭР 0, 4–6 и 7–8 баллов составил $31,39 \pm 27,25$, $13,50 \pm 17,14$ и $12,56 \pm 12,57$ соответственно ($p < 0,0001$). С этих позиций логично, что наименьший размер опухоли имели женщины с максимальной экспрессией ЭР: средний (\pm SD) размер опухоли в когортах ЭР 0, 4–6 и 7–8 баллов составил $2,50 \pm 1,20$, $2,64 \pm 0,89$ и $2,28 \pm 0,84$ соответственно.

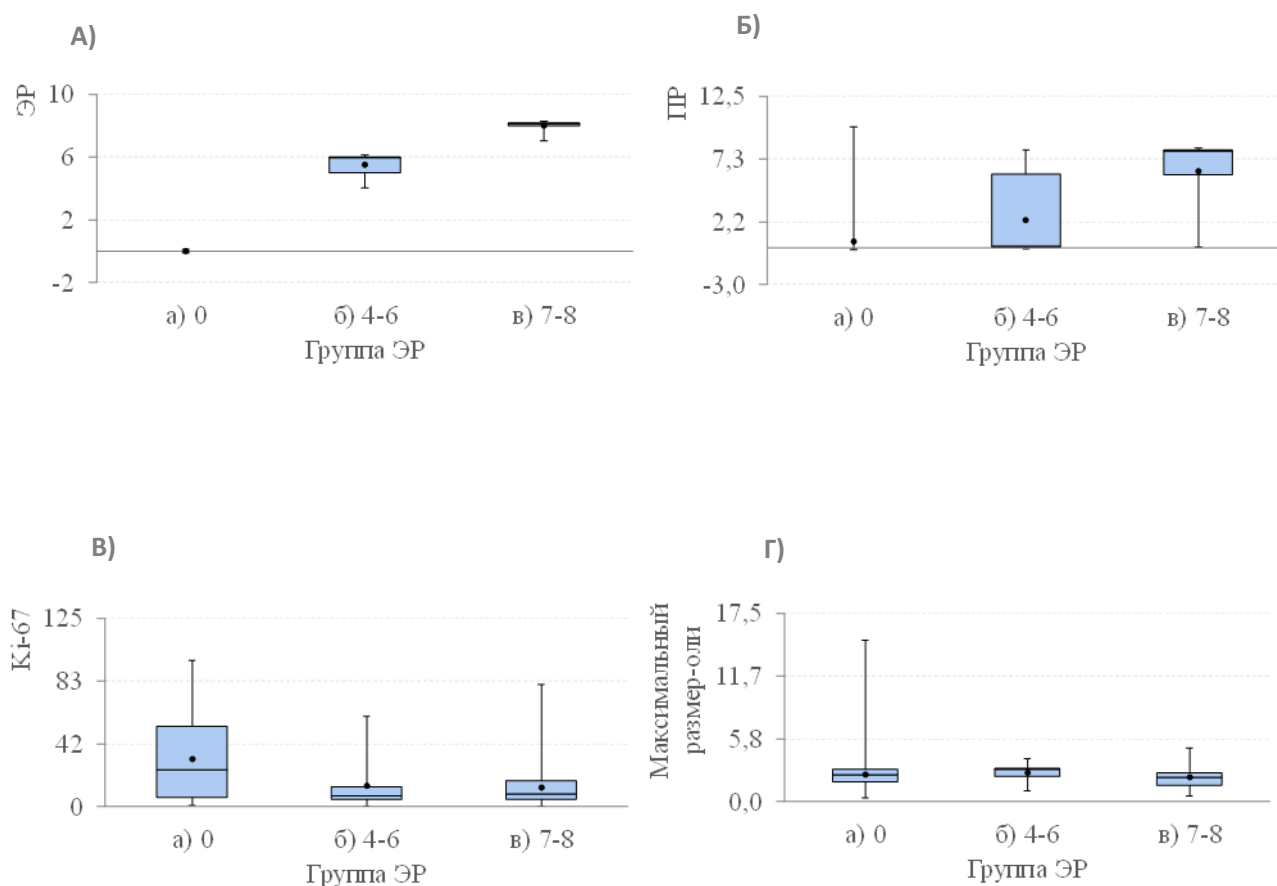


Рисунок 23 – Диаграммы размаха показателей ЭР (А), ПР (Б), Ki-67 (В) и максимального размера опухоли (Г) в зависимости от уровня экспрессии эстрогеновых рецепторов (ЭР)

Анализ степени дифференцировки опухоли в подгруппах различного уровня экспрессии ЭР (Рисунок 24) показал преобладание степени дифференцировки G₃ в когорте ЭР-негативного РМЖ (46,6 %). В когортах ЭР 4–6 и 7–8 баллов преобладала степень G₂ (58,82 % и 58,22 % соответственно), а доля степени G₃ составляла 29,4 % и 25,0 % ($p < 0,0001$).

Степень экспрессии прогестероновых рецепторов в целом соотносилась с экспрессией ЭР (Рисунок 25). В группе с максимальной экспрессией ЭР (7–8 баллов) доля экспрессии ПР 7–8 баллов была наибольшей (70,2 %). В когорте с ЭР-негативным статусом ПР-негативные формы РМЖ были доминирующими (92,65 %) ($p < 0,0001$).

Независимо от уровня экспрессии эстрогеновых рецепторов более половины женщин имели РМЖ с минимальной активностью HER2 (0 баллов) (Рисунок 26). Доля таких пациенток в группах ЭР0, 4–6 и 7–8 баллов составила 74,9 %, 84,2 % и 74,3 % соответственно. Наиболее злокачественные формы опухоли с максимальной экспрессией HER2 преобладали в когорте женщин с ЭР-негативным РМЖ. Доля таких пациенток в группах ЭР0, 4–6 и 7–8 баллов составила 15,6 %, 10,5 % и 4,2 % соответственно. В целом, взаимосвязь между изучаемыми ЭР и HER2 подгруппами была статистически значимой ($p < 0,0001$).

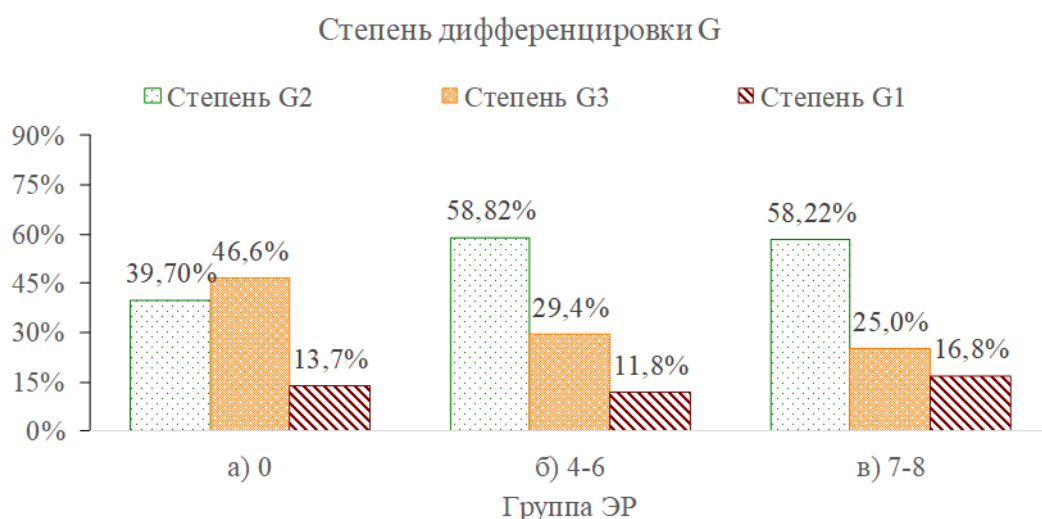


Рисунок 24 – Структура соотношений экспрессии эстрогеновых рецепторов (ЭР) и гистологической злокачественности РМЖ (G₁–G₃)

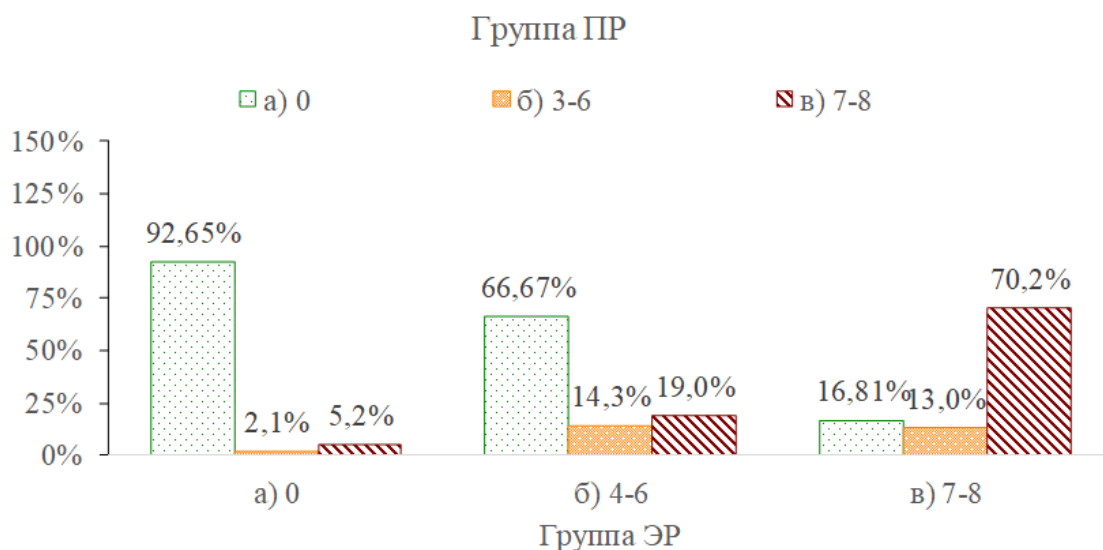


Рисунок 25 – Структура соотношений экспрессии эстрогеновых рецепторов (ЭР) и прогестероновых рецепторов (ПР)

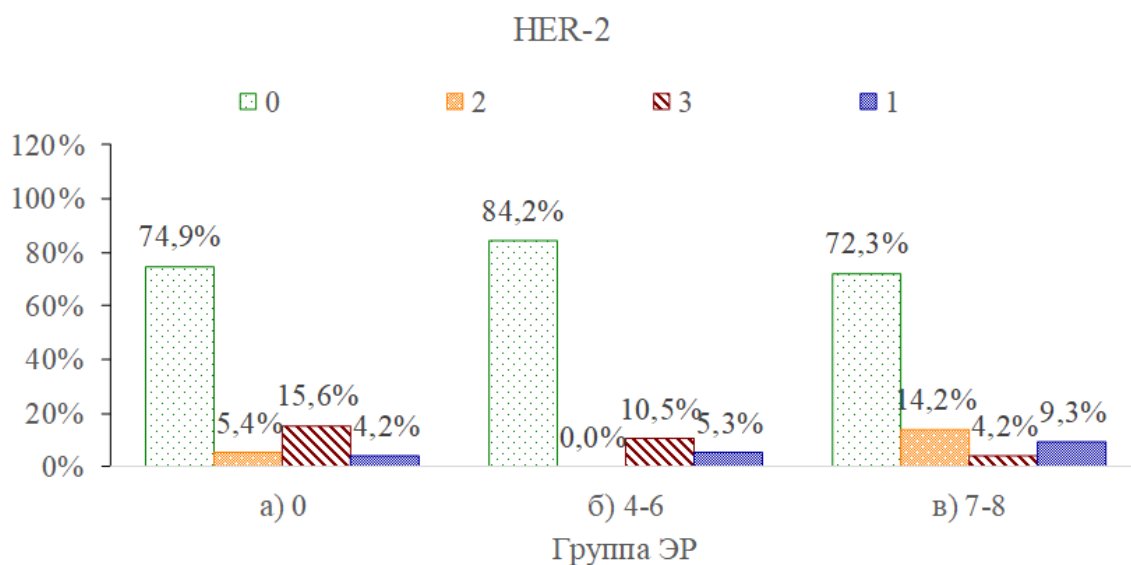


Рисунок 26 – Структура соотношений экспрессии эстрогеновых рецепторов (ЭР) и уровня экспрессии HER2

При сравнительном анализе уровня экспрессии Ki-67 (<5 % и \geq 5 %) в когортах с различной экспрессией ЭР статистически значимых межгрупповых различий выявлено не было ($p = 0,1346$). Вместе с тем, отмечалось, что минимальная экспрессия гена Ki-67 (<5 %) была более характерна для РМЖ с уровнем ЭР 4–6 баллов (33,33 %), а реже всего категория «Ki-67 <5 %» верифицировалась в когорте женщин с ЭР-негативным РМЖ (21,05 %).

При пограничном значении Ki-67, равном 13 %, были установлены статистически значимые различия в уровне экспрессии данного маркера в группах с разным значением ЭР (Рисунок 27). Из Рисунка 27 следует, что в когорте женщин с ЭР-негативными формами РМЖ избыточная активность гена Ki-67 (>13 %) двукратно превышала типы опухоли с низкой экспрессией описываемого маркера (64,9 % против 33,6 %). Напротив, при увеличении чувствительности опухоли к эстрогенам продукция маркера Ki-67 снижалась и преобладали типы РМЖ с экспрессией гена менее 13 %. Взаимосвязь между изучаемыми ЭР и Ki-67 подгруппами была статистически значимой ($p < 0,0001$).

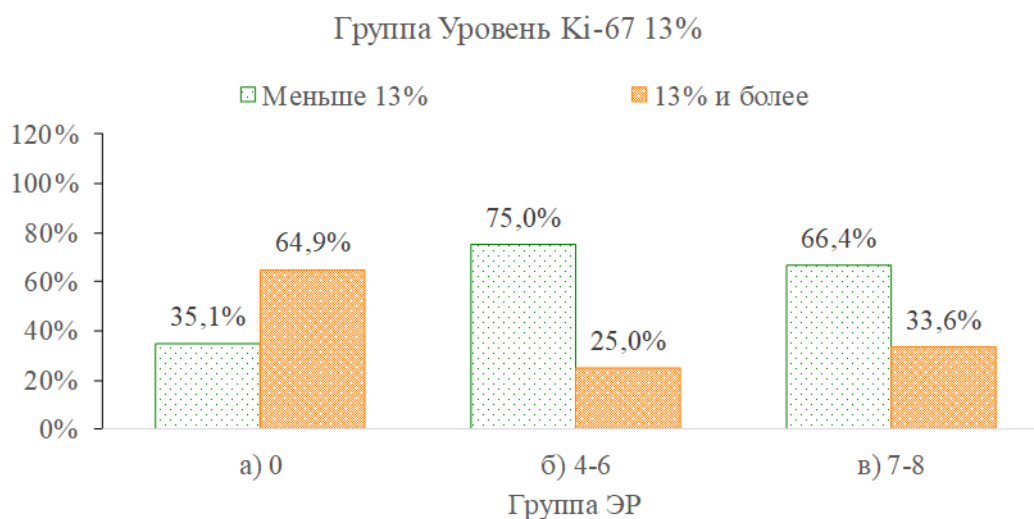


Рисунок 27 – Структура соотношений экспрессии эстрогеновых рецепторов (ЭР) и уровня экспрессии Ki-67 13 %

Сравнительный анализ размеров опухоли и клинико-морфологических параметров злокачественности процесса по классификации pTNM не выявил статистически значимых межгрупповых различий в зависимости от уровня экспрессии ЭР. Так, размер опухоли <1 см был диагностирован у 1,66; 0,00 и 0,93 % женщин с эстрогеновой активностью клеток 0 баллов, 4–6 баллов и 7–8 баллов соответственно. Максимальный размер новообразования (>2 см) имели 59,28; 77,78 и 53,78 % женщин соответственно при ЭР-негативных формах РМЖ и опухолях с экспрессией ЭР 4–6 баллов и 7–8 баллов ($p = 0,1110$). Клинико-

морфологические параметры злокачественности процесса по классификации pTNM, независимо от плотности ЭР, распределялись приблизительно поровну T1N0M0/T2N0M0. В когортах женщин с эстрогеновой активностью РМЖ, равной 0 баллов, 4–6 баллов и 7–8 баллов, доли T1N0M0 составили 49,34; 47,62 и 55,46 %. Соответственно, при последовательном увеличении экспрессии ЭР распространенность T2N0M0 составила 50,66; 52,38 и 44,54 % ($p = 0,2393$).

3.6. Оценка прогностической и предиктивной значимости клинических, гистологических, морфологических и иммуногистохимических факторов и разработка прогностических шкал

3.6.1 Разработка моделей прогностических шкал

Первый этап оценки включал однофакторный анализ факторов риска летального исхода для комплекса показателей. Результаты анализа приведены в Таблицах 15-18 ниже.

Таблица 15 – Однофакторный анализ факторов риска в отношении переменной «Исход, смерть»

Фактор	Исход, смерть: частота* (риск, %)		Изменение риска (95 % ДИ)	Относитель- ный риск (95 % ДИ)	Уровень <i>p</i>
	Фактор: Нет	Фактор: Есть			
Возраст на момент операции, лет $\geq 61,0$	83/768 (10,8%)	115/405 (28,4%)	17,6 (12,7; 22,5)	2,63 (2,04; 3,40)	<0,0001
Группа возраст (50 и более лет)	36/363 (9,9%)	162/810 (20,0%)	10,0 (5,9; 14,2)	2,01 (1,43; 2,82)	<0,0001
AR (2)	105/783 (13,4%)	35/138 (25,4%)	12,0 (4,3; 19,6)	1,9 (1,35; 2,66)	0,0003
FOXP3 (0)	28/201 (13,9%)	44/153 (28,8%)	14,8 (6,2; 23,5)	2,06 (1,35; 3,16)	0,0006
Ki-67 $\geq 2,0$	16/53 (30,2%)	96/679 (14,1%)	-16,1 (-28,7; -3,4)	0,47 (0,30; 0,73)	0,0018
PTNM (T2N0M0)	94/671 (14,0%)	112/545 (20,6%)	6,5 (2,3; 10,8)	1,47 (1,14; 1,88)	0,0025
CD8 (2, 0, 3)	47/391 (12,0%)	88/458 (19,2%)	7,2 (2,4; 12,0)	1,6 (1,15; 2,22)	0,0043
Адьювантная химиотерапия (Есть)	142/734 (19,3%)	64/482 (13,3%)	-6,1 (-10,2; -1,9)	0,69 (0,52; 0,90)	0,0058
ПР < 8,0	32/252 (12,7%)	100/489 (20,4%)	7,8 (2,3; 13,2)	1,61 (1,11; 2,33)	0,0090
Степень дифференцировки G (Степень G3, Степень G2)	14/157 (8,9%)	145/851 (17,0%)	8,1 (3,0; 13,2)%	1,91 (1,13; 3,22)	0,0103

*Данные представлены как число пациентов с летальным исходом/число пациентов с оценкой «Фактор: Нет» или «Фактор: Есть» соответственно (% , процент).

Оценка статистической значимости различий проведена с использованием критерия Хи-квадрат Пирсона.

Таблица 16 – Однофакторный анализ ключевых рутинных факторов риска в отношении переменной «Исход, смерть 5 лет»

Фактор	Исход 5 лет: частота (риск, %)		Изменение риска (95 % ДИ)	Относитель- ный риск (95 % ДИ)	Уровень <i>p</i>
	Фактор: Нет	Фактор: Есть			
Ki-67 \geq 32,2	7 (1,2%)	17 (11,6%)	10,4 (5,1; 15,7)	9,55 (4,04; 22,59)	<0,0001
Группа Уровень Ki-67 13 % (13 % и более)	5 (1,3%)	19 (5,5%)	4,2 (1,5; 6,9)	4,18 (1,58; 11,06)	0,0017
Максимальный размер опухоли \geq 3,7	36 (3,5%)	8 (9,9%)	6,4 (-0,2; 13,0)	2,83 (1,36; 5,88)	0,0045
Риск по степени дифференцировки G и Ki-67 (Высокий риск)	1 (0,8%)	11 (4,9%)	4,1 (0,8; 7,3)	5,92 (0,77; 45,27)	0,0489
Степень дифференцировки G (Степень G ₃ , Степень G ₁)	11 (2,4%)	24 (4,6%)	2,3 (0,0; 4,5)	1,96 (0,97; 3,96)	0,0545
Уровень Ki-67 (5 % и более)	2 (1,2%)	22 (4,0%)	2,8 (0,4; 5,1)	3,27 (0,78; 13,76)	0,0838
HER2 (3)	23 (3,3%)	5 (7,5%)	4,1 (-2,3; 10,6)	2,24 (0,88; 5,71)	0,0867
Рецепторный статус по ЭР и ПР (Рецептор- негативный статус по ЭР и ПР)	6 (2,2%)	16 (4,7%)	2,5 (-0,3; 5,4)	2,18 (0,87; 5,50)	0,0888
Группа ЭР (а) 0, б) 4-6)	8 (2,4%)	18 (4,6%)	2,2 (-0,4; 4,9)	1,93 (0,85; 4,39)	0,1081

*Данные представлены как число пациентов с летальным исходом (%), процент от числа пациентов с оценкой «Фактор: Нет» или «Фактор: Есть» соответственно.

Оценка статистической значимости различий проведена с использованием критерия Хи-квадрат Пирсона.

Таблица 17 – Однофакторный анализ 19 ключевых факторов влияния на целевой показатель «Исход смерть 5 лет»

Фактор	Исход смерть 5 лет: частота (риск, %)		Изменение риска (95 % ДИ)	Относительный риск (95 % ДИ)	Уровень <i>p</i>
	Фактор: Нет	Фактор: Есть			
СК5 (Есть)	19 (3,1%)	7 (8,9%)	5,8 (-0,6; 12,2)	2,88 (1,25; 6,64)	0,0106
FOXA1 < 8,0	17 (2,9%)	7 (7,6%)	4,7 (-0,9; 10,3)	2,6 (1,11; 6,10)	0,0244
P53 (Есть)	10 (4,1%)	2 (16,7%)	12,6 (-8,7; 33,8)	4,05 (1,00; 16,48)	0,0450
Ki-67 ≥ 32,2	7 (1,2%)	17 (11,6%)	10,4 (5,1; 15,7)	9,55 (4,04; 22,59)	<0,0001
Степень дифференцировки G (Степень G3, Степень G1)	11 (2,4%)	24 (4,6%)	2,3 (0,0; 4,5)	1,96 (0,97; 3,96)	0,0545
Клеточная плотность < 3 940,8	22 (3,8%)	1 (0,8%)	-3,0 (-5,2; -0,9)	0,2 (0,03; 1,49)	0,0788
HER2 (Позитив)	28 (3,5%)	5 (6,8%)	3,3 (-2,6; 9,2)	1,95 (0,78; 4,91)	0,1525
PTNM (T2N0M0)	21 (3,2%)	25 (4,7%)	1,5 (-0,8; 3,7)	1,46 (0,83; 2,58)	0,1898
AR < 2,0	16 (2,8%)	15 (4,4%)	1,6 (-1,0; 4,2)	1,57 (0,79; 3,14)	0,1960
ПР < 8,0	6 (2,4%)	20 (4,2%)	1,8 (-0,9; 4,4)	1,73 (0,70; 4,25)	0,2248
ЭР < 8,0	16 (3,2%)	24 (4,5%)	1,2 (-1,1; 3,6)	1,39 (0,75; 2,58)	0,2973
CD4 ≥ 1,0	3 (2,1%)	29 (3,9%)	1,8 (-1,0; 4,6)	1,84 (0,57; 5,95)	0,2988
EGFR (Есть)	27 (3,4%)	5 (5,1%)	1,7 (-2,8; 6,2)	1,5 (0,59; 3,82)	0,3899
CD8 < 2,0	9 (4,8%)	23 (3,5%)	-1,3 (-4,7; 2,1)	0,73 (0,35; 1,56)	0,4197
SMA (Есть)	11 (4,4%)	0 (0,0%)	-4,4	0,00	0,4997
E-cadherin (Есть)	6 (3,6%)	25 (4,2%)	0,6 (-2,6; 3,8)	1,16 (0,49; 2,79)	0,7318
PDL (Есть)	12 (3,9%)	2 (4,5%)	0,7 (-5,8; 7,2)	1,17 (0,27; 5,07)	0,8299
FOXP3 < 3,0	5 (3,5%)	8 (3,8%)	0,3 (-3,7; 4,3)	1,08 (0,36; 3,23)	0,8913
СК14 (Есть)	14 (3,4%)	1 (3,3%)	-0,1 (-6,8; 6,6)	0,97 (0,13; 7,14)	0,9773

Таблица 18 – Однофакторный анализ 19 ключевых факторов влияния на целевой показатель «Исход смерть 10 лет»

Фактор	Исход, смерть: частота (риск, %)		Изменение риска (95 % ДИ)	Относитель- ный риск (95 % ДИ)	Уровень <i>p</i>
	Фактор: Нет	Фактор: Есть			
FOXP3 < 1,0	28 (14,2%)	44 (28,8%)	14,5 (5,9; 23,2)%	2,02 (1,32; 3,09)	0,0008
PTNM (T2N0M0)	93 (14,2%)	112 (20,9%)	6,8 (2,4; 11,1)%	1,48 (1,15; 1,90)	0,0021
CD8 < 1,0	79 (13,9%)	56 (21,2%)	7,4 (1,7; 13,0)%	1,53 (1,12; 2,09)	0,0073
ПР < 8,0	32 (13,0%)	99 (20,8%)	7,8 (2,3; 13,4)%	1,61 (1,11; 2,32)	0,0094
Степень дифференцировки G (Степень G3, G2)	14 (9,1%)	144 (17,3%)	8,2 (3,0; 13,4)%	1,9 (1,13; 3,20)	0,0110
Уровень Ki-67 (Меньше 2 %)	16 (30,2%)	96 (14,1%)	-16,1 (-28,7; -3,4)%	0,47 (0,30; 0,73)	0,0018
E-cadherin (Есть)	18 (10,7%)	101 (16,8%)	6,1 (0,5; 11,6)%	1,57 (0,98; 2,51)	0,0536
AR < 3,0	57 (13,2%)	83 (17,5%)	4,3 (-0,4; 9,0)%	1,32 (0,97; 1,81)	0,0750
Клеточная плотность $\geq 5 \ 869,7$	59 (13,7%)	51 (18,1%)	4,4 (-1,1; 10,0)%	1,32 (0,94; 1,86)	0,1104
HER2 (Позитив)	121 (15,0%)	15 (20,3%)	5,3 (-4,2; 14,8)%	1,36 (0,84; 2,19)	0,2255
CD4 < 1,0	114 (15,5%)	27 (19,3%)	3,8 (-3,2; 10,8)%	1,25 (0,85; 1,82)	0,2625
FOXA1 < 8,0	74 (12,7%)	15 (16,3%)	3,6 (-4,5; 11,6)%	1,28 (0,77; 2,13)	0,3479
СК5 (Есть)	93 (15,0%)	15 (19,0%)	3,9 (-5,2; 13,0)%	1,26 (0,77; 2,06)	0,3623
P53 (Есть)	62 (25,5%)	2 (16,7%)	-8,8 (-30,6; 12,9)%	0,65 (0,18; 2,36)	0,4902
СК14 (Есть)	41 (10,0%)	4 (13,3%)	3,3 (-9,2; 15,8)%	1,33 (0,51; 3,46)	0,5674
ЭР < 8,0	83 (16,6%)	96 (17,8%)	1,2 (-3,4; 5,8)%	1,07 (0,82; 1,40)	0,6159
SMA (Есть)	66 (26,2%)	2 (20,0%)	-6,2 (-31,6; 19,2)%	0,76 (0,22; 2,68)	0,6614
EGFR (Есть)	119 (14,9%)	16 (16,3%)	1,4 (-6,3; 9,1)%	1,09 (0,68; 1,76)	0,7195
PDL (Есть)	67 (21,6%)	9 (20,5%)	-1,2 (-13,9; 11,6)%	0,95 (0,51; 1,76)	0,8610

На основе полученных данных выбирались наиболее значимые со статистической и клинической точки зрения факторы, влияющие на параметр «Исход, смерть». Среди них на основе логистической регрессии были выбраны 10 факторов, которые оказывают наибольшее влияние на прогнозируемую переменную «Исход, смерть». Результаты пошаговой логистической регрессии представлены в Таблице 19.

Таблица 19 – Результаты пошаговой логистической регрессии для прогнозирования показателя «Исход, смерть»

N	Фактор	AuROC	AuROC изменение	Уровень <i>p</i>
1	CK14, есть	0,612	0,112	0,0159
2	FOXP3 =0	0,635	0,023	0,0048
3	T2N0M0	0,639	0,004	0,0056
4	E-cadherin	0,647	0,008	0,1405
5	P53	0,652	0,005	0,0073
6	HER2 =3	0,662	0,010	0,0123
7	CD8>0	0,663	0,001	0,0351
8	EGFR (Есть)	0,665	0,002	0,3987
9	Степень G2, G3	0,667	0,002	0,2228
10	CD4>0	0,669	0,001	0,4719

Исходя из выделенных факторов были построены балльные шкалы с разным количеством факторов.

Шкалы строились следующим образом: за каждый фактор, который присутствует у пациентки, начислялось по 1 баллу, при отсутствии данных – 0,5 балла. Названия шкал соответствовали количеству факторов, входящих в шкалу. Факторы всегда выбирались по порядку на основании влияния на прогнозируемую переменную «Исход, смерть». Сравнение этих шкал для использования в качестве модели, а также традиционной шкалы (на основе рутинных маркеров: T2NOMO, ПР<8, G2G, ЭР<8, HER2=3 и Ki-67>5 %) приведены в Таблице 20.

Таблица 20 –Результаты сравнения балльных шкал для прогноза показателя «Исход, смерть»

Фактор	Точка отсечения	AuROC	Чувствительность	Специфичность	Эффективность	Хи-квадрат
Шкала 8	3,5	0,67	76,70%	49,11%	62,90%	46,0957
Шкала 9	4,5	0,67	67,48%	58,22%	62,85%	45,4534
Шкала 10	6,0	0,65	64,56%	57,33%	60,94%	32,9671
Традиционная шкала	4,0	0,57	45,63%	61,98%	53,81%	4,1548

Примечание:

Шкала 8: CK14, есть; FOXP3 =0; T2N0M0; E-cadherin; P53; HER2=3; CD8>0; EGFR (Есть) (8 факторов)

Шкала 9: CK14, есть; FOXP3 =0; T2N0M0; E-cadherin; P53; HER2=3; CD8>0; EGFR (Есть); Степень G2, G3 (9 факторов)

Шкала 10: CK14, есть; FOXP3 =0; T2N0M0; E-cadherin; P53; HER2=3; CD8>0; EGFR (Есть); Степень G2, G3; CD4>0 (10 факторов)

Традиционная шкала: T2N0M0, ПП<8, G2G, ЭР<8, HER2=3 и Ki-67>5 % (6 факторов)

На основании трех шкал (Шкала 8, Шкала 9, Шкала 10) были построены 100-балльные модели «Регрессия 8», «Регрессия 9», «Регрессия 10» соответственно. В Таблице 21 представлены результаты сравнения всех моделей для прогнозирования целевого показателя.

Таблица 21 –Результаты сравнения балльных шкал и шкал на основе пошаговой регрессии для прогноза показателя «Исход, смерть»

Фактор	Точка отсечения	AuROC	Чувствительность	Специфичность	Эффективность	Хи-квадрат
Регрессия 10	51,0	0,67	59,22%	66,34%	62,78%	47,4491
Шкала 8	3,5	0,67	76,70%	49,11%	62,90%	46,0957
Шкала 9	4,5	0,67	67,48%	58,22%	62,85%	45,4534
Регрессия 8	45,5	0,67	72,82%	52,77%	62,79%	44,8545
Регрессия 9	46,0	0,67	72,33%	52,28%	62,30%	41,5017
Шкала 10	6,0	0,65	64,56%	57,33%	60,94%	32,9671
Традиционная 100-балльная шкала	41,0	0,60	82,04%	32,77%	57,41%	17,7850
Традиционная шкала	4,0	0,57	45,63%	61,98%	53,81%	4,1548

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что предложенные балльные и регрессионные шкалы имеют лучшие показатели, чем традиционная

шкала. Моделью, которая наилучшим образом предсказывает показатель «Исход, смерть», является «Регрессия 10».

Описание традиционной шкалы и новой шкалы «Регрессия 10» и их сравнительный анализ приведены в разделах ниже.

3.6.2 Традиционная прогностическая шкала

Традиционная шкала состоит из шести показателей, являющихся рутинными маркерами, используемыми в клинической практике: «T2N0M0», «PP<8», «G2G3», «ЭР< 8», «HER2=3» и «Ki-67>5 %».

В соответствии с предварительно полученной 100-балльной прогностической шкалой для каждого из шести указанных факторов был определен коэффициент, показывающий силу влияния фактора на ключевой показатель. При значении уровня экспрессии прогестерона менее 8 фактор оценивали в 24 балла, для стадии заболевания T2N0M0 показатель оценивали в 18 баллов, при значении уровня экспрессии HER2 равному 3 фактор оценивали в 20 баллов, для степени дифференцировки опухоли G2 или G3 фактор оценивали в 13 баллов, при значении уровня экспрессии эстрогена равному 8 фактор оценивали в 12 баллов, при значении уровня экспрессии пролиферативной активности в опухоли Ki-67 более 5 % фактор оценивали в 13 баллов. В том случае, если значение какого-либо прогностического фактора не соответствует установленным значениям, такой фактор оценивался 0 баллов (Таблица 22).

Таблица 22 – Традиционная прогностическая балльная шкала

Фактор	Коэффициент	100 баллов	Округленные
PP<8	0,609	24,143	24
T2N0M0	0,443	17,561	18
HER2 =3	0,509	20,172	20
Степень G2, G3	0,329	13,049	13
ЭР=8	0,294	11,650	12
Ki-67>5 %	0,339	13,425	13
Сумма	2,523	100	100

Все пациенты были разделены на группы по степени риска летального исхода, в зависимости от набранных баллов по традиционной шкале: до 40 баллов – низкий риск, от 40 до 60 баллов – средний риск, более 60 баллов – высокий риск. Результаты распределения по группам риска, представленные на Рисунке 28, свидетельствуют о преобладании в исследуемой популяции пациентов группы среднего риска (51,0 %). Почти треть анализируемой популяции (28,6 %) имела благоприятный прогноз, высокий риск прогрессирования новообразования имела только пятая часть обследованных женщин (20,4 %).

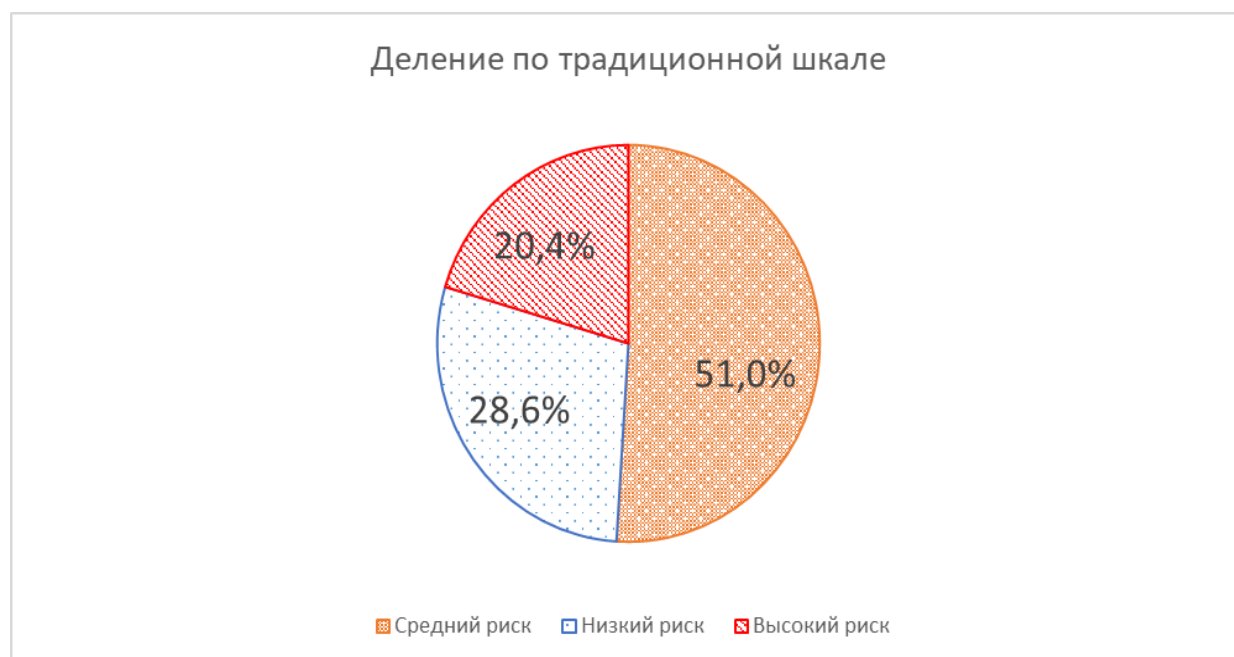


Рисунок 28 – Распределение пациенток по группам риска на основании оценки по традиционной шкале

В дальнейшем для каждой группы риска проводили анализ распределения пациентов трех подгрупп: (1) ЭР+, ПР±, HER2–; (2) HER2 +; (3) ЭР–, ПР–, HER2–. Результаты представлены на Рисунке 29. Благоприятный прогноз ассоциировался с высокой экспрессией ЭР и ПР-позитивным статусом. Для группы низкого риска прогрессирования злокачественного процесса активация HER2 была не характерна. Напротив, неблагоприятный прогноз развития заболевания сопровождался повышенной экспрессией HER2 и снижением экспрессии рецепторов стероидных гормонов.

Группы риска пациенток с ЭР–, ПР–, HER2– статусом представлены на Рисунке 30. Почти у половины пациенток исследуемой популяции (45,7 %) был верифицирован благоприятный прогноз. При этом высокий риск неблагоприятного течения РМЖ был выявлен только у 17,3 % женщин.

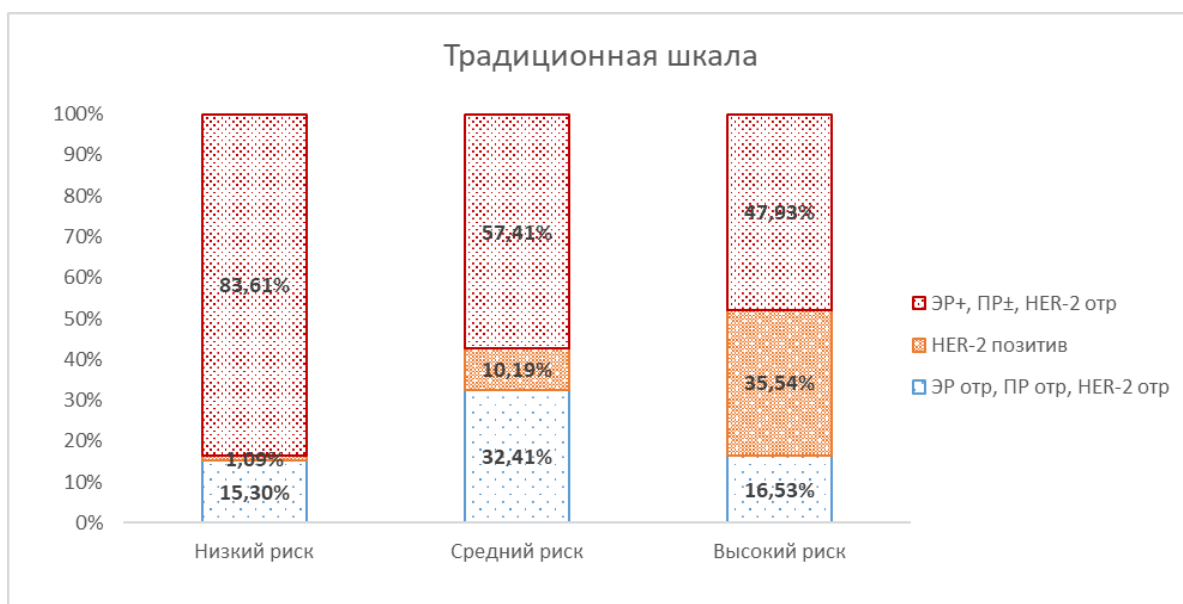


Рисунок 29 – Распределение пациенток с разным рецепторным статусом в подгруппах низкого, среднего и высокого риска летального исхода по традиционной шкале

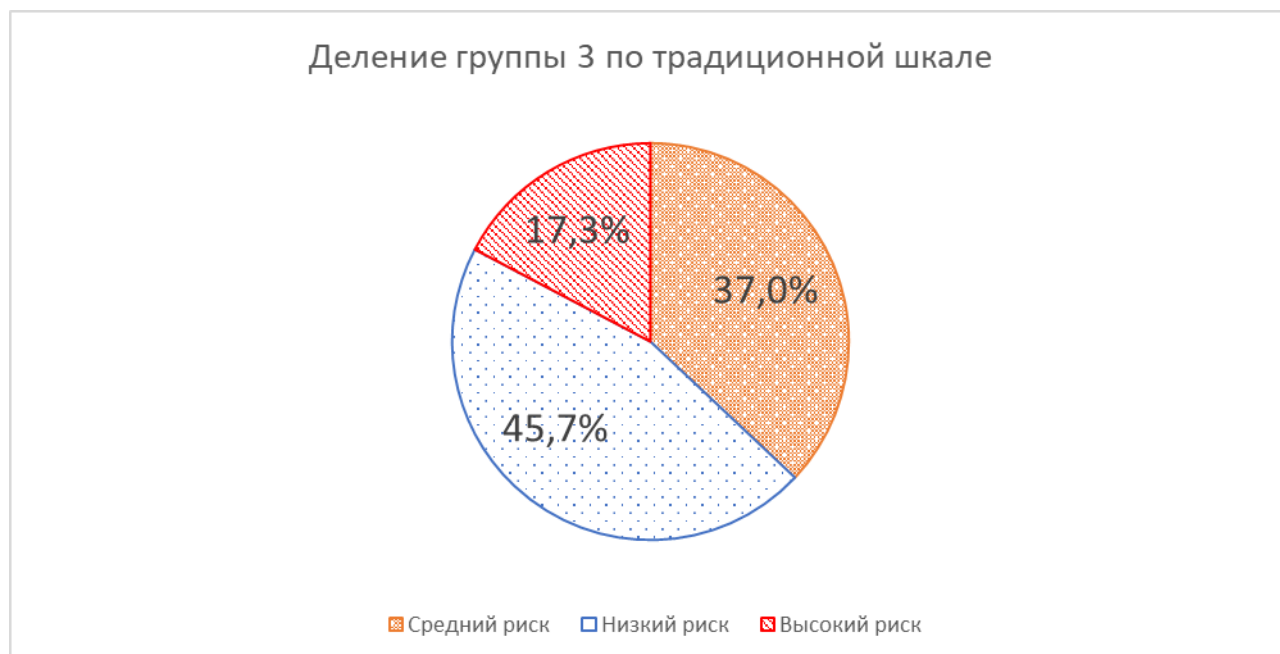


Рисунок 30 – Группы риска летального исхода по традиционной шкале среди пациенток с ЭР–, ПР–, HER2– статусом

Результаты оценки летальности за 5 лет и 10 лет в группах различного риска по традиционной шкале приведены на Рисунке 31. Летальность в течение 10 лет в группе высокого риска была в 2,5 раза выше таковой в группе низкого риска (25,7 % против 10,0 %).

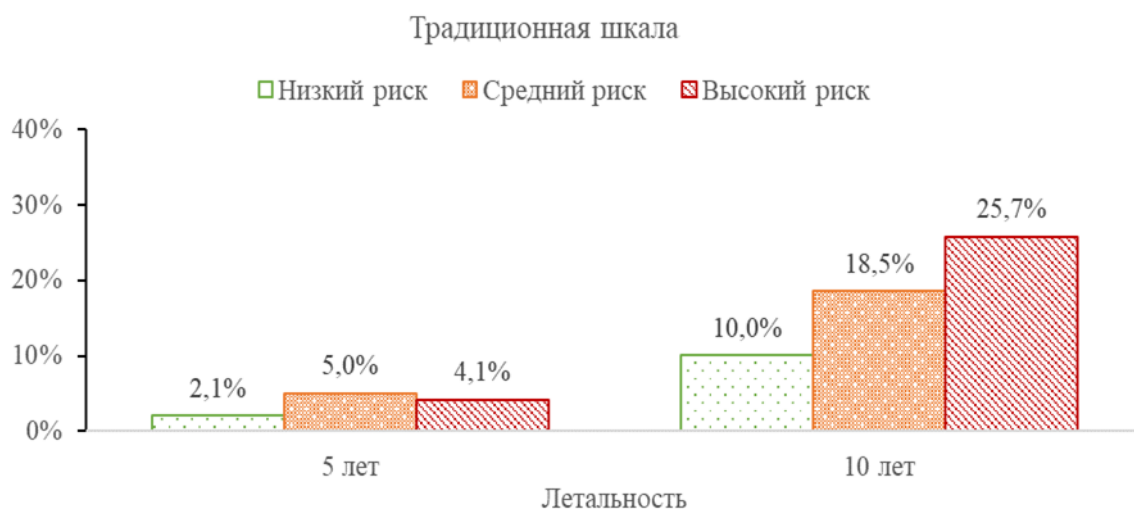


Рисунок 31 – Летальность в группах низкого, среднего и высокого риска по традиционной шкале

Результаты анализа выживаемости для пациенток групп высокого и низкого риска по традиционной шкале приведены на Рисунке 32 ниже ($p = 0,0004$, лог-ранговый тест). Показатель 10-летней выживаемости составил 84,1 % и 91,7 % для групп высокого и низкого риска, соответственно. Отношение рисков (hazard ratio) в регрессионной модели Кокса группы высокого риска к группе низкого риска составило 2,17 (95 % ДИ (1,44; 3,25)).

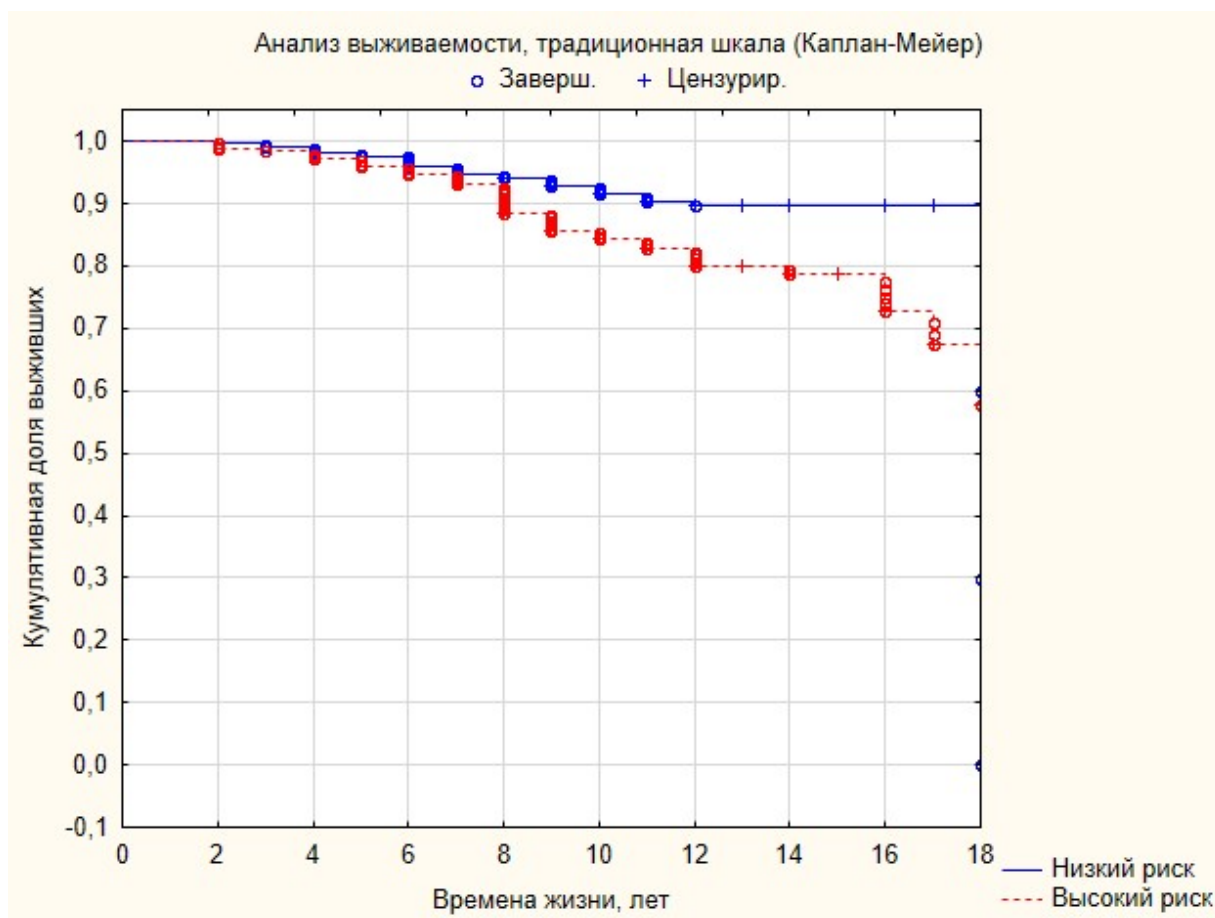


Рисунок 32 – Кривые Каплана – Майера, отражающие общую выживаемость для групп высокого и низкого риска по традиционной шкале

Результаты анализа общей выживаемости в исследуемой популяции в зависимости от проведения адъювантной химиотерапии приведены на Рисунке 33 ниже ($p = 0,0009$, лог-ранговый тест).

Показатель 10-летней выживаемости составил 91,1 % в группе с химиотерапией и 87,3 % в группе без химиотерапии. Отношение рисков (hazard ratio) в регрессионной модели Кокса группы без химиотерапии к группе с химиотерапией составило 1,63 (95 % ДИ (1,21; 2,19)).

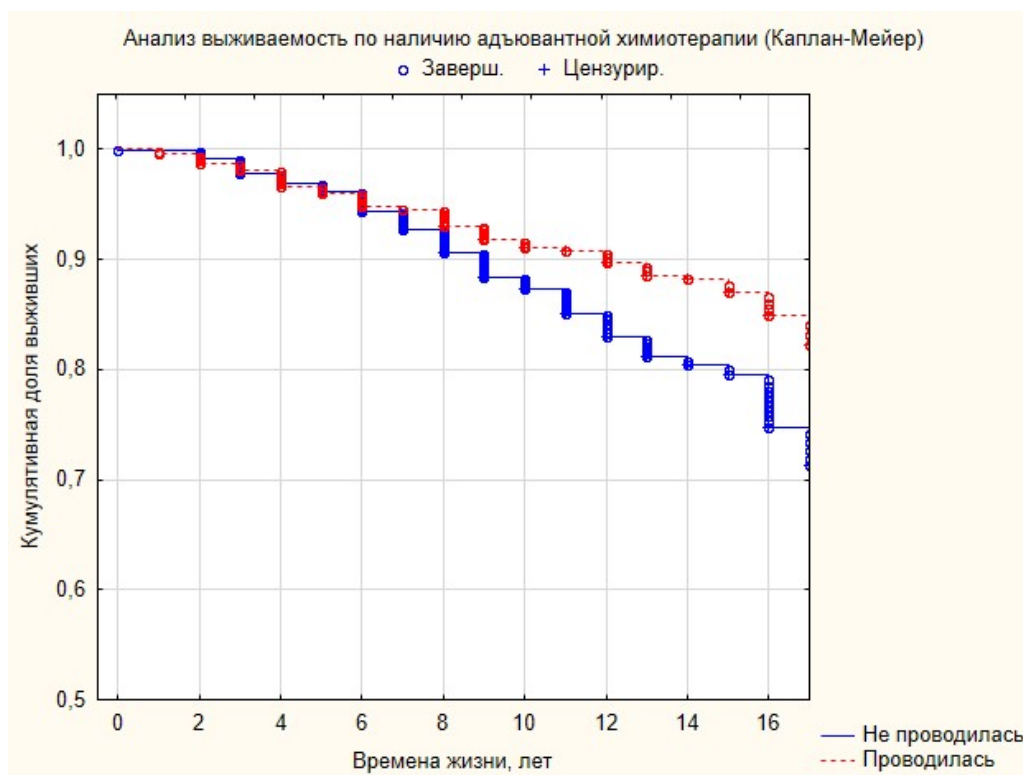


Рисунок 33 – Кривые Каплана – Майера, отражающие общую выживаемость в зависимости от адъювантной химиотерапии

Результаты оценки эффективности адъювантной химиотерапии в объединенной группе среднего и высокого риска по традиционной шкале представлены на Рисунке 34 ниже. Анализ выживаемости в зависимости от химиотерапии по традиционной шкале с применением новой 40-балльной шкалы продемонстрировал статистически значимые преимущества адъювантной химиотерапии в когортах пациентов с высоким и средним рисками неблагоприятного развития заболевания ($p < 0,0131$, лог-ранговый тест).

Показатель 10-летней выживаемости составил 88,9 % в группе с химиотерапией и 86,2 % в группе без химиотерапии. Отношение рисков (hazard ratio) в регрессионной модели Кокса группы без химиотерапии к группе с химиотерапией составило 1,48 (95 % ДИ (1,07; 2,04)).

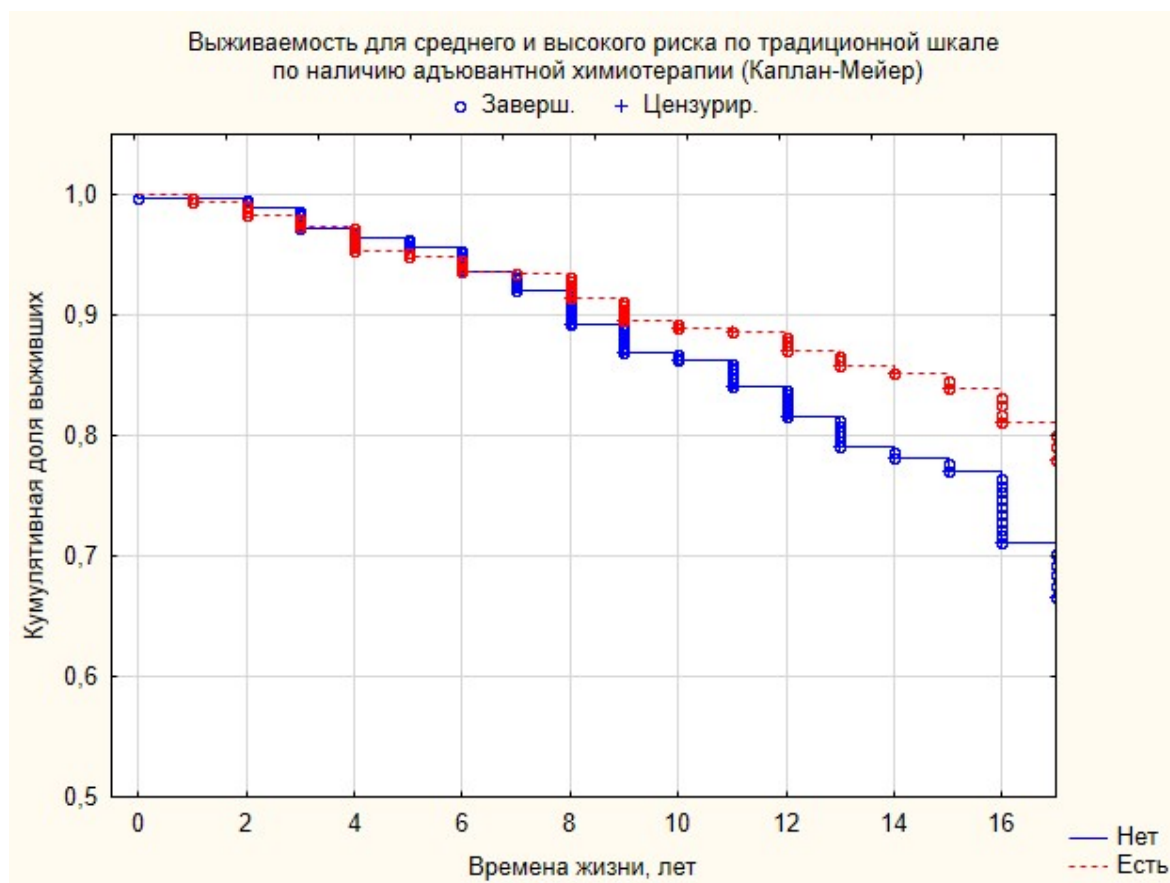


Рисунок 34 – Кривые Каплана – Майера, отражающие общую выживаемость в зависимости от адъювантной химиотерапии в объединенной группе среднего и высокого риска по традиционной шкале

3.6.3 Регрессионная прогностическая шкала

Согласно результатам проведенного анализа (Раздел 3.6.1), моделью, которая наилучшим образом предсказывает показатель «Исход, смерть», является регрессионная шкала, учитывающая 10 факторов, включая малоизученные иммуногистохимические маркеры РМЖ. Каждый фактор из таблицы может принимать значение 0, если у пациента не выполняется условие, 1 – если условие выполняется и 0,5 если данных по показателю отсутствуют. Соответствующие

значения умножаются на коэффициенты и складываются по всем факторам. Чем больше баллов набирается по шкале, тем выше риск наличия соответствующего фактора.

Таблица 23 – Прогностическая шкала альтернативных маркеров РМЖ

Фактор	Коэффициент	100 баллов	Округленные
CK14, есть	0,903	16,111	16
FOXP3 =0	0,833	14,863	15
T2N0M0	0,310	9,982	10
E-cadherin (Есть)	0,342	6,091	6
P53, есть	1,060	18,903	19
HER2 =3	0,709	12,642	13
CD8>0	0,495	8,823	9
EGFR (Есть)	0,233	4,152	4
Степень G2, G3	0,296	5,283	5
CD4>0	0,179	3,189	3
Сумма	5,607	100	100

Согласно количеству набранных баллов, все пациенты были разделены на три группы риска летального исхода: до 40 баллов – низкий риск, от 40 до 60 баллов – средний риск, более 60 баллов – высокий риск. Распределение пациенток исследуемой популяции на группы риска по регрессионной шкале приведено на Рисунке 35 ниже. Высокий риск прогрессирования злокачественного процесса был верифицирован только у 11,3 % участниц исследования.

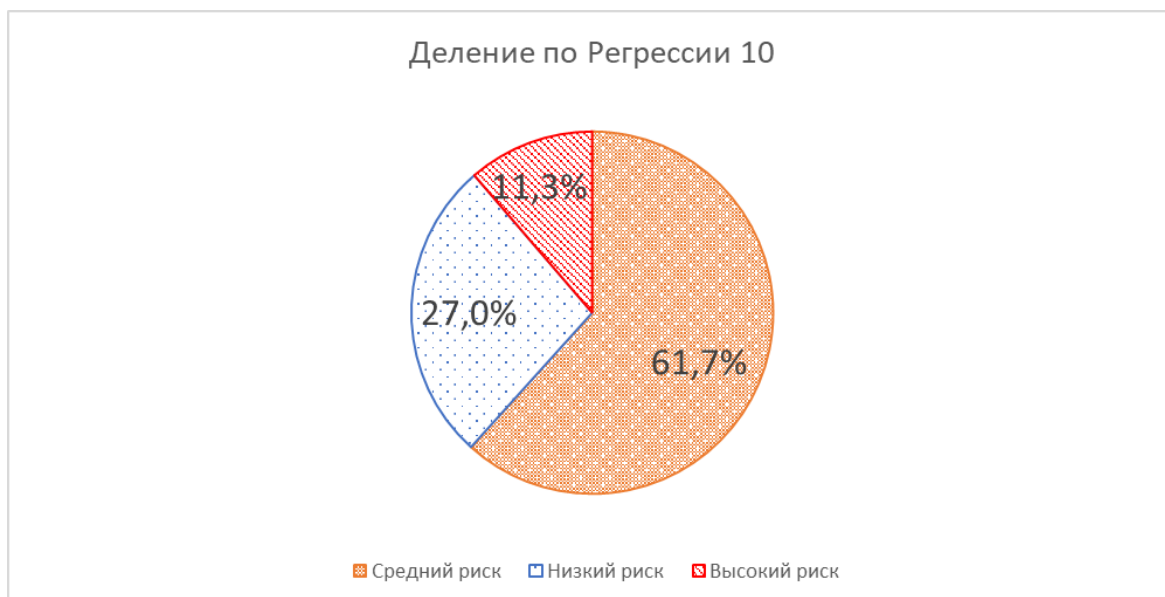


Рисунок 35 – Распределение пациенток по группам риска на основании оценки по регрессионной шкале

Анализ рецепторного статуса опухоли в когортах с разным прогностическим риском по количеству баллов показал, что низкий риск прогрессирования злокачественного процесса у 85,53 % женщин был ассоциирован с положительным стероидным статусом по ЭР/ПР и отрицательной экспрессией HER2 (Рисунок 36). Доля данного типа опухоли, в среднем, в 1,5 раза снижалась по мере увеличения риска прогрессирования РМЖ, достигая 55,89 % и 55,24 % соответственно в когортах со средним и высоким риском неблагоприятного развития заболевания. РМЖ, для которого был характерен отрицательный стероидный статус по ЭР/ПР и экспрессия HER2, был верифицирован только у 13,16 % когорты с благоприятным развитием заболевания. По мере увеличения риска прогрессирования РМЖ доля женщин с данной характеристикой рецепторного статуса, в среднем, двукратно увеличивалась.

Группы риска пациенток с ЭР–, ПР–, HER2– статусом представлены на Рисунке 37 ниже. Почти у половины пациенток исследуемой популяции (43,9 %) был верифицирован средний риск неблагоприятных событий. Высокий риск прогрессирования РМЖ был верифицирован только у 1/5 обследованных женщин (17,3 %), низкий риск – у 38,8 %.

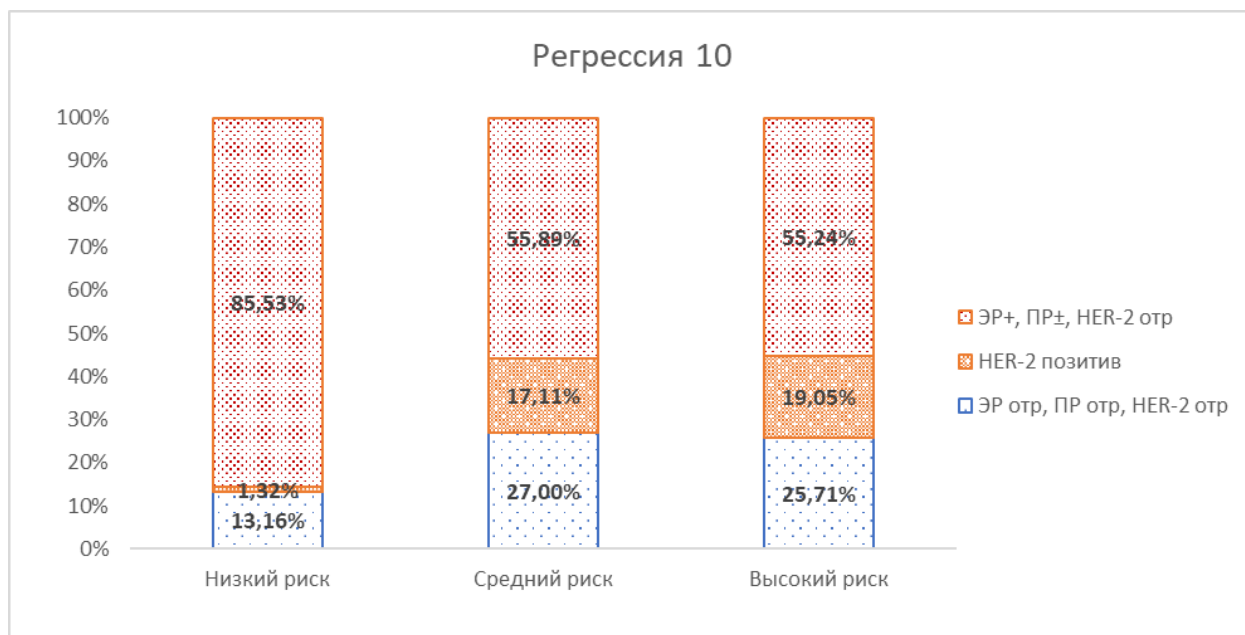


Рисунок 36 – Распределение пациенток с разным рецепторным статусом в подгруппах низкого, среднего и высокого риска летального исхода по традиционной шкале

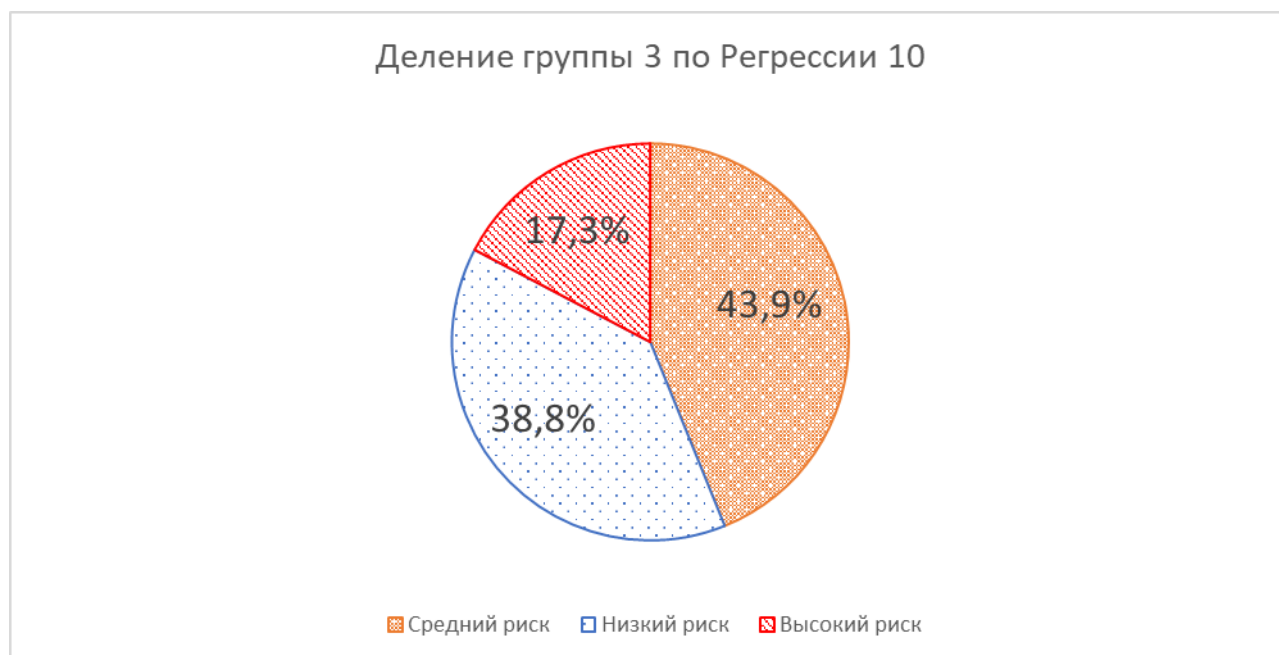


Рисунок 37 – Деление пациентов 3-ей группы по риску исходя из баллов шкалы «Регрессия»

Результаты оценки летальности за 5 лет и 10 лет в группах различного риска по регрессионной шкале приведены на Рисунке 38. Летальность в течение 10 лет в группе высокого риска была в 2,5 раза выше таковой в группе низкого риска

(25,7 % против 10,0 %). Согласно представленным результатам статистического анализа, пятилетняя летальность, достигнув максимальных значений в группе высокого риска, составила только 5,8 %. Относительно пятилетнего срока наблюдения на временном отрезке 10 лет отмечался рост летальности в три раза в группе низкого риска и более, чем в четыре раза в когорте со средним риском. В когорте с высоким риском неблагоприятного течения заболевания летальность на 10-летнем отрезке времени достигла 30,4 %, пятикратно превысив значения пятилетней летальности. Таким образом, если при применении традиционной шкалы отличия между группами низкого и среднего риска регистрировались при сроке наблюдения 10 лет, то анализ летальности с применением новой шкалы позволил идентифицировать различия между группами низкого и высокого риска на отрезке 5 лет.

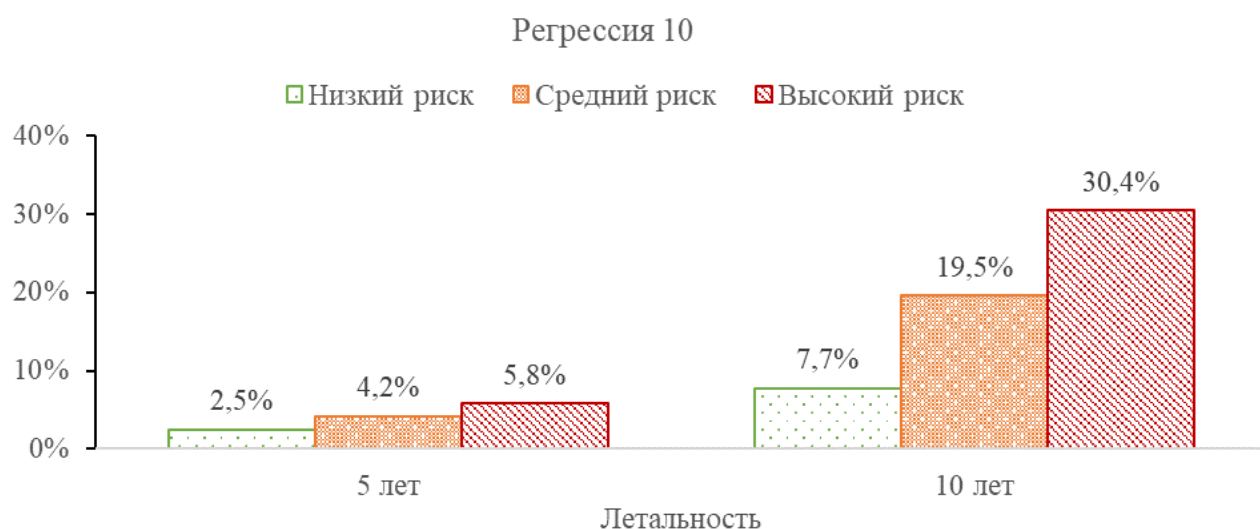


Рисунок 38 – Летальность в группах низкого, среднего и высокого риска по регрессионной шкале

Анализ выживаемости для пациенток групп высокого и низкого риска по регрессионной шкале продемонстрировал выраженные статистически значимые различия ($p < 0,00001$) (Рисунок 39).

Показатель 10-летней выживаемости составил 77,3 % и 94,0 % для групп высокого и низкого риска, соответственно. Отношение рисков (hazard ratio) в регрессионной модели Кокса группы высокого риска к группе низкого риска составило 3,29 (95 % ДИ (2,01; 5,38)).

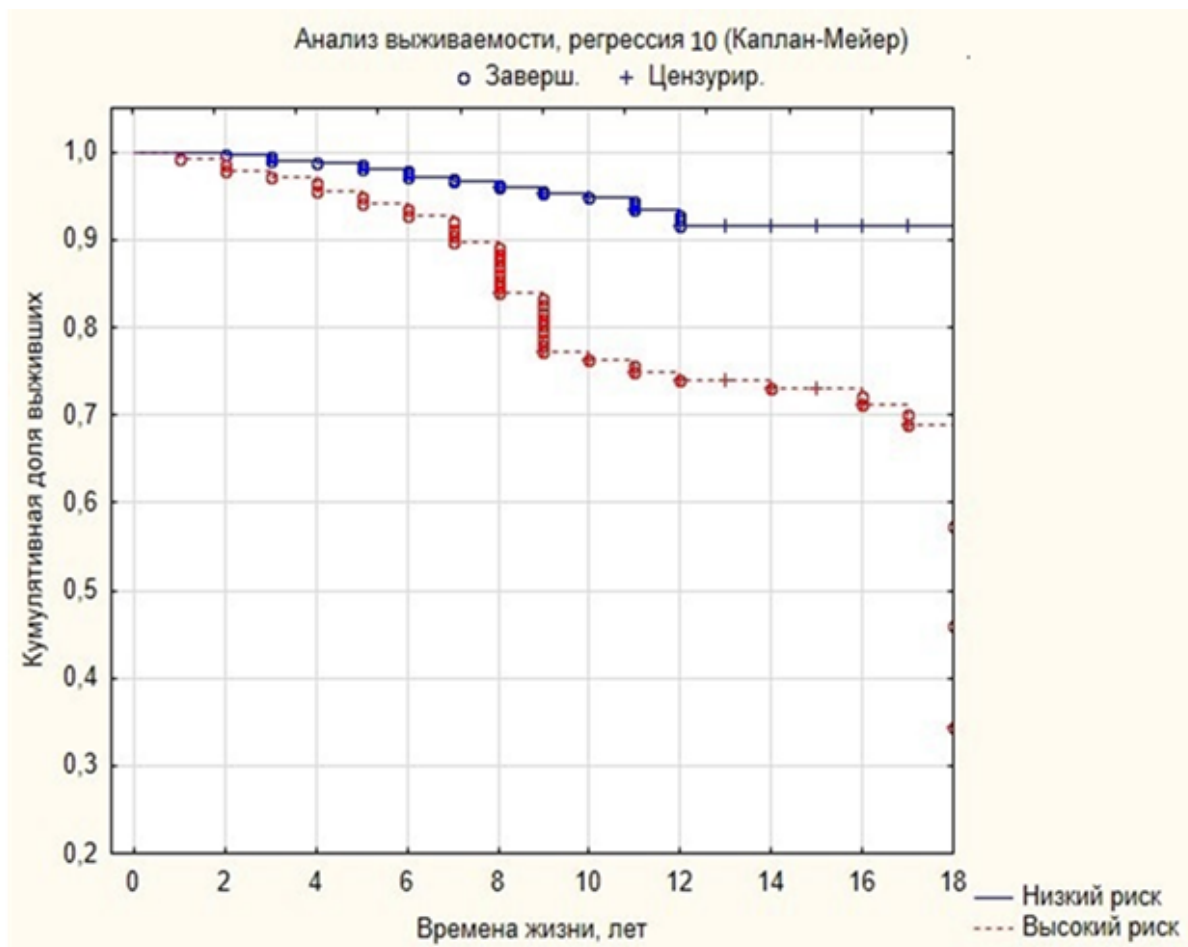


Рисунок 39 – Кривые Каплана – Майера, отражающие общую выживаемость для групп высокого и низкого риска по регрессионной шкале

Результаты оценки эффективности адъювантной химиотерапии в объединенной группе среднего и высокого риска летального исхода по регрессионной шкале представлены на Рисунке 40 ниже. Пациенты групп среднего и высокого рисков (от 40 баллов и выше), получающие адъювантную химиотерапию, имели статистически значимые отличия выживаемости ($p = 0,0057$).

Показатель 10-летней выживаемости составил 88,6 % в группе с химиотерапией и 84,9 % в группе без химиотерапии. Отношение рисков (hazard ratio) в регрессионной модели Кокса группы без химиотерапии к группе с химиотерапией составило 1,53 (95 % ДИ (1,12; 2,08)).

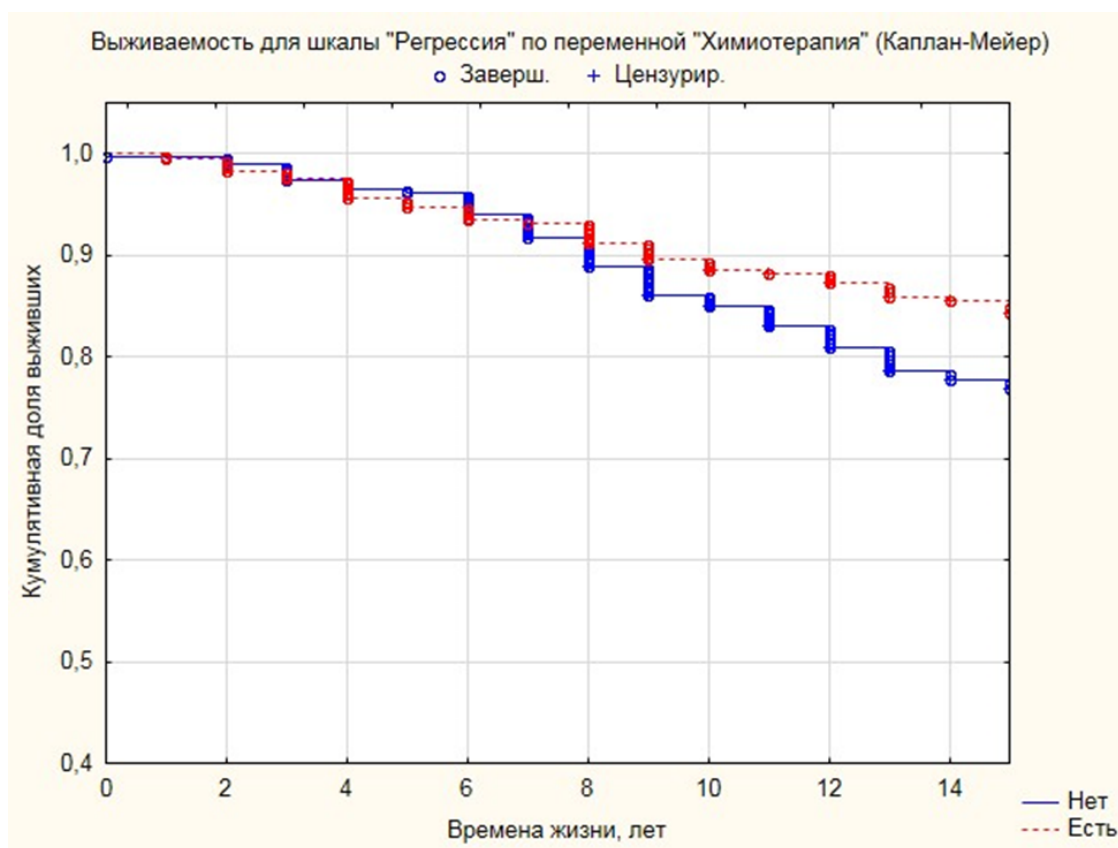


Рисунок 40 – Кривые Каплана – Майера, отражающие общую выживаемость в зависимости от адъювантной химиотерапии в объединенной группе среднего и высокого риска по регрессионной шкале

Результаты сравнения традиционной шкалы и новой шкалы для показателя «Исход, смерть» на 10-летнем этапе продемонстрировали достаточную чувствительность (58,05 %), специфичность (69,47 %) и эффективность (63,76 %) новой шкалы для прогнозирования неблагоприятного развития РМЖ (Таблица 24, Рисунок 41).

Таблица 24 – Результаты сравнения традиционной шкалы и регрессионной для показателя «Исход, смерть» на 10-летнем этапе

Показатель	Традиционная шкала	Регрессионная шкала
Чувствительность	80,49%	58,05 %
Специфичность	36,92%	69,47 %
Эффективность	58,7%	63,76 %
AUROC	0,61	0,67

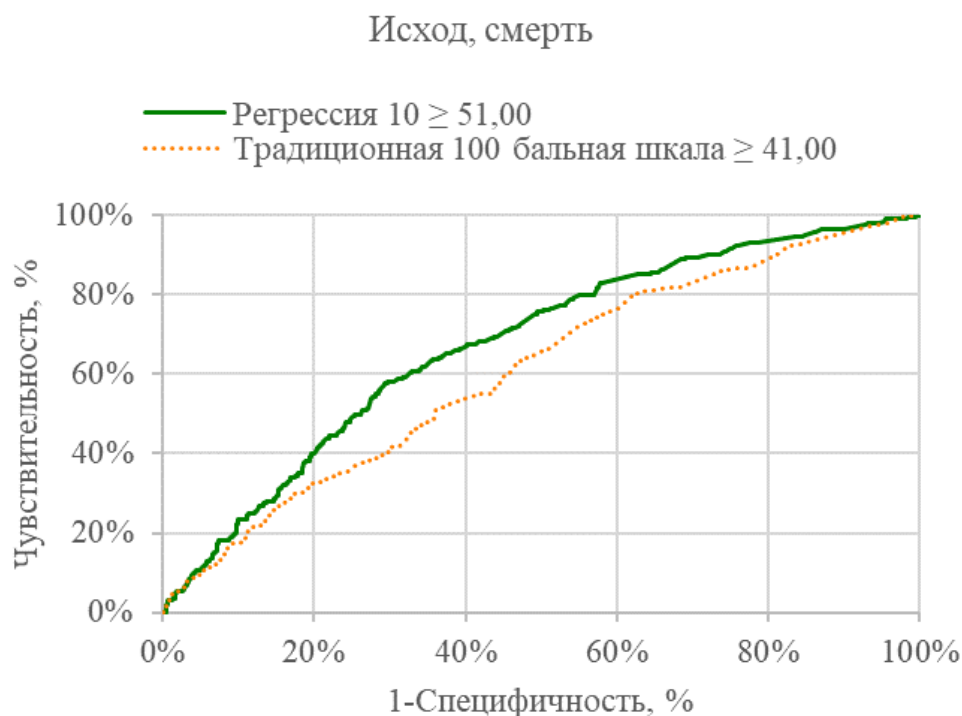


Рисунок 41 – AuROC кривая для традиционной и регрессионной шкалы для 10-летней выживаемости

Таким образом, чувствительность и специфичность у данного метода прогнозирования выше такового традиционной модели. В основе эскалации прогностической и предиктивной значимости новой шкалы лежат высокоточные иммуногистохимические методы оценки, определяющие востребованность детектирования молекулярно-генетического профиля опухоли с целью повышения эффективности и персонализации терапии.

3.7. Молекулярная диагностика РМЖ

3.7.1 Сравнение результатов оценки типа опухоли с помощью молекулярно-генетического анализа и иммуногистохимического исследования

Выполнен молекулярно-генетический анализ с использованием технологии nCounter 84 образца опухоли пациенток пре- и постменопаузального возраста с метастатическим РМЖ, которые наблюдались и получали лечение в 6 медицинских учреждениях Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, ГБУЗ НО «Нижегородский областной клинический онкологический диспансер», КГБУЗ «Алтайский краевой онкологический диспансер», ОБУЗ «Ивановский областной онкологический диспансер», ГБУЗ СК «Пятигорский межрайонный онкологический диспансер», ГБУЗ СК «Ставропольский краевой клинический онкологический диспансер»). В рамках исследования был выполнен анализ экспрессии 28 генов с высокой предиктивной значимостью и значительным накопленным опытом изучения по данным литературы (*ESR1, PGR, PIK3CA, BCAR4, BCAS2, CCND1, CCND2, CCND3, FOXA1, Erb2, EGFR, CDH3, FOXC1, KRT14, KRT5, CD274, CDK4, CDK6, P53, PTEN, BRCA1, BRCA2, CHEK2, CLDN3, CLDN7, AR, TOP2a, TUBBIII*) (Раздел 2.3). По результатам анализа был определен молекулярный подтип опухоли, который сравнивали с результатами, полученными при проведении ИГХ исследования в локальной лаборатории соответствующего медицинского учреждения (суррогатный подтип). Назначение лекарственной терапии

проводилось лечащим врачом по данным ИГХ на основании Клинических рекомендаций Министерства здравоохранения Российской Федерации «Рак молочной железы» [8].

Результаты сравнений представлены в Таблице 25. В двух направленных образцах (№23, №33) был выявлен фиброз, данные образцы использовались в качестве контроля.

По результатам сравнения было выявлено 29 случаев (29/84, 34,5 %) расхождения оценки подтипа опухоли. В 11 случаях (образцы №№2, 8, 14, 21, 24, 40, 41, 52, 58, 70, 77) расхождения относились к люминальным А и В подтипам РМЖ, что может оказать влияние на выбор оптимальной лекарственной терапии, однако при любой тактике назначенное лечение будет соответствовать утвержденным клиническим рекомендациям [8]. В 18 случаях (образцы №№4, 9, 15, 16, 25, 34, 35, 37, 38, 45, 47, 53, 57, 65, 76, 78, 80, 83) расхождения относились к подтипам опухоли РМЖ, для которых рекомендуются принципиально различные схемы лекарственной терапии [8].

Таблица 25 – Сравнение результатов оценки типа опухоли с помощью молекулярно-генетического анализа и иммуногистохимического исследования

Образец опухоли	Молекулярный подтип (100-генная сигнатура)	Суррогатный подтип (по данным ИГХ анализа в локальной лаборатории)	
№1	Erb2-эксперессирующий	Люминальный В HER2 положительный	ЭР – 8, ПР – 0, HER2 – 3+, Ki-67 – 15%
№2	Люминальный А	Люминальный В	ЭР – 8, ПР – 0, HER2 – 1+, Ki-67 – 40%
№3	Базальный	Трижды негативный	ЭР – 0, ПР – 4, HER2 – 0, Ki-67 – 60%
№4	Базальный	HER2 положительный (не люминальный)	ЭР – 0, ПР – 0, HER2 – 3+, Ki-67 – 40%
№5	Erb2-эксперессирующий	HER2 положительный (не люминальный)	ЭР – 0, ПР – 0, HER2 – 3+, Ki-67 – 80%
№6	Базальный	Трижды негативный	ЭР – 0, ПР – 0, HER2 – 0, Ki-67 – 60%
№7	Люминальный А	Люминальный А	ЭР – 8, ПР – 8, HER2 – 1+, Ki-67 – не исследован
№8	Люминальный В	Люминальный А	ЭР – 8, ПР – 4, HER2 – 0, Ki-67 – 10%
№9	Базальный	HER2 положительный (не люминальный)	ЭР – 0, ПР – 0, HER2 – 3+, Ki-67 – 80%
№10	Люминальный А	Люминальный А	ЭР – 8, ПР – 8, HER2 – 0, Ki-67 – 10%
№11	Люминальный В	Люминальный В	ЭР – 8, ПР – 3, HER2 – 2+, Ki-67 – 40%
№12	Базальный	Трижды негативный	ЭР – 0, ПР – 5, HER2 – 1+, Ki-67 – 7%
№13	Базальный	Трижды негативный	ЭР – 0, ПР – 3, HER2 – 1+, Ki-67 – 80%, PD-L1-негативный
№14	Люминальный А	Люминальный В	ЭР – 8, ПР – 8, HER2 – 1+, Ki-67 – 20%

Образец опухоли	Молекулярный подтип (100-генная сигнатура)	Суррогатный подтип (по данным ИГХ анализа в локальной лаборатории)	
№15	Базальный	Люминальный В	ЭР – 8, ПР – 5, HER2 – 1+, Ki-67 – 25%
№16	Базальный	Люминальный В	ЭР – 8, ПР – 0, HER2 – 0, Ki-67 – 50%
№17	Базальный	Трижды негативный	ЭР – 0, ПР – 0, HER2 – 0, Ki-67 – 95%
№18	Базальный	Трижды негативный	ЭР – 0, ПР – 0, HER2 – 2+, Ki-67 – 90%
№19	Люминальный В	Люминальный В	ЭР – 8, ПР – 0, HER2 – 0, Ki-67 – 30%
№20	Базальный	Трижды негативный	ЭР – 0, ПР – 0, HER2 – 0, Ki-67 – 45%
№21	Люминальный В	Люминальный А	ЭР – 100%, ПР – 20%, HER2 – 0, Ki-67 – 15%
№22	Erb2-эксперессирующий	Люминальный В HER2 положительный	ЭР – 5, ПР – 0, HER2 – 3+, Ki-67 – не исследован
№23	<i>контроль</i>	<i>контроль</i>	<i>контроль</i>
№24	Люминальный В	Люминальный А	ЭР – 7, ПР – 8, HER2 – 0, Ki-67 – 11%
№25	Базальный	Люминальный В	ЭР – 5, ПР – 0, HER2 – 1+, Ki-67 – 25%
№26	Базальный	Трижды негативный	ЭР – 0, ПР – 0, HER2 – 1+, Ki-67 – 95%
№27	Базальный	Трижды негативный	ЭР – 0, ПР – 0, HER2 – 0, Ki-67 – 60%
№28	Базальный	Трижды негативный	ЭР – 0, ПР – 0, HER2 – 1+, Ki-67 – 80%
№29	Люминальный В	Люминальный В	ЭР – 8, ПР – 7, HER2 – 0, Ki-67 – 40%
№30	Люминальный В	Люминальный В	ЭР – 8, ПР – 8, HER2 – 0, Ki-67 – 35%
№31	Люминальный В	Люминальный В	ЭР – 100%, ПР – 25%, HER2 – 1+, Ki-67 – 25%
№32	Люминальный В	Люминальный В	ЭР – 5, ПР – не исследован, HER2 – 1+ Ki-67 – 30%
№33	<i>контроль</i>	<i>контроль</i>	<i>контроль</i>
№34	Базальный	Люминальный В	ЭР – 8, ПР – 4, HER2 – 0, Ki-67 – 35%
№35	Базальный	Люминальный А	ЭР – 8, ПР – 8, HER2 – 1+, Ki-67 – 10%
№36	Люминальный В	Люминальный В	ЭР – 8, ПР – 6, HER2 – 0, Ki-67 – 40%
№37	Люминальный В	Трижды негативный	ЭР – 0, ПР – 0, HER2 – 0, Ki-67 – 90%
№38	Люминальный В	Трижды негативный	ЭР – 0, ПР – 0, HER2 – 0, Ki-67 – 80%
№39	Люминальный В	Люминальный В	ЭР – 100%, ПР – 100%, HER2 – 0 Ki-67 – 30%
№40	Люминальный В	Люминальный А	ЭР – 7, ПР – 7, HER2 – 0, Ki-67 – 15%
№41	Люминальный В	Люминальный А	ЭР – 8, ПР – 8, Ki-67 – 5%
№42	Люминальный В	Люминальный В	ЭР – 8, ПР – 8, Ki-67 – 60%
№43	Люминальный В	Люминальный В	ЭР – 8, ПР – 5, HER2 – 0, Ki-67 – 35%
№44	Люминальный В	Люминальный В	ЭР – 8, ПР – 8, HER2 – 1+, Ki-67 – 63%
№45	Базальный	Люминальный В	ЭР – 8, ПР – 8, HER2 – 1+, Ki-67 – 17%
№46	Люминальный В	Люминальный В	ЭР – 7, ПР – 6, HER2 – 1+, Ki-67 – 12%
№47	Базальный	Люминальный В	ЭР – 8, ПР – 3, HER2 – 0, Ki-67 – 25%
№48	Люминальный В	Люминальный В	ЭР – 8, ПР – 6, HER2 – 2+, Ki-67 – 3%
№49	Люминальный В	Люминальный В	ЭР – 8, ПР – 8, HER2 – 1, Ki-67 – 67-70%
№50	Люминальный В	Люминальный В	РЭ-3+++ , РП-3+++ , HER2 – 3+ Ki-67 – 85%
№51	Люминальный В	Люминальный В	ЭР – 0, ПР – 0, HER2 – 1+, Ki-67 – 40%
№52	Люминальный В	Люминальный А	ЭР – 95, ПР – 60, HER2 – 0, Ki-67 – 17%
№53	Базальный	Люминальный В	ЭР – 1+, ПР – 3+++ , HER2 – 0, Ki-67 – 15%
№54	Люминальный В	Люминальный В	ЭР – 8, ПР – 7, HER2 – 0, Ki-67 – 50%
№55	Erb2-эксперессирующий	Люминальный В HER2 положительный	ЭР – 80% , ПР – 50%, HER2 – 3+ Ki-67 – 20%
№56	Erb2-эксперессирующий	HER2 положительный (не люминальный)	ЭР – 2%, ПР – 60%, HER2 – 3+ Ki-67 – 70%

Образец опухоли	Молекулярный подтип (100-генная сигнатура)	Суррогатный подтип (по данным ИГХ анализа в локальной лаборатории)	
		Молекулярный подтип	Суррогатный подтип
№57	Erb2-эксперессирующий	Люминальный В	ЭР – положит., ПР – положит., HER2 – 1+, Ki-67 – 40%
№58	Люминальный В	Люминальный А	ЭР – 8, ПР – 8, HER2 – 0, Ki-67 – 10%
№59	Люминальный В	Люминальный В	ЭР – 8, ПР – 8, HER2 – 1+, Ki-67 – 5%
№60	Люминальный В	Люминальный В	ЭР – 3+++, ПР – 2++, HER2 – 2+ Ki-67 – 50%
№61	Базальный	Трижды негативный	ЭР – 0, ПР – 0, HER2 – 1, Ki-67 – 30%
№62	Erb2-эксперессирующий	Люминальный В HER2 положительный	ЭР – 0, ПР – 0, HER2 – 3+, Ki-67 – 26%
№63	Erb2-эксперессирующий	Люминальный В HER2 положительный	ЭР – 5, ПР – 0, HER2 – 3+, Ki-67 – 22%
№64	Базальный	Трижды негативный	ЭР – 0, ПР – 0, HER2 – 0, Ki-67 – 52%
№65	Базальный	Люминальный В	ЭР – 8, ПР – 4, HER2 – 2+, Ki-67 – 21%
№66	Люминальный В	Люминальный В	ЭР – 8, ПР – 7%, HER2 – 1+, Ki-67 – 25%
№67	Erb2-эксперессирующий	Люминальный В HER2 положительный	ЭР – 0, ПР – 0, HER2 – 2+, Ki-67 – 38%
№68	Erb2-эксперессирующий	Люминальный В HER2 положительный	ЭР – 6, ПР – 0, HER2 – 1+, Ki-67 – 28%
№69	Люминальный В	Люминальный В	ЭР – 5, ПР – 0, HER2 – 1+, Ki-67 – 56%
№70	Люминальный А	Люминальный В	ЭР – 7, ПР – 0, HER2 – 0, Ki-67 – 85%
№71	Erb2-эксперессирующий	Люминальный В HER2 положительный	ЭР – 7, ПР – 0, HER2 – 3+, Ki-67 – 63%
№72	Базальный	Трижды негативный	ЭР – 0, ПР – 0, HER2 – 1+, Ki-67 – 8%
№73	Erb2-эксперессирующий	Люминальный В HER2 положительный	ЭР – положит., ПР – положит., HER2 – 3+, Ki-67 – 40%
№74	Люминальный В	Люминальный В	ЭР – 6, ПР – 7, HER2 – 1+, Ki-67 – 35%
№75	Люминальный А	Люминальный А	ЭР – 6, ПР – 3, HER2 – 0, Ki-67 – 10%
№76	Базальный	Люминальный В	ЭР – 6, ПР – 0, HER2 – 0, Ki-67 – 60%
№77	Люминальный В	Люминальный А	ЭР – 8, ПР – 6, HER2 – 0, Ki-67 – 15%
№78	Базальный	HER2 положительный (не люминальный)	ЭР – 0, ПР – 0, HER2 – 3+, Ki-67 – 40%
№79	Люминальный В	Люминальный В	ЭР – 8, ПР – 7, HER2 – 0, Ki-67 – 40%
№80	Базальный	Трижды негативный	ЭР – 0, ПР – 0, HER2 – 0, Ki-67 – 95%
№81	Люминальный В	Люминальный В	ЭР – 8, ПР – 7, HER2 – 0, Ki-67 – 40%
№82	Люминальный В	Люминальный В	ЭР – 7, ПР – 4, HER2 – 0, Ki-67 – 40%
№83	Базальный	Люминальный В	ЭР – 7, ПР – 0, HER2 – 0, Ki-67 – 15%
№84	Люминальный В	Люминальный В	ЭР – 7, ПР – 0, HER2 – 0, Ki-67 – 30%

Примечание: В таблице серым цветом выделены случаи расхождения оценки подтипа опухоли.

Перед исследованием вышеописанных образцов опухолевой ткани в качестве тестовой реакции был проведен анализ архивного материала из парафиновых блоков опухолей 12 женщин из 1216 больных с T1–2N0M0 ЭР+, ПР+, HER2– РМЖ, включенных в ретроспективный анализ (Глава 2.1). Тепловая карта 12 больных представлена на Рисунке 42 ниже. Интерпретация результатов оценки подтипа опухоли по тепловой карте совпала с результатами ИГХ

исследований, что позволило перейти к исследованию образцов опухолевой ткани у пациенток с мРМЖ.

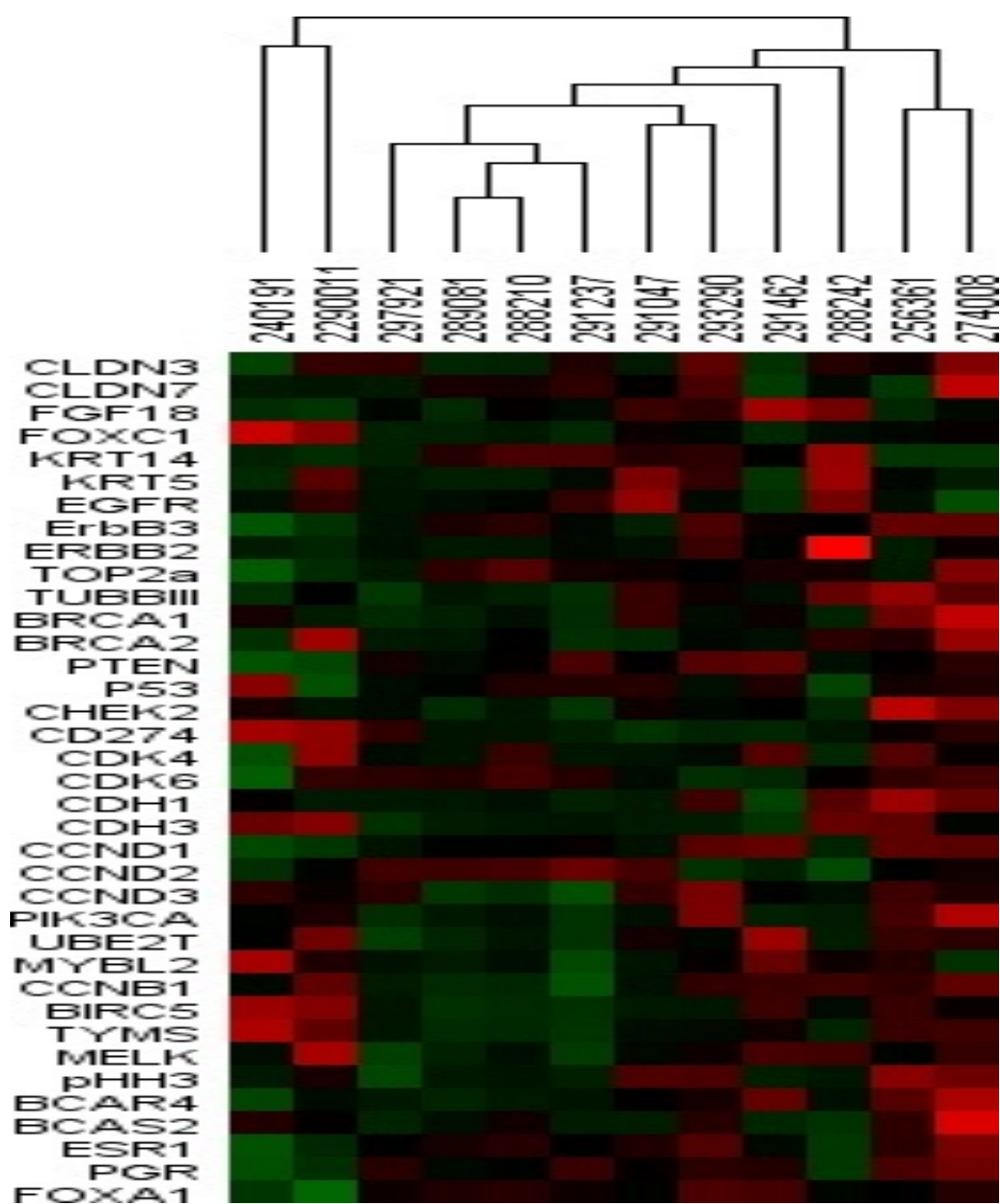


Рисунок 42 – Тепловая карта: тестовая реакция у 12 больных с T1–2N0M0 ЭР+, ПР+, HER2– РМЖ (анализ архивного материала)

Примечание: цветовой показатель соответствует числовому значению для каждого маркера

3.7.2 Результаты оценки экспрессии отдельных генов

3.7.2.1 Оценка экспрессии *ESR1*, *PGR*, *PIK3CA*, *ERB2*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CD274*

Результаты оценки экспрессии 7 генов (*ESR1*, *PGR*, *PIK3CA*, *ERB2*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CD274*), рекомендуемых для исследования клиническими рекомендациями МЗ РФ [8], обобщены на Рисунках 43-51 ниже.

Уровень экспрессии *ESR1* (Рисунок 43) варьировал от 52,42 до 86467,64. При сравнительном анализе с результатами ИГХ исследования ЭР+ статус (ИГХ) расценивался как ложноположительный в случае значений экспрессии *ESR1* от 52,42 до 3054,92 (+1), а для ЭР– статуса оценка считалась ложноотрицательной в случае значений экспрессии от 9184,07 (+2) и выше.

В целом, уровень экспрессии *ESR1* по nCounter Analysis System коррелировал с результатами ИГХ исследования. В образцах с ЭР– статусом уровень экспрессии *ESR1* составлял от 52,42 до 26652,61 (медиана: 293,28; среднее (\pm SD): 4869,70 (8823,17)), в образцах с ЭР+ статусом – от 304,30 до 86467,64 (медиана: 5560,13; среднее (\pm SD): 11756,48 (15325,72)), различия между группами ЭР– и ЭР+ статуса были статистически значимыми ($p < 0,0001$) (Рисунок 44).

Уровень экспрессии *PGR* (Рисунок 45) варьировал от 41,89 до 86467,64. Уровни 41,89–2058,33, которые отмечались для большинства исследуемых образцов, соответствовали оценке экспрессии «+1», 2058,33–4002,01 – «+2», выше 4002,01 – «+3».

Уровень экспрессии *PIK3CA* (Рисунок 46) варьировал от 323,59 до 3583,97. Уровни 323,59–1293,65, наблюдаемые для большинства исследуемых образцов, соответствовали оценке экспрессии «+1», 1293,65–2244,04 – «+2», выше 2244,04 – «+3».

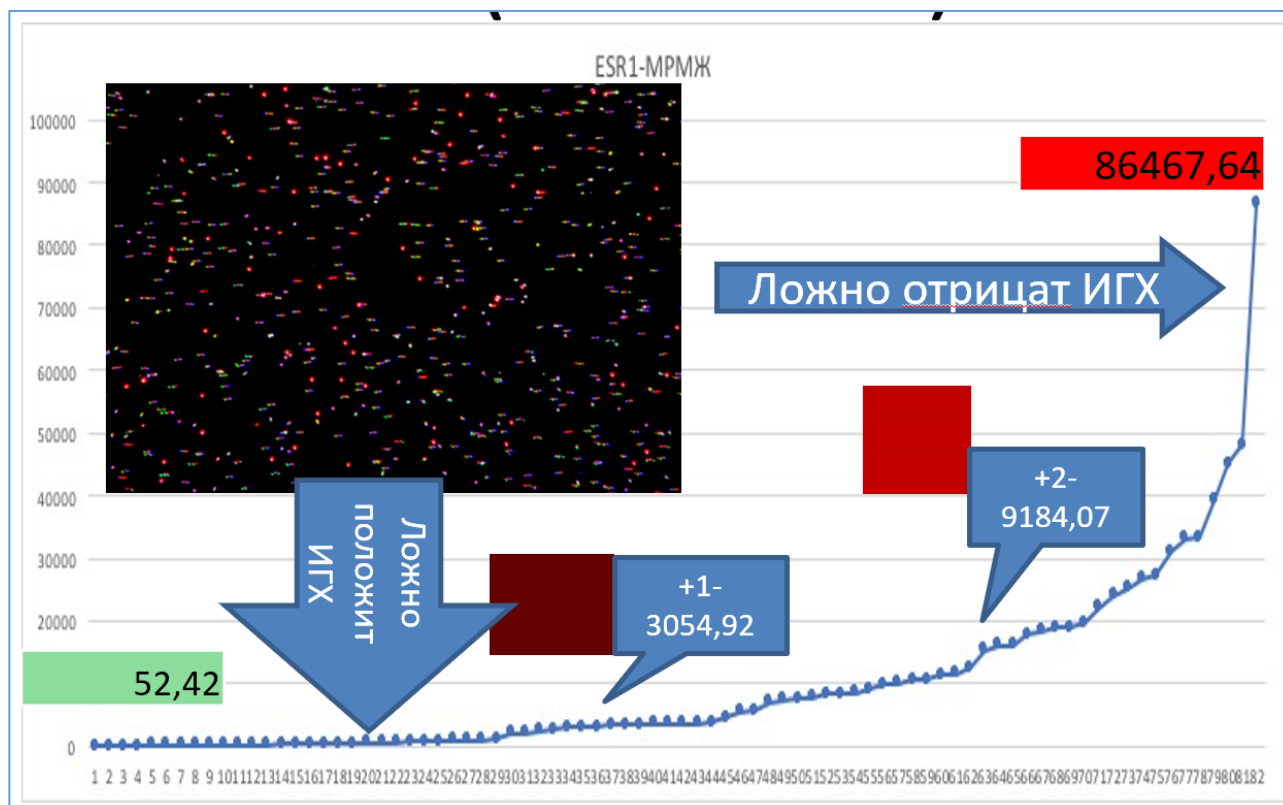


Рисунок 43 – Результаты оценки экспрессии *ESR1*

Примечание: Представлены числовые результаты в порядке возрастания, значения от 1 до 82 соответствуют номеру в упорядоченном ряду (не номеру опухолевого образца)

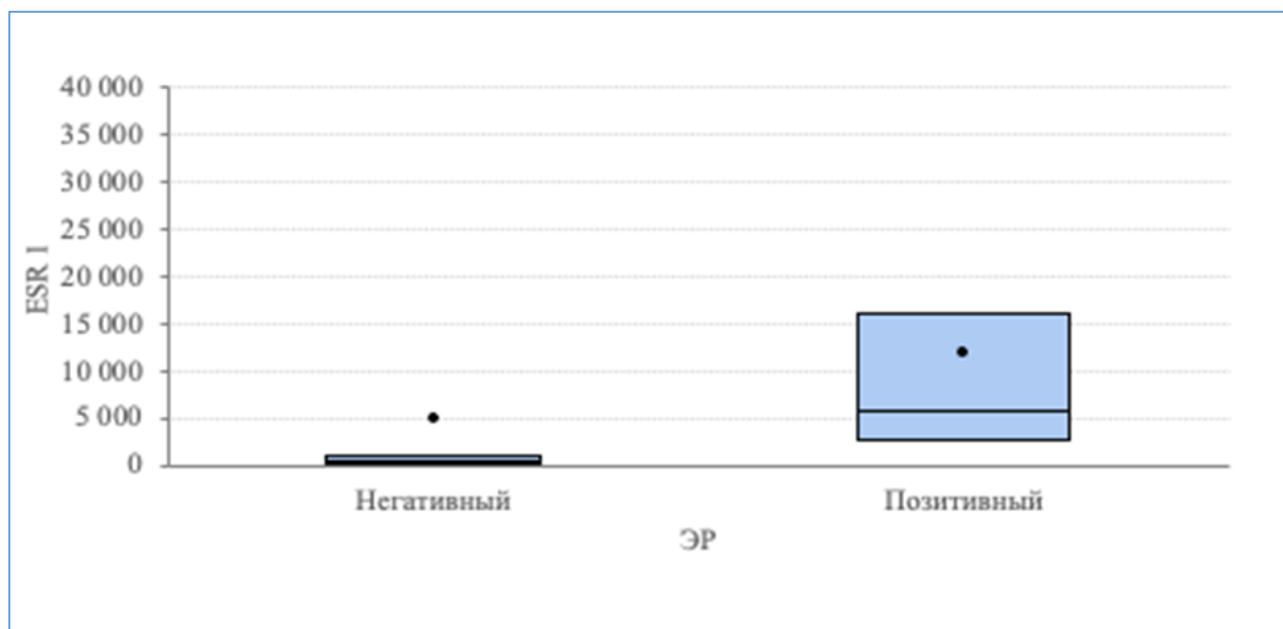


Рисунок 44 – Результаты оценки экспрессии *ESR1* в сравнении с оценкой ЭР статуса методом ИГХ

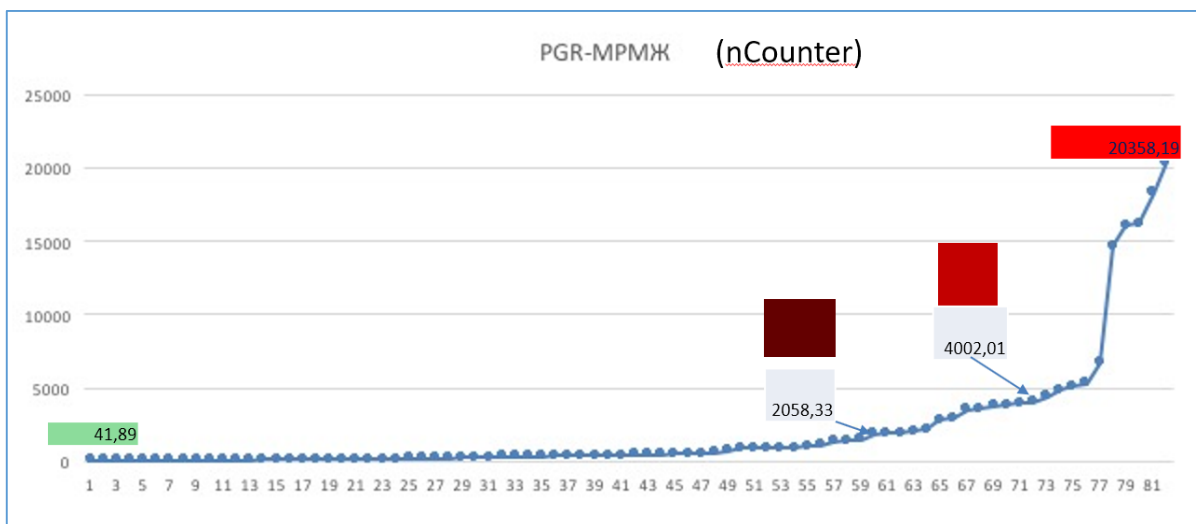


Рисунок 45 – Результаты оценки экспрессии *PGR*

Примечание: Представлены числовые результаты в порядке возрастания, значения от 1 до 81 соответствуют номеру в упорядоченном ряду (не номеру опухолевого образца)

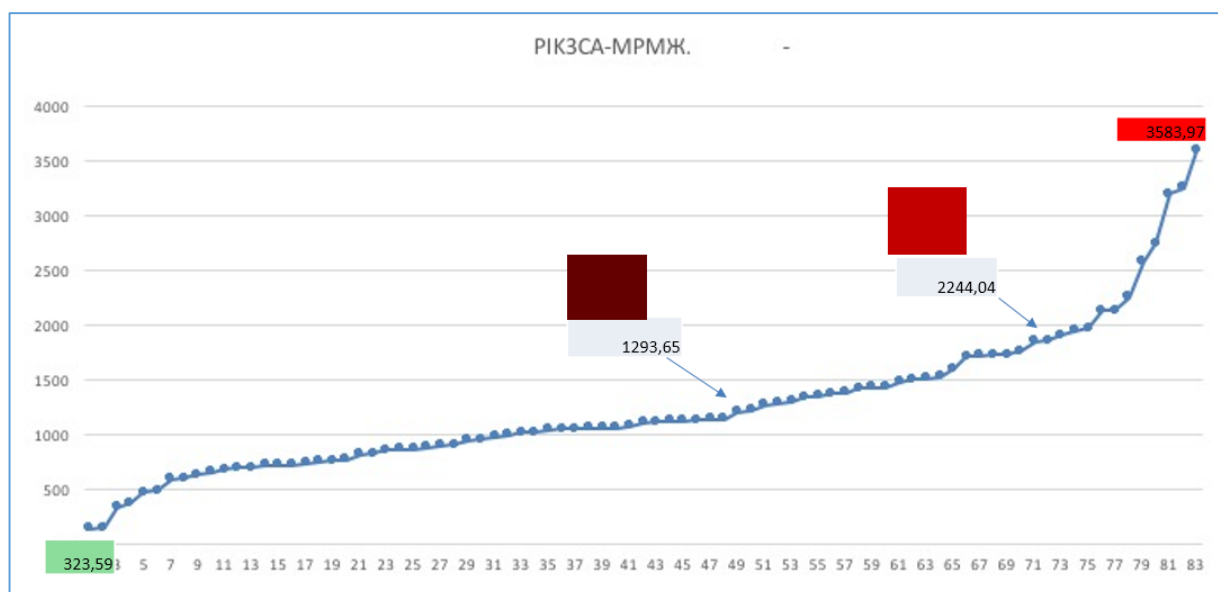


Рисунок 46 – Результаты оценки экспрессии *PIK3CA*

Примечание: Представлены числовые результаты в порядке возрастания, значения от 1 до 83 соответствуют номеру в упорядоченном ряду (не номеру опухолевого образца)

Согласно действующим клиническим рекомендациям МЗ РФ [8] пациенткам с гормонозависимым HER2– мРМЖ целесообразно определение мутации в гене *PIK3CA* для выбора оптимальной тактики лекарственной терапии. В связи с этим, был проведен генетический анализ (RT-PCR, секвенирование по Сенгеру) трех образцов опухолевой ткани с ЭР+, ПР+, HER2– статусом и экспрессией гена *PIK3CA* >2244,04, который подтвердил наличие мутации.

Оценка экспрессии *PIK3CA* позволяет индивидуализировать тактику лечения пациенток с РМЖ. Результаты III фазы рандомизированного исследования SOLAR-1 продемонстрировали преимущество комбинации алпелисиба с фулвестрантом по сравнению с монотерапией фулвестрантом у больных с HR+/HER2-распространенным РМЖ с наличием мутации *PIK3CA* в опухоли в увеличении медианы выживаемости без прогрессирования (11,0 месяцев против 5,7 месяцев, $p < 0,001$), увеличении частоты объективных ответов (26,6 % против 12,8 %), в том числе и у пациентов с измеряемыми очагами (35,7 % против 16,2 %). Комбинация алпелисиб + фулвестрант показала значимую эффективность по сравнению с одним фулвестрантом в 1–2 линии терапии, в том числе у пациенток, получавших лечение CDK4/6-ингибиторами [27].

Уровень экспрессии *ERB2* (Рисунок 47) варьировал от 252,32 до 128519,2. При сравнительном анализе с результатами ИГХ исследования HER2+ статус (ИГХ) расценивался как ложноположительный в случае значений экспрессии *ERB2* от 252,32 до 9196,25 (+1), а для HER2– статуса оценка считалась ложноотрицательной в случае значений экспрессии от 15022,46 (+2) и выше.

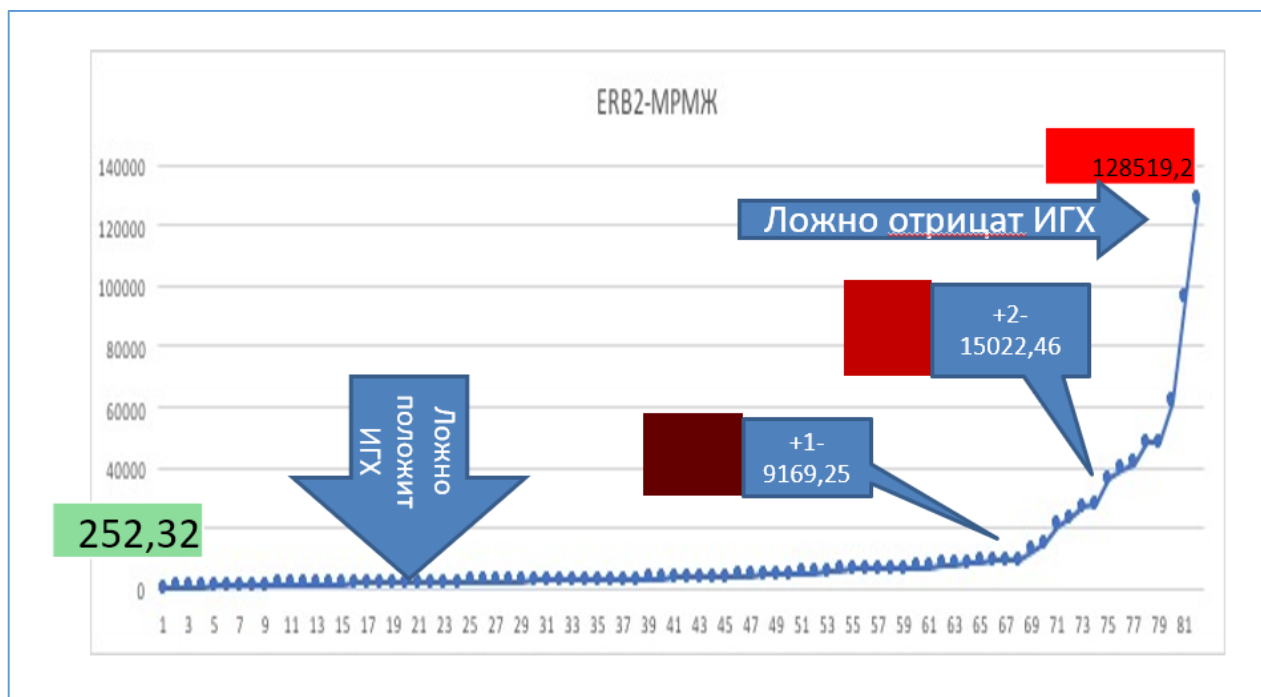


Рисунок 47 – Результаты оценки экспрессии *ERB2*

Примечание: Представлены числовые результаты в порядке возрастания, значения от 1 до 81 соответствуют номеру в упорядоченном ряду (не номеру опухолевого образца)

Результаты дополнительного анализа показали, что уровень экспрессии *ERB2* по nCounter Analysis System коррелировал с результатами ИГХ оценки HER2 статуса.

В образцах с HER2 статусом 0 баллов уровень экспрессии *ERB2* составлял от 583,93 до 22986,09 (медиана: 2841,31; среднее (\pm SD): 4130,28 (3903,91)), статусом 1 балл – от 252,32 до 39315,20 (медиана: 3097,72; среднее (\pm SD): 5258,62 (7431,21)), статусом 2 балла – от 2995,61 до 15022,46 (медиана: 8898,56; среднее (\pm SD): 9053,16 (3664,86)), статусом 3 балла – от 819,72 до 128519,20 (медиана: 36025,32; среднее (\pm SD): 43412,01 (35165,59)), различия между группами разного статуса были статистически значимыми ($p < 0,0001$) (Рисунок 48).

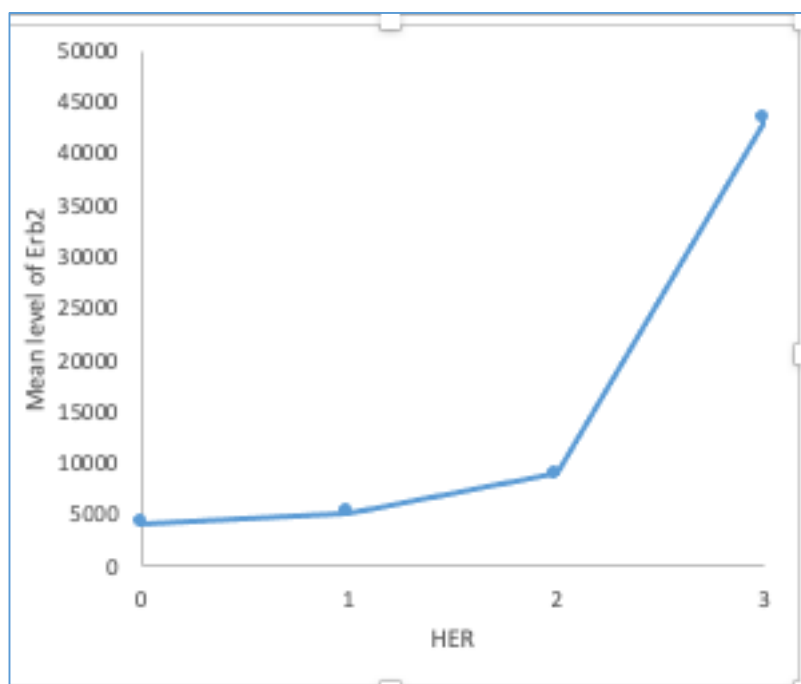


Рисунок 48 – Результаты оценки экспрессии *ERB2* в сравнении с оценкой HER2 статуса методом ИГХ

Уровень экспрессии *BRCA1* (Рисунок 49) варьировал от 123,8 до 3583,97. Уровни 123,8–583,77, наблюдаемые для большинства исследуемых образцов, соответствовали оценки экспрессии «+1», уровни 583,77–1500,91 – «+2», выше 1500,91 – «+3». У двух пациенток с HER2– статусом опухоли и экспрессией гена *BRCA1* выше 583,77, был проведен генетический анализ методом NGS и выявлена мутация гена *BRCA1*.



Рисунок 49 – Результаты оценки экспрессии *BRCA1*

Примечание: Представлены числовые результаты в порядке возрастания, значения от 1 до 81 соответствуют номеру в упорядоченном ряду (не номеру опухолевого образца)

Уровень экспрессии *BRCA2* (Рисунок 50) варьировал от 123,8 до 3583,97. Уровни 123,8–782,16, наблюдаемые для большинства исследуемых образцов, соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 782,16–1303,97 – «+2», выше 1303,97 – «+3».

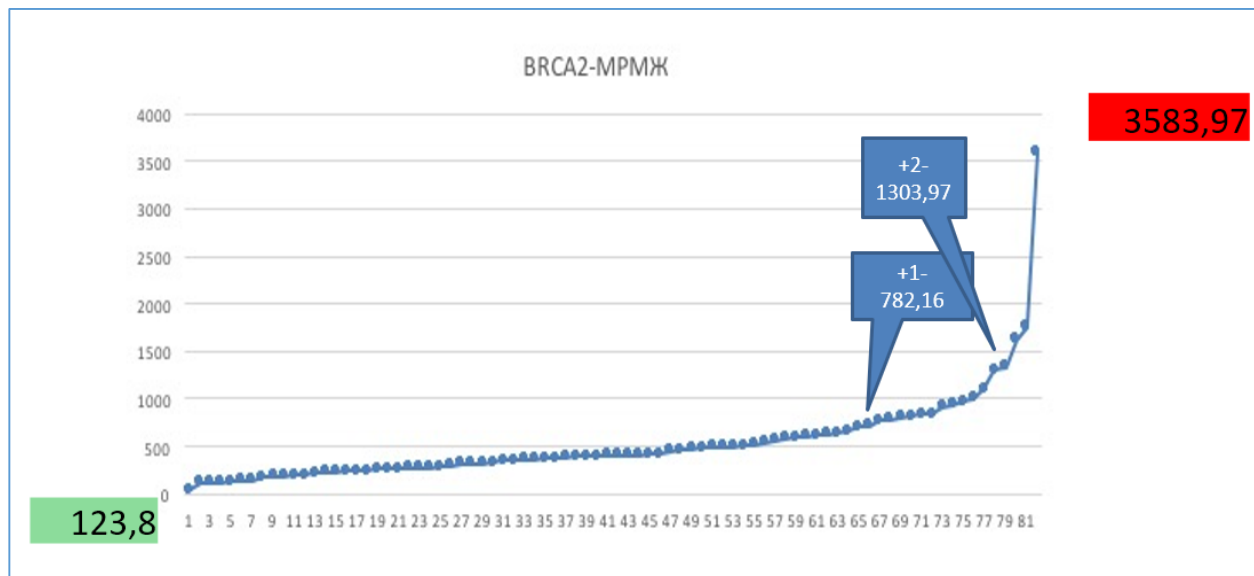


Рисунок 50 – Результаты оценки экспрессии *BRCA2*

Примечание: Представлены числовые результаты в порядке возрастания, значения от 1 до 81 соответствуют номеру в упорядоченном ряду (не номеру опухолевого образца)

Результаты недавних клинических исследований позволяют индивидуализировать назначение терапии при выявлении мутаций генов *BRCA1/2*. В исследовании III фазы OlympiA с включением 1836 больных с ранним РМЖ, выявленными патогенными мутациями генов *BRCA1/2* и высоким риском рецидива, на промежуточном анализе после 2,5 лет наблюдения было показано, что при терапии олапарибом в дозе 300 мг 2 раза в день в течение одного года после полностью завершенного локального и системного лечения (неoadъювантной и/или адъювантной химиотерапии) 3-летняя выживаемость без инвазивных заболеваний составила 85,9 % в группе олапариба и 77,1 % в группе плацебо (разница, 8,8 %; 95 % ДИ: 4,5; 13,0; отношение рисков для инвазивного заболевания или смерти, 0,58; 99,5 % ДИ: 0,41; 0,82; $p < 0,001$). 3-летняя выживаемость без отдаленного заболевания составила 87,5 % в группе олапариба и 80,4 % в группе плацебо (разница, 7,1 %; 95 % ДИ, 3,0-11,1;

отношение рисков для отдаленного заболевания или смерти, 0,57; 99,5 % ДИ: 0,39; 0,83; $p < 0,001$). Профиль безопасности олапариба соответствовал ранее полученным данным [349]. Кроме того, показана эффективность олапариба при наличии мутаций gPALB2 [348]. В исследовании EMBRACA талазопариб оказался более эффективным, чем терапия по выбору врача, у пациентов с мРМЖ и мутацией гена *BRCA*. Выживаемость без прогрессирования составила 8,6 месяцев и 5,6 месяцев в группах талазопариба и химиотерапии соответственно (отношение рисков 0,54; 95 % ДИ: 0,41; 0,71; $p < 0,0001$) [164, 209]. В отдельном исследовании не было установлено связи между эффективностью талазопариба и генетическими/геномными характеристиками [52].

Уровень экспрессии *CD274* (Рисунок 51) варьировал от 36,97 до 3550,56. Уровни 36,94–500,04, наблюдаемые для большинства исследуемых образцов, соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 500,04–1100,17 – «+2», выше 1100,17 – «+3». У трех пациенток с HER2– статусом опухоли и экспрессией гена *CD274* выше 500, по результатам ИГХ исследования был подтвержден PDL1-положительный статус опухоли.

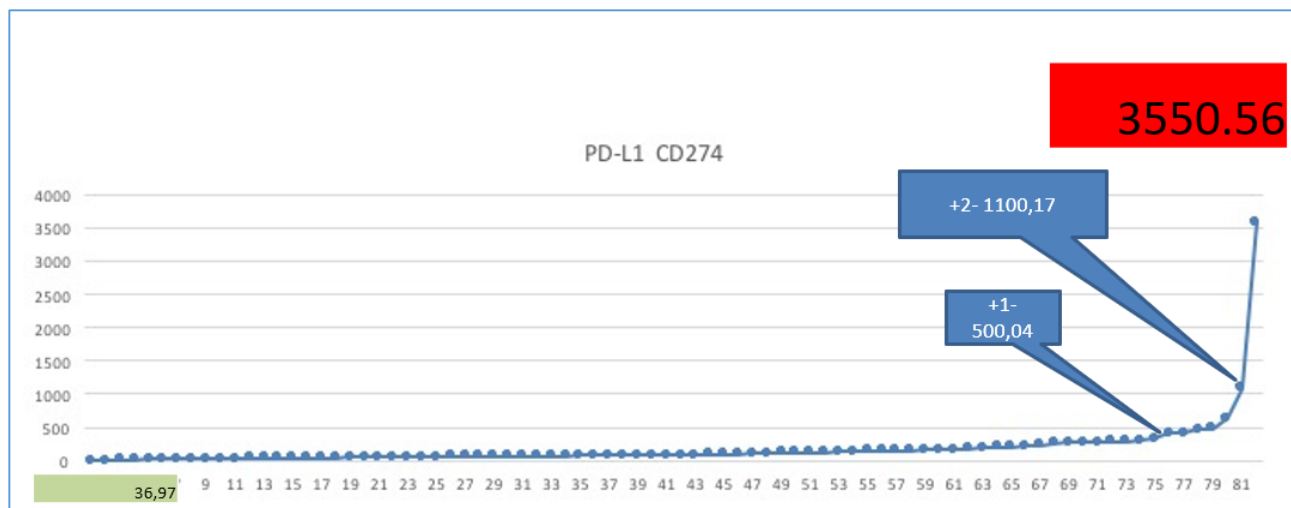


Рисунок 51 – Результаты оценки экспрессии *CD274*

Примечание: Представлены числовые результаты в порядке возрастания, значения от 1 до 81 соответствуют номеру в упорядоченном ряду (не номеру опухолевого образца)

3.7.2.2 Оценка экспрессии *BCAR4*, *BCAS2*, *CCND1*, *CCND2*, *CCND3*, *FOXAI*

Результаты оценки экспрессии генов *BCAR4*, *BCAS2*, *CCND1*, *CCND2*, *CCND3*, *FOXAI*, связанных с гормоночувствительностью и гормонорезистентностью опухоли, обобщены ниже.

Уровень экспрессии *BCAR4* (Рисунок 52) варьировал от 9,08 до 678,82. Уровни 9,08–214,37 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 214,37–3163,766 – «+2», выше 3163,766 – «+3».

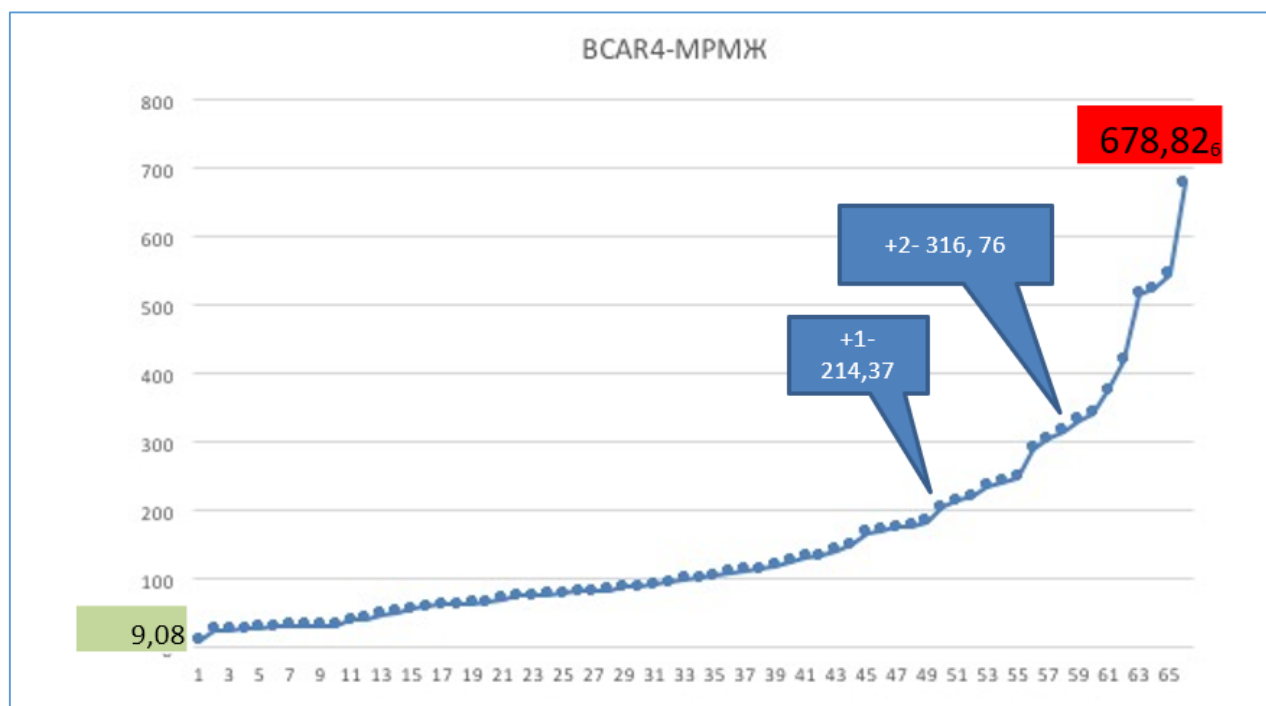


Рисунок 52 – Результаты оценки экспрессии *BCAR4*

Примечание: Представлены числовые результаты в порядке возрастания, значения от 1 до 65 соответствуют номеру в упорядоченном ряду (не номеру опухолевого образца)

Уровень экспрессии *BCAS2* (Рисунок 53) варьировал от 1006,72 до 5511,82. Уровни 1006,72–2833,88 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 2833,88–3378,02 – «+2», выше 3378,02 – «+3».

Уровень экспрессии *CCND1* (Рисунок 54) варьировал от 449,85 до 63718,82. Уровни 449,85–10324,3 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 10324,3–23160,94 – «+2», выше 23160,94 – «+3».

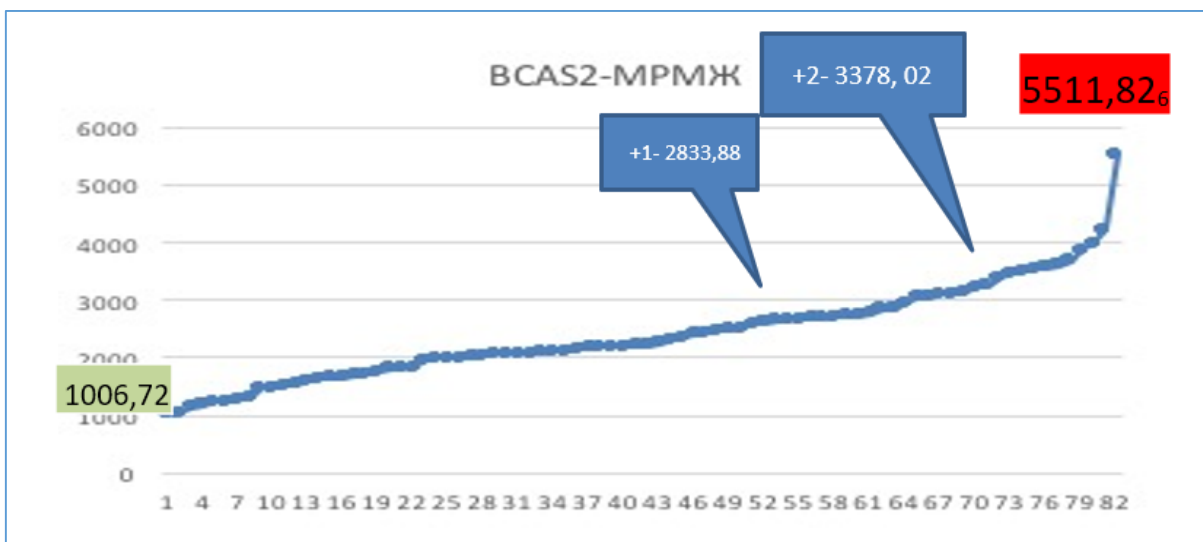


Рисунок 53 – Результаты оценки экспрессии *BCAS2*

Примечание: Представлены числовые результаты в порядке возрастания, значения от 1 до 82 соответствуют номеру в упорядоченном ряду (не номеру опухолевого образца)

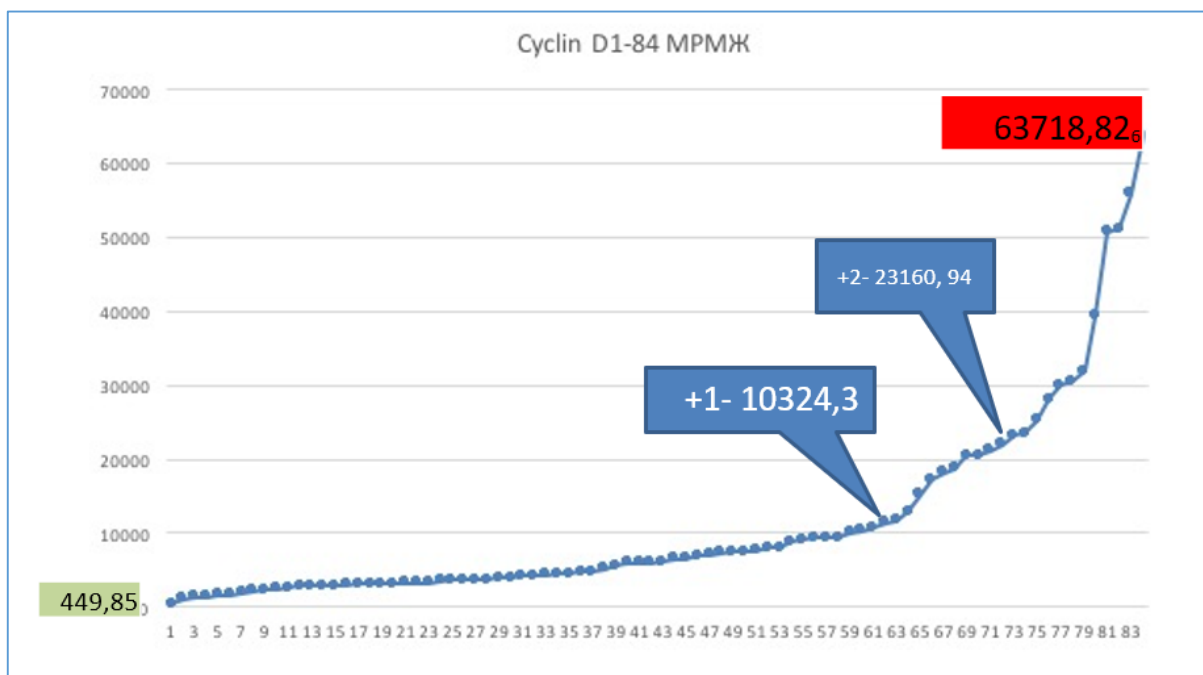


Рисунок 54 – Результаты оценки экспрессии *CCND1*

Примечание: Представлены числовые результаты в порядке возрастания, значения от 1 до 83 соответствуют номеру в упорядоченном ряду (не номеру опухолевого образца)

Уровень экспрессии *CCND2* (Рисунок 55) варьировал от 438,32 до 7448,47. Уровни 438,32–2029 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 2029–3157,54 – «+2», выше 7448,47 – «+3».

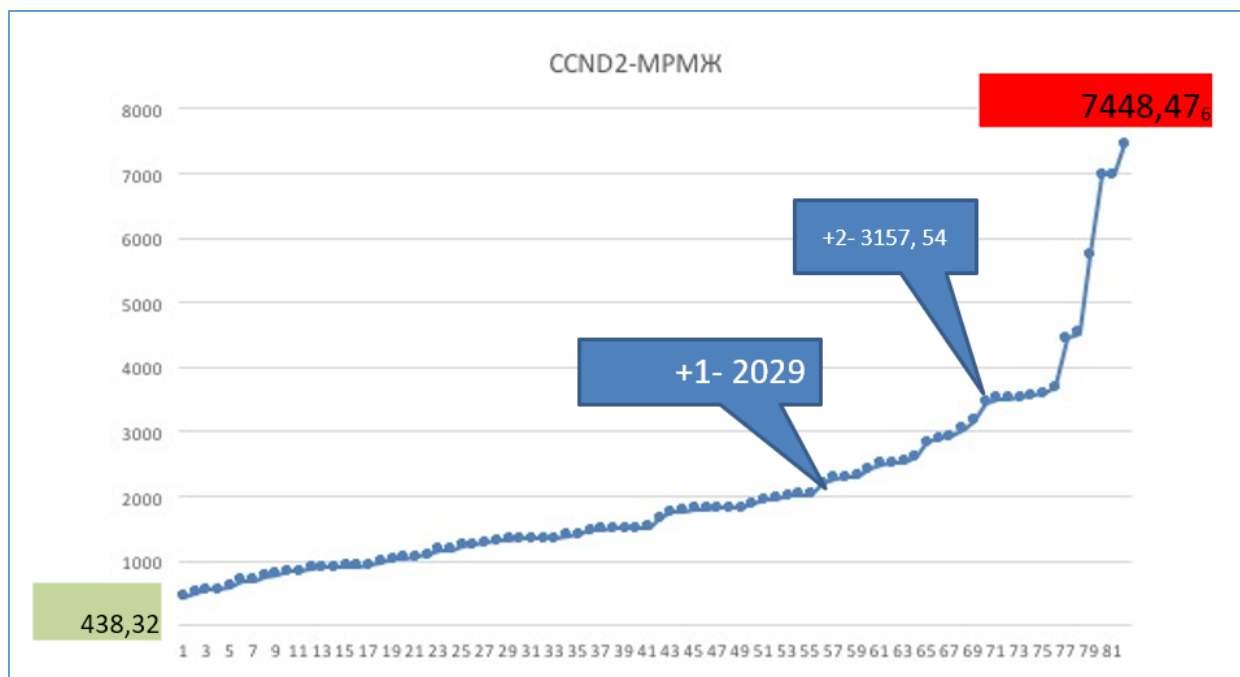


Рисунок 55 – Результаты оценки экспрессии *CCND2*

Примечание: Представлены числовые результаты в порядке возрастания, значения от 1 до 81 соответствуют номеру в упорядоченном ряду (не номеру опухолевого образца)

Уровень экспрессии *CCND3* (Рисунок 56) варьировал от 173,68 до 6763,5. Уровни 173,68–1518,29 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 1518,29–2087,82 – «+2», выше 2087,82 – «+3».

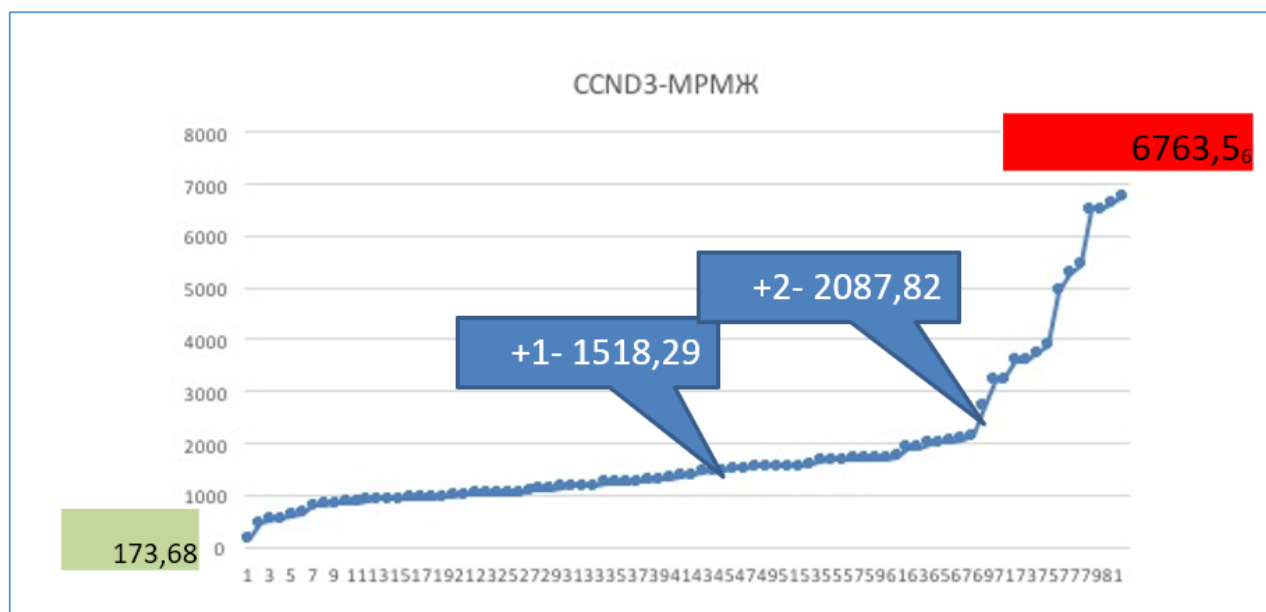


Рисунок 56 – Результаты оценки экспрессии *CCND3*

Примечание: Представлены числовые результаты в порядке возрастания, значения от 1 до 81 соответствуют номеру в упорядоченном ряду (не номеру опухолевого образца)

Уровень экспрессии *FOXA1* (Рисунок 57) варьировал от 38,17 до 133744,09. Уровни 38,17–22839,1 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 22839,21–33634,59 – «+2», выше 33634,59 – «+3».

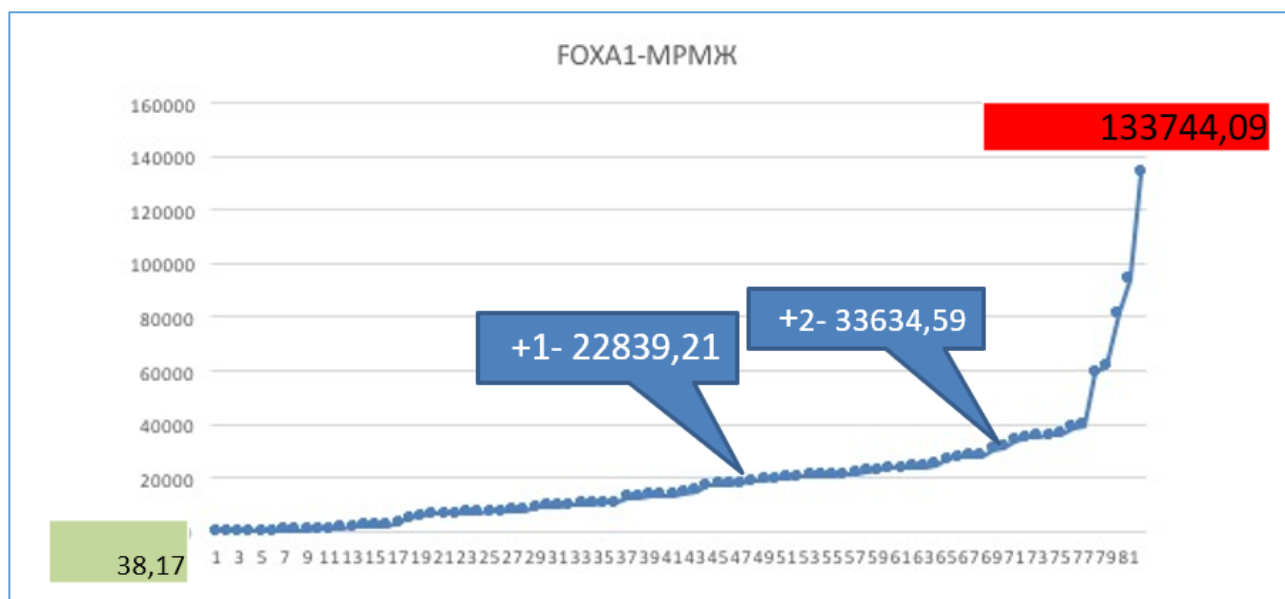


Рисунок 57 – Результаты оценки экспрессии *FOXA1*

Примечание: Представлены числовые результаты в порядке возрастания, значения от 1 до 81 соответствуют номеру в упорядоченном ряду (не номеру опухолевого образца)

3.7.2.3 Оценка экспрессии *EGFR*, *CDH3*, *FOXCl*, *KRT14*, *KRT5*

Результаты оценки экспрессии генов *EGFR*, *CDH3*, *FOXCl*, *KRT14*, *KRT5*, повышенная экспрессия которых является маркером базального РМЖ, обобщены ниже.

Уровень экспрессии *EGFR* (Рисунок 58) варьировал от 36,97 до 11125,56. Уровни 36,97–1031,04 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 1031,04–2843,17 – «+2», выше 2843,17 – «+3».

Уровень экспрессии *CDH3* (Рисунок 59) варьировал от 27,39 до 7231,56. Уровни 27,39–1064,04 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 1064,04–2820,59 – «+2», выше 2820,59 – «+3».

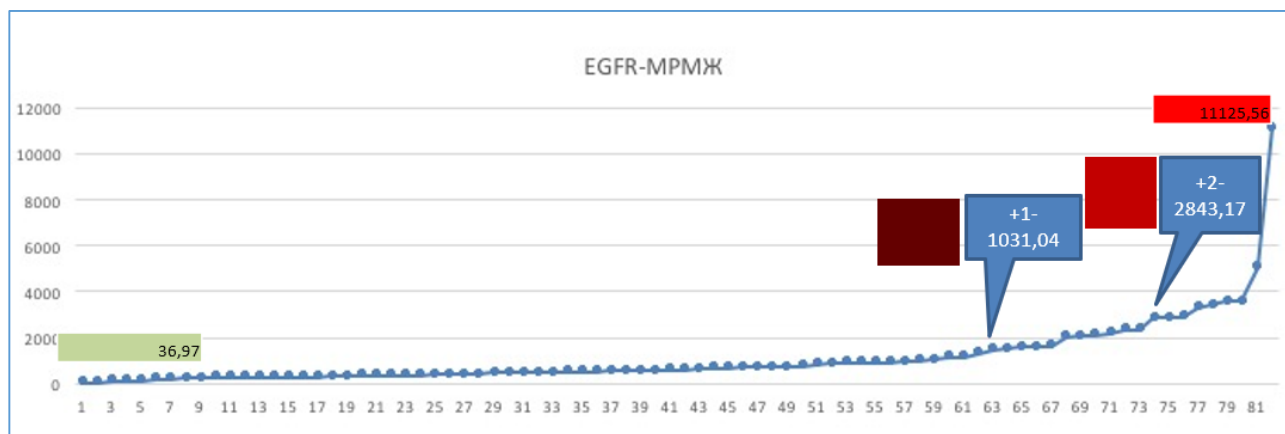


Рисунок 58 – Результаты оценки экспрессии *EGFR*

Примечание: Представлены числовые результаты в порядке возрастания, значения от 1 до 81 соответствуют номеру в упорядоченном ряду (не номеру опухолевого образца)

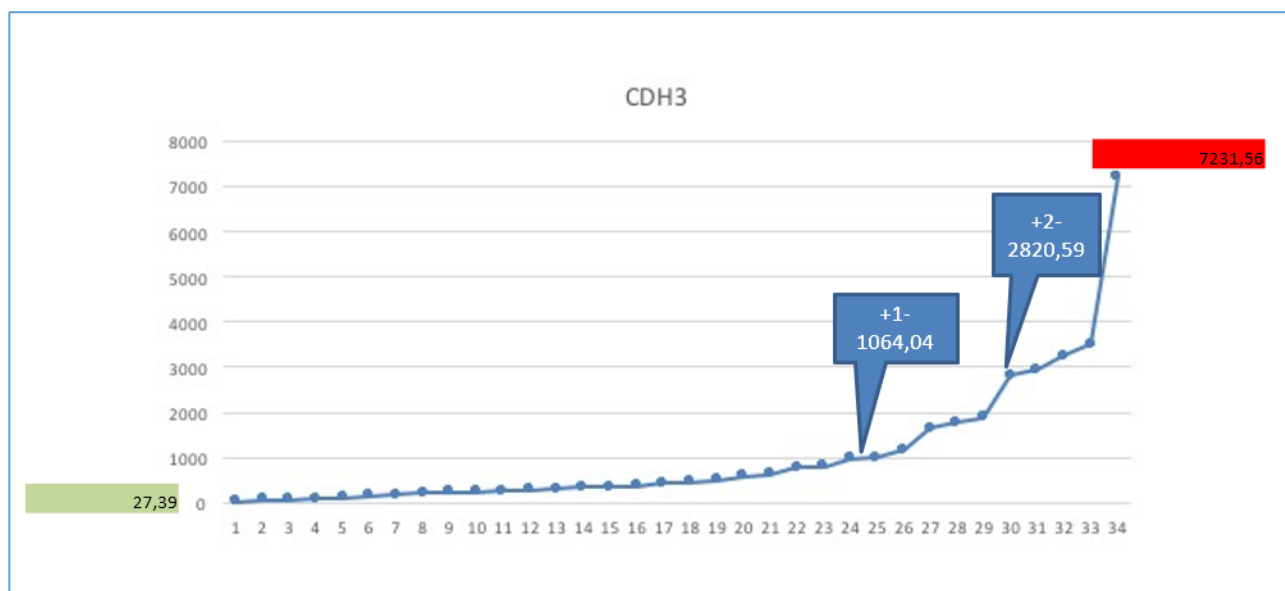


Рисунок 59 – Результаты оценки экспрессии *CDH3*

Примечание: Представлены числовые результаты в порядке возрастания, значения от 1 до 34 соответствуют номеру в упорядоченном ряду (не номеру опухолевого образца)

Уровень экспрессии *FOXCI* (Рисунок 60) варьировал от 30,79 до 8867,77. Уровни 30,97–1121,59 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 1121,59–2129,13 – «+2», выше 2129,13 – «+3».

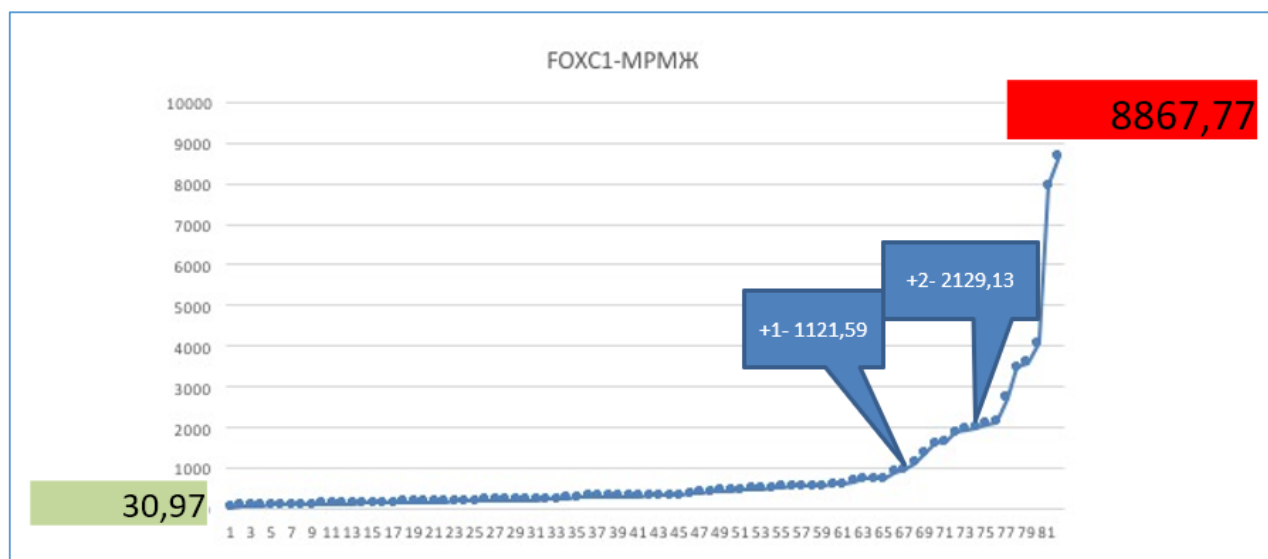


Рисунок 60 – Результаты оценки экспрессии *FOXCI*

Примечание: Представлены числовые результаты в порядке возрастания, значения от 1 до 81 соответствуют номеру в упорядоченном ряду (не номеру опухолевого образца)

Уровень экспрессии *KRT14* (Рисунок 61) варьировал от 2,87 до 56567,54. Уровни 2,87–3087,84 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 3087,84–17911,44 – «+2», выше 17911,44 – «+3».

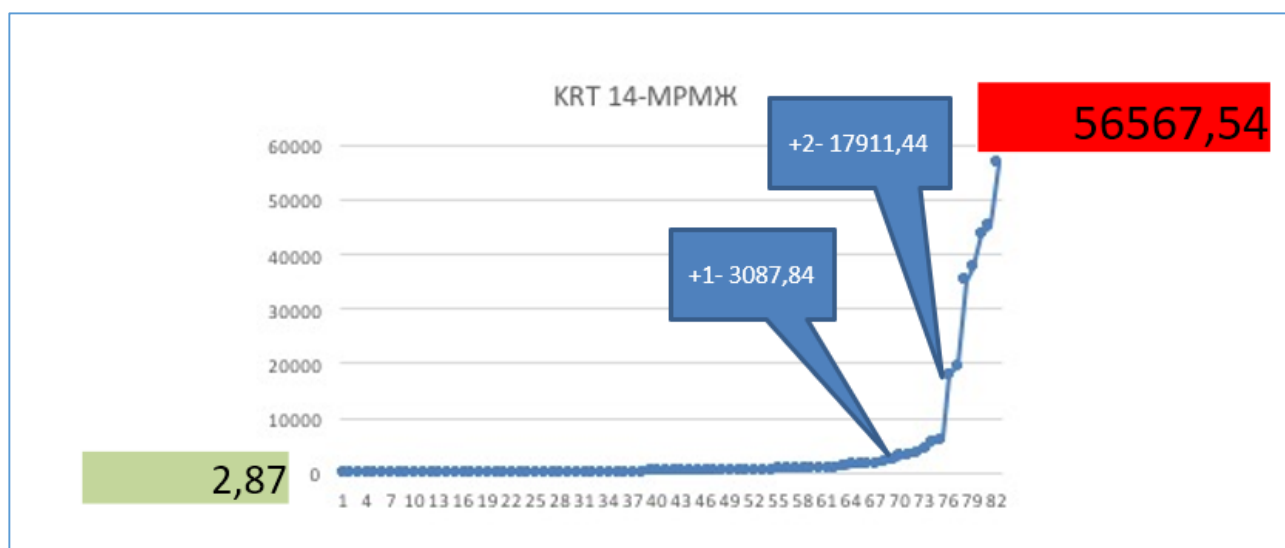


Рисунок 61 – Результаты оценки экспрессии *KRT14*

Примечание: Представлены числовые результаты в порядке возрастания, значения от 1 до 82 соответствуют номеру в упорядоченном ряду (не номеру опухолевого образца)

Уровень экспрессии *KRT5* (Рисунок 62) варьировал от 1,15 до 20332,77. Уровни 1,15–1121,59 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни до 2129,13 – «+2», выше 2129,13 – «+3».

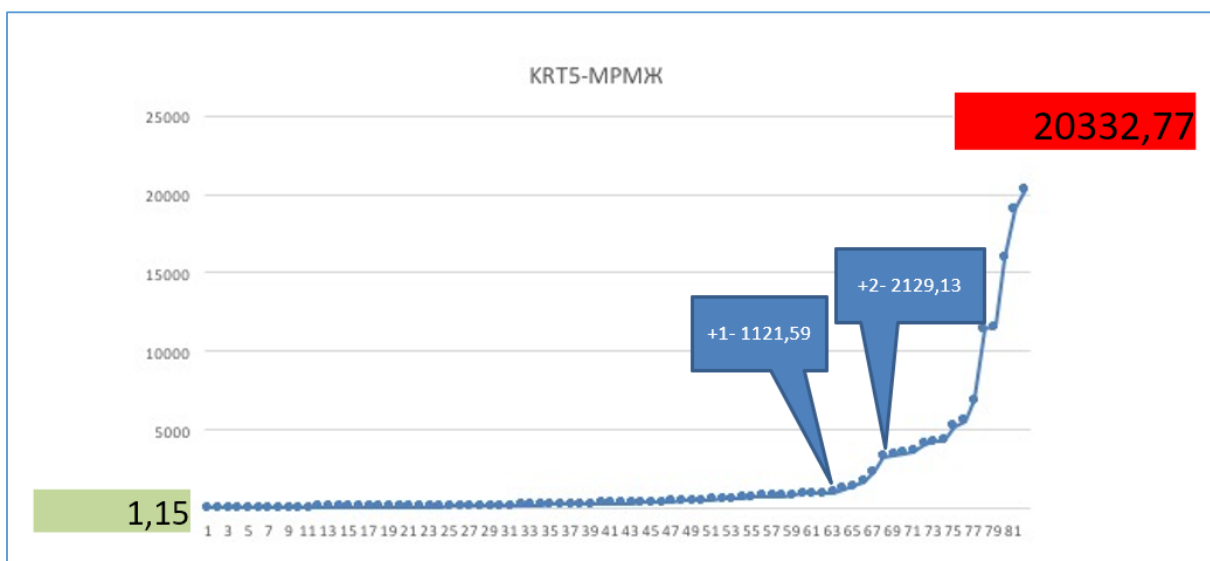


Рисунок 62 – Результаты оценки экспрессии *KRT5*

Примечание: Представлены числовые результаты в порядке возрастания, значения от 1 до 81 соответствуют номеру в упорядоченном ряду (не номеру опухолевого образца)

3.7.2.4 Оценка экспрессии *CDK4*, *CDK6*

Результаты оценки экспрессии генов *CDK4*, *CDK6* обобщены ниже.

Уровень экспрессии *CDK4* (Рисунок 63) варьировал от 813,2 до 15607,49. Уровни 813,2–2875,81 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 2875,81–4458,03 – «+2», выше 4458,03 – «+3».

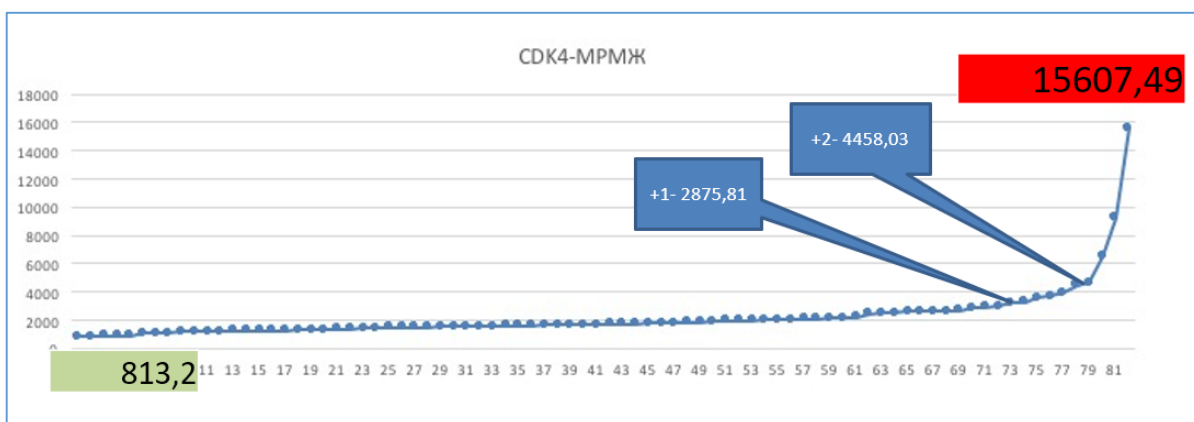


Рисунок 63 – Результаты оценки экспрессии *CDK4*

Примечание: Представлены числовые результаты в порядке возрастания, значения от 1 до 81 соответствуют номеру в упорядоченном ряду (не номеру опухолевого образца)

Уровень экспрессии *CDK6* (Рисунок 64) варьировал от 250,51 до 9736,2. Уровни 250,51–1878,93 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 1878,93–4458,03 – «+2», выше 4458,03 – «+3».

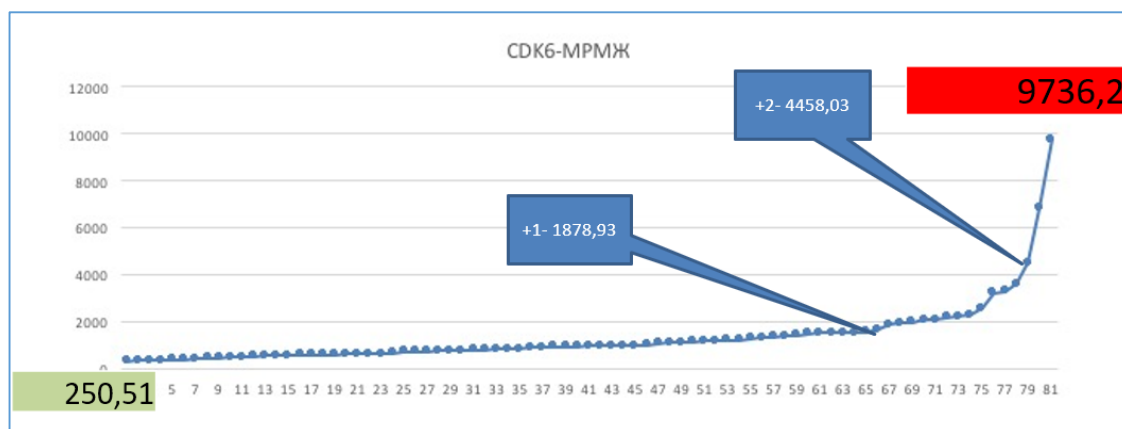


Рисунок 64 – Результаты оценки экспрессии *CDK6*

Примечание: Представлены числовые результаты в порядке возрастания, значения от 1 до 81 соответствуют номеру в упорядоченном ряду (не номеру опухолевого образца)

3.7.2.5 Оценка экспрессии *P53*, *PTEN*, *CHEK2*

Результаты оценки экспрессии генов *P53*, *PTEN*, *CHEK2*, связанных с развитием наследственной формы РМЖ, обобщены ниже.

Уровень экспрессии *P53* (Рисунок 65) варьировал от 208,83 до 9742,76. Уровни 208,83–2485,77 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 2485,77–3864,35 – «+2», выше 3864,35 – «+3».

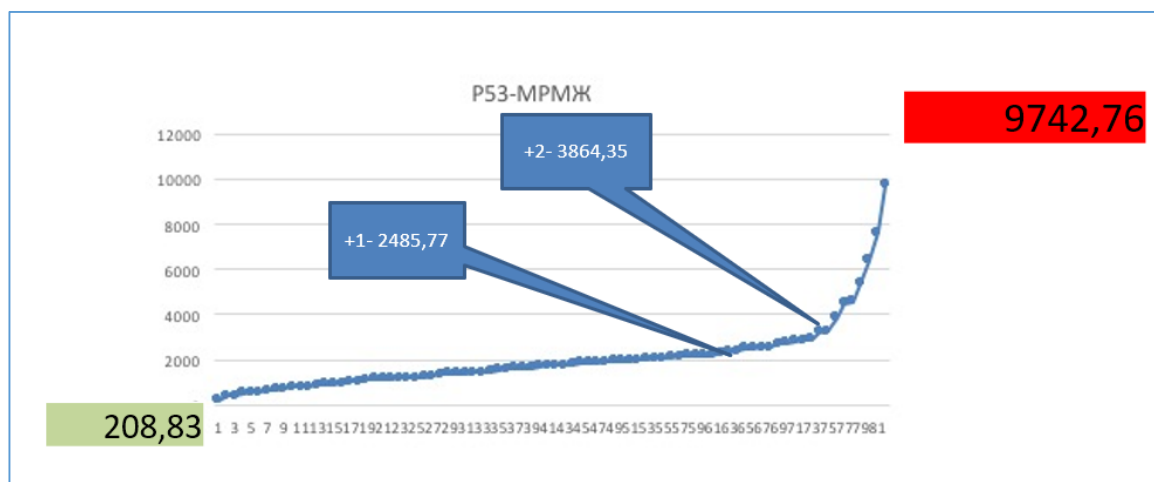


Рисунок 65 – Результаты оценки экспрессии *P53*

Примечание: Представлены числовые результаты в порядке возрастания, значения от 1 до 81 соответствуют номеру в упорядоченном ряду (не номеру опухолевого образца)

Уровень экспрессии *PTEN* (Рисунок 66) варьировал от 1064,64 до 27368,31. Уровни 1064,64–10455,52 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 10455,52–14492,47 – «+2», выше 14492,47 – «+3».

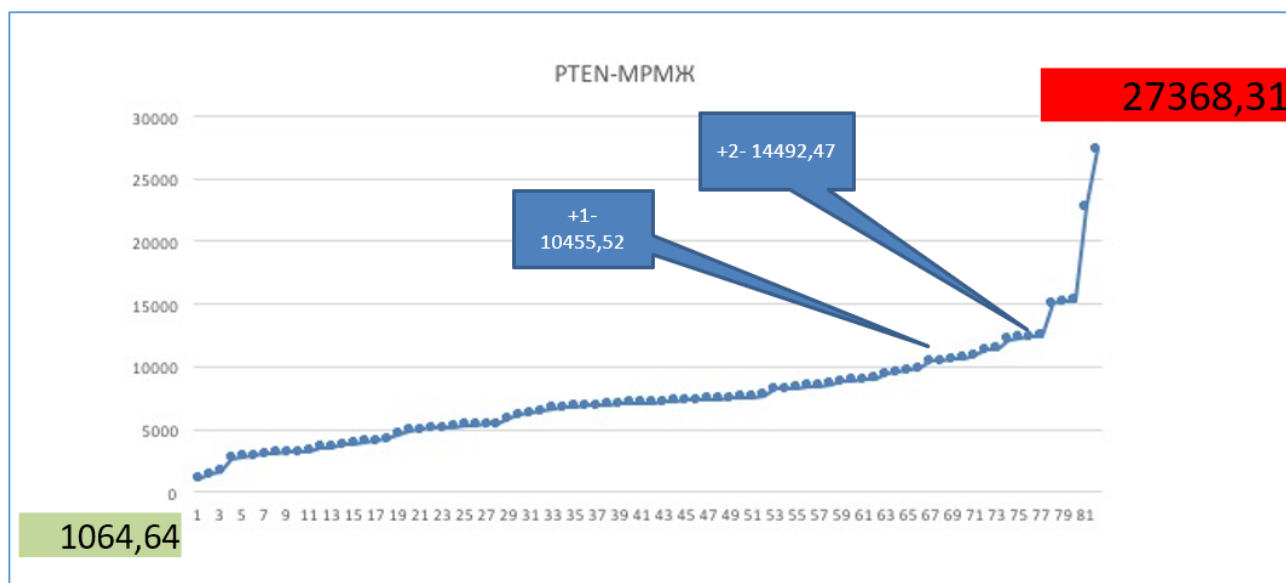


Рисунок 66 – Результаты оценки экспрессии *PTEN*

Примечание: Представлены числовые результаты в порядке возрастания, значения от 1 до 81 соответствуют номеру в упорядоченном ряду (не номеру опухолевого образца)

Уровень экспрессии *CHEK2* (Рисунок 67) варьировал от 127,47 до 3589,97. Уровни 127,47–693,24 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 693,24–1001,47 – «+2», выше 1001,47 – «+3».

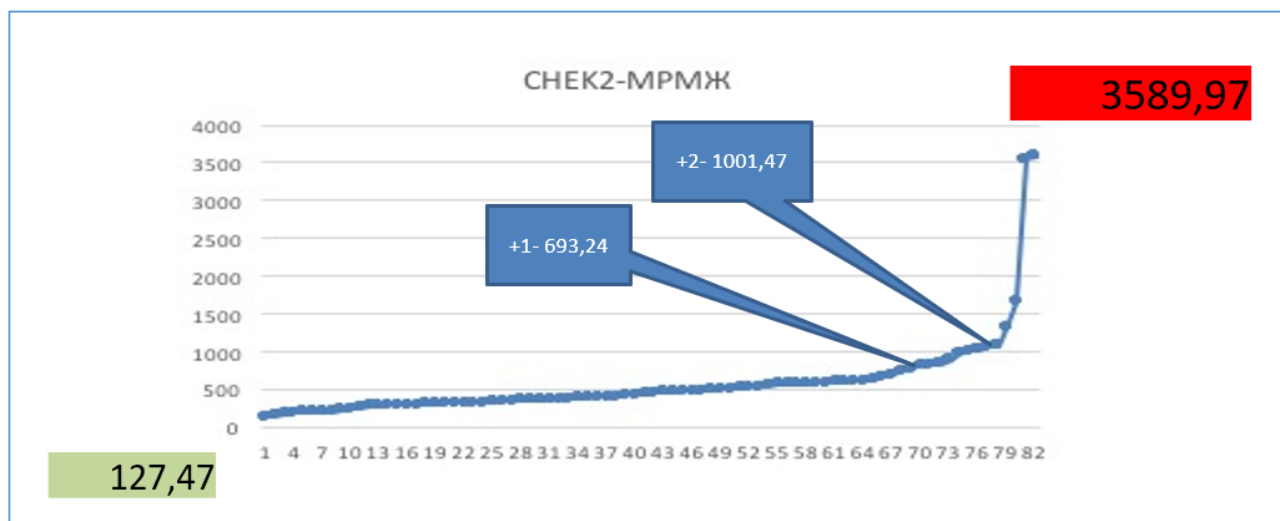


Рисунок 67 – Результаты оценки экспрессии *CHEK2*

Примечание: Представлены числовые результаты в порядке возрастания, значения от 1 до 82 соответствуют номеру в упорядоченном ряду (не номеру опухолевого образца)

3.7.2.6 Оценка экспрессии AR

Уровень экспрессии AR (Рисунок 68) варьировал от 28,9 до 18115,38. Уровни 28,9–1770,44 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 1770,44–4113,61 – «+2», выше 4113,61 – «+3».

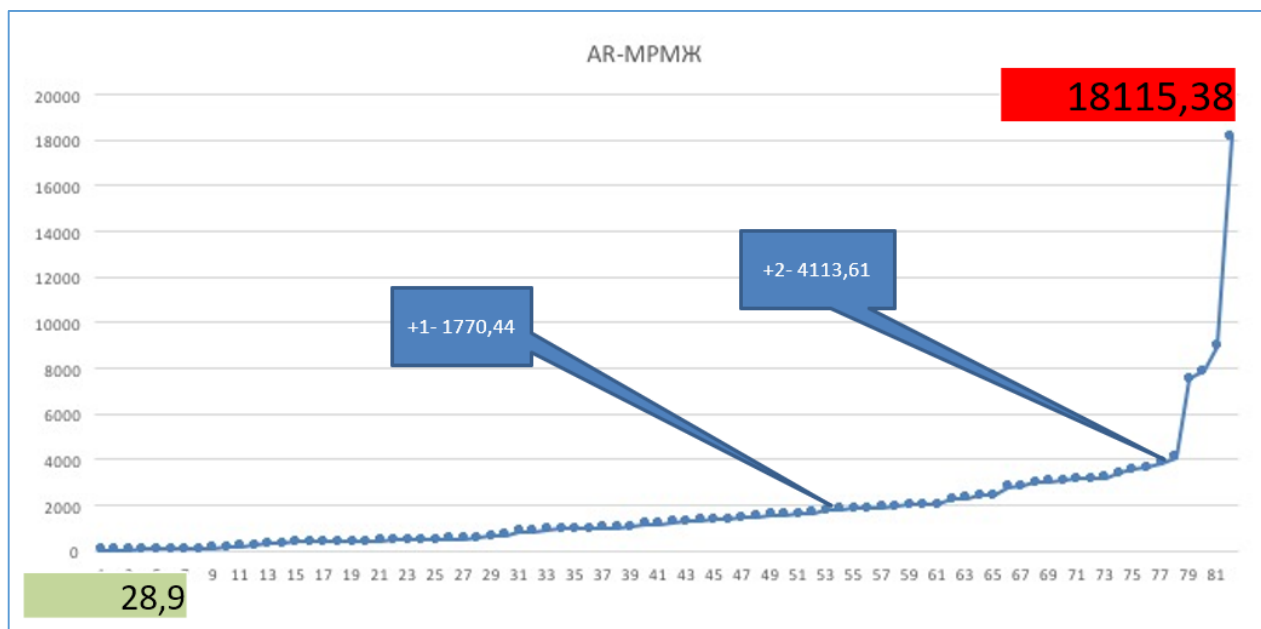


Рисунок 68 – Результаты оценки экспрессии AR

Примечание: Представлены числовые результаты в порядке возрастания, значения от 1 до 81 соответствуют номеру в упорядоченном ряду (не номеру опухолевого образца)

3.7.2.7 Оценка экспрессии CLDN3, CLDN7

Повышенная экспрессия генов *CLDN3*, *CLDN7* обуславливает наличие клаудиноподобного РМЖ [112, 189, 217, 243, 273, 315, 331]. Уровень экспрессии *CLDN3* (Рисунок 69) варьировал от 40,81 до 21225,17. Уровни 40,81–5104,86 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 5104,86–7700,96 – «+2», выше 7700,96 – «+3».

Уровень экспрессии *CLDN7* (Рисунок 70) варьировал от 66,7 до 48720,61. Уровни 66,7–6543,89 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 6543,89–11029,96 – «+2», выше 11029,96 – «+3».

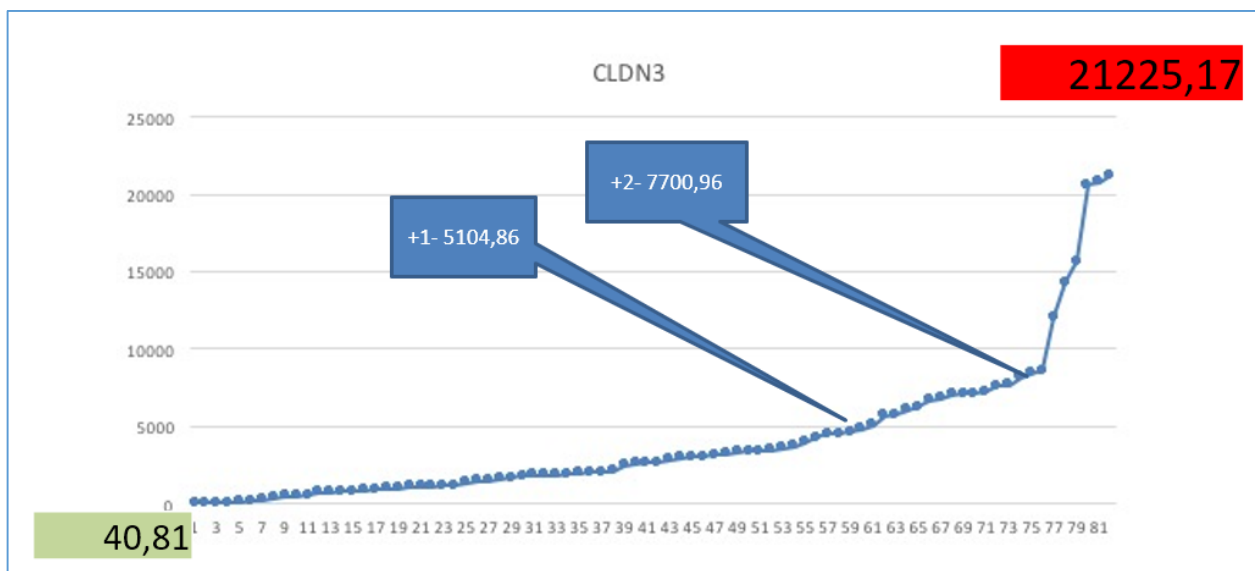


Рисунок 69 – Результаты оценки экспрессии *CLDN3*

Примечание: Представлены числовые результаты в порядке возрастания, значения от 1 до 81 соответствуют номеру в упорядоченном ряду (не номеру опухолевого образца)

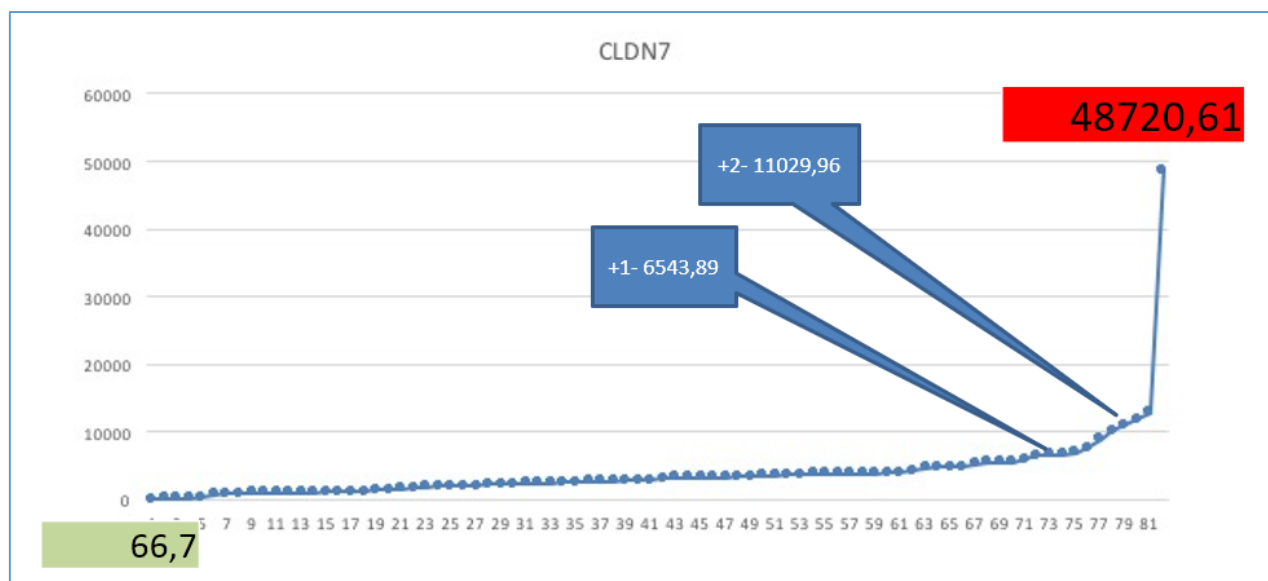


Рисунок 70 – Результаты оценки экспрессии *CLDN7*

Примечание: Представлены числовые результаты в порядке возрастания, значения от 1 до 81 соответствуют номеру в упорядоченном ряду (не номеру опухолевого образца)

3.7.2.8 Оценки экспрессии *TOP2a*, *TUBBIII*

Результаты оценки экспрессии генов *TOP2a*, *TUBBIII*, отвечающих за чувствительность к химиотерапии антрациклинами и таксанами, обобщены ниже.

Уровень экспрессии *TOP2a* (Рисунок 71) варьировал от 454,33 до 4080,08. Уровни 454,33–1851,11 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 1851,11–2292,96 – «+2», выше 2292,96 – «+3».

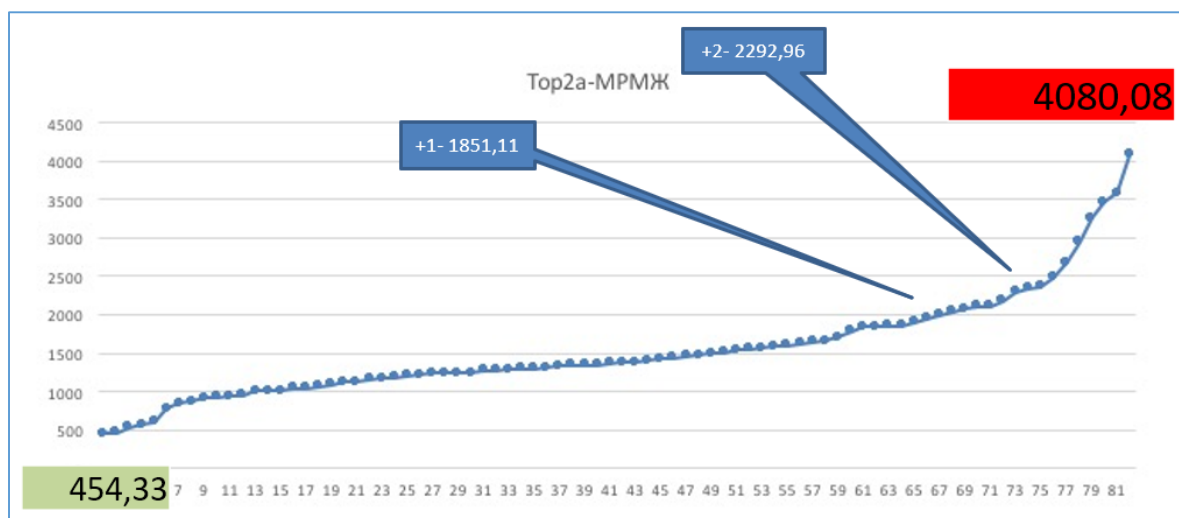


Рисунок 71 – Результаты оценки экспрессии *TOP2a*

Примечание: Представлены числовые результаты в порядке возрастания, значения от 1 до 81 соответствуют номеру в упорядоченном ряду (не номеру опухолевого образца)

Уровень экспрессии *TUBBIII* (Рисунок 72) варьировал от 25,71 до 3583,97. Уровни 25,71–1523,89 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 523,89–811,03 – «+2», выше 811,03 – «+3».

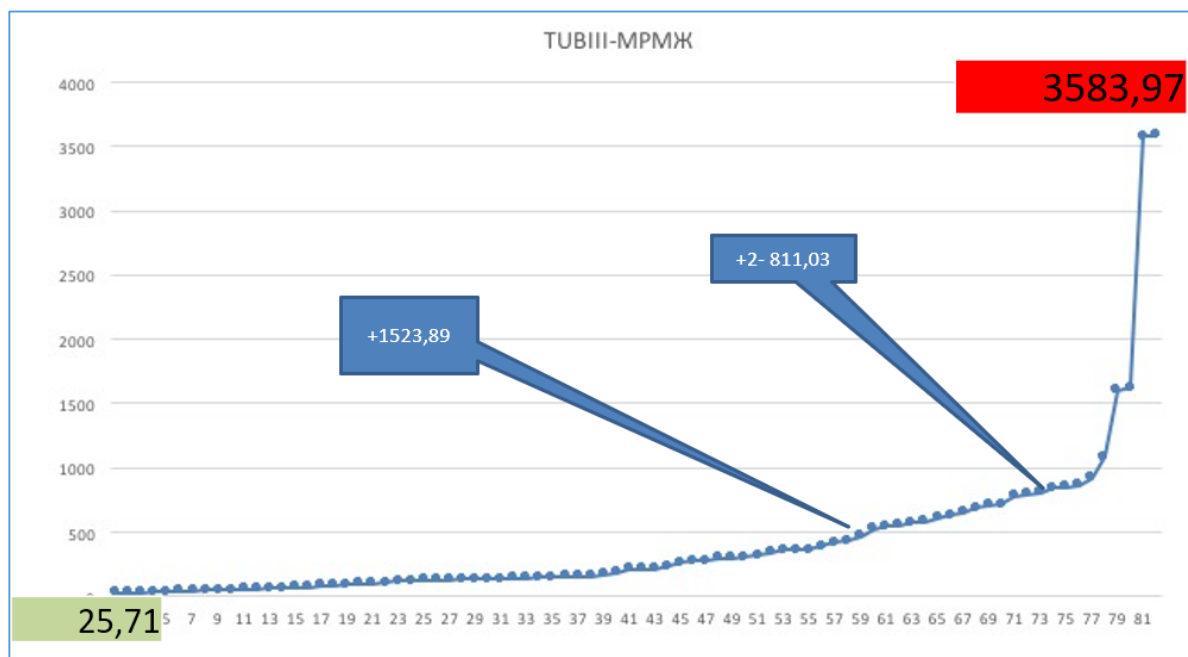


Рисунок 72 – Результаты оценки экспрессии *TUBBIII*

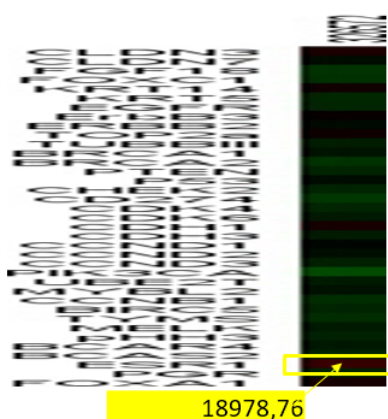
Примечание: Представлены числовые результаты в порядке возрастания, значения от 1 до 81 соответствуют номеру в упорядоченном ряду (не номеру опухолевого образца)

3.7.3 Клинические примеры

Изучение индивидуальных молекулярно-генетических профилей опухолевых образцов, имеющих одинаковый суррогатный подтип по данным ИГХ анализа, выявило случаи клинически значимых различий характеристик опухоли, несмотря на сопоставимый результат оценки на основании ИГХ анализа.

Так, при сравнении профилей образцов №2 и №19, имеющих по результатам ИГХ анализа HER2–, ЭР+ статус, в опухолевом образце №19 была выявлена более высокая экспрессия ESR1 (31139,35 против 18978,76) и маркеров неблагоприятного прогноза: PIK3CA (15921,1 против 1054,68), P53 (7620,37 против 1620,58), CCND1 (51152,27 против 7404,94), BCAS2 (3114,45 против 2179,47), FOXA1 (35336,07 против 20930,43) (Рисунок 73).

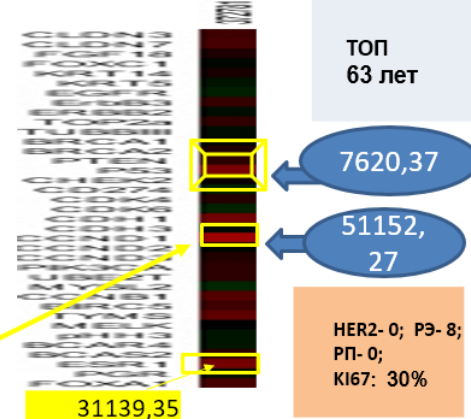
Опухолевый образец №2



ЛАЛ
60 лет

HER2: 1+;
PЭ-8; РП-0;
KI67: 40%

Опухолевый образец №19



BCAR4	Relevance of BCAR4 in tamoxifen resistance and tumour aggressiveness of human breast cancer. Godinho MF ... van Agthoven T <i>British Journal of cancer</i> 2010 3
BCAS2	BCAS2 Enhances Carcinogenic Effects of Estrogen Receptor-Alpha in Breast Cancer Cells Ángel Salmerón-Hernández Int J Mol Sci 2019 Feb 22;20(4):966 Активация ERα путь PI3K / AKT
CCND1	Циклин D1 (D2.D3) переход от фазы G1 в S-фазу клеточного цикла осуществляется путем образования активных ферментных комплексов с ЦИКЛИНЗАВИСИМЫМИ КИНАЗАМИ CDK4 и CDK6 Избыток циклина D1 негативно влияет на общую и безрецидивную выживаемость у больных РМЖ. Rudas, M. Cyclin D1 Expression in Breast Cancer Patients Receiving Adjuvant Tamoxifen-Based Therapy / M. Rudas, M. Lehnert, A. Huynh [et al.] // <i>Clinical Cancer Research</i> . – 2008. – № 6 (14). – P. 1767–1774.
CCND2	
CCND3	
ESR1	
FOXA1	Высокая экспрессия FOXA1 ассоциирована с благоприятным прогнозом [Hisamatsu, Y. Impact of FOXA1 expression on the prognosis of patients with hormone receptor-positive breast cancer / Y. Hisamatsu, E. Tokunaga, N. Yamashita [et al.] // <i>Annals of Surgical Oncology</i> . – 2012. – № 4 (19). – P. 1145–1152.
PGR	
PIK3CA	

Рисунок 73 – Сравнительный анализ молекулярно-генетических профилей опухолевых образцов, имеющих сопоставимые результаты ИГХ анализа

Клинически значимые различия были также выявлены при сравнении профилей опухолевых образцов, имеющих HER2– и ЭР–статус по результатам молекулярной диагностики (образцы №6, №9, №17, №27, №34) (Рисунок 74).

В опухолевом образце №6 была выявлена гиперэкспрессия генов *KRT5* (19066,63) и *CDH3* (3240,66), являющихся маркером базального РМЖ, что позволяет рассматривать вопрос о применении карбоплатина. Кроме того, наблюдалась повышенная экспрессия гена *CLDN3* (20771,73), отвечающего за синтез клаудина-3, ассоциированного с более агрессивным течением РМЖ. Danzinger S. и соавт. было показано, что высокий уровень клаудина-3 может рассматриваться в качестве предиктора мутации *BRCA1* [86].

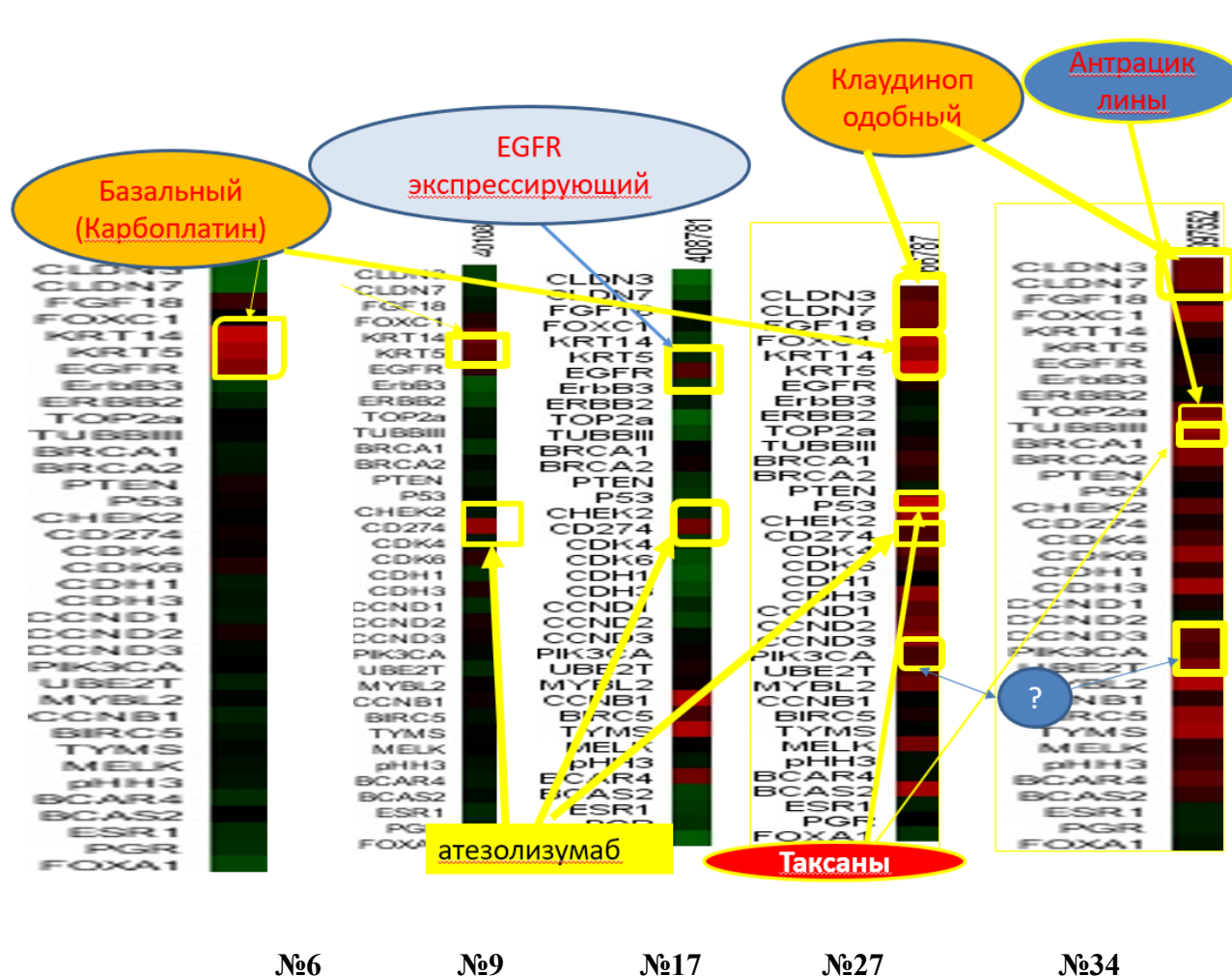


Рисунок 74 – Сравнительный анализ молекулярно-генетических профилей опухолевых образцов с HER2–, ЭР– статусом

В опухолевом образце №9 наблюдалась гиперэкспрессия генов *EGFR* (3281,37) и *CD274* (419,29). По данным мета-анализа от 2018 г. высокая экспрессия *EGFR* обнаруживается у 27 % пациентов с ранним РМЖ. У больных ТНРМЖ с гиперэкспрессией *EGFR* показатели безрецидивной и общей выживаемости были существенно ниже в сравнении с ТНРМЖ без гиперэкспрессии *EGFR*. [137]. В течение последних лет проводятся исследования по изучению анти-*EGFR* препаратов при РМЖ, в частности ингибиторов тирозинкиназы, однако препараты, одобренные для применения в рутинной клинической практике, отсутствуют [166]. Высокая экспрессия гена *CD274*, отвечающего за синтез PDL1, обуславливает необходимость назначения атезолизумаба (анти-PDL1 моноклонального антитела) [8]. Недавние результаты исследования KEYNOTE-355 продемонстрировали эффективность комбинации химиотерапии с анти-PDL1 моноклональным антителом пембролизумаб у больных с распространенным ТНРМЖ с PDL1 позитивным статусом (combined positive score) CPS>10, определенным с помощью теста DACO 22C3 [79].

В опухолевом образце №17 наблюдалась гиперэкспрессия *EGFR* (2331,39), а также *KRT14* (35159,16) и *KRT5* (11546,55), ответственных за синтез цитокератинов. Повышенная экспрессия данных генов является маркером базального РМЖ и обуславливает необходимость назначения карбоплатина.

В опухолевом образце №27 также отмечалась повышенная экспрессия маркеров базального РМЖ: *CDH3* (1003,54), *FOXC1* (743,59), *KRT14* (4354,4). Кроме того, была выявлена гиперэкспрессия *CD274*, что, как описано выше, требует назначения атезолизумаба.

В опухолевом образце №34 выявлена гиперэкспрессия маркеров базального РМЖ (*CDH3* (7231,59), *FOXC1* (4077,66)), а также маркеров клаудиноподобного РМЖ (*CLDN3* (15655,36), *CLDN7* (11793,47)), обуславливающих более агрессивное течение РМЖ. Кроме того, отмечалась повышенная экспрессия генов *TOP2α* (3468,56) и *TUBBIII* (1626,9), которые могут служить маркерами чувствительности к антрациклиновым антибиотикам и таксанам [4].

Таким образом, разработанная мультигенная сигнатура в рамках одного лабораторного исследования обеспечивает точное определение подтипа опухоли у пациенток с мРМЖ и выбор оптимальной тактики лекарственной терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одним из актуальных вопросов современной онкологии является проблема прогнозирования течения и исхода злокачественных новообразований с целью предсказания развития разных форм прогрессии заболевания и проведения коррекции противоопухолевой терапии. Важным направлением в исследованиях является поиск новых более точных и достоверных способов прогноза, основанных на оценке не единичного фактора прогноза, а на совокупности нескольких различных клинических, биологических, морфологических, иммунологических и других факторов и определении прогностической значимости каждого из них [10, 265, 318].

Для решения задач исследования была разработана программа, которая включала ретроспективный анализ данных канцер-регистра, гистологические, иммуногистохимические и молекулярно-генетические исследования образцов ткани пациенток с РМЖ.

Общая численность исследуемой популяции канцер-регистра составила 1216 пациенток. В рамках ретроспективного анализа выполнена оценка комплекса анамнестических, клинических, патоморфологических и иммуногистохимических данных пациенток, включая возраст на момент операции, стадию pTNM, размеры опухоли до лечения, вид неoadъювантной и адъювантной терапии, длительность наблюдения после операции, данные о рецидиве и выживаемости, степень гистологической злокачественности по Elston–Ellis, уровень экспрессии ЭР, ПР, HER2. На следующем этапе был проведен анализ архивного материала из парафиновых блоков опухолей исследуемой популяции 1216 больных с T1–2N0M0 РМЖ. Оценивали степень злокачественности опухоли (Elston–Ellis), клеточную плотность, традиционные (ЭР, ПР, HER2, Ki-67) [147] и малоизученные (СК 14, FOXA1, FOXP3, PDL1, P53, SMA, AR, E-cadherin, CD4, CD8, СК 5\6, EGFR) маркеры. План молекулярно-генетических исследований включал разработку мультигенной сигнатуры, включающей пролиферативно-референсную и лечебно-

ориентированную часть, и изучение мРНК экспрессии генов, участвующих в развитии РМЖ.

Работа выполнена с использованием современных методик и оборудования. Иммуногистохимический анализ образцов ткани проводился с использованием метода тканевых матриц. Анализ экспрессии генов проводили с использованием технологии nCounter, основанной на прямой цифровой детекции мишеней с помощью флуоресцентных штрих-кодов (nCounter Analysis System компании NanoString). Исследования с целью подтверждения мутации генов проводили методами NGS (секвенирование нового поколения) и RT-PCR (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией).

Известно, что биологическое поведение злокачественной опухоли, которое характеризует скорость ее роста, способность к инвазии и распространению зависит от многих причин, связанных как с ее особенностями, так и с эффективностью или неэффективностью системных защитных механизмов.

Результаты изучения прогностической значимости рутинных и малоизученных маркеров позволили заключить, что уровни экспрессии стероидных гормонов, HER2, Ki-67, CK5, CK14, EGFR, PDL и FOXA1 демонстрируют высокую прогностическую значимость у пациенток с T1-2N0M0 РМЖ. На основе полученных данных были созданы традиционная и регрессионная прогностические шкалы.

Традиционная шкала состоит из шести показателей, являющихся рутинными маркерами, используемыми в клинической практике: «T2N0M0», «ПР<8», «G2G3», «ЭР<8», «HER2=3» и «Ki-67>5 %».

В соответствии с предварительно полученной 100-балльной прогностической шкалой для каждого из шести указанных факторов был определен коэффициент, показывающий силу влияния фактора на ключевой показатель. При значении уровня экспрессии прогестерона менее 8 фактор оценивали в 24 балла (фактор «ПР<8»), для стадии заболевания T2N0M0 показатель оценивали в 18 баллов (фактор «T2N0M0»), при значении уровня экспрессии HER2 равному 3 фактор оценивали в 20 баллов (фактор «HER2=3»),

для степени дифференцировки опухоли G2 или G3 фактор оценивали в 13 баллов (фактор «G2G3»), при значении уровня экспрессии эстрогена равному 8 фактор оценивали в 12 баллов (фактор «ЭР<8»), при значении уровня экспрессии пролиферативной активности в опухоли Ki-67 более 5 % фактор оценивали в 13 баллов (фактор «Ki-67>5 %»). В том случае, если значение какого-либо прогностического фактора не соответствует установленным значениям, такой фактор оценивался 0 баллов. Для оценки риска суммировали полученные баллы и использовали суммарное значение баллов в качестве прогностического параметра для количественного определения границ групп риска неблагоприятного исхода (наступление смерти ранее 10 лет), а именно, при значениях суммарного балла менее 40, пациентов относили к группе низкого риска, при значениях суммарного балла от 40 до 60 – к группе среднего риска, а при значениях более 60 пациентов относили к группе высокого риска.

Анализ выживаемости для пациенток групп высокого и низкого риска по традиционной шкале продемонстрировал статистически значимые различия между группами ($p = 0,0004$). Показатель 10-летней выживаемости составил 84,1 % и 91,7 % для групп высокого и низкого риска, соответственно. Отношение рисков (hazard ratio) в регрессионной модели Кокса группы высокого риска к группе низкого риска составило 2,17 (95 % ДИ (1,44; 3,25)).

Анализ эффективности адъювантной химиотерапии в объединенной группе среднего и высокого риска летального исхода по традиционной шкале показал статистически значимое преимущество ($p < 0,0131$) назначения адъювантной химиотерапии у пациенток среднего и высокого рисков (от 40 баллов и выше). Показатель 10-летней выживаемости составил 88,9 % в группе с химиотерапией и 86,2 % в группе без химиотерапии. Отношение рисков (hazard ratio) в регрессионной модели Кокса группы без химиотерапии к группе с химиотерапией составило 1,48 (95 % ДИ (1,07; 2,04)).

На основании результатов многофакторного анализа была разработана регрессионная прогностическая шкала, в которую вошли 10 наиболее значимых прогностических факторов, отражающих различные аспекты процесса

возникновения и развития РМЖ, такие как клинико-морфологические факторы (стадия заболевания, степень дифференцировки опухоли); факторы, отражающие гистологические особенности РМЖ – белки СК14, E-cadherin, p53, EGFR; факторы, отражающие статус иммунного ответа пациента против РМЖ (белок FOXP3, количество клеток CD8 и CD4); фактор, отражающий вовлеченность клеток в передачу сигналов, управляющих ростом и дифференцированием клеток (уровень экспрессии рецепторов HER2).

Разработанная регрессионная прогностическая шкала включает как традиционные, так и малоизученные маркеры, для которых была выявлена высокая прогностическая значимость. К последним относится FOXP3 – белок, вовлеченный в иммунные реакции, функционирующий как регулятор (транскрипционный фактор) регуляторных Т-клеток. Прогностическая значимость указанного белка при РМЖ отмечается рядом исследований [13, 174, 253]. СК14 относится к группе цитокератинов – тканеспецифических белков промежуточных филаментов. E-cadherin (Е-кадхерин) является маркером межклеточной адгезии эпителиальных клеток, и утрата его экспрессии в раковых клетках является признаком частичной потери эпителиального фенотипа [18, 168]. P53 является транскрипционным фактором, регулирующим клеточный цикл, выполняет функцию супрессора образования злокачественных опухолей [25, 229, 269]. Прогностическая значимость указанных белков при РМЖ отмечается рядом исследований [4]. Т-лимфоциты CD8⁺ (цитотоксические) и CD4⁺ (регуляторные) являются одними из ключевых участников клеточного звена иммунитета у больных РМЖ, их прогностическая и предиктивная значимость установлена целым рядом исследований [89, 128, 174, 215, 253, 256, 304].

Каждому фактору присваивают количество баллов в соответствии с разработанной 100-балльной прогностической шкалой, при этом в случае обнаружения экспрессии белка СК14 фактор оценивают в 16 баллов (фактор «СК14, есть»), при значении уровня экспрессии белка FOXP3, равном 0, фактор оценивают в 15 баллов (фактор «FOXP3=0»), для стадии заболевания T2N0M0

фактор оценивают в 10 баллов (фактор «T2N0M0»), в случае обнаружения экспрессии белка E-cadherin фактор оценивают в 6 баллов (фактор «E-cadherin»), в случае обнаружения экспрессии белка p53 фактор оценивают в 19 баллов (фактор «P53»), при значении уровня экспрессии рецепторов HER2 равном 3 фактор оценивают в 13 баллов (фактор «HER2=3»), при количестве Т-лимфоцитов CD8+ больше 0 фактор оценивают в 9 баллов (фактор «CD8>0»), в случае обнаружения экспрессии белка EGFR фактор оценивают в 4 балла (фактор «EGFR есть»), для степени дифференцировки опухоли G2 или G3 фактор оценивают в 5 баллов (фактор «степень G2, G3»), при количестве Т-лимфоцитов CD4+ больше 0 фактор оценивают в 3 балла (фактор «CD4>0»). Отсутствие фактора оценивается как 0 баллов. Для оценки риска суммируют полученные баллы и используют суммарное значение баллов в качестве прогностического параметра для количественного определения границ групп риска неблагоприятного исхода (наступление смерти ранее 10 лет), а именно, при значениях суммарного балла менее 40, пациентов относят к группе низкого риска, при значениях суммарного балла от 40 до 60 – к группе среднего риска, а при значениях более 60 пациентов относят к группе высокого риска.

Анализ выживаемости для пациенток групп высокого и низкого риска по регрессионной шкале продемонстрировал выраженные статистически значимые различия между группами ($p < 0,00001$). Показатель 10-летней выживаемости составил 77,3 % и 94,0 % для групп высокого и низкого риска, соответственно. Отношение рисков (hazard ratio) в регрессионной модели Кокса группы высокого риска к группе низкого риска составило 3,29 (95 % ДИ (2,01; 5,38)).

Анализ эффективности адъювантной химиотерапии в объединенной группе среднего и высокого риска летального исхода по регрессионной шкале показал статистически значимое преимущество ($p = 0,0057$) назначения адъювантной химиотерапии у пациенток среднего и высокого рисков (от 40 баллов и выше). Показатель 10-летней выживаемости составил 88,6 % в группе с химиотерапией и 84,9 % в группе без химиотерапии. Отношение рисков (hazard ratio) в

регрессионной модели Кокса группы без химиотерапии к группе с химиотерапией составило 1,53 (95 % ДИ (1,12; 2,08)).

Использованный в разработанных шкалах многоаспектный подход к формированию прогноза РМЖ способствует повышению точности и достоверности прогноза.

Исследования последних лет позволили заключить о значительном вкладе генетического фактора в биологическом поведении опухолей, что послужило стимулом к разработке прогностических и/или предиктивных мультигенных сигнатур, позволяющих выделять молекулярные подтипы РМЖ с оценкой прогноза развития заболевания и ответа на проводимую терапию [265, 317]. В настоящее время наиболее широко известны и продолжают изучаться 70-генная прогностическая сигнатура Mammaprint для оценки риска отдаленного метастазирования и выявления пациенток, которые могут получить пользу от назначения системной химиотерапии [55, 59], 21-генная шкала оценки вероятности рецидива Oncotype DX [222, 225, 254, 320], 11-генная сигнатура EndoPredict для прогноза метастазирования у пациенток с ЭР+ и HER2– РМЖ, получающих только эндокринную терапию, на основе которой разработана шкала оценки клинического риска EPclin [242, 305, 314], прогностическая 55-генная панель PAM50 [252, 277], комбинированная сигнатура Breast Cancer Index для прогноза риска рецидива и эндокринного ответа после лечения у пациенток с ЭР+ РМЖ [40, 207]. Большие перспективы в индивидуализации лечения РМЖ открывает методика геномного секвенирования NGS [144, 204, 312].

Изучение литературных данных и выполненные работы по оценке клинической значимости маркеров прогностических шкал позволили разработать 100-генную сигнатуру, включающую молекулярные подтипы РМЖ (люминальный А, люминальный В, базальный) и лечебно-ориентированные кластеры. Мультигенная сигнатура состоит из пролиферативно-референсной части (58 генов), лечебно-ориентированной части (37 генов) и референса (5 генов).

В рамках исследования сравнивали молекулярный подтип опухоли, определенный с помощью разработанной мультигенной сигнатуры, и результаты, полученные при проведении ИГХ исследования. Молекулярно-генетический анализ с использованием технологии nCounter 84 образцов опухоли пациенток пре- и постменопаузального возраста с метастатическим РМЖ, в рамках которого была проведена оценка экспрессии 28 генов с высокой предиктивной значимостью (*ESR1*, *PGR*, *PIK3CA*, *BCAR4*, *BCAS2*, *CCND1*, *CCND2*, *CCND3*, *FOXA1*, *ERBB2*, *EGFR*, *CDH3*, *FOXC1*, *KRT14*, *KRT5*, *CD274*, *CDK4*, *CDK6*, *P53*, *PTEN*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *CLDN3*, *CLDN7*, *AR*, *TOP2a*, *TUBBIII*), выявил 29 случаев (29/84, 34,5 %) расхождения оценки подтипа опухоли в сравнении с результатами ИГХ исследования, из них в 18 случаях (18/84, 21%) расхождения относились к подтипам опухоли РМЖ, для которых рекомендуются принципиально различные схемы химиотерапии.

Изучение образцов опухолевой ткани с использованием технологии nCounter позволило описать для каждого из выбранных 28 генов уровни экспрессии, соответствующие оценкам «+1», «+2» и «+3». Исследуемый перечень генов включал:

- 7 генов, рекомендуемых для исследования клиническими рекомендациями МЗ РФ (*ESR1*, *PGR*, *PIK3CA*, *ERB2*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CD274*) [8];
- гены *BCAR4*, *BCAS2*, *CCND1*, *CCND2*, *CCND3*, *FOXA1*, связанные с гормоночувствительностью и гормонорезистентностью опухоли;
- гены *EGFR*, *CDH3*, *FOXC1*, *KRT14*, *KRT5*, повышенная экспрессия которых является маркером базального РМЖ;
- гены *CDK4*, *CDK6* (циклин зависимые киназы РМЖ);
- гены *P53*, *PTEN*, *CHEK2*, связанные с развитием наследственной формы РМЖ;
- ген *AR*;
- гены *CLDN3*, *CLDN7* (клаудиноподобный РМЖ);
- гены *TOP2a*, *TUBBIII*, отвечающие за чувствительность к химиотерапии антрациклинами и таксанами.

Для генов *ESR1* и *ERBB2* показана корреляция результатов ИГХ исследования с данными ИГХ исследования для ЭР и HER2 статуса соответственно.

Кроме того, выполненные работы позволили установить для генов *ESR1* и *ERBB2* диапазоны уровней экспрессии, соответствующие ложноположительным и ложноотрицательным результатам ИГХ исследований статуса опухоли в отношении ЭР и HER2 рецепторов, что позволяет обеспечить выбор оптимальной тактики лечения.

Так, согласно рекомендациям NCCN 2022 [246] и ASCO/CAP 2020 [23] пациентки с низким уровнем экспрессии ЭР (1–10 %) могут получить эффект от эндокринной терапии, однако биологическое поведение некоторых карцином с низкой экспрессией ЭР более схоже с ЭР-негативными карциномами, поэтому такой результат в настоящее время следует считать сомнительным, течение заболевания более близко к ЭР-негативному РМЖ, что должно учитываться при выборе лечебной стратегии. В исследовании В. S. Sheffield и соавт. [306] в группе ЭР (1–10 %) по результатам PAM50 только 10 % составляет люминальный HER2-негативный рак, 90 % – базальный и HER2-позитивный подтипы. Эти результаты существенно не отличаются от доли люминальных подтипов, выявленных в когорте ИГХ ЭР-отрицательных опухолей молочной железы (5 % люминальных, (95 %) не люминальных. Показатели безрецидивной и общей выживаемости были одинаковыми в обеих группах ($p = 0,4$ и $p = 0,5$ соответственно), несмотря на адъювантную гормональную терапию, назначенную в большинстве (59 %) слабо положительных случаев ЭР. В ретроспективном исследовании М. Yi и соавт. [379] на основании анализа данных 9369 больных РМЖ также были получены результаты, свидетельствующие о неэффективности гормонотерапии как у пациенток с низкой экспрессией ЭР, так и у пациенток с ЭР-отрицательным статусом.

Регистрация и внедрение в клиническую практику препаратов из группы конъюгатов моноклональных антител (antibody-drug conjugates, ADC), демонстрирующих эффективность при низком уровне экспрессии HER2,

обуславливает важность точного определения HER2 статуса опухоли [75, 93, 115, 146, 159, 196, 203, 224, 236, 244, 292, 332, 337, 338, 339, 340, 341, 382, 383, 384]. В исследовании DESTINY-Breast04 [353] трастузумаб дерукстекан (ADC препарат) продемонстрировал снижение риска прогрессирования заболевания или смерти на 50 % (отношение рисков 0,50 (95 % ДИ: 0,40; 0,63), $p < 0,0001$) у пациентов с HER2-слабоположительным мРМЖ как с положительным, так и с отрицательным статусом гормональных рецепторов. В группе трастузумаб дерукстекана медиана выживаемости без прогрессирования составила 9,9 месяца по сравнению с 5,1 месяца в группе химиотерапии. При применении трастузумаба дерукстекана, по сравнению с химиотерапией, наблюдалось статистически значимое уменьшение риска смерти (отношение рисков 0,64 (95 % ДИ: 0,49; 0,84), $p = 0,001$) при этом медиана общей выживаемости составила 23,4 месяца и 16,8 месяцев соответственно.

Вместе с тем, клинические и молекулярные особенности РМЖ с низким уровнем экспрессии HER2 (HER2-low) еще предстоит выяснить. F. Schettini и соавт. [301] проведено ретроспективное исследование клинико-патологических данных 3689 пациентов с HER2-отрицательным РМЖ в сравнении с результатами PAM50. Доля HER2-low была выше при гормоноположительном заболевании (65,4 %), чем ТНРМЖ (36,6 %). При HER2-low уровни экспрессии *ERBB2* были выше при гормоноположительном заболевании, чем при трижды негативном. Воспроизводимость результатов HER2-low среди патологоанатомов была субоптимальной. Это исследование подчеркивает большую биологическую гетерогенность РМЖ с низким уровнем экспрессии HER2 и необходимость внедрения воспроизводимых и чувствительных анализов для измерения низкой экспрессии HER2.

Высокая корреляция между генным статусом HER2 и уровнем мРНК HER2 хорошо документирована. Для анализа мРНК HER2 применяется несколько методик, в том числе количественные, такие как количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени. Однако эти методы не нашли широкого

применения в клинической практике и в настоящее время не признаны в качестве альтернативных методов оценки HER2-статуса в диагностической практике

Тесты на экспрессию генов, такие как Oncotype Dx и Prosigna, в настоящее время используются в некоторых случаях для оценки ЭР+/HER2- статуса. Oncotype Dx позволяет определить уровень мРНК HER2, а Prosigna – внутренний подтип (например, HER2-обогащенный). Следует отметить, что существует лишь незначительная корреляция между внутренним подтипом, установленным с помощью профилирования экспрессии генов, и клиническим уровнем HER2-реакции; до трети HER2-обогащенных опухолей являются HER2-отрицательными при использовании общепринятых методик и примерно треть HER2-положительных опухолей классифицируются как не-HER2-обогащенные. Тем не менее в случае несоответствия результатов клинического теста на экспрессию генов данным клинического исследования необходимо пересмотреть результаты анализа на HER2, и, если первоначальный HER2-статус был установлен при трепанобиопсии, следует рассмотреть возможность проведения повторного HER2-тестирования.

HER2-тестирование должно быть проведено на образце для эксцизии (в идеале на том же блоке, который был представлен для геномного тестирования). Несмотря на корреляцию между молекулярным классом, обогащенным HER2, и ответом на антиHER2-терапию, окончательный результат определения HER2 в дискордантных случаях должен основываться на утвержденных в настоящее время анализах после валидации результатов. Результаты геномных анализов не должны использоваться для определения HER2-статуса опухоли как положительного или отрицательного для клинического лечения.

Методы NGS, такие как секвенирование всего генома, находят все большее применение в клинической практике. Методы NGS могут помочь выявить *ERBB2*-активирующие мутации и увеличение количества копий HER2, а также составить список генов, предположительно коррелирующих с ответом или резистентностью к терапии HER2 [286]. Однако их использование в клинической практике для определения HER2-статуса еще предстоит оценить: надежность

NGS анализа для выявления HER2-статуса, критерии определения HER2-положительности и доказательства в пользу использования NGS в качестве предиктора ответа на анти-HER2-терапию по сравнению с существующими утвержденными анализами. В опухолях, в которых результаты HER2 по данным NGS не совпадают с результатами одобренных анализов (ИГХ-исследование и/или ISH), HER2-статус определяется в соответствии с результатами одобренных анализов.

О. Martinez-Sáez и соавт. [226] опубликовали исследование, основанное на результатах определения мутации *PIK3CA* у 6338 пациентов с РМЖ, в котором была определена группа пациентов с HER2-положительным РМЖ с мутацией *PIK3CA*. Доля пациентов, имеющих сопряжение 2 предикторов – HER2 и *PIK3CA*, составила 31 %. В 2022 г. было начато исследование ALPHABET – рандомизированное исследование фазы III, в котором оценивается применение комбинации алпелисиб + трастузумаб с фулвестрантом или без него при ранее леченном HER2-положительном распространенном РМЖ с мутацией *PIK3CA* [264].

Тактика терапии при ТНРМЖ долгое время оставалась неопределенной, однако результаты недавнего мета-анализа подтверждают эффективность платиносодержащей терапии по сравнению со схемами без препаратов платины по показателям частоты полной патологической ремиссии (pCR), объективного общего ответа (ORR), выживаемости без прогрессирования (PFS), безрецидивной выживаемости (DFS) и общей выживаемости (OS) у пациенток с ТНРМЖ без мутации *BRCA*, что подтверждает важность профилирования опухоли для индивидуализации лечения [208]. В исследовании, выполняемом с использованием сигнатуры PAM50, было показано преимущество карбоплатина против доцетаксела по параметру ORR при базальноподобном ТНРМЖ с герминальной мутацией *BRCA1*, при этом доцетаксел показал более высокую эффективность в подгруппе пациенток с не базальноподобным ТНРМЖ [350].

В настоящем исследовании была показана сопоставимость результатов определения экспрессии генов с использованием технологии nCounter с данными

генетического исследования на мутации соответствующего гена. Так, в образцах опухолевой ткани с высокой экспрессией генов *PIK3CA* и *BRCA1* генетические анализы с использованием методов RT-PCR и NGS подтвердили наличие соответствующих мутаций. В образцах с высокой экспрессией гена *CD274* ИГХ анализ подтвердил PDL1-положительный статус опухоли. Полученные результаты согласуются с данными других работ, в которых также была продемонстрирована сопоставимость результатов технологии nCounter с данными qRT-PCR, ИГХ и флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) [164].

Изучение индивидуальных молекулярно-генетических профилей опухолевых образцов, имеющих одинаковый суррогатный подтип по данным ИГХ анализа (HER2–, ЭР+ статус и HER2– и ЭР–статус), выявило случаи клинически значимых различий характеристик опухоли, несмотря на сходный результат оценки на основании ИГХ анализа. В опухолевых образцах с HER2–, ЭР+ статусом индивидуальные характеристики опухолей включали более высокую экспрессию *ESR1* и маркеров неблагоприятного прогноза (*PIK3CA*, *P53*, *CCND1*, *BCAS2*, *FOXAI*). В образцах с HER2– и ЭР– статусом – гиперэкспрессию генов *KRT5* и *CDH3*, являющихся маркером базального РМЖ; гиперэкспрессию генов *EGFR* и *CD274*, требующих соответствующую лечебную тактику с назначением анти-EGFR препаратов и анти-PDL1 моноклональных антител; повышенную экспрессию маркеров базального РМЖ (*CDH3*, *FOXCI*, *KRT14*) и клаубиноподобного РМЖ (*CLDN3*, *CLDN7*, обуславливающих более агрессивное течение РМЖ; повышенная экспрессия генов *TOP2α* и *TUBBIII*, которые могут служить маркерами чувствительности к антрациклиновым антибиотикам и таксанам.

Таким образом, молекулярно-генетическое профилирование опухоли с использованием разработанной мультигенной сигнатуры является точным методом определения подтипа опухоли у пациенток с РМЖ, что определяет возможность индивидуализации тактики лекарственной терапии.

ВЫВОДЫ

1. Сравнение возрастных подгрупп среди пациенток с T1-2N0M0 РМЖ в возрасте <50 лет и ≥50 лет, доля которых составила 30,9 % и 69,1 % соответственно, не выявило статистически значимых различий между подгруппами в отношении степени дифференцировки опухолевого процесса, уровня экспрессии ЭР, ПР, Ki-67, HER2, размера опухоли и pTNM классификации.

2. Результаты сравнительного анализа в подгруппах с низким (<13 %) и высоким (>13 %) уровнем экспрессии Ki-67 показали, что возрастание продукции Ki-67 сопровождается снижением уровня экспрессии ЭР, ПР, увеличением экспрессии HER2, степени злокачественности и размера опухоли (для всех сравнений получены статистически значимые различия, $p < 0,0001$).

3. У пациенток с T1-2N0M0 РМЖ установлено преобладание степеней G2 и G3 опухолевого процесса (47,5 % и 36,9 % соответственно). Показано, что по мере увеличения злокачественности опухоли снижается средний уровень экспрессии ЭР (4,51 при G2 и 2,59 при G3, $p < 0,0001$) и ПР (3,96 при G2 и 2,15 при G3, $p < 0,0001$), а уровень экспрессии Ki-67 возрастает (12,20 при G1 и 31,58 при G3, $p < 0,0001$). Прогрессивное увеличение гистологической злокачественности РМЖ сопровождается статистически значимым ($p < 0,05$) возрастанием таких предикторов, как CK5, CK14, EGFR, PDL, и снижением FOXA1.

4. На основании полученных данных создана традиционная шкала, состоящая из 6 показателей, являющихся рутинными маркерами, используемыми в клинической практике («T2N0M0», «ПР<8», «G2G3», «ЭР<8», «HER2=3» и «Ki-67>5 %»).

5. Анализ выживаемости для пациенток групп высокого и низкого риска по традиционной шкале продемонстрировал статистически значимые различия между группами (отношение рисков 2,17 (95 % ДИ: 1,44; 3,25), $p = 0,0004$). Анализ эффективности адъювантной химиотерапии в объединенной

группе среднего и высокого риска летального исхода по традиционной шкале показал статистически значимое преимущество (отношение рисков 1,48 (95 % ДИ: 1,07; 2,04), $p < 0,0131$) назначения адъювантной химиотерапии у пациенток данных подгрупп риска (от 40 баллов и выше).

6. На основании результатов однофакторного и многофакторного анализов впервые разработана регрессионная прогностическая шкала из 10 факторов с наибольшим влиянием в отношении риска летального исхода («СК14, есть»; «FOXP3=0»; «T2N0M0»; «E-cadherin»; «P53»; «HER2=3»; «CD8>0»; «EGFR есть»; «степень G2, G3»; «CD4>0»). По сравнению с традиционной шкалой, включающей рутинные маркеры («T2N0M0», «PP<8», «G2G3», «ЭР<8», «HER2=3» и «Ki-67>5 %»), разработанная регрессионная шкала обладает более высокой специфичностью (69,74 % против 36,92 %), эффективностью (63,76 % против 58,7%) и прогностической значимостью (AUROC 0,67 против 0,61).

7. Анализ выживаемости для пациенток групп высокого и низкого риска по регрессионной шкале продемонстрировал выраженные статистически значимые различия между группами (отношение рисков 3,29 (95 % ДИ: 2,01; 5,38), $p < 0,00001$). Показано, что в объединенной группе среднего и высокого риска летального исхода по регрессионной шкале проведение адъювантной химиотерапии было ассоциировано со статическим значимым преимуществом в отношении показателя выживаемости (отношение рисков 1,53 (95 % ДИ: 1,12; 2,08), $p = 0,0057$).

8. Впервые создана 100-генная мультигенная сигнатура, включающая молекулярные подтипы РМЖ (люминальный А, люминальный В, базальный) и лечебно-ориентированные кластеры. Мультигенная сигнатура включает пролиферативно-референсную часть (58 генов), лечебно-ориентированную часть (37 генов) и референс (5 генов).

9. По результатам анализа 84 образцов опухоли пациенток пре- и постменопаузального возраста с метастатическим РМЖ, в рамках которого была проведена оценка экспрессии 28 генов с высокой предиктивной значимостью (*ESR1*, *PGR*, *PIK3CA*, *BCAR4*, *BCAS2*, *CCND1*, *CCND2*, *CCND3*, *FOXA1*, *ERBB2*,

EGFR, CDH3, FOXC1, KRT14, KRT5, CD274, CDK4, CDK6, P53, PTEN, BRCA1, BRCA2, CHEK2, CLDN3, CLDN7, AR, TOP2a, TUBBIII), выявлено 29 случаев (29/84, 34,5 %) расхождения оценки подтипа опухоли в сравнении с результатами ИГХ исследования, из них в 18 случаях (18/84, 21%) расхождения относились к подтипам опухоли РМЖ, для которых рекомендуются принципиально различные схемы системного лечения.

10. Для каждого из 28 генов высокой предиктивной ценности в исследуемой выборке образцов опухоли описаны уровни экспрессии, соответствующие оценкам «+1», «+2» и «+3». Для генов *ESR1* и *ERBB2* оценена корреляция *ESR/ЭР* и *ERBB2/HER2* и обозначены диапазоны уровней экспрессии, соответствующие ложноположительным и ложноотрицательным результатам ИГХ исследований статуса опухоли в отношении ЭР и HER2 рецепторов.

11. Изучение индивидуальных молекулярно-генетических профилей опухолевых образцов, имеющих одинаковый суррогатный подтип по данным ИГХ анализа, выявило случаи клинически значимых различий характеристик опухоли, несмотря на сопоставимый результат оценки на основании ИГХ анализа.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Уровень экспрессии стероидных гормонов (ЭР и ПР), HER2, Ki-67, CK5, CK14, EGFR, P53 может быть использован в многофакторном анализе для оценки риска рецидива у больных T1-2N0M0 независимо от подтипа РМЖ.

2. Разработанные традиционная прогностическая шкала и регрессионная прогностическая шкала рекомендуются для определения группы риска в отношении летального исхода ранее 10 лет и ответа на адъювантную химиотерапию, при этом регрессионная прогностическая шкала на основе новых маркеров является более эффективным и точным методом оценки риска.

Таблица 26 – Традиционная прогностическая шкала

Фактор	Баллы	Оценка результата
ПР<8	24	до 40 баллов – низкий риск, от 40 до 60 баллов – средний риск, более 60 баллов – высокий риск
T2N0M0	18	
HER2=3	20	
Степень G2, G3	13	
ЭР=8	12	
Ki-67>5 %	13	
Сумма	100	

Таблица 27 – Регрессионная прогностическая шкала

Фактор	Баллы	Оценка результата
CK14, есть	16	до 40 баллов – низкий риск, от 40 до 60 баллов – средний риск, более 60 баллов – высокий риск
FOXP3>0	15	
T2N0M0	10	
E-cadherin (Есть)	6	
P53, есть	19	
HER2=3	13	
CD8>0	9	
EGFR (Есть)	4	
Степень G2, G3	5	
CD4>0	3	
Сумма	100	

3. Разработанная мультигенная сигнатура из 100 генов, обладающих высокой предиктивной и прогностической значимостью, может использоваться для персонализированного подхода к назначению системного лечения РМЖ.

4. Молекулярно-генетическое профилирование опухоли является более точным методом определения подтипа опухоли у пациенток с мРМЖ в сравнении с рутинным суррогатным иммуногистохимическим исследованием.

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ДАННОЙ ТЕМЫ

Данные об индивидуальном профиле опухоли расширяют представления о гетерогенности опухолевого процесса, позволяют проводить сбор данных о предиктивной и прогностической значимости отдельных биомаркеров и формировать базу для развития персонализированного подхода в терапии РМЖ.

Представляется целесообразным продолжение исследований разработанных прогностических шкал и накопление данных рутинной клинической практики о группах риска пациенток с РМЖ, выборе терапии и оценке ее эффективности, сопоставлении полученных результатов с данными о группе риска пациентов.

Представляется интересным отбор и изучение новых малоизученных предиктивных и прогностических биомаркеров, которые могут стать основой для разработки новых прогностических и предиктивных шкал для пациенток с РМЖ.

Представляется крайне актуальным продолжение исследований мультигенной сигнатуры с целью более глубокого изучения характеристик опухолевого процесса и разработки рекомендаций по персонализации лечения РМЖ. В частности, представляются важными исследования всех предиктивных и прогностических компонентов сигнатуры, сопоставления результатов оценки экспрессии отдельных генов с помощью технологии nCounter с данными методов по выявлению мутаций в генах и новые исследования по оценке диагностической эффективности мультигенной сигнатуры при различных стадиях и подтипах РМЖ.

СОКРАЩЕНИЯ И УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

ДИ – доверительный интервал

ИГХ – иммуногистохимический

ЛДРМЖ – лимфоцитдоминирующий рак молочной железы

МАИР – Международное агентство по изучению рака

ОР – отношение рисков

ОШ – отношение шансов

ПМР – полная морфологическая ремиссия

РА – рецептор андрогенов

РМЖ – рак молочной железы

ПР – рецептор прогестерона

ЭР – рецептор эстрогенов

ТНРМЖ – трижды негативный рак молочной железы

AJCC (American Joint Committee on Cancer) – Американский объединенный комитет по изучению рака

ASCO (American Society of Clinical Oncology) – Американское общество клинической онкологии

CAP (College of American Pathologists) – Коллегия американских патологов

GGI (Genomic Grade Index) – геномный индекс степени злокачественности

HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) – рецептор эпидермального фактора роста 2-го типа

NGS (Next generation sequencing) – секвенирование нового поколения

RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреев, Д. А. Статус низкой экспрессии HER2 — инновационная концепция в дифференцированном подходе к выбору терапии пациентов с тройным негативным раком молочной железы / Андреев Д. А., Завьялов А. А. // Вопросы онкологии. – 2023. – Т. 69, №1. – С. 38–44.
2. Имянитов, Е. Н. Практические аспекты тестирования наследственных мутаций в генах *BRCAl/2*: позиция Межрегиональной организации молекулярных генетиков в онкологии и онкогематологии / Е. Н. Имянитов, М. Л. Филипенко, Т. В. Кекеева, И. А. Демидова // Вопросы онкологии. – 2022. – Т. 68, №3. – С. 260–266.
3. Каприн, А. Д. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность) / А. Д. Каприн, В. В. Старинский, Г. В. Петрова. – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019. – 250 с.
4. Клименко, В. В. Молекулярные маркеры эффективности предоперационной химиотерапии местно-распространенного рака молочной железы : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.01.12, 03.01.04 / Клименко Вероника Викторовна. – Санкт-Петербург, 2015. – 24 с.
5. Мерабишвили, В. М. Состояние онкологической помощи в России: однолетняя выживаемость больных злокачественными новообразованиями и летальность на первом году жизни по всем локализациям опухолей. (Популяционное исследование на уровне федерального округа) / В. М. Мерабишвили, А. М. Беляев // Вопросы онкологии. – 2023. – Т. 69, №1. – С. 55–66.
6. Пожарисский, К. М. Значение иммуногистохимических методик для определения характера лечения и прогноза опухолевых заболеваний / К. М. Пожарисский, Е. Н. Леенман // Архив патологии. – 2000. – № 5. – С. 3–11.
7. Портной, С. М. Адьювантная гормонотерапия рака молочной железы длительностью 10 лет: за и против (обзор литературы) / С. М. Портной,

Т. А. Шендрикова // Опухоли Женской Репродуктивной Системы. – 2013. – № 3–4. – С. 50–53.

8. Рак молочной железы. Клинические рекомендации Министерства здравоохранения Российской Федерации. 2021. – URL: https://apicr.minzdrav.gov.ru/api.ashx?op=GetClinrecPdf&id=379_4 (дата обращения: 06.05.2021).

9. Семиглазов, В. Ф. Клинико-патогенетические формы рака молочной железы (новые подходы к планированию лечения) / В. Ф. Семиглазов // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 1980. – № 12. – С. 27.

10. Семиглазов, В. Ф. Общие рекомендации по лечению раннего рака молочной железы St. Gallen-2015, адаптированные экспертами Российского общества онкомаммологов / В. Ф. Семиглазов, Р. М. Палтуев, В. В. Семиглазов [и др.] // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2015. – № 11 (3). – С. 43–60.

11. Скотаренко, Л. В. Особенности Т-клеточного иммунитета при раке молочной железы / Л. В. Скотаренко, И. К. Воротников, З. Г. Кадагидзе, Ф. А. Шамилов // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2011. – №4. – С. 24–27.

12. Степанов, И. А. Частота и спектр наследственных мутаций в гене *TP53* в обширном исследовании российских пациенток с раком молочной железы // И. А. Степанов, Е. В. Васильева, А. П. Соколенко, Е. Н. Имянитов // Вопросы онкологии. – 2022. – Т. 68, №5. – С. 589–597.

13. Целуйко, А. И. Некоторые аспекты противоопухолевого иммунитета при раке молочной железы / А. И. Целуйко, В. Ф. Семиглазов, А. Г. Кудайбергенова // Эффективная фармакотерапия. – 2021. – № 2. – С. 6–14.

14. Янус, Г. А. Предиктивные молекулярно-генетические тесты в клинической онкологии / Г. А. Янус, А. Г. Иевлева, С. Н. Алексахина, Е. Н. Имянитов // Предиктивные молекулярно-генетические тесты в клинической онкологии // Вопросы онкологии. – 2022. – Т. 68, №1. – С. 17–28.

15. Aas, T. Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients / T. Aas, A. L. Børresen, S. Geisler [et al.] // *Nature Medicine*. – 1996. – № 7 (2). – P. 811–814.
16. Abd El-Rehim, D. M. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma / Dalia M. Abd El-Rehim, Sarah E. Pinder, Claire E. Paish [et al.] // *The Journal of Pathology*. – 2004. – № 2 (203). – P. 661–671.
17. Abdelrahman, A. E. Prognostic impact of EGFR and cytokeratin 5/6 immunohistochemical expression in triple-negative breast cancer / A. E. Abdelrahman, H. E. Rashed, M. Abdelgawad [et al.] // *Annals of Diagnostic Pathology*. – 2017. – Vol. 28. – P. 43–53.
18. Adamo, B. The prognostic significance of combined androgen receptor, E-Cadherin, Ki-67 and CK5/6 expression in patients with triple negative breast cancer / B. Adamo, G. R. R. Ricciardi, A. Ieni [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – № 44 (8). – P. 76974–76986.
19. AJCC Cancer Staging Manual под ред. M.B. Amin [и др.], 8-е изд., Springer International Publishing, 2017.
20. Albain, K. S. Prognostic and predictive value of the 21-gene recurrence score assay in postmenopausal women with node-positive, oestrogen-receptor-positive breast cancer on chemotherapy: a retrospective analysis of a randomised trial / K. S. Albain, W. E. Barlow, S. Shak [et al.] // *The Lancet. Oncology*. – 2010. – № 1 (11). – P. 55–65.
21. Albergaria, A. Expression of FOXA1 and GATA-3 in breast cancer: the prognostic significance in hormone receptor-negative tumours / A. Albergaria, J. Paredes, B. Sousa [et al.] // *Breast cancer research: BCR*. – 2009. – № 3 (11). – P. R40.
22. Aleskandarany, M. A. Prognostic value of proliferation assay in the luminal, HER2-positive, and triple-negative biologic classes of breast cancer / M. A. Aleskandarany, A. R. Green, A. A. Benhasouna [et al.] // *Breast cancer research: BCR*. – 2012. – № 1 (14). – P. R3.

23. Allison, K. H. Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: ASCO/CAP Guideline Update / K. H. Allison, M. E. H. Hammond, M. Dowsett [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2020. – № 38 (12). – P. 1346–1366.
24. Allred, D. C. Histological and biological evolution of human premalignant breast disease / D. C. Allred, S. K. Mohsin, S. A. Fuqua // *Endocrine-Related Cancer*. – 2001. – № 1 (8). – P. 47–61.
25. Alsner, J. Heterogeneity in the clinical phenotype of TP53 mutations in breast cancer patients / J. Alsner, M. Yilmaz, P. Guldborg [et al.] // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2000. – № 10 (6). – P. 3923–3931.
26. Anders, C. K. Young age at diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of breast cancers with shared patterns of gene expression / C. K. Anders, D. S. Hsu, G. Broadwater // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2008. – № 20 (26). – P. 3324–3330.
27. André, F. Alpelisib for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer / F. André, E. Ciruelos, G. Rubovszky [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2019. № 380 (20). – P. 1929–1940.
28. Andre, F. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Update-Integration of Results From TAILORx / F. Andre, N. Ismaila, N. L. Henry // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2019. – № 37 (22). – P. 1956–1964.
29. Angèle, S. Abnormal expression of the ATM and TP53 genes in sporadic breast carcinomas / S. Angèle, I. Treilleux, P. Tanière [et al.] // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2000. – № 9 (6). – P. 3536–3544.
30. Asleh, K. Heterogeneity of triple negative breast cancer: Current advances in subtyping and treatment implications / K. Asleh, N. Riaz, T. O. Nielsen // *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. – 2022. – №41 (1). – P. 265.

31. Axelsson, C. K. Axillary dissection of level I and II lymph nodes is important in breast cancer classification. The Danish Breast Cancer Cooperative Group (DBCG) / C. K. Axelsson, H. T. Mouridsen, K. Zedeler // *European Journal of Cancer* (Oxford, England: 1990). – 1992. – № 8–9 (28A). – P. 1415–1418.

32. Azambuja, E. de. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients / E. de Azambuja, F. Cardoso, G. de Castro [et al.] // *British Journal of Cancer*. – 2007. № 10 (96). – P. 1504–1513.

33. Azim, H. A. Elucidating prognosis and biology of breast cancer arising in young women using gene expression profiling / H. A. Azim Jr, S. Michiels, P. L. Bedard [et al.] // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2012. – № 5 (18). – P. 1341–1351.

34. Badve, S. FOXA1 expression in breast cancer--correlation with luminal subtype A and survival / S. Badve, D. Turbin, M. A. Thorat [et al.] // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2007. – № 15 Pt 1 (13). – P. 4415–4421.

35. Bai, X. Triple-negative breast cancer therapeutic resistance: Where is the Achilles' heel? / X. Bai, J. Ni, J. Beretov // *Cancer Letters*. – 2021. – № 497. – P. 100–111.

36. Balestrieri, K. Proteomic identification of tumor- and metastasis-associated galectin-1 in claudin-low breast cancer / K. Balestrieri, K. Kew, M. McDaniel [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta. General Subjects*. – 2021. – № 1865 (2). – P. 129784.

37. Bardou, V.-J. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases / V.-J. Bardou, G. Arpino, R. M. Elledge [et al.] // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2003. – № 10 (21). – P. 1973–1979.

38. Barnes, D. M. Cyclin D1 in breast cancer / D. M. Barnes, C. E. Gillett // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 1998. – № 1–3 (52). – P. 1–15.

39. Bartlett, J. The clinical evaluation of HER-2 status: which test to use? / J. Bartlett, E. Mallon, T. Cooke // *The Journal of Pathology*. – 2003. – № 4 (199). – P. 411–417.
40. Bartlett, J. Breast Cancer Index and prediction of benefit from extended endocrine therapy in breast cancer patients treated in the adjuvant tamoxifen- to offer more? (aTTom) trial / J. M. Bartlett, D. C. Sgroi, K. Treuner [et al.] // *Annals of Oncology*. – 2019. № 30. – P. 1776–1783.
41. Beadle, B. M. The impact of age on outcome in early-stage breast cancer / B. M. Beadle, W. A. Woodward, T. A. Buchholz // *Seminars in Radiation Oncology*. – 2011. – № 1 (21). – P. 26–34.
42. Beck, S. Hepatocyte nuclear factor 3 (winged helix domain) activates trefoil factor gene TFF1 through a binding motif adjacent to the TATAA box / S. Beck, P. Sommer, E. dos Santos Silva // *DNA and cell biology*. – 1999. – № 2 (18). – P. 157–164.
43. Beith, J. Hormone receptor positive, HER2 negative metastatic breast cancer: A systematic review of the current treatment landscape / J. Beith, K. Burslem, R. Bell // *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*. – 2016. – (12 Suppl 1). – C. 3–18.
44. Beresford, M. J. Measuring proliferation in breast cancer: practicalities and applications / M. J. Beresford, G. D. Wilson, A. Makris // *Breast cancer research: BCR*. – 2006. – № 6 (8). – P. 216.
45. Bernardo, G.M. FOXA1 represses the molecular phenotype of basal breast cancer cells / G. M. Bernardo, G. Bebek, C. L. Ginther // *Oncogene*. – 2013. – № 5 (32). – P. 554–563.
46. Bernardo, G. M. FOXA1: a transcription factor with parallel functions in development and cancer / G. M. Bernardo, R. A. Keri // *Bioscience Reports*. – 2012. – № 2 (32). – P. 113–130.
47. Bertucci, F. Gene expression profiling and clinical outcome in breast cancer / F. Bertucci, P. Finetti, N. Cervera // *Omics: A Journal of Integrative Biology*. – 2006. – № 4 (10). – P. 429–443.

48. Bianchini, G. Treatment landscape of triple-negative breast cancer - expanded options, evolving needs / G. Bianchini, C. De Angelis, L. Licata [et al.] // *Nature Reviews Clinical Oncology*. – 2022. – № 19 (2). – P. 91–113.
49. Blamey, R. W. ONCOPOOL - a European database for 16,944 cases of breast cancer / R. W. Blamey, B. Hornmark-Stenstam, G. Ball [et al.] // *European Journal of Cancer* (Oxford, England: 1990). – 2010. – № 1 (46). – P. 56–71.
50. Bloom, H. J. Host resistance and survival in carcinoma of breast: a study of 104 cases of medullary carcinoma in a series of 1,411 cases of breast cancer followed for 20 years / H. J. Bloom, W. W. Richardson, J. R. Field // *British Medical Journal*. – 1970. – № 5716 (3). – P. 181–188.
51. Blows, F.M. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies / F. M. Blows, K. E. Driver, M. K. Schmidt // *PLoS medicine*. – 2010. – № 5 (7). – P. e1000279.
52. Blum, J. L. Determinants of Response to Talazoparib in Patients with HER2-Negative, Germline BRCA1/2-Mutated Breast Cancer / J. L. Blum, A. D. Laird, J. K. Litton [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2022. – № 28 (7). P. 1383–1390.
53. Bollet, M. A. Age remains the first prognostic factor for loco-regional breast cancer recurrence in young (< 40 years) women treated with breast conserving surgery first / M. A. Bollet, B. Sigal-Zafrani, V. Mazeau [et al.] // *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. – 2007. – № 3 (82). – P. 272–280.
54. Borri, F. Pathology of triple negative breast cancer / F. Borri, A. Granaglia // *Seminars in Cancer Biology*. – 2021. – № 72. – P. 136–145.
55. Brandão, M. Mammaprint™: a comprehensive review / M. Brandão, N. Pondé, M. Piccart-Gebhart // *Future Oncology* (London, England). – 2019. – № 2 (15). – P. 207–224.
56. Broude, E.V. Expression of CDK8 and CDK8-interacting Genes as Potential Biomarkers in Breast Cancer / E. V. Broude, B. Györffy, A. A. Chumanevich // *Current Cancer Drug Targets*. – 2015. – № 8 (15). – P. 739–749.

57. Burness, M. L. Epidermal growth factor receptor in triple-negative and basal-like breast cancer: promising clinical target or only a marker? / M. L. Burness, T. A. Grushko, O. I. Olopade // *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*. – 2010. – № 1 (16). – P. 23–32.

58. Cancer Genome Atlas Network Comprehensive molecular portraits of human breast tumours // *Nature*. – 2012. – № 7418 (490). – P. 61–70.

59. Cardoso, F. 70- gene signature as an aid to treatment decisions in early- stage breast cancer / F. Cardoso, L. J. van't Veer, J. Bogaerts [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2016. – № 375. – P. 717–729.

60. Carey, L. A. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study / L. A. Carey, C. M. Perou, C. A. Livasy // *JAMA*. – 2006. – № 21 (295). – P. 2492–2502.

61. Carroll, J. S. Estrogen receptor target gene: an evolving concept / J. S. Carroll, M. Brown // *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*. – 2006. – № 8 (20). – P. 1707–1714.

62. Cascione, L. Integrated MicroRNA and mRNA Signatures Associated with Survival in Triple Negative Breast Cancer / L. Cascione, P. Gasparini, F. Lovat // *PLOS ONE*. – 2013. – № 2 (8). – P. e55910.

63. Casper, D. J. Use of anti-phosphohistone H3 immunohistochemistry to determine mitotic rate in thin melanoma / D. J. Casper, K. I. Ross, J. L. Messina // *The American Journal of Dermatopathology*. – 2010. – № 7 (32). – P. 650–654.

64. Chagpar, A. B. Lymph node ratio should be considered for incorporation into staging for breast cancer / A. B. Chagpar, R. L. Camp, D. L. Rimm // *Annals of Surgical Oncology*. – 2011. – № 11 (18). – P. 3143–3148.

65. Chan, M. S. M. Changes of tumor infiltrating lymphocyte subtypes before and after neoadjuvant endocrine therapy in estrogen receptor-positive breast cancer patients--an immunohistochemical study of Cd8+ and Foxp3+ using double immunostaining with correlation to the pathobiological response of the patients / M. S. M Chan, L. Wang, S. J. A. Felizola [et al.] // *The International Journal of Biological Markers*. – 2012. – № 4 (27). – P. e295-304.

66. Chandarlapaty, S. Prevalence of ESR1 Mutations in Cell-Free DNA and Outcomes in Metastatic Breast Cancer: A Secondary Analysis of the BOLERO-2 Clinical Trial / S. Chandarlapaty, D. Chen, W. He [et al.] // *JAMA oncology*. – 2016. – № 10 (2). P. 1310–1315.
67. Chang, H. Y. Gene expression signature of fibroblast serum response predicts human cancer progression: similarities between tumors and wounds / H. Y. Chang, J. B. Sneddon, A. A. Alizadeh // *PLoS biology*. – 2004. – № 2 (2). – P. E7.
68. Chang, H.Y. Robustness, scalability, and integration of a wound-response gene expression signature in predicting breast cancer survival / H. Y. Chang, D. S. A. Nuyten, J. B. Sneddon [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2005. – № 10 (102). – P. 3738–3743.
69. Cheang, M. C. U. Basal-Like Breast Cancer Defined by Five Biomarkers Has Superior Prognostic Value than Triple-Negative Phenotype / M. C. U. Cheang, D. Voduc, C. Bajdik [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2008. – № 5 (14). – P. 1368–1376.
70. Cheang, M. C. U. Ki-67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer / M. C. U. Cheang, S. K. Chia, D. Voduc // *Journal of the National Cancer Institute*. – 2009. – № 10 (101). – P. 736–750.
71. Chollet-Hinton, L. Breast cancer biologic and etiologic heterogeneity by young age and menopausal status in the Carolina Breast Cancer Study: a case-control study / L. Chollet-Hinton, C. K. Anders, C.-K. Tse [et al.] // *Breast cancer research: BCR*. – 2016. – № 1 (18). – P. 79.
72. Cil, T. Factors affecting axillary lymph node retrieval and assessment in breast cancer patients / T. Cil, J. Hauspy, H. Kahn [et al.] // *Annals of Surgical Oncology*. – 2008. – № 12 (15). – P. 3361–3368.
73. Clatot, F. Kinetics, prognostic and predictive values of ESR1 circulating mutations in metastatic breast cancer patients progressing on aromatase inhibitor / F. Clatot, A. Perdrix, L. Augusto [et al.] // *Oncotarget*. – 2016. – № 46 (7). – P. 74448–74459.

74. Cole, B. F. Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised clinical trials with quality-adjusted survival analysis / B. F. Cole, R. D. Gelber, S. Gelber [et al.] // *Lancet* (London, England). – 2001. – № 9278 (358). – P. 277–286.

75. Collins, D. M. Effects of HER Family-targeting Tyrosine Kinase Inhibitors on Antibody-dependent Cell-mediated Cytotoxicity in HER2-expressing Breast Cancer / D. M. Collins, S. F. Madden, N. Gaynor // *Clinical Cancer Research*. – 2021. – № 27 (3). – P. 807–818.

76. Collins, L. C. Pathologic features and molecular phenotype by patient age in a large cohort of young women with breast cancer / L. C. Collins, J. D. Marotti, S. Gelber // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2012. – № 3 (131). – P. 1061–1066.

77. Colomer, R. It is not time to stop progesterone receptor testing in breast cancer / R. Colomer, M. Beltran, J. Dorcas [et al.] // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2005. – № 16 (23). – P. 3868–3869; author reply 3869-3870.

78. Cortazar, P. Pathological complete response in neoadjuvant treatment of breast cancer / P. Cortazar, C. E. Geyer Jr // *Annals of Surgical Oncology*. – 2015. – № 5 (22). – P. 1441–1446.

79. Cortés, J. Final results of KEYNOTE-355: Randomized, double-blind, phase 3 study of pembrolizumab + chemotherapy vs placebo + chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer / J. Cortés, D. W. Cescon, H. S. Rugo [et al.] // 2021 San Antonio Breast Cancer Symposium. Abstract GS1-02. Presented December 7, 2021.

80. Costa, R. H. Multiple hepatocyte-enriched nuclear factors function in the regulation of transthyretin and alpha 1-antitrypsin genes / R. H. Costa, D. R. Grayson, J. E. Darnell Jr // *Molecular and Cellular Biology*. – 1989. – № 4 (9). – P. 1415–1425.

81. Cowin, P. A. Profiling the cancer genome / P. A. Cowin, M. Anglesio, D. Etemadmoghadam // *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. – 2010. – (11). – P. 133–159.

82. Cremoux, P. *dep53* mutation as a genetic trait of typical medullary breast carcinoma / P. de Cremoux, A. V. Salomon, S. Liva [et al.] // *Journal of the National Cancer Institute*. – 1999. – № 7 (91). – P. 641–643.

83. Cui, X. The Utility of Phosphohistone H3 in Breast Cancer Grading / X. Cui, S. Harada, D. Shen [et al.] // *Applied immunohistochemistry & molecular morphology: AIMM*. – 2015. – № 10 (23). – P. 689–695.

84. Cuzick, J. Prognostic value of a combined estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67, and human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemical score and comparison with the Genomic Health recurrence score in early breast cancer / J. Cuzick, M. Dowsett, S. Pineda [et al.] // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2011. – № 32 (29). – P. 4273–4278.

85. Dandachi, N. Chromogenic in situ hybridization: a novel approach to a practical and sensitive method for the detection of HER2 oncogene in archival human breast carcinoma / N. Dandachi, O. Dietze, C. Hauser-Kronberger // *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*. – 2002. – № 8 (82). – P. 1007–1014.

86. Danzinger, S. Differential Claudin 3 and EGFR Expression Predicts BRCA1 Mutation in Triple-Negative Breast Cancer / S. Danzinger, Y. Y. Tan, M. Rudas [et al.] // *Cancer Invest*. – 2018. – №36(7). – P. 378–388.

87. Davidoff, A. M. Genetic basis for p53 overexpression in human breast cancer / A. M. Davidoff, P. A. Humphrey, J. D. Iglehart // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1991. – № 11 (88). – P. 5006–5010.

88. De Lima, M. A. G. Cost analysis of using Magee scores as a surrogate of Oncotype DX for adjuvant treatment decisions in women with early breast cancer / M. A. G. de Lima, M. Clemons, S. V. Katwyk // *Eval Clin Pract*. – 2020. – 26(3) – P. 889-892.

89. De Jong, V. M. T. Prognostic value of tumour infiltrating lymphocytes in young triple negative breast cancer patients who did not receive adjuvant systemic

treatment; by the PARADIGM study group / V. M. T. De Jong, Y. Wang, M. Opdam [et al.] // *Annals of Oncology* –2020. –№ 31. – S303–S339.

90. Deepak, K. G. K. Tumor microenvironment: Challenges and opportunities in targeting metastasis of triple negative breast cancer / K. G. K. Deepak, R. Vempati, G. P. Nagaraju [et al.] // *Pharmacological Research*. – 2020. – № 153. – P. 104683.

91. Dekker, T. J. A. Quality assessment of estrogen receptor and progesterone receptor testing in breast cancer using a tissue microarray-based approach / T. J. A. Dekker, S. ter Borg, G. K. J. Hooije [et al.] // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2015. – № 2 (152). – P. 247–252.

92. Denkert, C. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer / C. Denkert, S. Loibl, A. Noske // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2010. – № 1 (28). – P. 105–113.

93. Denkert, C. Clinical and molecular characteristics of HER2-low-positive breast cancer: pooled analysis of individual patient data from four prospective, neoadjuvant clinical trials / C. Denkert, F. Seither, A. Schneeweiss // *Lancet Oncology*. – 2021. – № 22 (8). – P. 1151–1161.

94. Denkert, C. Molecular alterations in triple-negative breast cancer-the road to new treatment strategies / C. Denkert, C. Liedtke, A. Tutt [et al.] // *Lancet*. – 2017. – № 389 (10087). – P. 2430–2442.

95. Denkert, C. Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers / C. Denkert, G. von Minckwitz, J. C. Brase [et al.] // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2015. – № 9 (33). – P. 983–991.

96. Derakhshan, F. Pathogenesis of Triple-Negative Breast Cancer / F. Derakhshan, J. S. Reis-Filho // *Annual Review of Pathology*. – 2022. – № 17. – P. 181–204.

97. Desmedt, C. Biological processes associated with breast cancer clinical outcome depend on the molecular subtypes / C. Desmedt, B. Haibe-Kains, P. Wirapati [et al.] // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2008. – № 16 (14). – P. 5158–5165.

98. Desmoulière, A. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior / A. Desmoulière, C. Guyot, G. Gabbiani // *The International Journal of Developmental Biology*. – 2004. – № 5–6 (48). – P. 509–517.

99. Di Franco, S. p63 role in breast cancer / S. Di Franco, G. Sala, M. Todaro // *Aging*. – 2016. – № 10 (8). – P. 2256–2257.

100. Dieci, M. V. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study / M. V. Dieci, C. Criscitiello, A. Goubar [et al.] // *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*. – 2014. – № 3 (25). – P. 611–618.

101. Dieci, M. V. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in two phase III randomized adjuvant breast cancer trials / M. V. Dieci, M. C. Mathieu, V. Guarneri [et al.] // *Annals of Oncology*. – 2015. – № 8 (26). – P. 1698–1704.

102. Dieci, M. V. Update on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer, including recommendations to assess TILs in residual disease after neoadjuvant therapy and in carcinoma in situ: A report of the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer / M. V. Dieci, N. Radosevic-Robin, S. Fineberg [et al.] // *Seminars in Cancer Biology*. – 2018. – № Pt 2 (52). – P. 16–25.

103. Dings, P. J. M. The prognostic value of lymph node ratio in node-positive breast cancer: a Dutch nationwide population-based study / P. J. M. Dings, M. A. G. Elferink, L. J. A. Strobbe [et al.] // *Annals of Surgical Oncology*. – 2013. – № 8 (20). – P. 2607–2614.

104. Donner, A. J. CDK8 is a positive regulator of transcriptional elongation within the serum response network / A. J. Donner, C. C. Ebmeier, D. J. Taatjes [et al.] // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 2010. – № 2 (17). – P. 194–201.

105. Dowsett, M. Estrogen Receptor Expression in 21-Gene Recurrence Score Predicts Increased Late Recurrence for Estrogen-Positive/HER2-Negative Breast Cancer / M. Dowsett, I. Sestak, R. Buus [et al.] // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2015. – № 12 (21). – P. 2763–2770.

106. Dumay, A. Distinct tumor protein p53 mutants in breast cancer subgroups / A. Dumay, J.-P. Feugeas, E. Wittmer // *International Journal of Cancer*. – 2013. – № 5 (132). – P. 1227–1231.

107. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials // *Lancet (London, England)*. – 2005. – № 9472 (365). – P. 1687–1717.

108. Eiermann, W. The 21-gene recurrence score assay impacts adjuvant therapy recommendations for ER-positive, node-negative and node-positive early breast cancer resulting in a risk-adapted change in chemotherapy use / W. Eiermann, M. Rezai, S. Kümmel [et al.] // *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*. – 2013. – № 3 (24). – P. 618–624.

109. Elsayaf, Z. Biological subtypes of triple-negative breast cancer are associated with distinct morphological changes and clinical behaviour / Z. Elsayaf, H.-P. Sinn, J. Rom [et al.] // *The Breast*. – 2013. – № 5 (22). – P. 986–992.

110. Elston, C. W. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up / C. W. Elston, I. O. Ellis. *Histopathology* 1991; 19; 403-410 // *Histopathology*. – 2002. – № 3A (41). – P. 151–152, discussion 152-153.

111. Elston, C. W. Pathological prognostic factors in breast cancer / C. W. Elston, I. O. Ellis, S. E. Pinder // *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. – 1999. – № 3 (31). – P. 209–223.

112. Fatima, Z. Dysregulated claudin expression significantly effect breast cancer disease progression / Z. Fatima, S. K. Riaz, J. S. Khan [et al.] // *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. – 2022. – № 18 (6). – P. 1771–1775.

113. FDA-NIH Biomarker Working Group BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource / FDA-NIH Biomarker Working Group, Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US), 2016.

114. Feng, Y. Differentially expressed genes between primary cancer and paired lymph node metastases predict clinical outcome of node-positive breast cancer patients / Y. Feng, B. Sun, X. Li [et al.] // Breast Cancer Research and Treatment. – 2007. – № 3 (103). – P. 319–329.

115. Fernandez, A. I. Examination of Low ERBB2 Protein Expression in Breast Cancer Tissue / A. I. Fernandez, M. Liu, A. Bellizzi [et al.] // JAMA Oncology. – 2022. – № 8 (4). – P. 1-4.

116. Finn, R. S. Targeting the cyclin-dependent kinases (CDK) 4/6 in estrogen receptor-positive breast cancers / R. S. Finn, A. Aleshin, D. J. Slamon // Breast cancer research: BCR. – 2016. – № 1 (18). – P. 17.

117. Fisher, B. Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update / B. Fisher, M. Bauer, D. L. Wickerham [et al.] // Cancer. – 1983. – № 9 (52). – P. 1551–1557.

118. Fonatsch, C. Assignment of the human Ki-67 gene (MK167) to 10q25-qter / C. Fonatsch, M. Duchrow, H. Rieder // Genomics. – 1991. – № 2 (11). – P. 476–477.

119. Fougner, C. Re-definition of claudin-low as a breast cancer phenotype / C. Fougner, H. Bergholtz, J. H. Norum [et al.] // Nature Communications. – 2020. – № 11 (1). – P. 1787.

120. Foulkes, W. D. Triple-Negative Breast Cancer / W. D. Foulkes, I. E. Smith, J. S. Reis-Filho // New England Journal of Medicine. – 2010. – № 20 (363). – P. 1938–1948.

121. Fox, S. B. The epidermal growth factor receptor as a prognostic marker: results of 370 patients and review of 3009 patients / S. B. Fox, K. Smith, J. Hollyer [et al.] // Breast Cancer Research and Treatment. – 1994. – № 1 (29). – P. 41–49.

122. Francis, P. A. Optimal adjuvant therapy for very young breast cancer patients / P. A. Francis // *Breast* (Edinburgh, Scotland). – 2011. – № 4 (20). – P. 297–302.
123. Fribbens, C. Plasma ESR1 Mutations and the Treatment of Estrogen Receptor-Positive Advanced Breast Cancer / C. Fribbens, B. O'Leary, L. Kilburn [et al.] // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2016. – № 25 (34). – P. 2961–2968.
124. Galbraith, M. D. HIF1A employs CDK8-mediator to stimulate RNAPII elongation in response to hypoxia / M. D. Galbraith, M. A. Allen, C. L. Bensard [et al.] // *Cell*. – 2013. – № 6 (153). – P. 1327–1339.
125. Galbraith, M. D. CDK8: a positive regulator of transcription / M. D. Galbraith, A. J. Donner, J. M. Espinosa // *Transcription*. – 2010. – № 1 (1). – P. 4–12.
126. Galea, M. H. The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer / M. H. Galea, R. W. Blamey, C. E. Elston [et al.] // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 1992. – № 3 (22). – P. 207–219.
127. Gandini, S. Association of molecular subtypes with Ki-67 changes in untreated breast cancer patients undergoing pre-surgical trials / S. Gandini, A. Guerrieri-Gonzaga, G. Pruneri [et al.] // *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*. – 2014. – № 3 (25). – P. 618–623.
128. Gao, Z. H. Predictive and prognostic role of tumour-infiltrating lymphocytes in breast cancer patients with different molecular subtypes: a meta-analysis / Z. H. Gao, C. X. Li, M. Liu [et al.] // *BMC Cancer*. – 2020. – № 20(1). – P. 1150.
129. Garrido-Castro, A. C. Insights into Molecular Classifications of Triple-Negative Breast Cancer: Improving Patient Selection for Treatment / A. C. Garrido-Castro, N. U. Lin, K. Polyak // *Cancer Discovery*. – 2019. – № 9 (2). – P. 176–198.
130. Gasparini, P. Androgen receptor status is a prognostic marker in non-basal triple negative breast cancers and determines novel therapeutic options / P. Gasparini, M. Fassan, L. Cascione [et al.] // *PloS One*. – 2014. – № 2 (9). – P. e88525.

131. Geisler, S. Influence of TP53 gene alterations and c-erbB-2 expression on the response to treatment with doxorubicin in locally advanced breast cancer / S. Geisler, P. E. Lønning, T. Aas [et al.] // *Cancer Research*. – 2001. – № 6 (61). – P. 2505–2512.
132. Gerdes, J. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67 / J. Gerdes, H. Lemke, H. Baisch [et al.] // *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950). – 1984. – № 4 (133). – P. 1710–1715.
133. Gerratana, L. Androgen receptor in triple negative breast cancer: A potential target for the targetless subtype / L. Gerratana, D. Basile, G. Buono [et al.] // *Cancer Treatment Reviews*. – 2018. – № 68. – P. 102–110.
134. Gerring, Z. Phosphohistone H3 outperforms Ki-67 as a marker of outcome for breast cancer patients / Z. Gerring, J. F. Pearson, H. R. Morrin [et al.] // *Histopathology*. – 2015. – № 4 (67). – P. 538–547.
135. Giordano, S. B. Breast cancer: updates and advances in 2016 / S. B. Giordano, W. Gradishar // *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*. – 2017. – № 1 (29). – P. 12–17.
136. Goldhirsch, A. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009 / A. Goldhirsch, J. N. Ingle, R. D. Gelber [et al.] // *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*. – 2009. – № 8 (20). – P. 1319–1329.
137. Gonzalez-Conchas, G. A. Epidermal growth factor receptor overexpression and outcomes in early breast cancer: A systematic review and a meta-analysis / G. A. Gonzalez-Conchas, L. Rodriguez-Romo, D. Hernandez-Barajas [et al.] // *Cancer Treatment Reviews*. – 2018. – (62). – P. 1–8.
138. Green, A. R. Nottingham prognostic index plus (NPI+) predicts risk of distant metastases in primary breast cancer / A. R. Green, D. Soria, D. G Powe [et al.] // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2016. – № 1 (157). – P. 65–75.

139. Groh, V. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation / V. Groh, J. Wu, C. Yee [et al.] // *Nature*. – 2002. – № 6908 (419). – P. 734–738.

140. Group F.-N.B.W. Glossary / F.-N.B.W. Group, Food and Drug Administration (US), 2018.

141. Gucalp, A. Triple-Negative Breast Cancer: Role of the Androgen Receptor / A. Gucalp, T. A. Traina // *The Cancer Journal*. – 2010. – № 1 (16). – P. 62.

142. Guiu, S. Prognostic value of androgen receptor and FOXA1 co-expression in non-metastatic triple negative breast cancer and correlation with other biomarkers / S. Guiu, C. Mollevi, C. Charon-Barra [et al.] // *British Journal of Cancer*. – 2018. – № 1 (119). – P. 76–79.

143. Guler, G. Aberrant expression of DNA damage response proteins is associated with breast cancer subtype and clinical features / G. Guler, C. Himmetoglu, R. E. Jimenez // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2011. – № 2 (129). – P. 421–432.

144. Gurda, G. T. Characterizing molecular variants and clinical utilization of next-generation sequencing in advanced breast cancer / G. T. Gurda, T. Ambros, M. N. Nikiforova [et al.] // *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*. – 2017. – № 25. – P. 392–398.

145. Györfy, B. Multigene prognostic tests in breast cancer: past, present, future / B. Györfy, C. Hatzis, T. Sanft // *Breast cancer research: BCR*. – 2015. – № 1 (17). – P. 11.

146. Hamilton, E. Targeting HER2 heterogeneity in breast cancer / E. Hamilton, M. Shastry, S. M. Shiller [et al.] // *Cancer Treatment Reviews*. – 2021. – № 100. – P. 102286.

147. Hammond, M. E. H. American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer / M. E. H. Hammond, D. F. Hayes, A. C. Wolff [et al.] // *Journal of Oncology Practice*. – 2010. – № 4 (6). – P. 195–197.

148. Hao, Q. Pooling analysis on prognostic value of PHH3 expression in cancer patients / Q. Hao, C. Dai, Y. Deng [et al.] // *Cancer Management and Research*. – 2018. – (10). – P. 2279–2288.

149. Harper-Wynne, C. Effects of the aromatase inhibitor letrozole on normal breast epithelial cell proliferation and metabolic indices in postmenopausal women: a pilot study for breast cancer prevention / C. Harper-Wynne, G. Ross, N. Sacks [et al.] // *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. – 2002. – № 7 (11). – P. 614–621.

150. Harris, L. N. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline / L. N. Harris, N. Ismaila, L. M. McShane [et al.] // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2016. – № 10 (34). – P. 1134–1150.

151. Harvey, J. M. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer / J. M. Harvey, G. M. Clark, C. K. Osborne [et al.] // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 1999. – № 5 (17). – P. 1474–1481.

152. Heidebrecht, H. J. Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yield new data on the «Ki-67» proteins / J. M. Harvey, G. M. Clark, C. K. Osborne [et al.] // *Cell Proliferation*. – 1996. – № 7 (29). – P. 413–425.

153. Henson, D. E. Relationship among outcome, stage of disease, and histologic grade for 22,616 cases of breast cancer. The basis for a prognostic index / D. E. Henson, L. Ries, L. S. Freedman [et al.] // *Cancer*. – 1991. – № 10 (68). – P. 2142–2149.

154. Hickey, T. E. Minireview: The androgen receptor in breast tissues: growth inhibitor, tumor suppressor, oncogene? / T. E. Hickey, J. L. L. Robinson, J. S. Carroll [et al.] // *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*. – 2012. – № 8 (26). – P. 1252–1267.

155. Higgins, M. J. The androgen receptor in breast cancer: learning from the past / M. J. Higgins, A. C. Wolff // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2010. – № 3 (124). – P. 619–621.
156. Hisamatsu, Y. Impact of FOXA1 expression on the prognosis of patients with hormone receptor-positive breast cancer / Y. Hisamatsu, E. Tokunaga, N. Yamashita [et al.] // *Annals of Surgical Oncology*. – 2012. – № 4 (19). – P. 1145–1152.
157. Hollis, P. R.. CYP1B1 Augments the Mesenchymal, Claudin-Low, and Chemoresistant Phenotypes of Triple-Negative Breast Cancer Cells // P. R. Hollis, R. J. Mobley, J. Bhujji [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – № 23 (17). – P. 9670.
158. Holst, F. On the evidence for ESR1 amplification in breast cancer / F. Holst, C. B. Moelans, M. Filipits [et al.] // *Nature Reviews. Cancer*. – 2012. – № 2 (12). – P. 149.
159. Horisawa, N. The frequency of low HER2 expression in breast cancer and a comparison of prognosis between patients with HER2-low and HER2-negative breast cancer by HR status / N. Horisawa, Y. Adachi, D. Takatsuka // *Breast Cancer*. – 2022. – № 29 (2). – P. 234–241.
160. Howard, F. M. Epidemiology of Triple-Negative Breast Cancer: A Review / F. M. Howard, O. I. Olopade // *Cancer Journal*. – 2021. – № 27 (1). – P. 8–16.
161. Howland, N. K. Lymph node involvement in immunohistochemistry-based molecular classifications of breast cancer / N. K. Howland, T. D. Driver, M. P. Sedrak // *The Journal of Surgical Research*. – 2013. – № 2 (185). – P. 697–703.
162. Hudis, C. A. Triple-Negative Breast Cancer: An Unmet Medical Need / C. A. Hudis, L. Gianni // *The Oncologist*. – 2011. – № Supplement 1 (16). – P. 1–11.
163. Hurtado, A. FOXA1 is a key determinant of estrogen receptor function and endocrine response / A. Hurtado, K. A. Holmes, C. S. Ross-Innes [et al.] // *Nature Genetics*. – 2011. – № 1 (43). – P. 27–33.

164. Hurvitz, S. A. Talazoparib in Patients with a Germline BRCA-Mutated Advanced Breast Cancer: Detailed Safety Analyses from the Phase III EMBRACA Trial / S. A. Hurvitz, A. Gonçalves, H. S. Rugo // *Oncologist*. – 2020. – № 25 (3). – P. 439–450.

165. Hyeon, J. NanoString nCounter® Approach in Breast Cancer: A Comparative Analysis with Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction, In Situ Hybridization, and Immunohistochemistry / J. Hyeon, S. Y. Cho, M. E. Hong [et al.] // *J Breast Cancer*. – 2017. – № 3 (20). – P. 286-296.

166. Iancu, G. Tyrosine kinase inhibitors in breast cancer (Review) / G. Iancu, D. Serban, C. D. Badiu [et al.] // *Exp Ther Med*. – 2022. – №23(2). – P. 114.

167. Ijichi, N. Association of double-positive FOXA1 and FOXP1 immunoreactivities with favorable prognosis of tamoxifen-treated breast cancer patients / N. Ijichi, T. Shigekawa, K. Ikeda // *Hormones & Cancer*. – 2012. – № 4 (3). – P. 147–159.

168. Ionescu Popescu, C. E-cadherin expression in molecular types of breast carcinoma / C. I. Popescu, S. E. Giușcă, L. Liliac [et al.] // *Romanian Journal of Morphology and Embryology = Revue Roumaine De Morphologie Et Embryologie*. – 2013. – № 2 (54). – P. 267–273.

169. Isola, J. Immunoelectron-microscopic localization of a proliferation-associated antigen Ki-67 in MCF-7 cells / J. Isola, H. Helin, O. P. Kallioniemi // *The Histochemical Journal*. – 1990. – № 9 (22). – P. 498–506.

170. Janakiram, M. Expression, Clinical Significance, and Receptor Identification of the Newest B7 Family Member HHLA2 Protein / M. Janakiram, J. M. Chinai, S. Fineberg [et al.] // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2015. – № 10 (21). – P. 2359–2366.

171. Jenkins, E. O. Age-specific changes in intrinsic breast cancer subtypes: a focus on older women / E. O. Jenkins, A. M. Deal, C. K. Anders [et al.] // *The Oncologist*. – 2014. – № 10 (19). – P. 1076–1083.

172. Jeselsohn, R. Emergence of constitutively active estrogen receptor- α mutations in pretreated advanced estrogen receptor-positive breast cancer /

R. Jeselsohn, R. Yelensky, G. Buchwalter [et al.] // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2014. – № 7 (20). – P. 1757–1767.

173. Jeselsohn, R. ESR1 mutations—a mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer / R. Jeselsohn, G. Buchwalter, C. De Angelis [et al.] // *Nature Reviews. Clinical Oncology*. – 2015. – № 10 (12). – P. 573–583.

174. Jiang, X. The immune system and inflammation in breast cancer / X. Jiang, D. J. Shapiro // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2014. – № 1 (382). – P. 673–682.

175. Kalkman, S. Brief fixation does not affect assessment of hormone receptor expression in invasive breast carcinoma biopsies: paving the road for same-day tissue diagnostics / S. Kalkman, M. W. Barentsz, A. J. Witkamp [et al.] // *The American Journal of Surgical Pathology*. – 2014. – № 8 (38). – P. 1071–1078.

176. Kalli, S. American Joint Committee on Cancer's Staging System for Breast Cancer, Eighth Edition: What the Radiologist Needs to Know / S. Kalli, A. Semine, S. Cohen [et al.] // *Radiographics: A Review Publication of the Radiological Society of North America, Inc.* – 2018. – № 7 (38). – P. 1921–1933.

177. Kandioler-Eckersberger, D. TP53 mutation and p53 overexpression for prediction of response to neoadjuvant treatment in breast cancer patients / D. Kandioler-Eckersberger, C. Ludwig, M. Rudas [et al.] // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2000. – № 1 (6). – P. 50–56.

178. Katoh, M. Precision medicine for human cancers with Notch signaling dysregulation (Review) / M. Katoh, M. Katoh // *International Journal of Molecular Medicine*. – 2020. – № 45 (2). – P. 279–297.

179. Kaufmann, M. Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: new perspectives 2006 / M. Kaufmann, G. von Minckwitz, H. D. Bear [et al.] // *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*. – 2007. – № 12 (18). – P. 1927–1934.

180. Kawase, M. FOXA1 expression after neoadjuvant chemotherapy is a prognostic marker in estrogen receptor-positive breast cancer / M. Kawase, T. Toyama, S. Takahashi // *Breast Cancer (Tokyo, Japan)*. – 2015. – № 3 (22). – P. 308–316.

181. Kayahan, M. Clinical Significance of Androgen Receptor, CK-5/6, KI-67 and Molecular Subtypes in Breast Cancer / M. Kayahan, U. Oğuz İdiz, Z. Gucin [et al.] // *The Journal of Breast Health*. – 2014. – № 4 (10). – P. 201–208.

182. Keenan, T. E. Role of Immunotherapy in Triple-Negative Breast Cancer / T. E. Keenan, S. M. Tolaney // *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. – 2020. – № 18 (4). – P. 479–489.

183. Kim, C. Chemoresistance Evolution in Triple-Negative Breast Cancer Delineated by Single-Cell Sequencing / C. Kim, R. Gao, E. Sei [et al.] // *Cell*. – 2018. – № 173 (4). – P. 879–893. – P. e13.

184. Kim, C. Gene-expression-based prognostic assays for breast cancer / C. Kim, S. Paik // *Nature Reviews. Clinical Oncology*. – 2010. – № 6 (7). – P. 340–347.

185. Kim, J.-Y. The value of phosphohistone H3 as a proliferation marker for evaluating invasive breast cancers: A comparative study with Ki-67 / J.-Y. Kim, H. S. Jeong, T. Chung // *Oncotarget*. – 2017. – № 39 (8). – P. 65064–65076.

186. Kim, T. M. Cross-species oncogenic signatures of breast cancer in canine mammary tumors / T. M. Kim, I. S. Yang, B. J. Seung [et al.] // *Nature Communications*. – 2020. – № 11 (1). – P. 3616.

187. Klintman, M. The prognostic value of Ki-67 is dependent on estrogen receptor status and histological grade in premenopausal patients with node-negative breast cancer / M. Klintman, P.-O. Bendahl, D. Grabau [et al.] // *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* – 2010. – № 2 (23). – P. 251–259.

188. Kreike, B. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas / B. Kreike, M. van Kouwenhove, H. Horlings // *Breast cancer research: BCR*. – 2007. – № 5 (9). – P. R65.

189. Kumar, N. Immunoexpression of claudin-4 and correlation with estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2-neu in breast cancer / N. Kumar, M. Tandon, C. M. Chintamani [et al.] // *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. – 2022. – № 18 (6). – P. 1766–1770.
190. Kumar, P. An overview of triple-negative breast cancer / P. Kumar, R. Aggarwal // *Archives of Gynecology and Obstetrics*. – 2016. – № 293 (2). – P. 247–269.
191. Kurebayashi, J. The prevalence of intrinsic subtypes and prognosis in breast cancer patients of different races / J. Kurebayashi, T. Moriya, T. Ishida [et al.] // *Breast (Edinburgh, Scotland)*. – 2007. – (16 Suppl 2). – P. S72-77.
192. Kwapisz, D. Pembrolizumab and atezolizumab in triple-negative breast cancer / D. Kwapisz // *Cancer Immunology and Immunotherapy*. – 2021. – № 70 (3). – P. 607–617.
193. Lakhani, S. R. Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancers involving BRCA1 and BRCA2 mutations / S. R. Lakhani, J. Jacquemier, J. P. Sloane // *Journal of the National Cancer Institute*. – 1998. – № 15 (90). – P. 1138–1145.
194. Lambertini, M. The prognostic performance of Adjuvant! Online and Nottingham Prognostic Index in young breast cancer patients / M. Lambertini, A. C. Pinto, L. Ameye [et al.] // *British Journal of Cancer*. – 2016. – № 12 (115). – P. 1471–1478.
195. Lange, C. A. Killing the second messenger: targeting loss of cell cycle control in endocrine-resistant breast cancer / C. A. Lange, D. Yee // *Endocrine-Related Cancer*. – 2011. – № 4 (18). – P. C19-24.
196. Lee, J. Trastuzumab deruxtecan for HER2+ advanced breast cancer / J. Lee, Y. H. Park // *Future Oncology*. – 2022. – № 18 (1). – P. 7–19.
197. Lee, J. L. MALT1 Is a Targetable Driver of Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Claudin-Low, Triple-Negative Breast Cancer // J. L. Lee, P. Ekambaram, N. M. Carleton [et al.] // *Molecular Cancer Research*. – 2022. – № 20 (3). – P. 373–386.

198. Lee, L. H. Current breast cancer proliferative markers correlate variably based on decoupled duration of cell cycle phases / L. H. Lee, H. Yang, G. Bigras // *Scientific Reports*. – 2014. – (4). – P. 5122.

199. Lee, S. K. Distinguishing Low-Risk Luminal A Breast Cancer Subtypes with Ki-67 and p53 Is More Predictive of Long-Term Survival / S. K. Lee, S. Y. Bae, J. H. Lee [et al.] // *PloS One*. – 2015. – № 8 (10). – P. e0124658.

200. Li, C. I. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer / C. I. Li., D. J. Uribe, J. R. Daling // *British Journal of Cancer*. – 2005. – № 9 (93). – P. 1046–1052.

201. Li, X. Triple-negative breast cancer has worse overall survival and cause-specific survival than non-triple-negative breast cancer / X. Li, J. Yang, L. Peng [et al.] // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2017. – № 161 (2). – P. 279–287.

202. Li, Y. Recent advances in therapeutic strategies for triple-negative breast cancer / Y. Li, H. Zhang, Y. Merkher Y [et al.] // *Journal of Hematology and Oncology*. – 2022. – № 15 (1). – P. 121.

203. Li, Y. Targeted immunotherapy for HER2-low breast cancer with 17p loss / Y. Li, Y. Sun, M. Kulke [et al.] // *Science Translation Medicine*. – 2021. – № 13 (580). – P. eabc6894.

204. Liang, X. Targeted next- generation sequencing identifies clinically relevant somatic mutations in a large cohort of inflammatory breast cancer / X. Liang, S. Vacher, A. Boulai [et al.] // *Breast Cancer Research*. – 2018. – № 20. – P. 88.

205. Liedtke, C. The prognostic impact of age in patients with triple-negative breast cancer / C. Liedtke, K. R. Hess, T. Karn [et al.] // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2013. – № 2 (138). – P. 591–599.

206. Liedtke, C. The prognostic impact of age in different molecular subtypes of breast cancer / C. Liedtke, A. Rody, O. Gluz [et al.] // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2015. – № 3 (152). – P. 667–673.

207. Liefers, G. J. Breast cancer index (BCI) predicts benefit of two- and- a- half versus five years of extended endocrine therapy in HR+breast

cancer patients treated in the ideal trial / G. J. Liefers, I. Noordhoek, K. Treuner [et al.]. – Journal of Clinical Oncology. – 2020. – № 38. – P. 512.

208. Lin, C. Efficacy of platinum-based and non-platinum-based drugs on triple-negative breast cancer: meta-analysis / C. Lin, J. Cui, Z. Peng, et al. // European Journal of Medical Research. – 2022. – № 27(1) – P. 201.

209. Litton, J. K. Talazoparib versus chemotherapy in patients with germline BRCA1/2-mutated HER2-negative advanced breast cancer: final overall survival results from the EMBRACA trial / J. K. Litton, S. A. Hurvitz, L. A. Mina // Annals of Oncology. – 2020, – №31 (11). – P. 1526–1535.

210. Liu, N. [Diagnostic and prognostic significance of FOXA1 expression in molecular subtypes of breast invasive ductal carcinomas] / N. Liu, Y. Niu, S.-l. Wang [et al.] // Zhonghua Yi Xue Za Zhi. – 2010. – № 20 (90). – P. 1403–1407.

211. Livasy, C.A. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma / C. A. Livasy, G. Karaca, R. Nanda [et al.] // Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. – 2006. – № 2 (19). – P. 264–271.

212. Loi, S. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98 / S. Loi, N. Sirtaine, F. Piette // Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology. – 2013. – № 7 (31). – P. 860–867.

213. Loi, S. Abstract S1-05: Tumor infiltrating lymphocytes (TILs) indicate trastuzumab benefit in early-stage HER2-positive breast cancer (HER2+ BC) / S. Loi // Cancer Research. – 2013. – № 24 Supplement (73). – P. S1-05-S1-05.

214. Loi, S. Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial / S. Loi, S. Michiels, R. Salgado [et al.] // Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology. – 2014. – № 8 (25). – P. 1544–1550.

215. Loi, S. The journey of tumor-infiltrating lymphocytes as a biomarker in breast cancer: clinical utility in an era of checkpoint inhibition / S. Loi, S. Michiels, S. Loibl [et al.] // *Annals of Oncology*. – 2021. – № 32 (10). – P. 1236–1244.

216. Loibl, S. Outcome after neoadjuvant chemotherapy in young breast cancer patients: a pooled analysis of individual patient data from eight prospectively randomized controlled trials / S. Loibl, C. Jackisch, B. Lederer [et al.] // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2015. – № 2 (152). – P. 377–387.

217. Luo, Y. Targeting claudin-4 enhances chemosensitivity in breast cancer / Y. Luo, S. Kishi, T. Sasaki [et al.] // *Cancer Science*. – 2020. – № 111 (5). – P. 1840–1850.

218. Lyons, T. G. Targeted Therapies for Triple-Negative Breast Cancer / T. G. Lyons // *Current Treatment Options in Oncology*. – 2019. – № 20 (11). – P. 82.

219. MacDonald, I., Nixon, N. A., Khan, O. F. Triple-Negative Breast Cancer: A Review of Current Curative Intent Therapies / I. MacDonald, N. A. Nixon, O. F. Khan // *Current Oncology*. – 2022. – № 29 (7). – P. 4768–4778.

220. Maeda, T. Immunohistochemical co-expression status of cytokeratin 5/6, androgen receptor, and p53 as prognostic factors of adjuvant chemotherapy for triple negative breast cancer / T. Maeda, Y. Nakanishi, Y. Hirotsu // *Medical Molecular Morphology*. – 2016. – № 1 (49). – P. 11–21.

221. Malkin, D. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms / D. Malkin, F. P. Li, L. C. Strong // *Science (New York, N.Y.)*. – 1990. – № 4985 (250). – P. 1233–1238.

222. Mamounas, E. P. Clinical relevance of the 21- gene Recurrence Score® assay in treatment decisions for patients with node- positive breast cancer in the genomic era / E. P. Mamounas, C. A. Russell, A. Lau [et al.] // *NPJ Breast Cancer*. – 2018. – № 4. – P. 27.

223. Mao, Y. The value of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) for predicting response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: a systematic review and meta-analysis / Y. Mao, Q. Qu, Y. Zhang [et al.] // *PloS One*. – 2014. – № 12 (9). – P. e115103.

224. Marchiò, C. Evolving concepts in HER2 evaluation in breast cancer: Heterogeneity, HER2-low carcinomas and beyond / C. Marchiò, L. Annaratone, A. Marques [et al.] // *Seminars in cancer biology*. – 2021. – № 72. – P. 123–135.

225. Markopoulos, C. Omitting chemotherapy in more patients with early breast cancer in the post- TAILORx era / C. Markopoulos, Z. A. Sariyanni, D. C. Ziogas [et al.] // *N J Clin Oncol*. – 2020. – № 38. – e12534.

226. Martinez-Sáez, O. Frequency and spectrum of PIK3CA somatic mutations in breast cancer / O. Martinez-Sáez, N. Chic, T. Pascual [et al.] // *Breast Cancer Research*. – 2020. – №. 22 (1). – P. 45.

227. Masuda, H. Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer / H. Masuda, D. Zhang, C. Bartholomeusz [et a.] // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2012. – № 2 (136). – P. 331–345.

228. Mattern, J. ADAM15 mediates upregulation of Claudin-1 expression in breast cancer cells / J. Mattern, C. S. Roghi, M. Hurtz [et al.] // *Scientific Reports*. – 2019. – № 9 (1). – P. 12540.

229. Mazars, R. p53 mutations occur in aggressive breast cancer / R. Mazars, L. Spinardi, M. BenCheikh [et al.] // *Cancer Research*. – 1992. – № 14 (52). – P. 3918–3923.

230. McGhan, L. J. Androgen Receptor-Positive Triple Negative Breast Cancer: A Unique Breast Cancer Subtype / L. J. McGhan, A. E. McCullough, C. A. Protheroe [et al.] // *Annals of Surgical Oncology*. – 2014. – № 2 (21). – P. 361–367.

231. McNamara, K. M. Androgenic pathway in triple negative invasive ductal tumors: Its correlation with tumor cell proliferation / K. M. McNamara, T. Yoda, Y. Miki [et al.] // *Cancer Science*. – 2013. – № 5 (104). – P. 639–646.

232. McNamara, K. M. Androgen receptor in triple negative breast cancer / K. M. McNamara, T. Yoda, K. Takagi // *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. – 2013. (133). – P. 66–76.

233. Medina, M. A. Triple-Negative Breast Cancer: A Review of Conventional and Advanced Therapeutic Strategies / M. A. Medina, G. Oza, A. Sharma //

International Journal of Environmental Research and Public Health. – 2020. – № 17 (6). – P. 2078.

234. Mehta, R. J. FOXA1 is an independent prognostic marker for ER-positive breast cancer / R. J. Mehta, R. K. Jain, S. Leung [et al.] // Breast Cancer Research and Treatment. – 2012. – № 3 (131). – P. 881–890.

235. Mishra, P. J. Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells / P. J. Mishra, P. J. Mishra, R. Humeniuk [et al.] // Cancer Research. – 2008. – № 11 (68). – P. 4331–4339.

236. Modi, S. Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Low Advanced Breast Cancer / S. Modi, W. Jacot, T. Yamashita [et al.] // New England Journal of Medicine. – 2022. – № 1. – P. 9–20.

237. Moe, R. E. Androgens and androgen receptors: A clinically neglected sector in breast cancer biology / R. E. Moe, B. O. Anderson // Journal of Surgical Oncology. – 2007. – № 6 (95). – P. 437–439.

238. Moll, U. M. Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion / U. M. Moll, G. Riou, A. J. Levine // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1992. – № 15 (89). – P. 7262–7266.

239. Moore, H. M. Biospecimen reporting for improved study quality (BRISQ) / H. M. Moore, A. B. Kelly, S. D. Jewell // Cancer Cytopathology. – 2011. – № 2 (119). – P. 92–101.

240. Morigi, C. Highlights from the 15th St Gallen International Breast Cancer Conference 15-18 March, 2017, Vienna: tailored treatments for patients with early breast cancer / C. Morigi // Ecancermedicalscience. – 2017. – (11). – P. 732.

241. Motamedolshariati, M. Accuracy of prognostic and predictive markers in core needle breast biopsies compared with excisional specimens / M. Motamedolshariati, B. Memar, M. Aliakbaian [et al.] // Breast Care (Basel, Switzerland). – 2014. – № 2 (9). – P. 107–110.

242. Müller, B. M. The EndoPredict gene- expression assay in clinical practice – Performance and impact on clinical decisions / B. M. Müller, E. Keil, A. Lehmann [et al.]. – PLoS One. – 2013. – № 8. – e68252.

243. Naimi, A. High claudin-4 antigen expression in triple-negative breast cancer by the immunohistochemistry method / A. Naimi, N. Zare, E. Amjadi [et al.] // Journal of Research in Medical Science. – 2022. – № 27. – P. 20.

244. Najjar, S. Updates on breast biomarkers / S. Najjar, K. H. Allison // Virchows Arch. – 2022. – № 480 (1). – P. 163–176.

245. Nakshatri, H. FOXA1 as a therapeutic target for breast cancer / H. Nakshatri, S. Badve // Expert Opinion on Therapeutic Targets. – 2007. – № 4 (11). – P. 507–514.

246. National Comprehensive Cancer Network. NCCN practice guidelines for breast cancer (version 4.2022).

247. Nedeljković, M. Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer-How We Can Rise to the Challenge / M. Nedeljković, A. Damjanović // Cells. – 2019. – № 8 (9). – P. 957.

248. Ni, M. Targeting Androgen Receptor in Estrogen Receptor-Negative Breast Cancer / M. Ni, Y. Chen, E. Lim [et al.] // Cancer Cell. – 2011. – № 1 (20). – P. 119–131.

249. Nielsen, T. O. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma / T. O. Nielsen, F. D. Hsu, K. Jensen [et al.] // Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research. – 2004. – № 16 (10). – P. 5367–5374.

250. Nitz, U. Reducing chemotherapy use in clinically high-risk, genomically low-risk pN0 and pN1 early breast cancer patients: five-year data from the prospective, randomised phase 3 West German Study Group (WSG) PlanB trial / U. Nitz, O. Gluz, M. Christgen [et al.] // Breast Cancer Research and Treatment. – 2017. – № 3 (165). – P. 573–583.

251. O'Connor, C. J. Cancer stem cells in triple-negative breast cancer: a potential target and prognostic marker / C. J. O'Connor, T. Chen, I. González [et al.] // *Biomarkers in Medicine*. – 2018. – № 12 (7). – P. 813–820.

252. Ochoa, S. Multi-omic regulation of the PAM50 gene signature in breast cancer molecular subtypes / S. Ochoa, G. de Anda- Jáuregui, E. Hernández- Lemus // *E. Frontiers in Oncology*. – 2020. – № 10. – P. 845.

253. Oda, N. Intratumoral regulatory T cells as an independent predictive factor for pathological complete response to neoadjuvant paclitaxel followed by 5-FU/epirubicin/cyclophosphamide in breast cancer patients / N. Oda, K. Shimazu, Y. Naoi [et al.] // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2012. – № 1 (136). – P. 107–116.

254. Paik, S. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer / S. Paik, S. Shak, G. Tang // *The New England Journal of Medicine*. – 2004. – № 27 (351). – P. 2817–2826.

255. Park, C. Prognostic values of negative estrogen or progesterone receptor expression in patients with luminal B HER2-negative breast cancer / C. Park, K. Park, J. Kim [et al.] // *World Journal of Surgical Oncology*. – 2016. – № 1 (14). – P. 244.

256. Park, J. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with early-stage triple-negative breast cancers (TNBC) who did not receive adjuvant chemotherapy / J. H. Park, S. F. Jonas, G. Bataillon [et al.] // *Annals of Oncology*. – 2019. – № 30 (12). – P. 1941–1949.

257. Park, S. Expression of androgen receptors in primary breast cancer / S. Park, J. Koo, H. S. Park [et al.] // *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*. – 2010. – № 3 (21). – P. 488–492.

258. Park, S. Androgen receptor expression is significantly associated with better outcomes in estrogen receptor-positive breast cancers / S. Park, J. S. Koo, M. S. Kim [et al.] // *Annals of Oncology*. – 2011. – № 8 (22). – P. 1755–1762.

259. Pegram, M. D. Treating the HER2 pathway in early and advanced breast cancer / M. D. Pegram // *Hematology/Oncology Clinics of North America*. – 2013. – № 4 (27). – P. 751–765, viii.

260. Penault-Llorca, F. Changes and predictive and prognostic value of the mitotic index, Ki-67, cyclin D1, and cyclo-oxygenase-2 in 710 operable breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy / F. Penault-Llorca, C. Abrial, I. Raoelfils [et al.] // *The Oncologist*. – 2008. – № 12 (13). – P. 1235–1245.

261. Peng, L. Association Between BRCA Status and P53 Status in Breast Cancer: A Meta-Analysis / L. Peng, T. Xu, T. Long [et al.] // *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. – 2016. – (22). – P. 1939–1945.

262. Pereira, H. Pathological prognostic factors in breast cancer. IV: Should you be a typer or a grader? A comparative study of two histological prognostic features in operable breast carcinoma / H. Pereira, S. E. Pinder, D. M. Sibbering [et al.] // *Histopathology*. – 1995. – № 3 (27). – P. 219–226.

263. Perez, E. A. Abstract S1-06: Stromal tumor-infiltrating lymphocytes (S-TILs): In the alliance N9831 trial S-TILs are associated with chemotherapy benefit but not associated with trastuzumab benefit / E. A. Perez // *Cancer Research*. – 2015. – № 9 Supplement (75). – P. S1-06-S1-06.

264. Perez-Fidalgo, J. A. A phase III trial of alpelisib + trastuzumab ± fulvestrant versus trastuzumab + chemotherapy in HER2+ PIK3CA-mutated breast cancer / J. A. Perez-Fidalgo, C. Criscitiello, E. Carrasco [et al.] // *Future Oncology*. – 2022. – № 18 (19). – P. 2339–2349.

265. Perou, C. M. Molecular portraits of human breast tumours / C. M. Perou, T. Sørlie, M. B. Eisen [et al.] // *Nature*. – 2000. – № 6797 (406). – P. 747–752.

266. Peters, K. M. Androgen receptor expression predicts breast cancer survival: the role of genetic and epigenetic events / K. M. Peters, S. L. Edwards, S. S. Nair [et al.] // *BMC Cancer*. – 2012. – № 1 (12). – P. 132.

267. Petkov, V. I. Erratum: Author Correction: Breast-cancer-specific mortality in patients treated based on the 21-gene assay: a SEER population-based study / V. I. Petkov, D. P. Miller, N. Howlader [et al.] // *NPJ breast cancer*. – 2018. – (4). – P. 17.

268. Peurala, E. The prognostic significance and value of cyclin D1, CDK4 and p16 in human breast cancer / E. Peurala, P. Koivunen, Kirsi-Maria Haapasaari [et al.] // *Breast cancer research: BCR*. – 2013. – № 1 (15). – P. R5.

269. Pharoah, P. D. Somatic mutations in the p53 gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis / P. D. Pharoah, N. E. Day, C. Caldas // *British Journal of Cancer*. – 1999. – № 12 (80). – P. 1968–1973.

270. Phillips, K. A. Frequency of p53 mutations in breast carcinomas from Ashkenazi Jewish carriers of BRCA1 mutations / K. A. Phillips, K. Nichol, H Ozcelik [et al.] // *Journal of the National Cancer Institute*. – 1999. – № 5 (91). – P. 469–473.

271. Pickup, M. W. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer / M. W. Pickup, J. K. Mouw, V. M. Weaver // *EMBO reports*. – 2014. – № 12 (15). – P. 1243–1253.

272. Pinto, A. E. Prognostic comparative study of S-phase fraction and Ki-67 index in breast carcinoma / A. E. Pinto, S. André, T. Pereira [et al.] // *Journal of Clinical Pathology*. – 2001. – № 7 (54). – P. 543–549.

273. Popova, O. P., Kuznetsova, A. V., Bogomazova, S. Y. Sushchestvuet li «nizkoklaudinovyi» fenotip raka molochnoi zhelezy? [Is there a claudin-low phenotype of breast cancer?] / O. P. Popova, A. V. Kuznetsova, S. Y. Bogomazova [et al.] // *Arkhiv Patologii*. – 2022. – № 84 (1). – P. 45–49. Russian.

274. Porter, D. C. Cyclin-dependent kinase 8 mediates chemotherapy-induced tumor-promoting paracrine activities / D. C. Porter, E. Farmaki, S. Altilia [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2012. – № 34 (109). – P. 13799–13804.

275. Prat, A. Practical implications of gene-expression-based assays for breast oncologists / A. Prat, M. J. Ellis, C. M. Perou // *Nature Reviews. Clinical Oncology*. – 2011. – № 1 (9). – P. 48–57.

276. Prowell, T. M. Pathological complete response and accelerated drug approval in early breast cancer / T. M. Prowell, R. Pazdur // *The New England Journal of Medicine*. – 2012. – № 26 (366). – P. 2438–2441.

277. Pu, M. Research- based PAM50 signature and long- term breast cancer survival / M. Pu, K. Messer, S. R. Davies [et al.] // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2020. – № 179. – P.197–206.

278. Quezada, S. A. Shifting the equilibrium in cancer immunoediting: from tumor tolerance to eradication / S. A. Quezada, K. S. Peggs, T. R. Simpson // *Immunological Reviews*. – 2011. – № 1 (241). – P. 104–118.

279. Rakha, E. A. Prognostic markers in triple-negative breast cancer / E. A. Rakha, M. E. El-Sayed, A. R. Green // *Cancer*. – 2007. – № 1 (109). – P. 25–32.

280. Rakha, E. A. Biologic and clinical characteristics of breast cancer with single hormone receptor positive phenotype / E. A. Rakha, M. E. El-Sayed, A. R. Green // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2007. – № 30 (25). – P. 4772–4778.

281. Rakha, E. A. Expression profiling technology: its contribution to our understanding of breast cancer / E. A. Rakha, M. E. El-Sayed, J. S. Reis-Filho [et al.] // *Histopathology*. – 2008. – № 1 (52). – P. 67–81.

282. Rakha, E. A. Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma / E. A. Rakha, M. E. El-Sayed, A. H. S. Lee // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2008. – № 19 (26). – P. 3153–3158.

283. Rakha, E. A. Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes / E. A. Rakha, S. E. Elsheikh, M. A. Aleskandarany [et al.] // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2009. – № 7 (15). – P. 2302–2310.

284. Rakha, E. A. Updated UK Recommendations for HER2 assessment in breast cancer / E. A. Rakha, S. E. Pinder, J. M. S. Bartlett [et al.] // *Journal of Clinical Pathology*. – 2015. – № 2 (68). – P. 93–99.

285. Rakha, E. A. Combinatorial biomarker expression in breast cancer / E. A. Rakha, J. S. Reis-Filho, I. O. Ellis // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2010. – № 2 (120). – P. 293–308.

286. Rakha, E. A. UK recommendations for HER2 assessment in breast cancer: an update / E. A. Rakha, P. H. Tan, C. Quinn [et al.] // *Journal of Clinical Pathology*. – 2023. – № 76 (4). – P. 217–227.

287. Raman, V. Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours / V. Raman, S. A. Martensen, D. Reisman [et al.] // *Nature*. – 2000. – № 6789 (405). – P. 974–978.

288. Ravdin, P. M. Prognostic significance of progesterone receptor levels in estrogen receptor-positive patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen: results of a prospective Southwest Oncology Group study / P. M. Ravdin, S. Green, T. M. Dorr [et al.] // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 1992. – № 8 (10). – P. 1284–1291.

289. Recht, A. Locoregional failure 10 years after mastectomy and adjuvant chemotherapy with or without tamoxifen without irradiation: experience of the Eastern Cooperative Oncology Group / A. Recht, R. Gray, N. E. Davidson // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 1999. – № 6 (17). – P. 1689–1700.

290. Regan, M. M. Re-evaluating adjuvant breast cancer trials: assessing hormone receptor status by immunohistochemical versus extraction assays / M. M. Regan, G. Viale, M. G. Mastropasqua // *Journal of the National Cancer Institute*. – 2006. – № 21 (98). – P. 1571–1581.

291. Ribnikar, D. Tailoring Chemotherapy in Early-Stage Breast Cancer: Based on Tumor Biology or Tumor Burden? / D. Ribnikar, F. Cardoso // *American Society of Clinical Oncology Educational Book*. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting. – 2016. – (35). – P. e31-38.

292. Robson, M. E. OlympiAD final overall survival and tolerability results: Olaparib versus chemotherapy treatment of physician's choice in patients with a germline BRCA mutation and HER2-negative metastatic breast cancer / M. E. Robson, N. Tung, P. Conte // *Annals of Oncology*. – 2019. – № 30 (4). – P. 558–566.

293. Rosen, P. R. A long-term follow-up study of survival in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma / P. R. Rosen, S. Groshen, P. E. Saigo [et al.]

// Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology. – 1989. – № 3 (7). – P. 355–366.

294. Rosenberg, S. M. Management of breast cancer in very young women / S. M. Rosenberg, A. H. Partridge // Breast (Edinburgh, Scotland). – 2015. – (24 Suppl 2). – P. S154-158.

295. Rudas, M. Cyclin D1 Expression in Breast Cancer Patients Receiving Adjuvant Tamoxifen-Based Therapy / M. Rudas, M. Lehnert, A. Huynh [et al.] // Clinical Cancer Research. – 2008. – № 6 (14). – P. 1767–1774.

296. Ruiz, C. Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer / C. Ruiz, S. Seibt, K. A. Kuraya [et al.] // International Journal of Cancer. – 2006. – № 9 (118). – P. 2190–2194.

297. Salgado, R. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014 / R. Salgado, C. Denkert, S. Demaria / Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology. – 2015. – № 2 (26). – P. 259–271.

298. Salgado, R. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Associations With Pathological Complete Response and Event-Free Survival in HER2-Positive Early-Stage Breast Cancer Treated With Lapatinib and Trastuzumab: A Secondary Analysis of the NeoALTTO Trial / R. Salgado, C. Denkert, C. Campbell [et al.] // JAMA Oncology. – 2015. – № 4 (1). – P. 448–455.

299. Salomon, D. S. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies / D. S. Salomon, R. Brandt, F. Ciardiello [et al.] // Critical Reviews in Oncology/Hematology. – 1995. – № 3 (19). – P. 183–232.

300. Schaapveld, M. The prognostic effect of the number of histologically examined axillary lymph nodes in breast cancer: stage migration or age association? / M. Schaapveld, E. G. E. de Vries, W. T. A. van der Graaf [et al.] // Annals of Surgical Oncology. – 2006. – № 4 (13). – P. 465–474.

301. Schettini, F. Clinical, pathological, and PAM50 gene expression features of HER2-low breast cancer / F. Schettini, N. Chic, F. Brasó-Maristany [et al.] // Breast Cancer. – 2021. – № 7(1). – P.1.

302. Schwartz, A. M. Histologic grade remains a prognostic factor for breast cancer regardless of the number of positive lymph nodes and tumor size: a study of 161 708 cases of breast cancer from the SEER Program / A. M. Schwartz, D. E. Henson, D. Chen // *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. – 2014. – № 8 (138). – P. 1048–1052.

303. Secreto, G. Role of Androgen Excess in the Development of Estrogen Receptor-positive and Estrogen Receptor-negative Breast Cancer / G. Secreto, B. Zumoff // *Anticancer Research*. – 2012. – № 8 (32). – P. 3223–3228.

304. Seo, A. N. Tumour-infiltrating CD8+ lymphocytes as an independent predictive factor for pathological complete response to primary systemic therapy in breast cancer / A. N. Seo, H. J. Lee, E. J. Kim [et al.] // *British Journal of Cancer*. – 2013. – № 10 (109). – P. 2705–2713.

305. Sestak, I. Prediction of chemotherapy benefit by EndoPredict in patients with breast cancer who received adjuvant endocrine therapy plus chemotherapy or endocrine therapy alone / I. Sestak, M. Martín, P. Dubsy [et al.] // *Breast Cancer Res Treat*. – 2019. – № 176. – P. 377–386.

306. Sheffield, B. S. Molecular subtype profiling of invasive breast cancers weakly positive for estrogen receptor / B. S. Sheffield, Z. Kos, K. Asleh-Aburaya [et al.] // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2016. – № 155 (3). P. 483–490.

307. Sherr, C. J. Mammalian G1 cyclins / C. J. Sherr // *Cell*. – 1993. – № 6 (73). – P. 1059–1065.

308. Shou, J. Prognostic value of FOXA1 in breast cancer: A systematic review and meta-analysis / J. Shou, Y. Lai, J. Xu [et al.] // *Breast (Edinburgh, Scotland)*. – 2016. – (27). – P. 35–43.

309. Singh, S. Chemotherapy Coupled to Macrophage Inhibition Induces T-cell and B-cell Infiltration and Durable Regression in Triple-Negative Breast Cancer / S. Singh, N. Lee, D. A. Pedroza [et al.] // *Cancer Research*. – 2022. – № 82 (12). – P. 2281–2297.

310. Slamon, D. J. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene / D. J. Slamon, G. M. Clark,

S. G. Wong [et al.] // *Science* (New York, N.Y.). – 1987. – № 4785 (235). – P. 177–182.

311. Smith, I. C. Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: significantly enhanced response with docetaxel / I. C. Smith, S. D. Heys, A. W. Hutcheon // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2002. – № 6 (20). – P. 1456–1466.

312. Smith, N. G. Targeted mutation detection in breast cancer using MammaSeq™ / N. G. Smith, R. Gyanchandani, O. S. Shah [et al.] // *Breast Cancer Research*. – 2019. – № 21. – P. 22.

313. Smith, P. D. Novel p53 mutants selected in BRCA-associated tumours which dissociate transformation suppression from other wild-type p53 functions / P. D. Smith, S. Crossland, G. Parker [et al.] // *Oncogene*. – 1999. – № 15 (18). – P. 2451–2459.

314. Somashekhar, S. P. Individualized chemotherapy benefit prediction by EndoPredict in patients with early breast cancer in an Indian cohort / S. P. Somashekhar, S. Zaveri, D. G. Vijay, [et al.] // *JCO Glob Oncol*. – 2020. – № 6. P. 1363–1369.

315. Song, P. Estrogen receptor β inhibits breast cancer cells migration and invasion through CLDN6-mediated autophagy / P. Song, Y. Li, Y. Dong [et al.] // *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. – 2019. – № 38 (1). – P. 354.

316. Sopik, V. The prognostic effect of estrogen receptor status differs for younger versus older breast cancer patients / V. Sopik, P. Sun, S. A. Narod // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2017. – № 2 (165). – P. 391–402.

317. Sørlie, T. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications / T. Sørlie, C. M. Perou, R. Tibshirani [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2001. – № 19 (98). – P. 10869–10874.

318. Sotiriou, C. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study / C. Sotiriou, S.-Y. Neo, L. M.

McShane [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2003. – № 18 (100). – P. 10393–10398.

319. Sparano, J. A. TAILORx: trial assigning individualized options for treatment (Rx) / J. A. Sparano // Clinical Breast Cancer. – 2006. – № 4 (7). – P. 347–350.

320. Sparano, J. A. Clinical outcomes in early breast cancer with a high 21- gene recurrence score of 26 to 100 assigned to adjuvant chemotherapy plus endocrine therapy: A secondary analysis of the TAILORx randomized clinical trial / J. A. Sparano, R. J. Gray, D. F. Makower [et al.] // JAMA Oncology. – 2020. – № 6. – P. 367–374.

321. Sporikova, Z. Genetic Markers in Triple-Negative Breast Cancer / Z. Sporikova, V. Koudelakova, R. Trojanec // Clinical Breast Cancer. – 2018. – № 18 (5). – P. e841-e850.

322. Stankovic, T. ATM mutations and phenotypes in ataxia-telangiectasia families in the British Isles: expression of mutant ATM and the risk of leukemia, lymphoma, and breast cancer / T. Stankovic, A. M. Kidd, A. Sutcliffe [et al.] // American Journal of Human Genetics. – 1998. – № 2 (62). – P. 334–345.

323. Stemmer, S. M. Clinical outcomes in patients with node-negative breast cancer treated based on the recurrence score results: evidence from a large prospectively designed registry / S. M. Stemmer, M. Steiner, S. Rizel [et al.] // NPJ breast cancer. – 2017. – (3). – P. 33.

324. Stendahl, M. High progesterone receptor expression correlates to the effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer patients / M. Stendahl, L. Rydén, B. Nordenskjöld [et al.] // Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research. – 2006. – № 15 (12). – P. 4614–4618.

325. Stuart-Harris, R. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients / R. Stuart-Harris, C. Caldas, S. E. Pinder // Breast (Edinburgh, Scotland). – 2008. – № 4 (17). – P. 323–334.

326. Suárez-Arriaga, M. C. Claudin-Low Breast Cancer Inflammatory Signatures Support Polarization of M1-Like Macrophages with Protumoral Activity / M. C. Suárez-Arriaga, A. Méndez-Tenorio, V. Pérez-Koldenkova [et al.] // *Cancers (Basel)*. – 2021. – № 13 (9). – P. 2248.

327. Sukumar, J. Triple-negative breast cancer: promising prognostic biomarkers currently in development / J. Sukumar, K. Gast, D. Quiroga [et al.] // *Expert Review of Anticancer Therapy*. – 2021. – № 21 (2). – P. 135–148.

328. Sun, S. PD-1(+) immune cell infiltration inversely correlates with survival of operable breast cancer patients / S. Sun, X. Fei, Y. Mao [et al.] // *Cancer immunology, immunotherapy: CII*. – 2014. – № 4 (63). – P. 395–406.

329. Sutton, L. M. Decreased Androgen Receptor Expression Is Associated With Distant Metastases in Patients With Androgen Receptor–Expressing Triple-Negative Breast Carcinoma / L. M. Sutton, D. Cao, V. Sarode [et al.] // *American Journal of Clinical Pathology*. – 2012. – № 4 (138). – P. 511–516.

330. Symmans, W. F. Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy / W. F. Symmans, F. Peintinger, C. Hatzis [et al.] // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2007. – № 28 (25). – P. 4414–4422.

331. Szade, J. Comparison of claudin-3 and claudin-4 expression in bilateral and unilateral breast cancer / J. Szade, M. Kunc, B. Pieczyńska-Uziębło [et al.] // *Neoplasma*. – 2021. – № 68 (2). – P. 283–289.

332. T-DXd: New Standard for HER2-Low Breast Cancer. *Cancer Discovery*. – 2022. – № 12 (8). – P. 1828.

333. Tabariès, S. Afadin cooperates with Claudin-2 to promote breast cancer metastasis / S. Tabariès, A. McNulty, V. Ouellet // *Genes and Development*. – 2019. – № 33 (3-4). – P. 180–193.

334. Tabariès, S. Claudin-2 promotes colorectal cancer liver metastasis and is a biomarker of the replacement type growth pattern / S. Tabariès, M. G. Annis, A. Lazaris [et al.] // *Communications Biology*. – 2021. – № 4 (1). – P. 657.

335. Takeshita, T. Droplet digital polymerase chain reaction assay for screening of ESR1 mutations in 325 breast cancer specimens / T. Takeshita, Y. Yamamoto, M. Yamamoto-Ibusuki [et al.] // *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. – 2015. – № 6 (166). – P. 540-553.e2.

336. Tan, W. Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling / W. Tan, W. Zhang, A. Strasner [et al.] // *Nature*. – 2011. – № 7335 (470). – P. 548–553.

337. Tarantino, P. Evolution of low HER2 expression between early and advanced-stage breast cancer / P. Tarantino, S. Gandini, E. Nicolò [et al.] // *European Journal of Cancer*. – 2022. – № 163. – P. 35–43.

338. Tarantino, P. HER2-Low Breast Cancer: Pathological and Clinical Landscape. / P. Tarantino, E. Hamilton, S. M. Tolaney [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2020. – № 38 (17). – P. 1951–1962.

339. Tarantino, P. HER2-low inflammatory breast cancer: Clinicopathologic features and prognostic implications / P. Tarantino, S. M. Niman, T. K. Erick [et a.] // *European Journal of Cancer*. – 2022. – № 174. – P. 277–286.

340. Tarantino, P. Navigating the HER2-Low Paradigm in Breast Oncology: New Standards, Future Horizons / P. Tarantino, G. Curigliano, S. M. Tolaney // *Cancer Discovery*. – 2022. – № 12 (9). – P. 2026–2030.

341. Tarantino, P. Prognostic and Biologic Significance of ERBB2-Low Expression in Early-Stage Breast Cancer / P. Tarantino, Q. Jin, N. Tayob [et al.] // *JAMA Oncology*. – 2022. – № 8 (8). – P. 1177–1183.

342. Taylor-Papadimitriou, J. Keratin expression in human mammary epithelial cells cultured from normal and malignant tissue: relation to in vivo phenotypes and influence of medium / J. Taylor-Papadimitriou, M. Stampfer, J. Bartek [et al.] // *Journal of Cell Science*. – 1989. – (94 (Pt 3)). – P. 403–413.

343. Telli, M. L. Phase II Study of Gemcitabine, Carboplatin, and Iniparib As Neoadjuvant Therapy for Triple-Negative and BRCA1/2 Mutation-Associated Breast Cancer With Assessment of a Tumor-Based Measure of Genomic Instability: PrECOG 0105 / M. L. Telli, K. C. Jensen, S. Vinayak [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*:

Official Journal of the American Society of Clinical Oncology. – 2015. – № 17 (33). – P. 1895–1901.

344. Tetzlaff, M. T. Immunodetection of phosphohistone H3 as a surrogate of mitotic figure count and clinical outcome in cutaneous melanoma / M. T. Tetzlaff, J. L. Curry, D. Ivan [et al.] // *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* – 2013. – № 9 (26). – P. 1153–1160.

345. Thike, A. A. Loss of androgen receptor expression predicts early recurrence in triple-negative and basal-like breast cancer / A. A. Thike, L. Y.-Z. Chong, P. Y. Cheok [et al.] // *Modern Pathology*. – 2014. – № 3 (27). – P. 352–360.

346. Thomas, D. A. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance / D. A. Thomas, J. Massagué // *Cancer Cell*. – 2005. – № 5 (8). – P. 369–380.

347. TNM Classification of Malignant Tumours, 8th Edition. – URL: <https://www.wiley.com/en-us/TNM+Classification+of+Malignant+Tumours+%2C+8th+Edition-p-9781119263579> (дата обращения: 28.02.2019).

348. Tung, N. M. TBCRC 048: Phase II Study of Olaparib for Metastatic Breast Cancer and Mutations in Homologous Recombination-Related Genes / N. M. Tung, M. E. Robson, S. Venz // *Journal of Clinical Oncology*. – 2020. – № 38 (36). – P. 4274–4282.

349. Tutt, A. N. J. Adjuvant Olaparib for Patients with BRCA1- or BRCA2-Mutated Breast Cancer / A. N. J. Tutt, J. E. Garber, B. Kaufman B [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2021. – № 384 (25). – P. 2394–2405.

350. Tutt, A. Carboplatin in BRCA1/2-mutated and triple-negative breast cancer BRCAness subgroups: the TNT Trial / A. Tutt, H. Tovey, M. C. U. Cheang [et al.] // *Nature Medicine*. – 2018. – № 24(5). – P. 628–637.

351. Umekita, Y. Overexpression of cyclinD1 predicts for poor prognosis in estrogen receptor-negative breast cancer patients / Y. Umekita, Y. Ohi, Y. Sagara [et al.] // *International Journal of Cancer*. – 2002. – № 3 (98). – P. 415–418.

352. Van Poznak C. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Systemic Therapy for Women With Metastatic Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline / C. V. Poznak, L. N. Harris, M. R. Somerfield // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2015. – № 24 (33). – P. 2695–2704.

353. Venetis, K. HER2 Low, Ultra-low, and Novel Complementary Biomarkers: Expanding the Spectrum of HER2 Positivity in Breast Cancer / K. Venetis, E. Crimini, E. Sajjadi E [et al.] // *Frontiers in Molecular Biosciences*. – 2022. – № 9. – P. 834651.

354. Viale, G. Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki-67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from Breast International Group Trial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole / G. Viale, A. Giobbie-Hurder, M. M. Regan [et al.] // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2008. – № 34 (26). – P. 5569–5575.

355. Viale, G. High concordance of protein (by IHC), gene (by FISH; HER2 only), and microarray readout (by TargetPrint) of ER, PgR, and HER2: results from the EORTC 10041/BIG 03-04 MINDACT trial / G. Viale, L. Slaets, J. Bogaerts [et al.] // *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*. – 2014. – № 4 (25). – P. 816–823.

356. Vijver, M. J. van de Molecular tests as prognostic factors in breast cancer / M. J. van de Vijver // *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*. – 2014. – № 3 (464). – P. 283–291.

357. Vinh-Hung, V. Lymph node ratio as an alternative to pN staging in node-positive breast cancer / V. Vinh-Hung, H. M. Verkooijen, G. Fioretta // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2009. № 7 (27). – P. 1062–1068.

358. Wang, P. Sensitive Detection of Mono- and Polyclonal ESR1 Mutations in Primary Tumors, Metastatic Lesions, and Cell-Free DNA of Breast Cancer Patients / P. Wang, A. Bahreini, R. Gyanchandani [et al.] // *Clinical Cancer Research: An*

Official Journal of the American Association for Cancer Research. – 2016. – № 5 (22). – P. 1130–1137.

359. Wang, Z. Metabolic reprogramming in triple-negative breast cancer / Z. Wang, Q. Jiang, C. Dong // *Cancer Biology and Medicine*. – 2020. – № 17 (1). – P. 44–59.

360. Wang, Y. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer / Y. Wang, J. G. M. Klijn, Y. Zhang [et al.] // *Lancet* (London, England). – 2005. – № 9460 (365). – P. 671–679.

361. Warner, E. T. Reproductive factors and risk of premenopausal breast cancer by age at diagnosis: are there differences before and after age 40? / E. T. Warner, G. A. Colditz, J. R. Palmer [et al.] // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2013. – № 1 (142). – P. 165–175.

362. West, N. R. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer / N. R. West, K. Milne, P. T. Truong [et al.] // *Breast Cancer Research*. – 2011. – № 6 (13). – P. R126.

363. Westerling, T. Cdk8 is essential for preimplantation mouse development / T. Westerling, E. Kuuluvainen, T. P. Mäkelä // *Molecular and Cellular Biology*. – 2007. – № 17 (27). – P. 6177–6182.

364. Wiesner, F. G. Ki-67 as a prognostic molecular marker in routine clinical use in breast cancer patients / F. G. Wiesner, A. Magener, P. A. Fasching [et al.] // *Breast* (Edinburgh, Scotland). – 2009. – № 2 (18). – P. 135–141.

365. Williams, N. The renaissance of endocrine therapy in breast cancer / N. Williams., L. N. Harris // *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*. – 2014. № 1 (26). – P. 41–47.

366. Wilson, F. R. Herceptin® (trastuzumab) in HER2-positive early breast cancer: protocol for a systematic review and cumulative network meta-analysis / F. R. Wilson, M. E. Coombes, Q. Wylie [et al.] // *Systematic Reviews*. – 2017. – № 1 (6). – P. 196.

367. Wolf, I. FOXA1: Growth inhibitor and a favorable prognostic factor in human breast cancer / I. Wolf, S. Bose, E. A. Williamson [et al.] // *International Journal of Cancer*. – 2007. – № 5 (120). – P. 1013–1022.

368. Wolff, A. C. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update / A. C. Wolff, M. E. H. Hammond, D. G. Hicks // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2013. – № 31 (31). – P. 3997–4013.

369. Woolston, C. Breast cancer / C. Woolson // *Nature*. – 2015. – № 7578 (527). – P. S101.

370. Wu, S.-G. Prognostic value of metastatic axillary lymph node ratio for Chinese breast cancer patients / S.-G. Wu, Z.-Y. He, Q. Li // *PloS One*. – 2013. – № 4 (8). – P. e61410.

371. Xu, C. FOXA1 Expression Significantly Predict Response to Chemotherapy in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Patients / C. Xu, Q. Wei, J. Guo [et al.] // *Annals of Surgical Oncology*. – 2015. – № 6 (22). – P. 2034–2039.

372. Xu, J. Claudin 19 inhibits the malignant potential of breast cancer cells by modulating extracellular matrix-associated UBE2C/Wnt signaling / J. Xu, M. Chen, M. Hu [et al.] // *American Journal of Cancer Research*. – 2022. – № 12 (12). – P. 5552–5563.

373. Xu, J. Roles of miRNA and lncRNA in triple-negative breast cancer / J. Xu, K. J. Wu, Q. J. Jia [et al.] // *Journal of Zhejiang University. Science B*. – 2020. – № 21 (9). – P. 673–689.

374. Yadav, B. S. Biomarkers in triple negative breast cancer: A review / B. S. Yadav, P. Chanana, S. Jhamb // *World Journal of Clinical Oncology*. – 2015. – № 6 (6). – P. 252–263.

375. Yang, F. Ferroptosis heterogeneity in triple-negative breast cancer reveals an innovative immunotherapy combination strategy / F. Yang, Y. Xiao, J. H. Ding [et al.] // *Cell Metabolism*. – 2023. – № 35 (1). – P. 84-100.e8.

376. Yamashita, M. Role of stromal myofibroblasts in invasive breast cancer: stromal expression of alpha-smooth muscle actin correlates with worse clinical outcome / M. Yamashita, T. Ogawa, X. Zhang // *Breast Cancer (Tokyo, Japan)*. – 2012. – № 2 (19). – P. 170–176.

377. Yen, T. W. Myofibroblasts are responsible for the desmoplastic reaction surrounding human pancreatic carcinomas / T. W. f Yen, N. P. Aardal, M. P. Bronner // *Surgery*. – 2002. – № 2 (131). – P. 129–134.

378. Yerushalmi, R. Ki-67 in breast cancer: prognostic and predictive potential / R. Yerushalmi, R. Woods, P. M. Ravdin [et al.] // *The Lancet. Oncology*. – 2010. – № 2 (11). – P. 174–183.

379. Yi, M. Which threshold for ER positivity? a retrospective study based on 9639 patients / M. Yi, L. Huo, K. B. Koenig [et al.] // *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*. – 2014. – № 5 (25). – P. 1004–1011.

380. Yin, L. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress / L. Yin, J. J. Duan, X. W. Bian [et al.] // *Breast Cancer Research*. – 2020. – № 22 (1). – P. 61.

381. Yue, Y. Stratification of Prognosis of Triple-Negative Breast Cancer Patients Using Combinatorial Biomarkers / Y. Yue, K. Astvatsaturyan, X. Cui [et al.] // *PloS One*. – 2016. – № 3 (11). – P. e0149661.

382. Zhang, H. HER2-Low Breast Cancers / H. Zhang, H. Katerji, B. M. Turner [et al.] // *American Journal of Clinical Pathology*. – 2022. – № 157 (3). – P. 328–336.

383. Zhang, H. HER2-low breast cancers: Current insights and future directions / H. Zhang, C. Karakas, H. Tyburski [et al.] // *Seminars in Diagnostic Pathology*. – 2022. – № 39 (5). – P. 305–312.

384. Zhang, G. Distinct clinical and somatic mutational features of breast tumors with high-, low-, or non-expressing human epidermal growth factor receptor 2 status / G. Zhang, C. Ren, C. Li // *BMC Medicine*. – 2022. – № 20 (1). – P. 142.

385. Zhang, Y. The Expression and Prognostic Significance of Claudin-8 and Androgen Receptor in Breast Cancer / Y. Zhang, A. Zheng, H. Lu [et al.] // *Onco Targets and Therapy*. – 2020. – № 13. – P. 3437–3448.

386. Zhao, X. Regulation of lipogenesis by cyclin-dependent kinase 8-mediated control of SREBP-1 / X. Zhao, D. Feng, Q. Wang [et al.] // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2012. – № 7 (122). – P. 2417–2427.

387. Zou, Y. Leveraging diverse cell-death patterns to predict the prognosis and drug sensitivity of triple-negative breast cancer patients after surgery / Y. Zou, J. Xie, S. Zheng // *International Journal of Surgery*. – 2022. – № 107. – P. 106936.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Таблица 1 – Мультигенные сигнатуры.....	58
Таблица 2 – Возраст больных и клинико-морфологические характеристики опухоли пациенток исследуемой популяции.....	102
Таблица 3 – Данные об адьювантной терапии пациенток исследуемой популяции.....	103
Таблица 4 – Методы иммуногистохимических исследований образцов ткани опухоли.....	104
Таблица 5 – Исследуемая 100-генная сигнатура для РМЖ.....	109
Таблица 6 – Распределение прогностических и предиктивных маркеров рака молочной железы в исследуемой популяции.....	116
Таблица 7 – Распределение маркеров CK14, FOXA1, FOXP3, PDL1, P53, SMA, AR, E-cadherin, CD4, CD8, CK5\6, EGFR в исследуемой популяции.....	117
Таблица 8 – Характеристики опухоли в возрастных группах <50 лет и ≥50 лет.....	119
Таблица 9 – Рутинные опухолевые маркеры в возрастных группах <50 лет и ≥50 лет.....	120
Таблица 10 – Критерии злокачественности опухоли в возрастных группах <50 лет и ≥50 лет.....	122
Таблица 11 – Возраст женщин в когортах с различным уровнем злокачественности рака молочной железы.....	122
Таблица 12 – Множественные попарные сравнения степеней злокачественности рака молочной железы и уровней экспрессии ЭР в зависимости от возраста на момент операции.....	123

Таблица 13 – Распределение маркеров CK14, FOXA1, FOXP3, PDL1, P53, SMA, AR, E-cadherin, CD4, CD8, CK5\6, EGFR в возрастных группах <50 лет и ≥50 лет	123
Таблица 14 – Распределение маркеров CK14, FOXA1, FOXP3, PDL1, P53, SMA, AR, E-cadherin, CD4, CD8, CK5\6, EGFR в подгруппах G1, G2, G3 степени гистологической злокачественности опухоли	126
Таблица 15 – Однофакторный анализ факторов риска в отношении переменной «Исход, смерть»	138
Таблица 16 – Однофакторный анализ ключевых рутинных факторов риска в отношении переменной «Исход, смерть 5 лет»	139
Таблица 17 – Однофакторный анализ 19 ключевых факторов влияния на целевой показатель «Исход смерть 5 лет»	140
Таблица 18 – Однофакторный анализ 19 ключевых факторов влияния на целевой показатель «Исход смерть 10 лет»	141
Таблица 19 – Результаты пошаговой логистической регрессии для прогнозирования показателя «Исход, смерть»	142
Таблица 20 – Результаты сравнения балльных шкал для прогноза показателя «Исход, смерть»	143
Таблица 21 – Результаты сравнения балльных шкал и шкал на основе пошаговой регрессии для прогноза показателя «Исход, смерть»	143
Таблица 22 – Традиционная прогностическая балльная шкала	145
Таблица 23 – Прогностическая шкала альтернативных маркеров РМЖ	151
Таблица 24 – Результаты сравнения традиционной шкалы и регрессионной для показателя «Исход, смерть» на 10-летнем этапе	157
Таблица 25 – Сравнение результатов оценки типа опухоли с помощью молекулярно-генетического анализа и иммуногистохимического исследования	159

Таблица 26 – Традиционная прогностическая шкала	202
Таблица 27 – Регрессионная прогностическая шкала	202
Рисунок 1 – Кривые Каплана – Майера, отражающие выживаемость при раке молочной железы T1N2 разной степени злокачественности (grade) [302]	35
Рисунок 2 – Экспрессия Ki-67 при различных молекулярных подтипах рака молочной железы [127]	50
Рисунок 3 – Кривые Каплана – Майера, отражающие специфическую выживаемость, связанную с РМЖ, при экспрессии и отсутствии экспрессии циклина D1 [268].....	62
Рисунок 4 – Кривые Каплана – Майера, отражающие общую выживаемость при экспрессии и отсутствии экспрессии циклина D1 [268]	62
Рисунок 5 – Кривые Каплана – Майера, отражающие общую выживаемость в зависимости от уровня экспрессии рецептора андрогенов (РА) при трижды негативном раке молочной железы [130]	69
Рисунок 6 – Кривые Каплана – Майера, отражающие общую выживаемость в зависимости от уровня экспрессии рецептора андрогенов (РА) при базальном раке молочной железы [130]	70
Рисунок 7 – Кривые Каплана – Майера, отражающие общую выживаемость в зависимости от уровня экспрессии рецептора андрогенов (РА) при 5-негативном раке молочной железы [130]	70
Рисунок 8 – Вероятная выживаемость в зависимости от наличия экспрессии CK5/6 [6]	82
Рисунок 9 – Дизайн исследования в популяции пациенток с РМЖ T1-2N0M0	98
Рисунок 10 – Дизайн исследования в популяции пациенток с метастатическим РМЖ	99
Рисунок 11 – Иммуногистохимическая картина биоптатов опухоли.....	105
Рисунок 12 – Исследуемая 100-генная сигнатура для РМЖ (тепловая карта) .	111

Рисунок 13 – Распределение женщин по возрастным группам	118
Рисунок 14 – Диаграммы размаха экспрессии ЭР (а), ПР (б), Ki-67-антигена (в) и максимального размера новообразования (г) в зависимости от степени дифференцировки опухоли G	125
Рисунок 15 – Структура соотношений гистологической злокачественности рака молочной железы (G ₁ –G ₃) и экспрессии гена Ki-67	126
Рисунок 16 – Диаграммы размаха экспрессии ЭР (а), ПР (б), Ki-67-антигена (в) и максимального размера новообразования (г) в зависимости от уровня экспрессии гена Ki-67 (с пограничным значением 13 %)	128
Рисунок 17 – Распространенность опухолей различной степени гистологической злокачественности (G ₁ –G ₃) в когортах с низкой и высокой экспрессией гена Ki-67	129
Рисунок 18 – Распространенность опухолей с различной экспрессией эстрогеновых рецепторов (ЭР) в когортах с низкой и высокой экспрессией гена Ki-67	130
Рисунок 19 – Распространенность опухолей с различной экспрессией прогестероновых рецепторов (ПР) в когортах с низкой и высокой экспрессией гена Ki-67	130
Рисунок 20 – Характеристика когорт с низким и высоким уровнем Ki-67 в зависимости от рецепторного статуса по ЭР и ПР	131
Рисунок 21 – Распространенность опухолей с различным уровнем продукции HER2 в когортах с низкой и высокой экспрессией гена Ki-67	131
Рисунок 22 – Характеристика когорт с низким и высоким уровнем Ki-67 в зависимости от клинико-морфологических критериев злокачественности по классификации pTNM	132
Рисунок 23 – Диаграммы размаха показателей ЭР (А), ПР (Б), Ki-67 (В) и максимального размера опухоли (Г) в зависимости от уровня экспрессии эстрогеновых рецепторов (ЭР)	133

Рисунок 24 – Структура соотношений экспрессии эстрогеновых рецепторов (ЭР) и гистологической злокачественности РМЖ (G ₁ –G ₃)	134
Рисунок 25 – Структура соотношений экспрессии эстрогеновых рецепторов (ЭР) и прогестероновых рецепторов (ПГ)	135
Рисунок 26 – Структура соотношений экспрессии эстрогеновых рецепторов (ЭР) и уровня экспрессии HER2	135
Рисунок 27 – Структура соотношений экспрессии эстрогеновых рецепторов (ЭР) и уровня экспрессии Ki-67 13 %.....	136
Рисунок 28 – Распределение пациенток по группам риска на основании оценки по традиционной шкале	145
Рисунок 29 – Распределение пациенток с разным рецепторным статусом в подгруппах низкого, среднего и высокого риска летального исхода по традиционной шкале.....	146
Рисунок 30 – Группы риска летального исхода по традиционной шкале среди пациенток с ЭР–, ПР–, HER2– статусом.....	147
Рисунок 31 – Летальность в группах низкого, среднего и высокого риска по традиционной шкале.....	147
Рисунок 32 – Кривые Каплана – Майера, отражающие общую выживаемость для групп высокого и низкого риска по традиционной шкале	148
Рисунок 33 – Кривые Каплана – Майера, отражающие общую выживаемость в зависимости от адъювантной химиотерапии	149
Рисунок 34 – Кривые Каплана – Майера, отражающие общую выживаемость в зависимости от адъювантной химиотерапии в объединенной группе среднего и высокого риска по традиционной шкале	150
Рисунок 35 – Распределение пациенток по группам риска на основании оценки по регрессионной шкале	152

Рисунок 36 – Распределение пациенток с разным рецепторным статусом в подгруппах низкого, среднего и высокого риска летального исхода по традиционной шкале.....	153
Рисунок 37 – Деление пациентов 3-ей группы по риску исходя из баллов шкалы «Регрессия».....	153
Рисунок 38 – Летальность в группах низкого, среднего и высокого риска по регрессионной шкале.....	154
Рисунок 39 – Кривые Каплана – Майера, отражающие общую выживаемость для групп высокого и низкого риска по регрессионной шкале	155
Рисунок 40 – Кривые Каплана – Майера, отражающие общую выживаемость в зависимости от адъювантной химиотерапии в объединенной группе среднего и высокого риска по регрессионной шкале.....	156
Рисунок 41 – AuROC кривая для традиционной и регрессионной шкалы для 10-летней выживаемости.....	157
Рисунок 42 – Тепловая карта: тестовая реакция у 12 больных с T1–2N0M0 ЭР+, ПР+, HER2– РМЖ (анализ архивного материала).....	162
Рисунок 43 – Результаты оценки экспрессии <i>ESR1</i>	164
Рисунок 44 – Результаты оценки экспрессии <i>ESR1</i> в сравнении с оценкой ЭР статуса методом ИГХ.....	164
Рисунок 45 – Результаты оценки экспрессии <i>PGR</i>	165
Рисунок 46 – Результаты оценки экспрессии <i>PIK3CA</i>	165
Рисунок 47 – Результаты оценки экспрессии <i>ERB2</i>	167
Рисунок 48 – Результаты оценки экспрессии <i>ERB2</i> в сравнении с оценкой HER2 статуса методом ИГХ.....	168
Рисунок 49 – Результаты оценки экспрессии <i>BRCA1</i>	168
Рисунок 50 – Результаты оценки экспрессии <i>BRCA2</i>	169

Рисунок 51 – Результаты оценки экспрессии <i>CD274</i>	170
Рисунок 52 – Результаты оценки экспрессии <i>BCAR4</i>	171
Рисунок 53 – Результаты оценки экспрессии <i>BCAS2</i>	172
Рисунок 54 – Результаты оценки экспрессии <i>CCND1</i>	172
Рисунок 55 – Результаты оценки экспрессии <i>CCND2</i>	173
Рисунок 56 – Результаты оценки экспрессии <i>CCND3</i>	173
Рисунок 57 – Результаты оценки экспрессии <i>FOXA1</i>	174
Рисунок 58 – Результаты оценки экспрессии <i>EGFR</i>	175
Рисунок 59 – Результаты оценки экспрессии <i>CDH3</i>	175
Рисунок 60 – Результаты оценки экспрессии <i>FOXCl</i>	176
Рисунок 61 – Результаты оценки экспрессии <i>KRT14</i>	176
Рисунок 62 – Результаты оценки экспрессии <i>KRT5</i>	177
Рисунок 63 – Результаты оценки экспрессии <i>CDK4</i>	177
Рисунок 64 – Результаты оценки экспрессии <i>CDK6</i>	178
Рисунок 65 – Результаты оценки экспрессии <i>P53</i>	178
Рисунок 66 – Результаты оценки экспрессии <i>PTEN</i>	179
Рисунок 67 – Результаты оценки экспрессии <i>CHEK2</i>	179
Рисунок 68 – Результаты оценки экспрессии <i>AR</i>	180
Рисунок 69 – Результаты оценки экспрессии <i>CLDN3</i>	181
Рисунок 70 – Результаты оценки экспрессии <i>CLDN7</i>	181
Рисунок 71 – Результаты оценки экспрессии <i>TOP2a</i>	182
Рисунок 72 – Результаты оценки экспрессии <i>TUBBIII</i>	182
Рисунок 73 – Сравнительный анализ молекулярно-генетических профилей опухолевых образцов, имеющих сопоставимые результаты ИГХ анализа	183

Рисунок 74 – Сравнительный анализ молекулярно-генетических профилей
опухолевых образцов с HER2-, ЭР- статусом..... 184