

ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава РФ

На правах рукописи

КЛИМЕНКО

Вероника Викторовна

**МОЛЕКУЛЯРЫЕ МАРКЕРЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ
ПРЕДОПЕРАЦИОННОЙ ХИМИОТЕРАПИИ
МЕСТНО-РАСПРОСТРАНЕННОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

14.01.12 – онкология

03.01.04 - биохимия

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

д.м.н. Семиглазова Т.Ю.

д.м.н., проф. Имянитов Е.Н.

Санкт-Петербург

2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

	ВВЕДЕНИЕ.	4
ГЛАВА 1.	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. Молекулярные маркеры эффективности лекарственной терапии рака молочной железы.	8
	Рецепторы эстрогенов и прогестерона	9
	Рецептор эпидермального фактора роста 2-го типа	12
	Маркер пролиферации, степень злокачественности и митотический индекс	13
	Цитокератины	15
	Инфильтрация опухоли лимфоцитами	16
	Фосфатидилинозитол-3-киназа	19
	Молекулярно-генетические нарушения	20
	Топоизомераза II альфа	24
	Бета-тубулины III класса	26
	Молекулярно-генетические и биологические подтипы	28
	Предоперационная (неoadьювантная) лекарственная терапия	33
	Полный патоморфологический ответ (pT0N0M0)	39
ГЛАВА 2.	Материалы и методы	46
	2.1 Характеристика больных	46
	2.2 Обследование больных	47
	2.2.1 Гистологическое исследование	47
	2.2.2 Патоморфологическая оценка степени регресса опухоли молочной железы и лимфатических узлов	54
	2.2.3 Иммуногистохимический анализ	60
	2.2.4 Молекулярно-генетическое тестирование	66
	2.2.5 Клиническая оценка степени регресса опухоли молочной железы и лимфатических узлов.	73

2.2.6	Статистический анализ	74
ГЛАВА 3.	Оценка эффективности проведённого предоперационного лечения местно-распространённого рака молочной железы.	80
3.1	Объективный и патоморфологический ответ.	80
3.2	Клинические наблюдения ответа на неоадьювантную таксан-содержащую полихимиотерапию у больной РМЖ с трижды негативным фенотипом и мутацией гена BRCA1 5382insC.	84
ГЛАВА 4.	Предиктивное и прогностическое значение молекулярных и биологических маркеров эффективности предоперационной химиотерапии местно-распространённого РМЖ.	92
4.1	Предиктивное значение молекулярных и биологических маркеров чувствительности к антрациклиновым антибиотикам и таксанам.	92
4.2	Чувствительность, специфичность, диагностическую точность, предсказательную ценность положительного и отрицательного результатов достижения полного патоморфологического регресса (pCR) с помощью ПЦР экспрессии генов топоизомеразы II альфа и бета-тубулинов III класса.	98
4.3	Прогностическое значение молекулярных и биологических маркеров.	105
ГЛАВА 5.	Обсуждение полученных результатов и заключение.	111
	ВЫВОДЫ.	116
	ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.	118
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.	119
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.	121

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

За последнее десятилетие сохраняются высокие показатели заболеваемости и смертности больных местно-распространенным раком молочной железы (сT1-2N2-3M0, сT3N1-3M0, сT4N0-3M0). Главными целями предоперационной (неoadъювантной) химиотерапии данной категории больных являются: увеличение удельного веса органосохраняющих операций, ранняя оценка эффективности выбранного режима системного лечения, уточнение долгосрочного прогноза в зависимости от степени патоморфологического ответа опухоли на лечение. Благодаря прогрессу молекулярно-генетических исследований все больше признание получает представление о гетерогенности и патогенетическом многообразии рака молочной железы (РМЖ). Выбор лекарственного лечения, который ответил бы всем этим критериям, представляет одну из актуальных проблем терапии больных местно-распространенным РМЖ [Семиглазов В.Ф., 2015].

Препаратами выбора в химиотерапии РМЖ по-прежнему остаются антрациклиновые антибиотики и таксаны [Cardoso F., 2014; Орлова Р.В., 2015; Sparano J.A., 2015]. В работах *in vivo* угнетение экспрессии топоизомеразы II альфа приводит к значительному снижению чувствительности опухоли к антрациклиновым антибиотикам [Binaschi, 2001; Bhargava, 2005]. Повышение экспрессии белка бета-тубулина III класса считается важным звеном в механизме развития резистентности к таксанам [Brase, 2010; Arteaga, 2012]. Все большую актуальность приобретает изучение мутации гена BRCA1, которая ассоциируется с высокой пенетрантностью и наследственной предрасположенностью РМЖ [Imyanitov E.N., Hanson K.P., 2004]. В литературе данные о предиктивном и прогностическом значении экспрессии генов топоизомеразы II альфа, бета-тубулина III класса и мутации гена BRCA1 разноречивы.

Знание молекулярных характеристик опухоли может улучшить раннюю оценку эффективности выбранного режима лечения, а также уточнить

долгосрочный прогноз в зависимости от степени патоморфологического ответа опухоли на терапию [Jain, 2004; Проценко С.А., 2007, 2012].

Все выше изложенное и определило актуальность настоящего исследования, направленного на выявление молекулярных маркеров с целью персонализации терапии, то есть «правильного лечения для правильного больного».

Цель исследования

Улучшить результаты лечения больных местно-распространенным раком молочной железы.

Задачи исследования

1. В рамках рандомизированного исследования оценить непосредственные результаты сравниваемых схем неoadьювантной терапии больных местно-распространенного РМЖ:
 - объективный клинический ответ по средством физикального метода, маммографии, ультразвукового исследования с соноэластографией и маммосцинтиграфии;
 - патоморфологический ответ первичной опухоли по Miller-Payne и степень регресса регионарных метастазов в лимфатических узлах.
2. Оценить предиктивную значимость молекулярных маркеров (экспрессии генов топоизомеразы II альфа, бета-тубулина III класса и мутации гена BRCA1) в оценке полного патоморфологического ответа (pCR или urTON0).
3. Определить чувствительность, специфичность, диагностическую точность, предсказательную ценность положительного и отрицательного результатов достижения полного патоморфологического регресса (pCR) с помощью полуколичественной полимеразной цепной реакции в реальном времени экспрессии генов топоизомеразы II альфа и бета-тубулинов III класса.

4. Проанализировать ежегодные показатели выживаемости без «событий» (EFS) в зависимости молекулярных маркеров, клинических, морфологических и биологических особенностей рака молочной железы.

Научная новизна исследования

1. На основании анализа базы данных НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова, включающей сведения более чем на 2000 больных РМЖ, проходивших лечение с 2010 по 2014 гг., получена детальная информация о 141 пациенте, получавших в соответствии с рандомизацией неoadъювантную химиотерапию по схеме ТАС в сравнении со схемой ТС.
2. В рамках рандомизированного неoadъювантного исследования определены чувствительность, специфичность, диагностическая точность, предсказательная ценность положительного и отрицательного результатов достижения полного патоморфологического регресса опухоли (урT0N0) с помощью полуколичественной полимеразной цепной реакции в реальном времени детекции экспрессии генов топоизомеразы II альфа и бета-тубулинов III класса.
3. Выполнена оценка предиктивной и прогностической значимости высокой экспрессии гена топоизомеразы II альфа, а также низкой экспрессии генов бета-тубулинов III класса и мутации BRCA1.

Практическая значимость

Детекция высокой экспрессии гена топоизомеразы II альфа, а также низкой экспрессии генов бета-тубулинов III класса и мутации BRCA1 методом полуколичественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с учётом клинических, морфологических и биологических особенностей местно-распространённого РМЖ в клинической практике позволит: улучшить планирование лекарственной неoadъювантной терапии, индивидуализировать системное лечение, увеличить показатели выживаемости

больных, сократить затраты на терапию за счет отказа от использования неэффективных дорогостоящих лекарственных средств.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Применение неoadъювантной цитотоксической химиотерапии по схеме ТАС (доцетаксел + адриабластин + циклофосфамид) чаще чем по схеме ТС (доцетаксел + циклофосфамид) приводит к объективному клиническому ответу и полному патоморфологическому ответу (pCR- ypT0N0), особенно при HER2 позитивном и трижды-негативном подтипах РМЖ.
2. При планировании системного лечения целесообразно определение биологического подтипа рака молочной железы, а также маркеров чувствительности к лекарственной терапии, включающей антрациклиновые антибиотики и таксаны.
3. Выбор лекарственного лечения с учетом детекции высокой экспрессии гена топоизомераза II альфа, а также низкой экспрессии генов бета-тубулины III класса и мутации BRCA1 методом полуколичественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с учётом клинических, морфологических и биологических особенностей местнораспространённого рака молочной железы позволит улучшить результаты лечения.

ГЛАВА 1
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ
ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ТЕРАПИИ РАКА
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Введение. Ежегодно рак молочной железы (РМЖ) выявляется у 1,2 млн женщин и является лидирующим заболеванием в структуре онкологической заболеваемости на территории Российской Федерации. В 2013 году заболеваемость РМЖ достигла 43,3 на 100 тыс. женщин (1 671 149 случаев), тогда как смертность от РМЖ - 12,9 на 100 тыс. женщин (521 907 случаев).

В России с 1990 по 2013 гг. абсолютное число новых случаев РМЖ возросло в 1,4 раза с 1760 до 2396 тыс. случаев [Каприн А.Д. и соавт., 2014]. В 2013 году заболеваемость РМЖ составила 47,1 на 100 тыс. женщин (61 308 случаев), смертность от РМЖ - 15,7 на 100 тыс. женщин (23 095 случаев) при общем количестве больных РМЖ – 562 053 человека [Каприн А.Д. и соавт., 2015]. Рост абсолютных случаев РМЖ связан с ростом численности населения города, а рост «грубых» показателей связан с увеличением жизни человека [Мерабишвили В.М., 2015]. За последнее десятилетие по Санкт-Петербургу также сохраняются высокие показатели заболеваемости и смертности больных местно-распространенным раком молочной железы (сT1-2N2-3M0, сT3N1-3M0, сT4N0-3M0).

Благодаря прогрессу в области молекулярно-генетических исследований все большее признание получает представление о гетерогенности и патогенетическом многообразии рака молочной железы. Выбор лекарственного лечения, который ответил бы всем этим критериям, представляет одну из актуальных проблем терапии больных местно-распространенным РМЖ [Семиглазов В.Ф., 2006; 2015]. Знание молекулярно-биологических маркеров, определяемых в опухолевой ткани, дает возможность охарактеризовать опухоль как в отношении чувствительности к лекарственному лечению, включая эн-

докринотерапию и таргетную терапию, так и большего потенциала к инвазии и метастазированию. Поиск и внедрение новых молекулярных маркеров в рутинную практику позволит в скором будущем: более точно выделять группу пациентов ранним РМЖ повышенного риска, подлежащих обязательной адъювантной химиотерапии; проводить индивидуальную оценку чувствительности к определённому виду системной терапии; а также разрабатывать новые современные препараты с биологической направленностью на конкретные маркеры – мишени [Герштейн Е.С. и соавт., 2004; Perou С., 2011].

Рецепторы эстрогенов и прогестерона. Развитие биологически направленной терапии рака молочной железы началось в 70-х годах с момента открытия гормональных рецепторов эстрогенов (ER) и чуть позднее рецепторов прогестерона (PR) [Имянитов Е.Н., 2007]. Рецепторы эстрогенов и прогестерона представляют собой специфически связывающиеся белки, избирательно воздействующие на клетку. При этом отсутствие экспрессии рецепторов прогестерона является для больных ранним раком молочной железы прогностически неблагоприятным фактором в отношении показателей общей и безрецидивной выживаемости. По данным Т. Pankaj и соавт. (2010) наличие положительных рецепторов эстрогена предсказывает медленное развитие опухоли и низкую степень её гистологической злокачественности.

Иммуногистохимический оценка для определения статуса стероидных гормонов – метод хорошо воспроизводимый в рутинной клинической практике. Превосходство данного метода заключается прежде всего и в том, что при окрашивании срезов можно чётко определить принадлежность рецепторов именно к опухолевым клеткам, в том числе и в архивном материале – парафиновых блоках [Prabhu J. S., 2014]. До 2010 года существовал достаточно высокий порог экспрессии рецепторов. В настоящее время экспрессия ER в $\geq 1\%$ опухолевых клеток является показанием для назначения эндокринотерапии. Важно, что для рецепторов прогестерона характерна коэкспрессия с рецепторами эстрогенов. Представленность рецепторов прогестерона

на ядре опухолевой клетки без рецепторов эстрогенов не возможна [Viale и соавт., 2012].

При наличии гиперэкспрессии рецепторов эстрогена опухоль чувствительна к эндокринотерапии, включающей антиэстрогеновые препараты блокирующие опухолевый рост. Например, тамоксифен (трифенилэтилен), являясь антиэстрогеном, конкурирующим образом занимает рецептор-«ловушку» к эстрогену, приводя к уменьшению транскрипции генов. В результате тамоксифен блокирует фазу G1 клеточного цикла и замедляет пролиферацию опухолевой клетки.

В свою очередь, ингибиторы ароматазы препятствуют синтезу в различных тканях и органах (молочной железе, головном мозге, жировой и мышечной тканях) эстрогенов из андрогенов. У больных ER-позитивным РМЖ в пременопаузе ингибиторы ароматазы самостоятельно противопоказаны, так как назначение препаратов данной группы стимулирует функцию яичников. Поэтому ингибиторы ароматазы у молодых назначаются только в сочетании с подавлением функции яичников. Выполнение овариоэктомии (хирургической, постлучевой или лекарственной) не может считаться полноценной гормонотерапией, поскольку через несколько месяцев запускаются процессы синтеза эстрогенов из андрогенов под действием фермента ароматазы в организме женщины аналогично менопаузе, поэтому обязательно рекомендуется в последующем назначение ингибиторов ароматазы 3-го поколения (нестероидных – летрозолола или анастразола, стероидного – экземестана) [Переводчикова Н.И., 2014].

В адьювантном режиме пациенты с положительными гормональными рецепторами и позитивным HER2 (ER+/HER2+) нуждаются в эндокринотерапии, соответствующей их менопаузальному возрасту в дополнение к цитотоксической химиотерапии и анти-HER2 терапии. Для пациентов с положительными гормональными рецепторами, но HER2-негативным заболеванием существует спектр различных видов терапии в зависимости от величины риска и чувствительности к цитотоксической химиотерапии. Пациенты низ-

кого риска с высокой экспрессией гормональных рецепторов (люминальный А) могут быть адекватно лечены с помощью одной эндокринотерапии в соответствии с менопаузальным статусом. При этом, пациенты с отягченными анатомическими признаками (крупная Т4 опухоль, метастазы в четырех и более лимфоузлах), а также с высоким Ki-67, низким уровнем гормональных рецепторов, даже при благоприятных результатах молекулярных мультипараметрических оценок, могут иметь достаточно высокий риск рецидива заболевания, и для них оправдано проведение адъювантной химиотерапии. В соответствии с рекомендациями Консенсуса Сан-Галлена 2015 года (Consensus 14th St. Gallen Breast Cancer Conference 2015 Voting Results): большинство экспертов сочли метастазы в 4-х и более регионарных лимфатических узлах, возраст < 35 лет и пременопаузальный уровень эстрогенов после адъювантной химиотерапии основными факторами, требующими добавления овариальной супрессии. Для примера, подавляющее большинство экспертов предложили бы овариальную супрессию больной 34 лет T1N1G3 в пременопаузе после адъювантной химиотерапии.

В НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова с 1997 по 2004гг. были проведены 4 рандомизированных клинических исследований неoadъювантной гормонотерапии местно-распространенного РМЖ. Первое из них выполнено в рамках многоцентрового испытания 024 «Неoadъювантная гормонотерапия летрозолом против тамоксифена у женщин с РМЖ ER+/PR+ в постменопаузе», в которое были включены 377 больных ER+ РМЖ. Было доказано, что частота объективных ответов была значительно выше при лечении летрозолом, чем при терапии тамоксифеном (55% vs 36%; p<0,001). Важно, что в группе «летрозолола» больным значительно чаще выполнялись органосохраняющие операции в сравнении с группой «тамоксифена» (45% против 35%; p<0,05).

Также в НИИ онкологии им. проф. Н.Н.Петрова было проведено специальное исследование сравнительной эффективности неoadъювантной эндокринотерапии (экземестана или анастрозола) и полихимиотерапии по схеме АТ «адриабластин + паклитаксел». В исследование были включены 152

«постменопаузальных» больных местно-распространенным РМЖ (T2N1-2, T3N0-1, T4N0M0) с положительным эстрогеновым статусом. В результате была получена очевидная тенденция к увеличению частоты выполнения органосохраняющих операций в группе больных «неoadьювантной эндокринологической терапии» в сравнении с группой «химиотерапии» (34,2% против 24,3%, $p=0,058$). При этом показатели трехлетней бессобытийной выживаемости достоверно не отличались (80,2% - в «химиотерапевтической» группе и 78,6% - в «эндокринной» группе. Таким образом, впервые было показано, что неoadьювантная (предоперационная) гормонотерапия не уступает химиотерапии по частоте ответов на лечение при значительно лучшей переносимости терапии и более высокого качества жизни больных. Поэтому предоперационная гормонотерапия может быть альтернативой химиотерапии у пожилых больных с эстроген-позитивными опухолями. Российский опыт по неoadьювантной системной терапии (первичная эндокринологическая терапия против химиотерапии) был представлен на всех площадках крупнейших международных форумах.

Полипептидные факторы роста. К значимому звену в регуляции роста опухоли относятся полипептидные факторы роста, вырабатываемые самой опухолью: эпидермального фактора роста, соматостатин, инсулиноподобные факторы роста и др.. Герштейн Е.С. еще в 1998 году в своих работах обратил внимание на тот факт, что при наличии пептидов эпидермального фактора роста (EGFR) и отсутствии рецепторов стероидных гормонов в опухоли молочной железы, возможен плохой прогноз заболевания. Но из-за противоречивости результатов, ни один из полипептидных факторов роста опухоли, характеризующих чувствительность РМЖ, не вошёл в рутинную клиническую практику.

Рецептор эпидермального фактора роста 2-го типа (HER2). Семейство онкогенов группы c-erbB-тирозинкиназных рецепторов, к которым относятся четыре трансмембранных рецептора: EGFR (ErbB-1), ErbB-2 (HER2), ErbB-3 (HER3) и ErbB-4 (HER4) – важнейшие регуляторы системы передачи

митогенного сигнала. HER2 хоть и не имеет собственного лиганда, но тем не менее является ключевым звеном в передаче митогенных сигналов [Moghal и соавт., 1999; Hortobagyi G.N., 2004]. Воздействие на HER2 существенно замедляет или даже останавливает рост опухолевых клеток. До «эры трастузумаба» для HER2-позитивного РМЖ было характерно более агрессивное течение, раннее прогрессирование с высокой частотой висцеральных метастазов и метастазов в головной мозг. С появлением таргетных препаратов (моноклональных антител, малых молекул и иммуноконъюгатов): трастузумаб, лапатиниба, пертузумаба, T-DM1, биологически направленных на рецептор эпидермального фактора роста 2-го типа, изменились «природа» и прогноз HER2-позитивного рака молочной железы [Perez E.A., Romond E., Suman V.J., 2014]. В проведенных ранее рандомизированных исследованиях неоадьювантной химиотерапии у больных HER2-позитивным РМЖ улучшение показателей выживаемости было отмечено при достижении полного патоморфологического ответа pCR или pT0pN0 по сравнению с теми больными, у кого оставалась резидуальная опухоль на момент операции [Gianny и соавт., 2010; Esserman и соавт., 2012; von Minckwitz и соавт., 2012; Cortazar и соавт., 2012]. Мета-анализ, проведенный по инициативе FDA Рабочей группой CTNeoBC, убедительно показал наибольшую корреляционную связь наблюдалась между pCR и показателями общей и безрецидивной выживаемости при агрессивных подтипах РМЖ: HER2-позитивном подтипе, трижды негативном, люминальном В РМЖ (HER2-негативном III степени злокачественности).

Маркер пролиферации Ki-67, степень злокачественности и митотический индекс. Ki-67 – ядерный антиген, экспрессируемый в пролиферативной фазе клеточного цикла (фазы G1, S, G2, M) и отсутствующий в фазе пролиферативного покоя (G0). Уровень экспрессии Ki-67 определяется в парафиновых блоках с помощью моноклональных антител MIB-1. Установлена прямая корреляция между маркером пролиферации Ki-67, и степенью злокачественности опухоли, а также митотическим индексом. В исследова-

нии Kuerer (1999), включавшем 372 больных РМЖ (медиана наблюдения 58 мес), при мультивариантном анализе лишь степень злокачественности и эстроген-позитивный статус опухоли оказались независимыми факторами, предсказывающими полный патоморфологический ответ в опухоли и улучшение показателей общей и безрецидивной выживаемости. В исследовании Vincent-Salomon (2004) при проведении неoadъювантной антрациклин-содержащей химиотерапии 55 больным местнораспространенным РМЖ показал, что фракция клеток в S-фазе, митотический индекс и уровень Ki-67 имели достоверное предсказывающее значение. Но наиболее значимым был Ki-67: при его уровне более 17 на 3,3 мм² частота pCR достиг 50%, при уровнях митотического индекса ниже порогового значения – лишь 7%. В исследовании Aas (2003) высокий митотический индекс и показатель Ki-67 были ассоциированы с мутацией гена p53, при этом вероятность достижения pCR при неoadъювантной химиотерапии крайне низка, а отдаленные результаты лечения значительно ухудшаются.

Сравнительный анализ, проведенный Urruticoechea и соавт. (2005), включал результаты 18 клинических исследований, в которых принимало участие более 200 пациенток. В 17 из 18 исследований [Urruticoechea и соавт., 2005] была выявлена статистически достоверная корреляция между экспрессией Ki-67 и прогнозом РМЖ, однако в данных исследованиях не было единой валидации уровня Ki-67, поэтому принято решение о индивидуальных критериях оценки данного показателя для каждого лечебного учреждения.

Повышенная экспрессия Ki-67 коррелирует с плохим прогнозом течения заболевания при лучшем ответе на химиотерапию [Urruticoechea и соавт., 2005; Taneja и соавт., 2010]. Важнейшая роль отводится индексу клеточной пролиферации Ki-67 для определения «Люминального А» и «Люминального В» подтипов.

В исследовании American Society of Clinical Oncology (ASCO) Tumor Marker Guidelines Committee показали, что в настоящее время достоверных

доказательств прогностической значимости определения Ki-67 в клинической практике недостаточно, чтобы рекомендовать рутинное определение Ki-67 для прогноза пациенткам местно-распространённым РМЖ [Harris и соавт., 2007]. По мнению экспертов Консенсуса Сан-Галлена 2015 года (Consensus 14th St. Gallen Breast Cancer Conference 2015) оценка Ki-67 должна быть интерпретирована с учётом местных лабораторных показателей: например, если в лаборатории среднее значение Ki-67 при эстроген-позитивном РМЖ равняется 20%, значение в 30% или выше может считаться высоким, а 10% или менее – низким.

В литературе имеются данные о влиянии Ki-67 при назначении вида системной терапии. По результатам исследования, в группе пациенток с эстроген экспрессирующими опухолями и высоким индексом Ki-67 целесообразно добавление доцетаксела к эпирубицину и 5-фторурацилу в качестве адъювантной химиотерапии [Penault-Llorca и соавт., 2009]. Результаты были подтверждены в исследовании Cancer International Research Group 001 trial [Hugh и соавт., 2009]. Однако эти результаты не соответствуют данным International Breast Cancer Study Group Trials VIII and IX. В этих исследованиях была показана предиктивная роль высокого уровня экспрессии Ki-67 в группе с рецептор-позитивным РМЖ без метастазов в лимфатических узлах по отношению к проведению адъювантной терапии с включением метотрексата, циклофосфамида и 5-фторурацила в дополнение к проводимой эндокринной терапии [Viale и соавт., 2009].

Проведение дальнейших исследований необходимо для более направленного выделения групп пациенток с высокими показателями Ki-67, которые могут получить максимальную пользу от проведения химиотерапии.

Цитокератины. Moll в 1982 г. впервые предложил разделить все карциномы на «люминальные» и «базальные», в зависимости какие цитокератины в них экспрессируются. По данным различных исследований трижды негативный РМЖ (когда на ядре опухолевой клетке нет рецепторов к эстрогенам, прогестерону при одновременном отсутствии гиперэкспрессии HER2) реги-

стрируется в 10-25% всех случаев РМЖ. ИГХ маркерами трижды негативно-го РМЖ считаются: гиперэкспрессия «базальных» маркеров c-kit, цитокератины (СК 5/6, СК 14, СК 17), виментин и EGFR (рецептор эпидермального фактора роста 1 типа) [Masuda H., 2011]. Данные маркеры не используются в рутинной клинической практике, так как наличие или отсутствие их экспрессии принципиально не влияет на выбор лечебной тактики [Lehmann B. D., 2014]. Однако при высокой экспрессии базальных маркеров отмечается значимая тенденция к увеличению местных рецидивов и снижению показателей выживаемости больных ТН РМЖ. Также получены данные о наибольшей частоте достижения полного патоморфологического ответа при трижды негативном РМЖ с экспрессией базальных маркеров [Rouzier R., 2005; Pfeifer W., 2014].

Инфильтрация опухоли лимфоцитами (TIL). Иммуноterapiи злокачественных опухолей последнее время уделяется много внимания, так как рост большинства злокачественных опухолей сопровождается серьезными нарушениями различных звеньев иммунного ответа организма, включая снижение функциональной активности Т-лимфоцитов. Наибольшая роль отводится инфильтрации опухоли CD8+–лимфоцитами. Установлена связь степени распространенности опухолевого процесса с уровнем CD8+ – лимфоцитов.

До настоящего времени считалось, что наличие TIL является суррогатным маркером активного противоопухолевого иммунитета и сочетается с улучшением прогноза у больных ранним РМЖ. Данный факт был подтвержден в адьювантном исследовании FinHER. У больных местнораспространенным HER2-позитивным РМЖ с высоким содержанием TIL назначение таргетной анти-HER2 терапии трастузумабом приводило к снижению относительного риска прогрессирования на 21% (ОР 0,79 [95%ДИ 0,64–0,98], p=0,032), риска смерти – на 20% (ОР 0,80 [95%ДИ 0,62–1,03], p=0,08) Наличие TIL оказалось независимым прогностическим фактором при проведении многофакторного анализа [Loi S., 2014].

Интригующе обратные данные были получены при анализе результатов адъювантной терапии (исследование N9831) с включением трастузумаба у больных операбельным HER2-позитивным РМЖ в зависимости от инфильтрация опухоли лимфоцитами (TIL). Проанализированы были данные о 925 больных HER2-позитивным ранним РМЖ, получавших 4 цикла АС и 4 цикла монокимиотерапии паклитакселом или химиотерапию в комбинации с трастузумабом в течение года. У больных с высоким содержанием TIL добавление трастузумаба к химиотерапии не улучшало результатов лечения. Наоборот, у больных со средним и низким содержанием TIL добавление трастузумаба к химиотерапии улучшало отдаленные результаты (в группе только химиотерапии 5-летняя безрецидивная выживаемость составила 64,3% и в группе «химиотерапии+трастузумаб» - 79,6%) [Perez E.A., 2014].

Механизм противоопухолевого эффекта трастузумаба может быть в данном конкретном случае объяснен способностью трастузумаба активировать Т-клеточный иммунитет у больных с низким содержанием TIL, что в свою очередь повышает противоопухолевый иммунитет и способствует улучшению результатов лечения.

Но почему так разнятся результаты о роли инфильтрации опухоли лимфоцитами в ответе на проводимую адъювантную таргетную терапию трастузумабом в двух представленных исследованиях? Вероятно, отчасти поэтому Консенсус Сан-Галлена 2015 года (Consensus 14th St. Gallen Breast Cancer Conference 2015 Voting Results) не рекомендовал детекцию инфильтрации опухоли лимфоцитами (TIL) к использованию в рутинной практике. К тому же, отсутствует и единая системы оценки и градации степени TIL. Однозначно, исследования в этом направлении должны быть продолжены.

Исследования в области иммунотерапии рака молочной железы в настоящее время находятся на ранних стадиях. Препараты нового класса – блокаторы сигнальных путей (моноклональные антитела к CTLA-4 рецепторам цитотоксических лимфоцитов – ипилимуаб, рецептору PD-1 и его лиганду – ниволумаб, пембролизумаб) тормозят иммунный ответ (immune

check-point inhibitors) [Pardoll D. M., 2012]. Препараты продемонстрировали высокую активность при меланоме, немелкоклеточном раке легкого [Ribas A., 2015; Brahmer J. et al., 2015]. Отличительная особенность действия препаратов этого класса является возможность достижения длительной ремиссии, не требующей проведения постоянного лечения. Nanda R. et al. (2015) представил результаты применения пембролизумаба (моноклонального антитела к PD-1) у 32 больных метастатическим трижды негативным РМЖ, ранее получавших 3 и более линий химиотерапии. Клиническая ремиссия была достигнута у 18,7% из них, полная ремиссия - у 3,8% и контроль над болезнью - у 44,5% больных.

Система активации плазминогена задействована в способности к метастазированию и инвазии опухолевой клетки, нарушающей окружающую базальную мембрану и внеклеточный матрикс опухолевыми протеазами. Протеазы также принимают участие в неоангиогенезе.

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов. Опубликованные результаты ряда ретроспективных исследований говорят о том, что экспрессия VEGF при раке молочной железы имеет значение в прогнозе заболевания и влияет на чувствительность к гормонотерапии и лекарственному лечению [Linderholm и соавт., 2000; Gasparini G., 2001]. Высокие значения экспрессии свидетельствуют о плохом прогнозе, как при раннем, так и при местнораспространённом РМЖ. Разработка новейших препаратов с антиангиогенными свойствами и оценка активности VEGF - зависимого ангиогенеза может стать основой для направленного лечения [Frasor J. и соавт., 2008]. Для лечения РМЖ зарегистрирован лишь один препарат бевацизумаб - рекомбинантное моноклональное антитело с прямым подавлением активности VEGF (сосудистого эндотелиального ростового фактора), препятствующего связыванию VEGF с рецепторами VEGFR-1 (Flt-1) и VEGFR-2 (Flk-1/KDR).

Большое внимание не так давно уделялось онкогенам c-myc и int-2/bcl-I, супрессорным белкам – производным генов p53 и ретинобластомы, а также

роли интегринов – белков, стабилизирующих межклеточные контакты и целостность ткани [Hodgkinson V.C. и соавт., 2012] (таблица 1.1).

PIK3CA или **фосфатидилинозитол-3-киназа** кодируется геном PIK3CA. PIK3CA играет ключевую роль в регуляции процессов роста, пролиферации, дифференцировки, выживания и метастатической активности опухолевой клетки. Фосфатидилинозитол-3-киназа потенцирует действие других онкогенов, активируя и усиливая трансформирующую активность многих известных онкобелков. Тогда как ферментативная активность PIK3CA контролируется белком PTEN.

PIK3CA мутация определяется в 23% HER2-позитивного РМЖ и, как правило, ассоциируется с плохим ответом на проводимое лекарственное лечение. В неoadъювантном исследовании III фазы NeoALTT0 (в котором сравнили эффективность таргетной терапии «биологического окна») полный патоморфологический ответ (pCR) на комбинацию лапатиниба с трастузумабом у больных местно-распространенным РМЖ с диким типом мутации PIK3CA составил 53,1%, а с активацией в опухоли мутации PIK3CA значительно уменьшался до 28,6% ($p=0,012$) [L. Majeovski, M. Piccart, J. Baselga, N. Harbeck, V. Semiglazov, 2015].

Тогда как адъювантном проекте NSABP B-31 мутация PIK3CA не сохранила за собой статуса предиктивного биомаркера чувствительности к трастузумабу. Относительный риск рецидива после адъювантной терапии трастузумабом у больных ранним HER2-позитивным РМЖ без мутации PIK3CA составил 0,51 (95% ДИ 0,37-0,71; $p<0,001$), а с мутацией PIK3CA - 0,44 (95% ДИ 0,24-0,82; $p<0,009$). Полученные результаты навели авторов работы на мысль, что результаты метастатических и неoadъювантных исследований не всегда могут экстраполироваться на «адъювант» [K. Poque-Geili et al., 2015].

Таблица 1.1 – Основные группы биологических маркеров

[Герштейн, Е.С., 2004]

Биологическое значение	Маркеры
Показатели эндокринной гормональной чувствительности	Рецепторы стероидных гормонов: рецепторы эстрогенов, рецепторы прогестерона
Показатели активности ауто/паракриновой регуляции пролиферации	Факторы роста и их рецепторы: EGFR и его лиганды: α -TNF, амфирегулин и др. HER2 и др. рецепторы семейства c-erb Рецепторы IFR-1 Рецепторы соматостатина
	Ферменты и белки, участвующие в передаче митогенных сигналов: Рецепторные тирозинкиназы, MAP-киназы, PI3K, Akt-1, Crb2 и др.
Показатели метастатической и инвазивной активности	Компоненты системы активизации плазминогена: uPA, PAI-1, рецептор uPA, PAI-2, tPA
	Металлопротеазы и их ингибиторы
	Другие протеолитические ферменты (катепсин D)
	Интегрины
Показатели неоангиогенеза	VEGF A и его рецепторы flt-1 и flk-1
	VEGF C и его рецепторы flt-4
	Другие ангиогенные факторы: тимидинфосфоорилаза, интерлейкины и др.
Регуляторы апоптоза	Супрессорные гены и их продукты: p53, ген ретинобластомы
	Проапоптотические факторы: bcl-2, Fas –рецептор и Fas - лиганд
Показатели, не имеющие чётко выраженной биологической роли при РМЖ	Белок pS2
	Онкогены c-мус, int-2 и др.

Молекулярно-генетические нарушения в опухолях молочной железы

BRCA1 и BRCA2. Уникальное достижение в молекулярной биологии 90-х годов – открытие супрессорных генов BRCA1 и BRCA2. Продукты BRCA1 и BRCA2 генов способны взаимодействовать с белком RAD51 системы репарации двухцепочечных разрывов ДНК белком. Нарушения репарационного пути BRCA/RAD51 ведут к увеличению нестабильности генома. С учетом функций гена BRCA, при его инактивации возникают опухоли, отличающиеся геномной нестабильностью и большой мутационной нагрузкой. Частота развития наследственного РМЖ составляет от 5 до 20% [Easton и

соавт., 2012]. В опухолевой ткани мутации BRCA чаще являются герминальными (наследуемыми), реже - соматическими [Имянитов Е.Н., 2011; Gonzalez-Angulo A.M., 2011].

Наследственный РМЖ связан с наличием нарушений в генах супрессорах высокой пенетрантности – BRCA1, BRCA2. По данным К. Offit, при наличии мутации в гене BRCA1 к 80-м годам риск развития РМЖ достигает в 90%, при мутации гена BRCA2 в 80% [Metcalfе и соавт., 2008; Mulligan A.M. и соавт., 2011]. Особенностью наследственного рака является повышенный риск возникновения РМЖ в контралатеральной молочной железе. Также характерен у женщин более молодого возраста (35–45 лет) [Соболевский В.А. и др., 2010].

По данным Е.Н. Имянитова (2010), наследственный РМЖ чаще имеет трижды негативный подтип опухоли, характеризуется высокой экспрессией Ki-67, высокой степенью злокачественности, негативным гормональным статусом опухоли, а также отсутствием экспрессии HER2. При этом отличный от трижды негативного РМЖ фенотип имеют 10% для наследственного (с герминальными мутациями BRCA1) и более 40% больных со спорадическими мутациями BRCA1. Наличие мутации в гене BRCA 1 имеет значение и в планировании проведения системного лечения. Т. Вурски и соавторы (2010) полагают, что инактивация гена BRCA1 приводит к утрате чувствительности опухолевых клеток к препаратам таксанового ряда и поэтому клиническая эффективность таксанов, может быть подтверждена с помощью низкой экспрессии бета-тубулина [Seve и соавт., 2010].

Немало важная роль в репарации двухцепочечных разрывов ДНК посредством гомологичных рекомбинаций принадлежит генам BRCA1 и BRCA2. По данным литературных источников, ДНК-повреждающие агенты активно работают у наследственного BRCA ассоциированного рака молочной железы [Имянитов Е.Н., 2004; Портной С.М., 2005]. В исследованиях, проведённых при раке легкого, яичников и молочной железы, показана предиктивная значимость для терапии препаратами платины и антрациклинами

при наличии гена BRCA1 [Taron M. et al., 2004; Quinn и соавт., 2007; Byrski и соавт., 2010].

Предрасполагающие факторы, которые приводят к соматическим мутациям в эпителиальных клетках, условно можно разделить на активирующие и дезактивирующие события. Отличительной чертой генома опухолевой клетки РМЖ является хромосомальная нестабильность, которая выражается в аномальном количестве крупных хромосомных перестроек. Изменения в генах, ассоциированных с РМЖ, могут быть пусковым механизмом для соматической нестабильности, а далее приводить к мутации [Colleu-Durel и соавт., 2004; Imyanitov и соавт., 2004].

В 1990-х и начале 2000-х исследователи пытались создать карту специфических для РМЖ делеций, но воспроизвести новые гены РМЖ с помощью картирования делеций не удалось по причине потери гетерозиготности. Внутригенные соматические мутации являются относительно редкими событиями в геноме РМЖ, к наиболее часто встречающимся относится ген p53 (20–53%), PIK3CA (26%), CDH1 (21%). С помощью полногеномного секвенирования удалось выявить более 120 специфических для РМЖ генов. В среднем, в каждой опухоли удается насчитать около сотни соматических драйвер-мутаций. Гены, контролирующие важнейшие клеточные функции, вовлеченные в неопластический процесс: адгезию, миграцию, апоптоз, трансформацию цитоскелета, пролиферацию и др., представлены в таблице 1.2.

Результатов клинических исследований по изучению этой группы маркеров местнораспространённого РМЖ крайне недостаточно. Остаются нерешенные вопросы о корреляции между их уровнем и эффективностью лечения, а также о возможности создания алгоритма тактики лекарственного лечения больных местнораспространённого рака молочной железы с учетом стандартных (стероидных гормонов и рецептора эпидермального фактора роста 2 типа) и экспериментальных маркеров. Знание экспрессии предиктивных маркеров даёт возможность определить течение заболевания от медлен-

но развивающейся опухоли до высокоагрессивных опухолей с быстрым метастазированием [Liedtke C., 2008; Dignam J.J. 2009; Cianfrocca M., Gradishar W., 2009] с учётом различного ответа на системную терапию [Nielsen T.O., 2004; Nguyen P.L., 2008; Albain K.S., 2010; Nielsen и соавт., 2010; Wo J.Y., 2010; Aebi S., 2011; Tang G., 2011].

Таблица 1.2 – Молекулярно-генетические нарушения в опухолях молочной железы [Colleu-Durel и соавт., 2004; Imyanitov и соавт., 2004]

Типы генетических повреждений	Гены и/или хромосомальные локусы
Активирующие генетические события	
Амплификация генов, сопровождающаяся увеличением их экспрессии	8q24: MYC; 11q13: CCND1, EMS1; 17q12–21: HER2, TOP2A; 20q13: AIB1
Увеличение экспрессии генов	BCL2, B94, Cathepsin D, CCNE, CD63, claudin-7, CRABP2, CTSD, GATA3, GZMH, hTERT, IGF1R, Ki-67, lactoferrin, lipocalin 2, MDM2, MUC1, MYBL2, neurosin, PAI1, PAI2, POH1, PS2, Rantes, SIX1, MARCD2, STMY3, VEGF
Увеличение копийности хромосомных локусов	1q (1q21, 1q32, 1q41), 8q (8q24), 11q (11q13), 16p (16p11), 17q (17q11. 2, 17q24), 20q (20q13)
Генетические события с неясными последствиями	
Потери гетерозиготности (аллельные имбалансы), которые могут отражать как делецию, так и амплификацию одного из аллелей	1p (1p36. 3), 2q (2q22. 1), 3p (3p14. 2), 4q (4q35. 1), 6q (6q25. 1), 7q (7q31. 2), 8p (8p21. 3), 9p (9p21. 3), 13q (13q14), 16q (16q22. 1, 16q24. 3), 17p (17p13. 3), 18p (18p11. 32), 18q (18q21. 2), 19p (19p13), 21q (21q11. 1)
Инактивирующие генетические события	
Делеции генетического материала	1p (1p31–35, 1p36), 6q (6q13–21, 6q21–23. 3, 6q25–27), 8p (8p21, 8p22–23), 11q (11q22–23, 11q24–25), 13q (13q12–13, 13q14. 1), 16q (16q21–23. 3, 16q24. 3), 17p (17p13. 1, 17p13. 3), 22q (22q13)
Внутригенные мутации	p53, PIK3CA, CDH1
Метилирование промоторов, сопровождаемое сни-	APC, BCSG1, BRCA1, CCND2, CDH1, CDH13, DAPK, ER, FHIT, GPC3, GSTP1, HIN1, HOXA5,

жением экспрессии соответствующих генов	Maspin, NES1, NM23-H1, NOEY2, PR, Prostatein, INK4, CIP1, RAR-beta, RASSF1A, RFC, RIZ1, SOCS1, SRBC, SYK, TGFBR2, THBS, TIMP3, TMS1, TWIST, ZAC, 14-3-3sigma
Снижение экспрессии генов	ATM, BAX, ITGA6, MGST1, OXTR, plakophilin 1, KIP1, RIG-like7-1, RB1, RBL2, SPARCL1, SPR1, TGFBR3, TFAP4, TNXA, 53BP2

Основными наиболее эффективными препаратами в лечении РМЖ, обладающими противоопухолевым действием, являются антрациклины и таксаны [Орлова Р.В., 2015; Sparano J. A., 2015]. Антрациклины – это одни из самых мощных групп противоопухолевых препаратов, применяющихся в лечении рака молочной железы. Однако они могут вызывать ряд токсических эффектов, в особенности кардиотоксичности (что может привести к сердечной недостаточности) [Castaneda С.А., Gomez Н.Л., 2009; Glynn и соавт., 2010].

Топоизомераза II альфа (TOP2 альфа) – сложный белок, необходимый для процесса репликации ДНК и главной мишенью антрациклиновых антибиотиков [Evans А., 1999; Кноор и соавт., 2005; Oakman С. и соавт., 2009]. В клетках человека гомодимерный фермент существует в двух изоформах: 170-кДа топоизомераза II альфа и 180-кД TOP2 бета (Wang J.C., 1996; Nakoroulou L. и соавт., 2000).

Доксорубин – основной представитель антрациклиновых антибиотиков - ингибирует топоизомеразу II в ходе репликации ДНК. В результате повреждения ДНК, что в конечном счете ведет к апоптозу опухолевой клетки [Pommier и соавт., 2010; Durbesq и соавт., 2004]. На лабораторных животных было установлено, что уровень экспрессии TOP 2 α является значимым фактором, устанавливающим чувствительность опухоли к доксорубину [Binaschi M., 2001].

По данным J. Coon (2002), в исследовании, в котором принимало участие 35 больных местно-распространённым раком молочной железы, амплификация гена была обнаружена в 6 случаях. Из шести больных у 4 наблю-

дался pCR на фоне проведения химиотерапии с включением антрациклиновых антибиотиков и в двух случаях – частичный регресс опухоли.

Ретроспективные исследования адъювантной химиотерапии показали, что химиотерапия на основе антрациклинов более эффективна у женщин с HER2-положительными опухолями молочной железы, возможно топоизомеразы II-альфа является медиатором в этом процессе. Очень близко к гену HER2 расположен ген топоизомеразы II, который локализуется на хромосоме 17q12. Предполагается, что гиперэкспрессия топоизомеразы коррелирует с повышенной чувствительностью к антрациклинам (табл. 1.3).

Таблица 1.3 – Эффективность эпирубина в зависимости от экспрессии HER2 и топоизомеразы II альфа.

Статус HER2	Статус топоизомеразы	Частота объективного эффекта
FISH -	Все больные	53%
FISH +	Все больные	46%
FISH +	Аmplифицирован	79%
FISH +	Не изменен	35%
FISH +	Делеция	17%

Одно из первых крупных исследований было представлено Isola и соавт. в 2000 году. В исследовании было включено 303 больных метастатическим раком молочной железы. Гиперэкспрессия в гене HER2, определяемая с помощью метода FISH (иммунофлюоресцентной гибридизации *in situ*), наблюдалась у 17 из 303 больных. Из них 43% имели амплификацию топоизомеразы II, у 41% ген топоизомеразы II отсутствовал и только 16% больных имели нормальную экспрессию топоизомеразы II. Среди 124 больных HER2-отрицательных опухолей (FISH) только у 3-х наблюдалась делеция гена топоизомеразы II и ни у одного не было отмечено амплификации.

При назначении антрациклинов хорошие результаты более ожидаемы, когда в опухоли имеется гиперэкспрессия маркера – топоизомеразы II-альфа [Coop и соавт., 2002; Di Leo и соавт., 2002; MacGrogan и соавт., 2003; Park и

соавт., 2003; Кноор и соавт., 2005; Tanner и соавт., 2006]. Значимое предиктивное значение высокой экспрессии топоизомеразы II альфа в отношении частоты объективных ответов на фоне лечения антрациклинами было выявлено в работах MacGrogan G., 2003; Martin-Richard M. (2004) и Bhargava R. и соавт. (2005).

Исследование, проведенное в Rush University в Чикаго [Coop и соавт., 2000], выявило, что у больных местнораспространенным раком молочной железы, которые получили лечение доксорубицином и доцетакселом, амплификация гена топоизомеразы II альфа была определена в опухолях у трех больных и у всех троих был достигнут полный регресс опухоли после индукционной химиотерапии с включением доксорубицина, в то время как только у 3 из 17 больных без амплификации гена топоизомеразы II в опухоли была достигнута полная регрессия опухоли. Полный регресс опухоли среди больных с HER2-положительным статусом опухоли молочной железы достигнут у 4 из 5 больных, в то время как у больных без гиперэкспрессии HER2 подобный результат был достигнут только у 2 из 15 больных.

В литературе данные о предиктивном и прогностическом значении экспрессии генов топоизомеразы II альфа для больных местнораспространенным раком молочной железы разноречивы.

Бета-тубулины III класса. G. Ferrandina (2006) выявил ответственный белок за чувствительность к препаратам таксанового ряда – бета-тубулин III класса, состоящий из двух субъединиц – α -тубулина и β -тубулина. Препараты таксанового ряда связывают β -тубулин, стабилизируя гуанозиндифосфат – связанную форму бета-тубулина III класса, что приводит к блокировке деполимеризации и стимуляции полимеризации тубулина из-за отсутствия гуанозинтрифосфата. В результате чего происходит остановка клеточного цикла и активация апоптоза [Castaneda C.A., Gomez H.L., 2009]. Важно, что резистентность опухоли к препаратам (таксанам), воздействующим на микротрубочки обусловлена гиперэкспрессией бета-тубулина III класса [Kamath K., 2005; Seve P., 2005; Ferrandina G., 2006; Urano N., 2006].

Rosell R. (2003), Dumontet C. (2005) предположил, что высокая экспрессия бета-тубулина III класса, определённая ПЦР в реальном времени, обладает неблагоприятным прогностическим фактором у больных раком лёгкого. Гиперэкспрессия белка бета-тубулина III класса в опухоли продемонстрировала низкий эффект от лечения паклитакселом при раке яичника и лёгкого [Mozzetti S., 2005; Paradiso A., 2005; Ferrandina G., 2006; Seve P., 2005]. По данным литературы такая же корреляция наблюдается при химиотерапии доцетакселом РМЖ и рака желудка [Hasegawa S., 2003; Miyoshi Y., 2003; Urano N., 2006].

Dumonet и соавт. (2005) изучили прогностическую значимость экспрессии бета-тубулина III класса в опухолях местно-распространённого и метастатического НМРЛ (n=91), получавшие таксаны. Пациенты у которых опухоль экспрессировала низкий уровень бета-тубулина III класса, имели более высокую частоту объективных ответов, более длительное время до прогрессирования и общую выживаемость ($p < 0,001$; 0,004 и 0,002 соответственно).

Исследования С. Burkhart (2001) и S. Mozzetti (2005) при раке яичников, НМРЛ и раке молочной железы показали, что высокий уровень экспрессии бета-тубулина III класса коррелирует с резистентностью опухоли к паклитакселу; а при раке поджелудочной железе к доцетакселу [Liu B., 2001].

Выявление биомаркеров на основе различных технологий, таких как иммуногистохимии, флуоресцентной гибридизации и хромогенных гибридизаций будут играть важную роль в дальнейшем развитии целевой терапии и могут служить ориентиром для назначения индивидуального лечения в онкологии [Проценко С.А., 2012]. Персонализированная медицина, направленная на поиск конкретного лекарственного препарата конкретному больному в соответствии с его генотипом, безусловно, перспективна [Jain K., 2009; Nair S., 2010; Arteaga и соавт., 2012].

Молекулярно-генетические и биологические подтипы РМЖ. В течение многих лет предпринимались различные способы классифицировать рак молочной железы. Попытки сгруппировать РМЖ, основываясь на клиничко-

морфологических характеристиках, оказывались неутешительными. Moll в 1982 г. впервые предложил разделить все карциномы на «люминальные» и «базальные», в зависимости какие цитокератины в них экспрессируются. Dairkee в 1987 г. описал взаимосвязь между ранним рецидивом РМЖ и экспрессией базальных цитокератинов. В 1998 г. Malzahn и соавт. описал, что базальный РМЖ, как правило, эстроген-негативен, низко дифференцированный и имеет плохой прогноз. Применение техники микрочипов для тотального скрининга транскрипционной активности генома раковой клетки позволило подойти к разгадке причин фенотипической гетерогенности опухолей молочной железы. В 2000 г. Перу и соавторы использовали микрочипы, содержащие гибридизационные пробы к 8102 мРНК, для получения индивидуальных экспрессионных профилей опухоли. Благодаря использованию кластерного анализа удалось выделить “внутреннюю панель”, состоящую из 465 генов, которые варьировали между образцами, определяя пять различных экспрессионных паттернов. Исходя из этого, было принято решение все карциномы разделить на несколько молекулярных подтипов: две группы с положительным статусом эстрогеновых рецепторов (ER), относящиеся к люминальным подтипам А и В; группу, экспрессирующую рецепторы HER2; группу, в которой экспрессия генов молочной железы остается в норме, и базальные или “трижды-негативные” опухоли [Sorlie и соавт., 2003; Hu и соавт., 2006; Perou и соавт., 2011].

Доказанность молекулярных подтипов было подтверждено в дальнейших исследованиях. РНК профайлинг карцином *in situ*, также продемонстрировал правомочность этой молекулярной классификации [van der Groep P., 2009].

Классификация экспрессий подтвердил тот факт, что разные подтипы РМЖ не просто имеют отличные друг от друга наборы молекулярных маркеров, но и характеризуются специфической биологией, прогнозом, а также предусматривают индивидуальный подбор терапии. Пациенты с люминальным А подтипом опухоли имеют самую длительную выживаемость; базальный и HER2-позитивный подтип РМЖ характеризуется плохим прогнозом и

наименьшей выживаемостью; люминальный В подтип опухоли занимает промежуточное место. Известно, что молекулярный подтип является независимым прогностическим признаком и с высокой точностью предсказывает эффективность терапии [Parker и соавт., 2009; Tanioka T., 2000].

Знание принадлежности опухоли к определённому биологическому подтипу (люминальный А и В, HER2-экспрессирующий, базальноподобный) лежит в основе выбора лекарственной терапии (химиотерапии, эндокринотерапии, таргетной терапии), а молекулярно генетические характеристики позволяют дать более точный прогноз и уточнить выбор конкретного препарата [Семиглазов В.Ф., 2013; Cheang M., 2009] (таблица 1.4).

Таблица 1.4 – Системное лечение, рекомендованное для подтипов РМЖ (St. Gallen 2013, 2015).

Подтип	Тип терапии
<p>«Люминальный А»: ER и/или PgR (+) (ASCO/CAP); HER2 (-) (ASCO/CAP); Ki 67 < 20%; низкая степень злокачественности</p>	<p>Одна эндокринотерапия (химиотерапия возможна при низкой экспрессии ER/PR и высокой Ki67, большом числе метастатических лимфоузлов, 3-ей степени гистологической злокачественности, выраженной лимфоваскулярной инвазии, большом размере опухоли – Т3). Для постменопаузальных больных нет доказательств о безопасности или эффективности терапии ингибиторам ароматазы более 5 лет.</p>
<p>Пременопаузальные больные низкого риска</p>	<p>Тамоксифен 5 лет</p>
<p>Другие пременопаузальные больные</p>	<p>Тамоксифен 5-10 лет или овариальная супрессия + тамоксифен или овариальная супрессия + экземестан</p>
<p>Постменопаузальные</p>	<p>Тамоксифен 5 лет</p>
<p>«Люминальный В (HER2-негативный)»: ER и/или PgR (+); HER2 (-); Ki 67 > 20%;</p>	<p>Эндокринотерапия +/- химиотерапия</p>

высокая степень злокачественности	
«Люминальный В (HER2-позитивный)»: ER и/или PgR (+); HER2 (+)	Химиотерапия + анти-HER2 терапия + эндокринотерапия)
«HER2 позитивный (нелюминальный)»: ER и PgR отсутств. HER2 (+)	Химиотерапия + анти HER-2 терапия. Антрациклины > таксаны + одновременно трастузумаб в течении 12 месяцев. Пациенты, неподходящие для терапии антрациклинами, могут получать химиотерапию по схеме TCH [Slamon, 2011].
Трижды негативный (дуктальный): ER и PgR отсутств. HER2 (-): HER2 0, HER2 1+, HER2 2+ и FISH (-)	Цитотоксическая химиотерапия, включающая антрациклины и таксаны. Платино-содержащая химиотерапия может рассматриваться у пациентов с BRCA-мутацией.

Люминальный А подтип диагностируется у 30-45% пациентов. Опухоль имеет высокую экспрессию эстрогеновых рецепторов (ESR1), XBP1, FOXA1, GATA3, TTF3, LIV3, HER4, PIK3RI, люминальные цитокератины (KRT 8/18), также имеется экспрессия маркеров ИHC: ER/PR+, HER2-, KRT 8/18+ [Hoadley и соавт., 2007; Walker L.C., Harris G.C., Holloway A.J., 2007; Ha S.A. и соавт., 2011]. Также этот подтип имеет активированный эстрогеновый сигнальный путь и метаболизм жирных кислот. К клинико-патологическим и прогностическим особенностям относятся: эстроген-зависимые опухоли; характерен более поздний возраст больных на момент диагноза, высокая степень дифференцировки и низкий пролиферативный индекс.

Опухоли относящиеся к этому типу менее агрессивны, характеризуется лучшим прогнозом по сравнению с рецептор-негативными раками (Carey и соавт., 2006). Риск развития рецидивов в течение первых 2-х лет у пациентов

люмильного А подтипа снижен, а общая выживаемость выше. Отмечают высокую эффективность гормональной терапии (тамоксифеном и ингибиторами ароматазы). Также весомая доля BRCA2-ассоциированных раков относится к этому Люминальному А подтипу [Parker и соавт., 2009].

Молекулярно-генетические особенности люминального А подтипа: +1q, +16p, - 16q, LOH BRCA2, амплификация 11q13, высокий тотальный уровень метилирования генома и специфически метилированы гены RASSF1, GSTP1, MMP7, PEG10, APC [Melchor L., Benítez J., 2008; Wang H. и соавт., 2010].

По данным литературных источников **Люминальный В подтип** встречается в 14-18% случаев РМЖ. Кластер генов подтипа высоко экспрессирует в опухоли: ESR1, CCNB1, MKI67 (Ki-67), MYBL, CCNE1, ERBB2, GRB7, HRAS. Маркеры ИHC экспрессируют: ER/PR+; HER+; Ki-67 > 13%; активирован HER2 сигнальный путь и пролиферация [Cheang M.C., 2009]. Клинико-патологические и прогностические особенности подтипа: эстроген-зависимый агрессивный рак, молодой возраст больных, низкая дифференцировка, высокий пролиферативный индекс, большой размер опухоли и поражение лимфатических узлов. У больных люминальным В подтипом РМЖ отмечается значительно худший прогноз и большая вероятность рецидивов, чем при других рецептор-позитивных опухолях. В большинстве случаев они не чувствительны к тамоксифену и ингибиторам ароматазы, но обладают чувствительностью к терапии направленной на блок HER2 рецепторов - трастузумабу. Молекулярно-генетические особенности подтипа: имеется амплификация онкогена HER2 и генов 17q ампликона, а также амплификация высокого уровня 8p11-p12, 8q21-q24, 20q13; гиперактивация ключевых промоторов клеточного цикла (например, cyclin E1) и клеточного роста (например, TOP2II) [Melchor L., Benítez J., 2008; Zelco I.N., Mariani T.J., Folz R.J., 2002]. Наивысший тотальный уровень метилирования генома среди всех подтипов; специфически метилированы гены RASSF1, GSTP1, CH13L2 [Holm и соавт., 2010].

Базальный, или «трижды негативный» подтип встречается в 27-39% случаев РМЖ. Гены кластеры, которые высоко экспрессируются в опухоли: онкогены NRAS, KRAS, C-KIT, кадхерин P (CDH3), ламинин альфа/гамма (LAMA5, LAMC1), MCM3/4/7, базальные цитокератины (KRT5/6/17); маркеры ИHC: ER-/PR-; HER2-; CK5/6+, EFGR (HER1)+, cadherin-P+; виментин+; c-kit+ [Livasy и соавт., 2006; Nielsen и соавт., 2004]. Активированные пути – p21, p53, FAS сигнальные пути, фосфорилирование белков, стимуляция клеточного цикла и пролиферации, дифференцировка [Hoadley и соавт., 2007]. Клинико-патологические и прогностические особенности: эстроген-негативные агрессивные опухоли, молодой возраст пациенток, протоковый или метапластический гистологический тип опухоли, низкая дифференцировка опухоли, высокий пролиферативный индекс, большой размер опухоли, поражение лимфатических узлов, ядерный плеоморфизм и некрозы. Базальные опухоли отличаются высокой агрессивностью, большой вероятностью развития местнораспространенных и метастатических форм. У пациенток с базальным РМЖ очень плохие перспективы выздоровления независимо от поражения лимфатических узлов. Выживаемость в этой группе ниже, чем для любого другого молекулярном подтипа, включая HER2-позитивный. Базальноподобный рак чувствителен к стандартным химиотерапевтическим схемам, включая антрациклин и таксансодержащие схемы. Наследственный BRCA1-ассоциированный РМЖ чаще относится именно к этому подтипу [Antoniou и соавт., 2003; Jensen E.V., Jordan V.C., 2003].

Нарушение репаративных систем делает злокачественные клетки уязвимыми для препаратов платины, ингибиторов топоизомеразы I и полиADP-рибополимераз (PARP) [Imyanitov E.N. 2009]. Молекулярно-генетические особенности: высокая частота соматических p53 мутаций, высокий уровень геномной нестабильности, LOH BRCA1; +3q, -3p, -4p, 4q, -5q; PTEN аберрации; инактивация RB; повышенная экспрессия теломеразы; низкий тотальный уровень метилирования генома; специфически ме-

тилированы гены ARHGDIВ, GRB7, SEMA3В [Melchor и соавт., 2008; Holm и соавт., 2010].

На настоящий момент, химиотерапия остается основным методом лечения больных РМЖ с тройным негативным фенотипом, но результаты ее по-прежнему неудовлетворительны. Применение бевацизумаба у больных трижды негативным РМЖ хотя и увеличивает выживаемость без прогрессирования, но не влияет на общую выживаемость. Это обуславливает необходимость поиска маркеров предсказания эффективности ее применения у этих больных, что позволило бы использовать препараты более рационально в целевой популяции больных раком молочной железы. В этом ключе, на инфильтрацию опухоли лимфоцитами (TIL) возлагаются большие надежды.

HER2 (ERBB2) - позитивный РМЖ встречается у 8-15% пациенток. Кластер генов, высоко экспрессирует в опухоли: ERBB2 (HER2), GRB7, HRAS, MEK1/MEK2, AKT1; ИHC маркеры: ER-/PR-; HER2+; Ki-67 > 13%; активирован EGFR/HER2 сигнальный путь, пролиферация [Holm, 2010; Cheang, 2009]. Клинико-патологические и прогностические особенности подтипа – эстроген-независимые агрессивные опухоли с высоким пролиферативным индексом, характерна низкая дифференцировка, большой размер опухоли, вовлечение лимфатических узлов, высокая вероятность метастазирования в висцеральные органы и головной мозг. Высоко эффективно адьювантное назначение трастузумаба. Высокая вероятность негативного исхода диссеминированного заболевания без анти-HER2 биологически направленной терапии [Carey, 2006; Theillet C. 2010]. Молекулярно-генетические особенности: амплификация онкогена HER2 и генов 17q ампликона. +1q, -8p [Melchor L., Benítez J., 2008].

Предоперационная (неoadьювантная) лекарственная терапия. В неoadьювантном системном лечении прежде всего нуждаются больные с местно распространёнными (неоперабельными формами) опухолями (Т3-4N1-2; Т2-3N2-3; Т4N0M0), а также воспалительные формы РМЖ, с целью перевода опухоли из неоперабельной в операбельную. Также кандидатами для прове-

дения предоперационной системной химиотерапии являются пациентки с ранним РМЖ категории T2-3N0-1M0, которым планируется выполнение радикальной мастэктомии, но желающим сохранить молочную железу [Семиглазов В.Ф., 2011].

Применение предоперационной (первичной) химиотерапии позволяет распознать чувствительность к определенному препарату на дооперационном этапе, тем самым улучшить результаты лечения местно-распространенного РМЖ. Данные, полученные на большом количестве пациентов, подтверждают гипотезу о том, что первичная опухоль и микрометастазы имеют сходную чувствительность к химиотерапевтическим препаратам. Поэтому при неэффективности предоперационной системной терапии можно прогнозировать подобный ответ на лечение теми же препаратами в адьювантном режиме [Bonadonna и соавт., 2006; Kaufmann и соавт., 2007].

Кроме уменьшения стадии заболевания и выполнения органосохраняющей операции, целью предоперационной химиотерапии является оценка патоморфологического ответа проводимого лечения, с последующим подбором препаратов для проведения адьювантной терапии [Dowsett и соавт., 2011]. Выбор терапии для конкретного пациента рака молочной железы основан на средних результатах рандомизированных клинических испытаний [Jan Trost Jorgensen et al., 2006]. Выявление факторов, предсказывающих ответ на лечение (predictive factors) остаётся актуальным и по сегодняшний день [Семиглазов В.Ф., 2015].

В ежедневной лечебной практике наиболее часто применяемые режимы основаны на препаратах антрациклинового ряда: FAC (доксорубицин + циклофосфан + 5-фторурацил), FEC (эпирубицин + циклофосфан + 5-фторурацил), CMF (циклофосфан + метотрексат + 5-фторурацил), AC (циклофосфан + доксорубицин), различные режимы монокимиотерапии доцетакселом/паклитакселом, таргетная терапия трастузумабом, гормонотерапия. Однако, несмотря на прогресс в лекарственной терапии местнораспространённого рака молочной железы, результаты лечения остаются недостаточными, а

«золотой стандарт» химиотерапии отсутствует [Семиглазов В.Ф., 2013; 2015].

Современная предоперационная химиотерапия, имеет ряд существенных недостатков, одним из которых является эмпирический выбор ее назначения. Учитывая, что большинство цитостатиков снижает качество жизни больных, а их использование имеет низкий терапевтический эффект, отказ от заведомо неэффективного лечения может быть наилучшим терапевтическим решением [Akiyama S., 2005]. Также не стоит забывать о высокой стоимости современных онкологических препаратов. Разработка маркеров, которые смогут заранее предсказать ответ на химиотерапию поможет снизить частоту побочных эффектов и уменьшить затраты на терапию за счет более обоснованного использования препаратов [Robert и соавт., 2004; Chabner и соавт., 2005; Robert и соавт., 2005]. Знание молекулярно-генетических характеристик опухоли может индивидуализировать выбор цитостатика и уменьшить риск появления побочных эффектов [Jain и соавт., 2004].

Данные, полученные в Объединённом Европейском испытании, продемонстрировали увеличение органосохраняющего лечения с 37% без предоперационного лечения до 65% после проведения 4 курсов неоадьювантной химиотерапии по схеме АТ (доксорубин+паклитаксел) с последующим проведением 4 циклов химиотерапии по схеме CMF ($p < 0,001$) [Gianni и соавт., 2002]. Во Франции в Институте Кюри органосохраняющее лечение было выполнено у 77% и у 82% после проведения неоадьювантной химиотерапии после применения выше указанных схем соответственно [Scholl и соавт., 1994].

В исследовании NSABP B-18 (National Surgical Breast and Bowel Project) с участием 1523 больных ранним РМЖ сравнили неоадьювантную и адьювантную химиотерапии. было включено. Первая группа получила 4 цикла химиотерапии по схеме АС (доксорубин в дозе 60 мг/м^2 и циклофосфамид в дозе 600 мг/м^2 каждые 3 недели) предоперационно, 2-я группа получила химиотерапию по такой же схеме после операции [Fisher и соавт., 2002]. Данные этого исследования охватывает 16-летний период наблюдения

[Rastogi и соавт., 2008]. У 80% больных, получавших предоперационную химиотерапию по схеме AC полный объективный ответ наблюдался у 36% больных. Полный патоморфологический ответ (pCR) отмечен у 13% больных. Кроме того, у большего числа больных после неoadъювантной химиотерапии выполнены органосохраняющие операции (68% против 60%; $p=0,001$), но это не привело к увеличению безрецидивной и общей выживаемости [Wolmark N., 2001]. При более позднем анализе этого исследования было установлено, что у пациенток моложе 49 лет, получивших неoadъювантную химиотерапию, достоверно лучше оказались показатели безрецидивной и общей выживаемости; у пациенток старше 50 лет показатели выживаемости были хуже. По данному исследованию можно предположить, что проведение неoadъювантной химиотерапии может в какой-то степени определяться возрастом [Семиглазов В.В. и соавт., 2009].

В исследовании NSABP B-27 изучался главный вопрос: увеличится ли выживаемость, если добавить таксаны к схеме, включающей антрациклины, больных с операбельным РМЖ. Исследование включало 2411 больных, которые получали 4 цикла неoadъювантной терапии по схеме AC, а затем были разделены на 3 группы в зависимости от последующего лечения: 1-я группа больных – без последующей терапии, 2-я группа далее получила 4 цикла химиотерапии доцетакселом неoadъювантно (100 мг/м^2 каждые 3 недели) и 3-я группа получила 4 цикла химиотерапии доцетакселом адъювантно. Последний анализ охватил 8,5 года наблюдения. Сравнение ответа опухоли на лечение во 2-й группе с 1-й и 3-й группами показало, что добавление доцетаксела улучшило показатели объективного ответа (91% против 86%; $p<0,001$), повысило частоту полного ответа (64% против 40%) и удвоило частоту полного патоморфологического ответа (26% против 14%). Однако отличий выживаемости между группами не выявлено. Статистически достоверное снижение частоты местного рецидива заболевания, наблюдалось в обеих группах, получавших доцетаксел [Smith I.C., 2002].

В классическом исследовании, проведённом A.U. Vuzdar и соавт. (1999), все 174 больные были разделены на 2 группы, 1-я группа получала химиотерапию по схеме FAC, 2-я группа получала монокимиотерапию паклитакселом (250 мг/м^2). Клинический ответ был сравнен между двумя группами, получавшими FAC и паклитаксел ($70,7\%$ против $80,2\%$; $p=0,9$). Полный патоморфологический ответ выявлен у $16,4\%$ больных в группе FAC и у $8,1\%$ получавших паклитаксел при этом 4-летняя безрецидивная выживаемость была одинакова в обеих группах.

В двух исследованиях V. И Dieras соавт. (2004) оценивалась неоадьювантная терапия с использованием комбинации доксорубицина и таксанов. Параллельное исследование доксорубицина в сочетании с паклитакселом (AP) и химиотерапии по схеме AC показало хороший ответ (у 89% и 70% больных соответственно) для обеих схем, но для сравнения эффекта не было достаточно числа больных.

T.R. Evans и соавт. (2005) сравнивали схему AC с комбинацией «доксорубин+доцетаксел» (AT). Достоверных отличий по частоте полного клинического и патоморфологического ответа (24% против 21% ; $p=0,61$) и частоте рецидивирования при наблюдении в течении 32 мес не показало.

Результаты исследований NSABP B-18 и B-27 показали зависимость, заключающуюся в том, что у больных, у которых удалось достичь полного патоморфологического ответа, исход намного благоприятнее в сравнении с пациентками достигших частичный ответ. У больных с полным патоморфологическим ответом достоверно и значительно увеличивались показатели безрецидивной и общей выживаемости ($p<0,0001$).

Исследование GEPAR-trio, включающее 2090 больных, основывалось на том, что первоначально пациентки получали 2 цикла неоадьювантной химиотерапии по схеме TAC (доцетаксел 75 мг/м^2 , доксорубин 50 мг/м^2 и циклофосфамид 500 мг/м^2 каждые 3 недели). Далее после первой оценки эффекта на проведённое лечение больные на основании данных УЗИ были разделены в группы: отвечающие на лечение (уменьшение размера опухоли бо-

лее чем на 50%) и не отвечающие (уменьшение менее на 50%), группа больных, у которых было прогрессирование процесса, исключалась из исследования. Исследование продолжалось в 2 частях, в одной оценивалось изменение терапии у больных, не ответивших на первую линию терапии, в другой – оптимальная продолжительность терапии у ответивших на первую линию терапии. В первой части 622 больных, не ответившие на первичное лечение (TACx2), рандомизированы на 2 группы: 1-я группа получала 4 цикла TAC каждые 3 недели, 2-я группа получала схему NX (винорелбин 25 мг/м² в 1-й 8-й день и капецитабин 1000 мг/м² внутрь 2 раза в день с 1-го по 14-й день) [Vov Minckwitz и соавт., 2008]. Достоверных различий в показателях сонографического ответа для обеих схем не наблюдалось, что подтверждало не меньшую эффективность NX. Показатели полного патоморфологического ответа были низкими как для схемы NX, так и для схемы TAC (6 и 5,3% соответственно). Во второй части испытания 1390 больных, ответивших на 2 цикла химиотерапии по схеме TAC, продолжили получать 4 или 6 циклов химиотерапии по схеме TAC (6–8 суммарно) [Vov Minckwitz и соавт., 2008]. При подведении результатов не было выявлено достоверных различий в показателях полного патоморфологического ответа (8 циклов – 23,5% против 6 циклов – 21,0%; $p=0,68$). Таким образом, чувствительность опухоли к химиотерапии не увеличивается от увеличения количества проведенных циклов химиотерапии.

Одна из самых важных характеристик предоперационной химиотерапии – патоморфологический ответ опухоли (ypT0N0) на проведенное лечение. Полный патоморфологический ответ (ypT0N0) является «суррогатным» маркером улучшения показателей выживаемости больных. По данным Konga X., полный патоморфологический ответ (по Payne Miller V степень) ypT0N0, является благоприятным прогностическим фактором для прогнозирования безрецидивной выживаемости. Также работы L. Esserman, P. Cortazar, G. von Minckwits продемонстрировали те же результаты.

Антрациклин-содержащая комбинированная химиотерапия в качестве первичного системного лечения по данным литературы приводит к высокой частоте клинических частичных и полных ответов, хотя при патоморфологическом исследовании лишь небольшой процент достигает полный регресс опухоли (от 5 до 15%). Но, тем не менее, при комплексном подходе, включающем применение химиотерапии, оперативного лечения и лучевой терапии, удаётся достичь хороших результатов у 79% больных местно-распространённым раком молочной железы [Семиглазов В.В., Топузов Э.Э., 2009].

Таким образом, принимая решение о выборе терапии, клиницисты нуждаются в информации о молекулярно-биологическом портрете данной опухоли. Таким образом, молекулярная классификация опухолей является мощным инструментом для выбора наиболее чувствительной неоадьювантной химиотерапии местно-распространённого РМЖ. В рутинной же клинической практике нашла методика определения «биологических» подтипов РМЖ посредством иммуногистохимического исследования опухоли.

Патоморфологический ответ на предоперационное (неоадьювантное) лекарственное лечение (pCR, ypT0N0M0). Морфологическое исследование опухоли при раке молочной железы до середины 1960-х годов проводили с целью определения ее гистологического строения, а также состояния регионарных лимфатических узлов. Применение неоадьювантной системной терапии при местнораспространённом РМЖ привело к более подробному изучению характеристик опухоли: определение иммуногистохимических показателей и молекулярно-биологических маркеров, а также обязательное определение лечебного патоморфологического ответа - показателя чувствительности опухоли к проведенному лечению. Патоморфологический ответ на лекарственное лечение – это изменения клинических и морфологических характеристик опухоли под воздействием специфического лечения [Раппопорт Я.Л., 1962; Лушников Е.Ф., 1977; Краевский Н.А., 1976]. Оценками эффективности являются: уменьшение размеров опухоли и пораженных лимфатических узлов. Исследование патоморфологического ответа определяется из-

менениями опухоли на клеточном уровне и проявляется апоптозом и дистрофией клеток, а также формированием полей некроза и развитием очагов фиброза и склероза. Субъективный клинический эффект, оцениваемый физикально, зачастую имеет преувеличение [Apple S.K., Suthar F., 2006]. При сравнении полученных данных при физикальном и инструментальном обследовании (ультразвукового исследования, маммографии, магнитно-резонансной томографии, макро- и микроскопической оценок) установлено, что наиболее точным методом является микроскопическая оценка размеров опухоли. Применение других методик имеют склонность к переоценке результатов неoadьювантного лечения. Макроскопическая оценка размеров опухоли сравнима с микроскопической оценкой только в 19 % случаев, в 56 % наблюдений размеры остаточной опухоли преувеличены, а в 25 % – уменьшены [Лисаева А.А. и соавт., 2011].

Множество классификаций лечебного патоморфоза в зависимости от степени морфологических изменений были изучены как отечественными, так и зарубежными авторами. В России основные положения изложены в работах Г.А. Лавниковой (1972), Е.Ф. Лушниковой (1977), Н.А. Краевского (1977). В Великобритании патологоанатомы используют классификацию I.D. Miller и S. Payne (1999), а во Франции конкурируют классификации В. Chevallier (1993) и D.M. Sataloff (1995). Также известны работы S. Akashi-Tanaka et al. (1996), А.Н. Nonkoop et al. (1998), Н.М. Kuerer et al. (1998), I.C. Smith et al. (2000). По данным этих авторов: при I степени изменения в общей структуре опухоли отметить не удастся, прослеживаются лишь несвойственные данному новообразованию полиморфизм и дистрофия клеток, а также подавление митозов; ко II степени относят опухоли, в которых, несмотря на сохранение основной массы опухоли, отчетливо видны очаги регрессивных изменений различного характера при наличии выраженных дистрофических изменений в клетках; к III степени – опухоли, структура которых резко изменена за счет фиброзного замещения, обширного некроза, выраженных в разных опухолях в неодинаковой степени; на этом фоне определяют остатки опухоли в виде

разрозненных групп паренхиматозных клеток, обычно с резкими дистрофическими изменениями; к IV степени патоморфологического ответа относят полное исчезновение элементов опухоли, но иногда могут определяться «следы» опухоли в виде гранул вокруг роговых масс, очагов некроза, лишенных клеточных элементов, или «озер» слизи.

По классификации Е.Ф. Лушникова определены 4 степени лечебного патоморфоза: I степень – изменения на субклеточном и молекулярном уровне, в тканях окружающих опухолевые комплексы, изменения не выражены; II степень – повреждение в основном паренхиматозных элементов опухоли (дистрофические и некробиотические изменения клеток опухоли, нарушения деления клеток с появлением гигантских форм), в строме опухоли – сосудистые изменения, активация клеток соединительной ткани; III степень – нарушение структуры опухоли в результате большой гибели опухолевых клеток (поля некроза, выраженные сосудистые расстройства, разрастание соединительной ткани), но сохраняются опухолевые клетки без повреждений, которые в дальнейшем могут приводить к развитию рецидива опухоли.; IV степень – замещение некротизированной опухолевой ткани соединительной тканью, кистообразование, в окружающих тканях – атрофические, дистрофические и склеротические изменения.

В классификации I.D. Miller и S. Payne выделено 5 степеней патоморфологического ответа на лекарственное лечение. В этой классификации учитываются изменения в клеточности опухоли по сравнению с материалом, полученным при выполнении трепан-биопсии до начала лечения. Патоморфолог при оценке патоморфологического эффекта имеет возможность прицельно изучить структуру первичной опухоли и более точно подойти к оценке лечебного патоморфоза [Miller I.D. и соавт., 2002].

В. И Chevallier соавт. в своей классификации (1993) выделили 4 класса патоморфологических изменений, но, в отличие от других классификаций, классы пронумерованы в обратном порядке: класс 1 (Ch1) — полное исчезновение опухолевых клеток в ткани молочной железы и лимфатическом узле;

класс 2 (Ch2) — наличие рака *in situ* в молочной железе, в лимфатическом узле опухолевые клетки не определяются; класс 3 (Ch3) — инфильтративный рак на фоне повреждения стромы (склероз, фиброз стромы); класс 4 (Ch4) — отсутствие изменений или незначительные изменения в опухоли [Chevallier В. и соавт., 1993].

По классификации D.M. Sataloff et al. (1995) полное исчезновение опухолевых клеток и рак *in situ* объединены в одну группу – полного или почти полного морфологического эффекта. В этой классификации проанализированы изменения выявленные в ткани молочной железы и лимфоузлах. В работе проводили сравнение лечебных (клинических) изменений с морфологическими изменениями в опухоли и лимфатическом узле, в классификации представлены данные клинического и морфологического эффектов [Sataloff D.M. и соавт., 1995]. В ткани молочной железы: 1) T–A – полный или почти полный лечебный эффект, свидетельствующий о наличии минимальной остаточной опухоли (рассеянные опухолевые клетки на площади < 5 % ложа опухоли при обязательной оценке всей опухолевой поверхности или оценке > 15 полей зрения), но клетки могут быть рассеяны или сгруппированы; в лимфатическом узле: отсутствие признаков метастатического поражения, выраженный лечебный эффект; 2) T–B – лечебный эффект > 50 %; в лимфатическом узле – отсутствие признаков метастатического поражения и лечебного эффекта; 3) T–C – лечебный эффект < 50 % в л/у наличие признаков метастатического поражения лечебный эффект не выражен; 4) T–D – отсутствие лечебного эффекта; метастазы в лимфатическом узле без признаков патоморфологического ответа.

Сравнение классификаций D.M. Sataloff и В. Chevallier было проведено в работе F. Penault-Llorca et al. [Penault-Llorca F. И соавт, 2008, 2009] на 710 больных, получивших неоадьювантную полихимиотерапию по поводу местно-распространённого РМЖ. Внутри каждой классификации осуществляли сравнение отдаленных результатов между группой с полным и почти полным морфологическими эффектами (Ch 1 + 2 и Sa A) и группой с неполным мор-

фологическим эффектом или с незначительными изменениями в опухоли (Ch 3 + 4 и Sa B + C + D). Продемонстрированы значительные различия в показателях общей и безрецидивной выживаемости. Однако при сравнении отдаленных показателей внутри группы больных (Ch 1 + 2 и Sa A), где был достигнут полный патоморфологический эффект (ypT0N0 – без опухолевых клеток в молочной железе и лимфатическом узле), и группой, у которой был получен почти полный патоморфологический эффект (рак *in situ* в опухоли и лимфатическом узле), значимых различий в показателях общей и безрецидивной выживаемости не обнаружено. Таким образом, наличие рака *in situ* после неoadьювантного лечения при условии проведения адекватного адьювантного лечения не влияет на отдаленные результаты.

Согласно классификации А.Н. Honkoop et al. (1998) выделяют 3 варианта морфологического ответа: полный (ypT0N0) – при макро- и микроскопическом изучении ткани молочной железы и лимфатических узлах не выявлено признаков остаточной инвазивной опухоли; частичный - макроскопически опухоль не определяется, но при микроскопии обнаружены рассеянные фокусы клеток; диффузный – микроскопически опухоль не определяется, но имеется обширная инфильтрация ткани [Honkoop А.Н. и соавт., 1997].

R. Burcombe и соавт. (2005) отказались от указанных выше классификаций, мотивируя это отсутствием общепринятой схемы, и предложили свой вариант оценки патоморфологического ответа опухоли: полный ответ – отсутствие остаточной инвазивной опухоли; частичный ответ – остаточная инвазивная опухоль с явлениями патоморфоза (увеличенные клетки с вакуолизированной цитоплазмой, увеличенные пористые ядра с выступающим эозинофильным ядрышком, увеличенные гиперхромные ядра с неровными контурами); стабилизация болезни – инвазивная опухоль без признаков морфологических изменений.

W. Symmans и соавт. (2007), предложили искусственный критерий – RCB (Residual Cancer Burden — ложе остаточной опухоли), позволяющий предсказывать БРВ на основании измерения остаточной опухоли (двухмерные показате-

тели с учетом возможной асимметрии опухоли), клеточности опухоли (по классификации Miller–Payne), наличия рака *in situ*, а также числа и размера пораженных ЛУ. Критерий RCB рассчитывается по формуле с помощью калькулятора (Residual Burden Calculator) на сайте M.D. Anderson Cancer Center, где также можно отнести полученный результат к одной из 3 групп (RCB I, II, III), каждая из которых соответствует низкому, промежуточному и высокому риску развития отдаленных метастазов [Kaufmann M. и соавт., 2006].

Объективный клинический ответ традиционно считается значимым фактором прогноза РМЖ, хотя в исследовании NSABP-B18, посвященном изучению неoadъювантной ХТ, было продемонстрировано, что объективный ответ предсказывает БРВ, но не ОВ [Fisher E.R. и соавт 1997; 2002].

В работе Н.А. Огнерубова (1992) получены результаты ОВ и БРВ в зависимости от патоморфологического ответа. Полная регрессия опухоли (IV степень по Г.И. Лавниковой) сопровождалась максимальными показателями ОВ: 3-, 5-, 10- и 15-летняя выживаемость у пациенток этой группы составила 100%; 92,3%; 83,1% и 83,1% соответственно, а при слабовыраженном патоморфологическом ответе общая выживаемость на аналогичных сроках достигала 57,8%; 42,3%; 28,7% и 28,7% соответственно. Аналогичная тенденция прослеживалась и в отношении бессобытийной выживаемости: при полном патоморфологическом ответе показатели 3-, 5- и 10-летней выживаемости составили 85,6%; 76,1% и 76,1%, при слабом – 42,9%; 33,7% и 28,7%. Различия в показателях между полной регрессией опухоли и слабым, а также умеренным патоморфозом были статистически значимы. Медиана общей выживаемости при отсутствии опухоли в препарате не определялась, при слабом патоморфологическом ответе она достигала всего 44,9 месяцев.

Таким образом, несмотря на большое сходство представленных классификаций, в патоморфологической оценке эффекта от лечения нет общепринятых международных стандартов. Поэтому FDA на основании результатов мета-анализа 12 клинических исследований было принято определение

полного патоморфологического ответа как pT0pN0 или pT0/ispN0 (возможно наличие протоковый карциномы in situ) [Cortazar и соавт., 2012].

Современная предоперационная химиотерапия, имеет ряд существенных недостатков, одним из которых является эмпирический выбор ее назначения. Учитывая, что большинство цитостатиков снижает качество жизни больных, а их использование имеет низкий терапевтический эффект, отказ от заведомо неэффективного лечения может быть наилучшим терапевтическим решением. Также не стоит забывать о высокой стоимости современных онкологических препаратов. Исследование же экспрессии предиктивных маркеров осуществляется в лаборатории при помощи иммуногистохимической или полимеразной реакции (ПЦР) соответствующих транскриптов [Watters J. и соавт., 2003; Sui W. и соавт., 2014].

Все выше изложенное и определило актуальность настоящего исследования, направленного на выявление молекулярных маркеров. Это позволит назначать «правильное лечение для правильного больного» с учетом чувствительности опухоли к лекарственным препаратам.

Глава 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Характеристика больных

Материалом для настоящего исследования послужили данные архива медицинской документации (истории болезни и амбулаторные карты) больных местно-распространённым раком молочной железы, которые проходили лечение в ФГБУ «НИИ онкологии им. проф. Н.Н. Петрова» Минздрава России с 2010 по 2014 гг. Медиана наблюдения за больными составила 2,7 года при максимальной прослеженности за больными 4,5 года. Больные были рандомизированы в группы, получающие неоадьювантную химиотерапию по схемам ТАС или ТС 4-6 курсов. Возраст больных составил $49,1 \pm 10,8$ (с колебаниями от 27 до 78) лет. Во всех случаях диагноз рак молочной железы был верифицирован гистологически.

Больные, включённые в исследование, согласно рандомизации в первой группе получали 4–8 циклов (в среднем 4-6 циклов) химиотерапии по схеме ТАС (доцетаксел 75 мг/м^2 , доксорубин 50 мг/м^2 , циклофосфамид 500 мг/м^2) 1 раз в 3 недели; во второй группе получали 4–8 циклов (в среднем 4–6 циклов) химиотерапии по схеме ТС (доцетаксел 75 мг/м^2 , циклофосфамид 600 мг/м^2) 1 раз в 3 недели на фоне стандартной пре- и постмедикации дексаметазоном (суммарная доза 48 мг). Больным HER2+ РМЖ одновременно с химиотерапией назначалась таргетная терапия трастузумабом в стандартных дозах. При отсутствии объективного ответа (частичного или полного регресса) на фоне проведения химиотерапии по схеме ТС больные переводились в группу ТАС (cross-over).

Все группы больных сопоставимы по клиническим, патоморфологическим и биологическим характеристикам (таблица 2.1.1, таблица 2.1.2).

Таблица 2.1.1 – Характеристика больных местно-распространённым РМЖ с учётом «биологических» подтипов

Биологический подтип	Общая группа (n=141)			ТАС (n= 82)			ТС (n= 59)			p
	n	%	95% ДИ	n	%	95% ДИ	n	%	95% ДИ	
Люминальный А	59	41,8	33,8–50,1	32	39,0	28,7–49,9	27	45,8	33,1–58,7	0,43
Люминальный В	30	21,3	14,9–28,5	19	23,2	14,6–33,0	11	18,6	9,7–29,7	0,51
HER2-позитивный	21	14,9	9,5–21,3	13	15,9	8,7–24,6	8	13,6	6,0–23,6	0,70
Трижды негативный	31	22,0	15,5–29,2	18	22,0	13,6–31,6	13	22,0	12,3–33,7	0,99

Таблица 2.1.2 – Характеристика больных местно-распространённым РМЖ с учётом экспрессии молекулярных маркеров

Экспрессия молекулярных маркеров	Общая группа (n=141)			ТАС (n= 82)			ТС (n= 59)			p
	n	%	95% ДИ	n	%	95% ДИ	n	%	95% ДИ	
Экспрессия бета-тубулинов III класса (n=140)										
высокая	61	43,6	35,4-51,9	36	44,4	33,7-55,5	25	42,4	29,9-55,4	0,81
низкая	79	56,4	48,1-64,6	45	55,6	44,5-66,3	34	57,6	44,6-70,1	
Экспрессия топоизомеразы II альфа (n=137)										
высокая	73	53,3	44,8-61,6	44	55,7	44,5-66,6	29	50,0	37,0-63,0	0,51
низкая	64	46,7	38,4-55,2	35	44,3	33,4-55,5	29	50,0	37,0-63,0	
Детекция мутации гена BRCA1 (n=141)										

2.2 ОБСЛЕДОВАНИЕ БОЛЬНЫХ

2.2.1 Гистологическое исследование

У всех больных был морфологически доказанный рак молочной железы. Трепан-биопсия опухоли молочной железы выполнялась на этапе скрининга, а по завершению неoadьювантной химиотерапии проводилось исследование операционного материала.

При мультифокальном или мультицентричном росте опухоли исследовали фрагменты всех макроскопически визуализируемых опухолевых узлов,

в случае если опухолевый узел отчётливо не определялся, то брали не менее 2 фрагментов ткани из каждой области подозрительных на опухоль. Все края опухоли были исследованы на наличие инвазивного рака или рака *in situ*, если края резекции не маркированы то исследовали микроскопически ближний край резекции. Отмечалось расположение опухолевого узла в ткани молочной железы, её размеры, гистологический тип инвазивного рака, наличие дуктального или долькового рака *in situ*, инвазия в кожу или мышцу, размеры краёв резекции, поражение лимфатических узлов, лечебный патоморфоза на проведённое предоперационное лечение.

Оценка материала

Описывали молочную железу или сектор молочной железы с регионарными лимфатическими узлами или без них, также обязательно отмечали наличие фрагментов скелетной мышцы.

Оценка обнаруженных опухолевых узлов

Обнаружение более 1 опухолевого узла в исследуемом препарате свидетельствует о мультифокальном и мультицентричной форме РМЖ, что является неблагоприятным прогностическим фактором. К мультифокальному росту опухоли относят очаги инвазивного рака, расположенные на расстоянии < 5 см друг от друга, а мультицентрическому – расположенные на расстоянии > 5 см. В случае мультифокального роста участки инвазивного роста часто имеют схожее биологическое строение (RE, RP, HER2, Ki-67), а при мультицентрическом – они различные. Стадирование опухоли pT осуществляли по размеру большего узла, при оценке поражения лимфоузлов N учитывали общее количество поражённых лимфатических узлов.

Расположение опухолевого узла

Оценка расположения опухолевого узла осуществлялась при помощи разделения молочной железы на квадранты: верхний наружный, нижний наружный, верхний внутренний, нижний внутренний, центральная зона, сосок.

Размер наибольшего опухолевого узла

При макроскопическом описании в обязательном порядке измеряли наибольший размер опухоли с точностью до миллиметров, который является важным прогностическим признаком. В случае мультифокального или мультицентричного роста, размеры узлов не суммировались. При наличии в опухолевом узле рака *in situ*, при установлении стадии заболевания учитывали размер инвазивного компонента. Если же достигался полный патоморфологический регресс опухоли, размер опухолевого узла не указывался, а стадию устанавливали pT0 или pTis (при наличии резидуального рака *in situ*).

Оценка гистологической формы инвазивного рака

При исследовании послеоперационного материала принципиальное значение имело выявление долькового и протокового рака *in situ* с микроинвазией.

Наличие инвазии кожи и скелетной мышцы

Распространение первичной опухоли на кожу описывали при изучении макропрепарата (опухоль врастает в дерму и эпидермис без изъязвления кожи (не влияет на pT); опухоль врастает в эпидермис кожа с изъязвлением (pT4b), если нет прорастания опухоли в грудную клетку (pT4c), отёчно-инфильтративная форма (pT4d); в случаях мультифокального роста, если один из узлов инвазивного рака врастает в кожу (pTb); наличие в лимфатических сосудах опухолевых эмболов, а также при клинически имеющихся признаках отёчно-инфильтративного рака (pT4d).

При наличии врастания в большую и малую грудные мышцы стадию не изменяли.

Оценка краев резекции

После радикальной мастэктомии или органосохраняющей операции обязательно проводили оценку краёв репарата. Хирурги маркировали края резекции шовным материалом, расположенным на поверхности фрагмента молочной железы. При вырезке патологоанатом повторно маркировал края макропрепарата красителем. Позитивный край препарата – окрашивался кра-

сителем опухоли, пораженные края в обязательном порядке были отражены в заключении. В случае, когда удавалось получить перпендикулярные срезы в отношении к поверхности края препарата, в заключении указывалось расстояние от опухоли до ближайшего края препарата. Следует отметить, что протоковый рак *in situ* распространяется по протокам, поэтому при близком прилегании опухоли к негативному краю имеется риск наличия поражения в неудалённой ткани молочной железы.

Поражение лимфатических узлов

При описании лимфатических узлов указывали количество исследованных и количество поражённых лимфатических узлов. Поражённые лимфатические узлы подразделяли на: макрометастазы (очаг > 2 мм) и микрометастазы (0,2–2,0 мм или > 200 клеток). В случае обнаружения только микрометастазов, в категории N обозначали как pN1mi.

Оценка степени злокачественности опухоли по Ellison-Elston

Степень злокачественности опухоли оценивалась по *Ellison-Elston*: G1 степень злокачественности – низкая, G2 степень злокачественности промежуточная – умеренная, G3 степень злокачественности – высокая (таблица 2.2.1.1).

Таблица 2.2.1.1 – Оценка степени злокачественности опухоли по Ellison-Elston

Признак	Баллы
Тубулярное строение: Большое количество (> 75%) Умеренное (10-75%) Мало или ни одного (< 10%)	1 2 3
Ядерный плеоморфизм: Слабо выраженный полиморфизм клеток Средне выраженный полиморфизм клеток Выраженный полиморфизм клеток	1 2 3
Подсчёт митозов: Зависит от микроскопа (Nikon Labophot) 1 балл (0-5 митозов) 2 балла (6-10 митозов) 3 балла (>11 митозов)	1 2 3

В зависимости от подсчёта баллов определялась степень злокачественности опухоли:

3–5 баллов: G1 степень злокачественности;

6–7 баллов: G2 степень злокачественности;

8–9 баллов: G3 степень злокачественности.

Примеры опухолей разной гистологической степени злокачественности представлены на рисунках 2.2.1.1.–2.2.1.3.

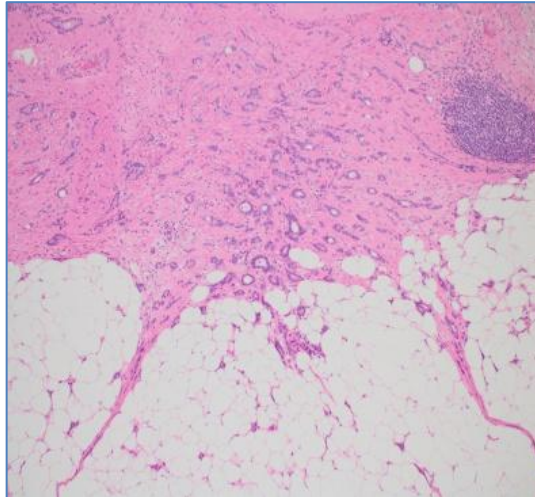


Рисунок 2.2.1.1 – Гистологическая степень злокачественности G1 (> 75% трубочек с просветом – 1 балл; мелкие круглые ядра с неразличимыми ядрышками – 1 балл, малое число митозов – 1 балл. Сумма баллов 3).

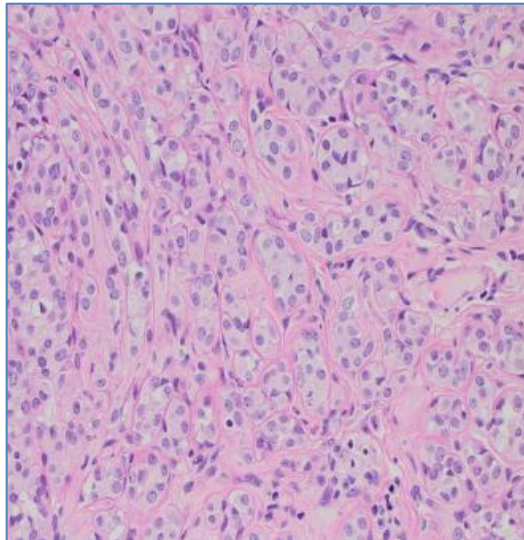


Рисунок 2.2.1.2 – G2 степень злокачественности (отсутствие тубулярных структур – 3 балла; ядра среднего размера с мелкими ядрышками – 2 балла; небольшое число митозов на 10 полей зрения -1 балл. Сумма 6 баллов)

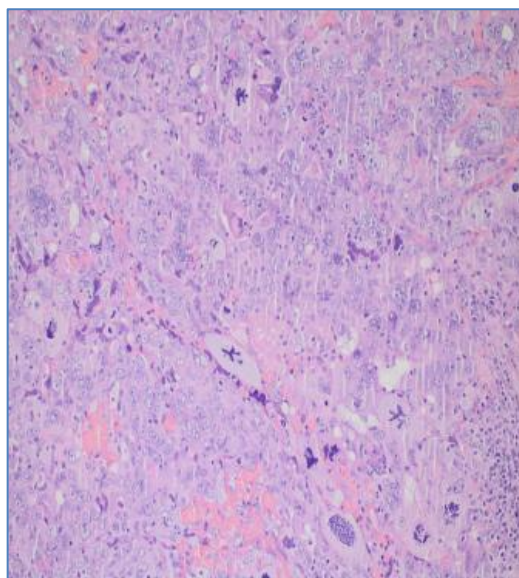


Рисунок 2.2.1.3 – G3 степень злокачественности (отсутствие тубулярных структур – 3 балла, крупные ядра с крупными ядрышками – 3 балла; большое число митозов – 3 балла. Сумма 9 баллов).

Определение пролиферативной активности

Митотическая активность оценивалась в инвазивном компоненте опухоли при выявлении четкой картины метафазы, анафазы и телофазы. Однако выявление митозов при исследовании операционного и биопсийного материала в значительной степени зависит от стандартизации преаналитического этапа, особенно на этапе фиксации материала. Так, задержка времени фиксации материала на 30 мин приводит к уменьшению числа выявляемых митозов почти на 20 %, а задержка более чем на 1 час – на 50 % [Филатов А.В., 2009]. Подсчёт митотической активности на гистологических срезах (рисунки 2.2.1.4-2.2.1.6) рака молочной железы проводился в 10 полях зрения [Омельчук Н.Н., Волкова Л.В., 2014].

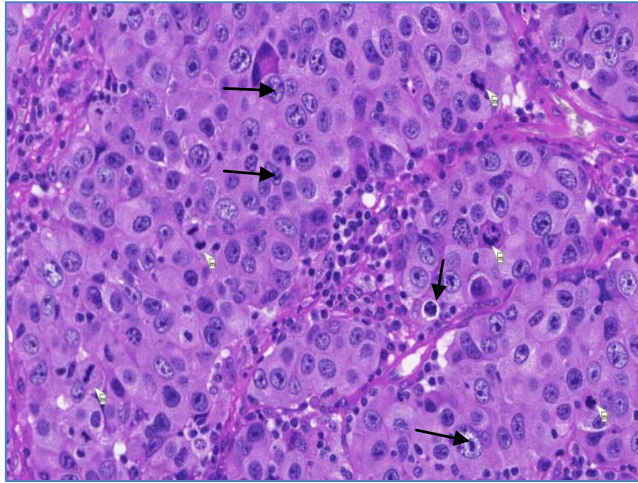


Рисунок 2.2.1.4 – Митозы в опухоли (70 на 10 полей зрения) указаны стрелками. Окраска гематоксилин и эозином, х40.

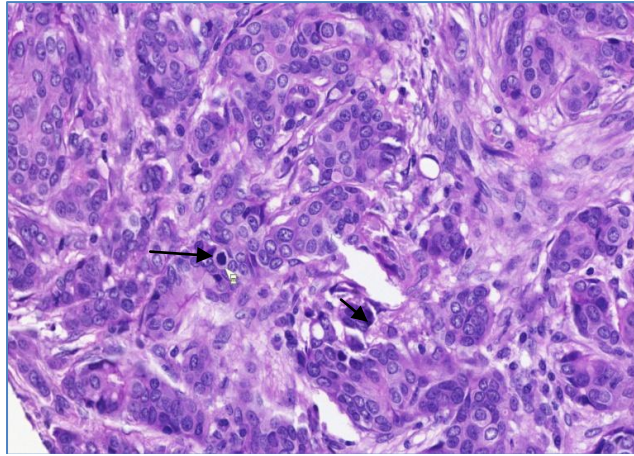


Рисунок 2.2.1.5 – Митозы в опухоли (10 на 10 полей зрения) указаны стрелками. Окраска гематоксилин и эозином, х40.

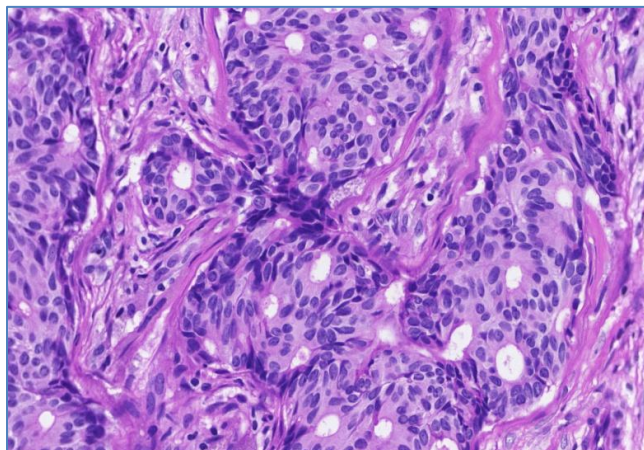


Рисунок 2.2.1.6 – Митозы в опухоли (0 на 10 полей зрения). Окраска гематоксилин и эозином, х40.)

Было проведено исследование морфологических особенностей первичного очага и регионального метастатического компонента при местнораспространенном РМЖ у 35 пациенток. При этом учитывали число митозов клеток, долю тубулярных и протоковоподобных структур, клеточный полиморфизм. При изучении гистологической характеристики было установлено, что в 85 % наблюдений это был инфильтрирующий протоковый рак. Медулярный и инфильтрирующий дольковый раки встречались значительно реже. Морфологически в ткани молочной железы и пораженных аксиллярных лимфатических узлах после проведения неoadьювантной химиотерапии наблюдались единичные тубулярные и протоковоподобные структуры, преобладал солидный тип строения, нарастал клеточный полиморфизм, количество митозов: более 10, но менее 20 митозов в 10 полях зрения отмечалось у 15 пациенток (10,4 %); более 20 митозов в 10 полях зрения – у 20 (14,1 %). Все это является свидетельством опухолевой прогрессии. Также было отмечено, что метастазы в подмышечных лимфоузлах значительно менее подверглись терапевтическому воздействию. Зафиксировано большое количество митозов в поражённых лимфатических узлах, что говорит об меньшем эффекте патоморфологического ответа даже I степени и устойчивости к химиотерапии регионарных лимфатических узлов.

2.2.2 Патоморфологическая оценка степени регресса опухоли молочной железы и лимфатических узлов.

Оценка степени патоморфологического регресса проводилась по классификации Miller I., Payne S., 2002. Примеры оценки в соответствии с этой классификацией представлены на рис. 2.2.2.1–2.2.2.4.

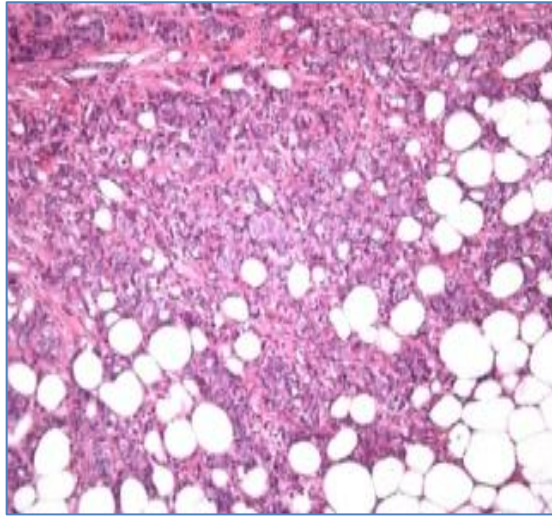


Рисунок 2.2.2.1 – 1-я степень - малозаметные изменения отдельных опухолевых клеток без уменьшения их числа.

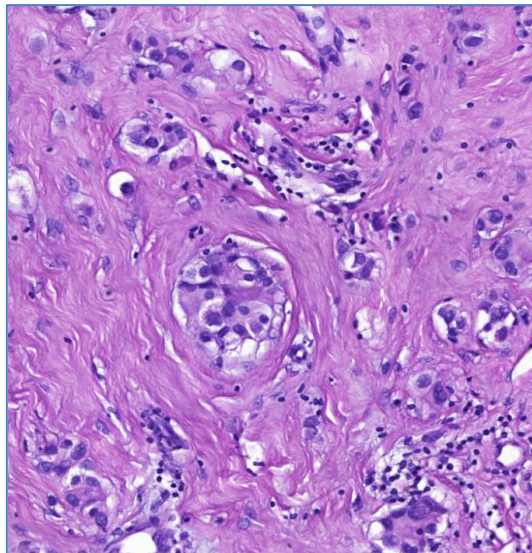


Рисунок 2.2.2.2 – 2-я степень – незначительное уменьшение количества инвазивных опухолевых клеток, но в целом клеточность остается высокой.

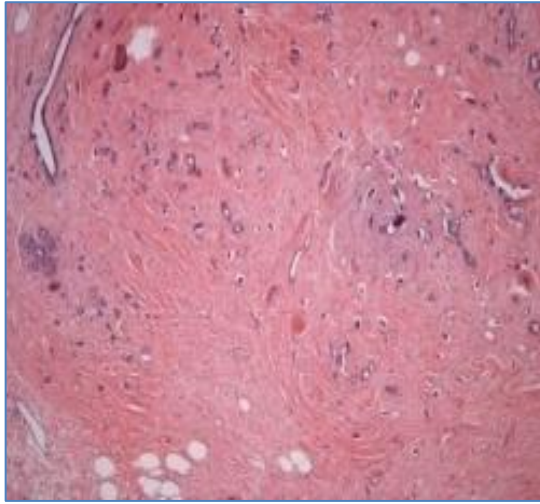


Рисунок 2.2.2.2 – 3-я степень – сокращение числа опухолевых клеток вплоть до 90%.

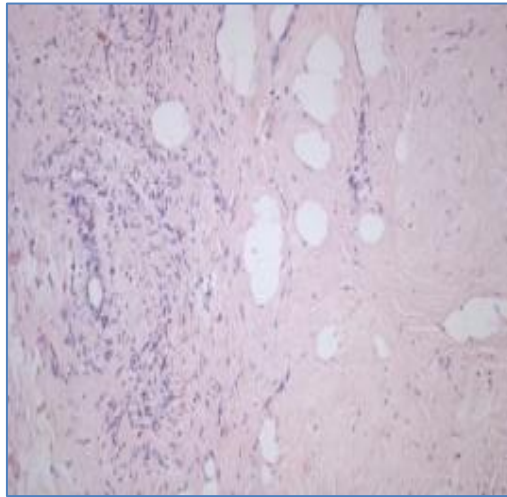


Рисунок 2.2.2.3 – 4-я степень – выраженное (явное) исчезновение инвазивных клеток. Определяются лишь широко рассеянные небольшие гнезда клеток.

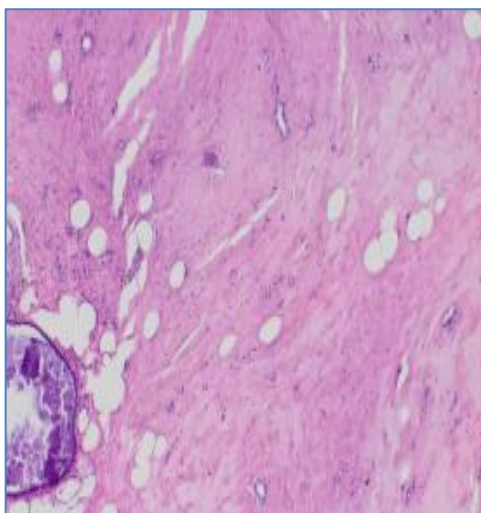


Рисунок 2.2.2.4 – 5-я степень – нет определяемых инвазивных клеток в секционных срезах из места расположения первичной опухоли или может присутствовать протоковая карцинома *in situ*.

2.2.3 Иммуногистохимический анализ

Экспрессия ER и PR выполнялась полуколичественным иммуногистохимическим методом. Гиперэкспрессия белка HER2 определяется иммуногистохимическим методом [Zabrecky и соавт., 1991].

Иммуногистохимическое исследование определения первичных антигенов к рецепторам эстрогена и прогестерона HER2 и Ki-67 проводилось в парафиновых срезах толщиной 3 мкм. Осуществляли прогревание в термостате при температуре 60⁰С в течение 30–60 минут. Далее проводили депарафинизацию в кислоте (3 минуты × 2), абсолютном спирте (3 минуты × 2), 96⁰ этиловом спирте (3 минуты × 2) с последующим блокированием эндогенной пероксидазой в 3% перекиси на воде, после чего промывали в дистиллированной воде (3 минуты). Восстановление активности антигенов проводили путём кипячения в ЭДТА буфере (рН 9,0) в водяной бане (Рт – линк ДАКО). Стёкла со срезами помещали в контейнер с буфером, прогретый предварительно до температуры 85⁰ С, далее включали нагрев. Демаскировка проводилась для определения рецепторов эстрогена и прогестерона, а также Ki-67 в Трис-эдта буфере рН 9,0, а для HER-2 – в цитратном буфере рН 6,0 при температуре 96–98⁰ С в течение 30 мин. Стёкла переносили в дистиллированную воду на 1–2 минуты, промывали в TBS и оставляли в TBS до нанесения первых анти-

тел. Инкубация с первичными антителами (30 минут при комнатной температуре), разведенными Antibody diluents (DAKO). Для определения рецепторов эстрогена использовали NCL-L-ER-6F11-антитело в разведении 1:50 (LEICA); рецепторов прогестерона – NCL-L-PGR-312-антитело в разведении 1:50 (LEICA); Ki-67 – использовали SP6-антитело в разведении 1:100 (Neo Markers); HER-2 – использовали cerbB-2 oncoprotein-антитело в разведении 1:400 (DAKO). Инкубация с Envision mouse/rabbit (30 минут при комнатной температуре), после чего промывали в TBS (2 раза по 5 мин). Реакция с DAB (3–5 мин под контролем микроскопа при комнатной температуре). Рабочий раствор DAB готовили путём добавления к 1 мл буфера 1 капли концентрированного хромогена по инструкции. Далее смывали хромоген дистиллированной водой в течение 3 минут, после чего докрашивали ядра гематоксилином в течение 2-х минут и подсинивали в проточной воде под контролем микроскопа. Обезвоживали и заключали в бальзам.

Иммуногистохимический анализ уровня рецепторов эстрогенов

Полуколичественную оценку иммуногистохимического определения рецепторов стероидных гормонов проводили по D.C. Allred и соавт. (1998) (таблица 2.2.3.1), примеры представлена на рисунках 2.2.3.1–2.2.3.2

Таблица 2.2.3.1 – Полуколичественная оценка иммуногистохимического определения рецепторов стероидных гормонов [D.C. Allred и соавт., 1998]

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

Интегральный показатель степени экспрессии рецепторов стероидных гормонов определяет сумма баллов, отражающих долю окрашенных клеток и интенсивность окраски. Эстроген позитивными опухоли считаются при сумме баллов 3 и более.

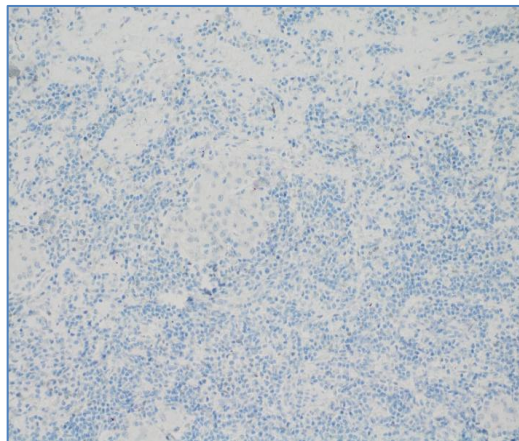


Рисунок 2.2.3.1 – Иммуногистохимический анализ уровня рецепторов эстрогенов – 0 баллов (отсутствие коричневого ядерного окрашивания).

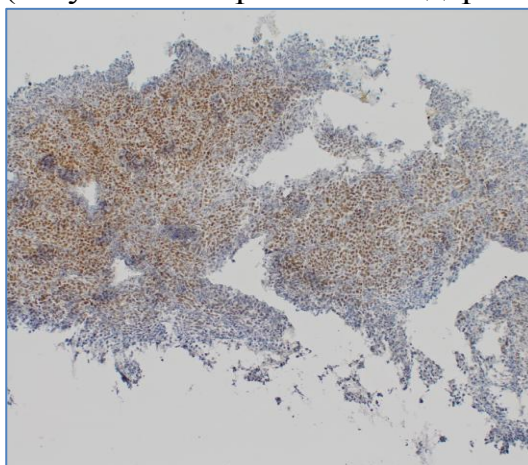


Рисунок 2.2.3.2 – Иммуногистохимический анализ уровня рецепторов эстрогенов – 8 баллов (коричневые ядра более 2/3 опухолевых клеток).

Иммуногистохимический анализ уровня рецепторов прогестерона

На рисунках 2.2.3.3 и 2.2.3.4 представлены варианты иммуногистохимического анализа уровня рецепторов прогестерона – 0 баллов (отсутствие коричневого ядерного окрашивания) и 8 баллов (коричневые ядра более 2/3 опухолевых клеток).

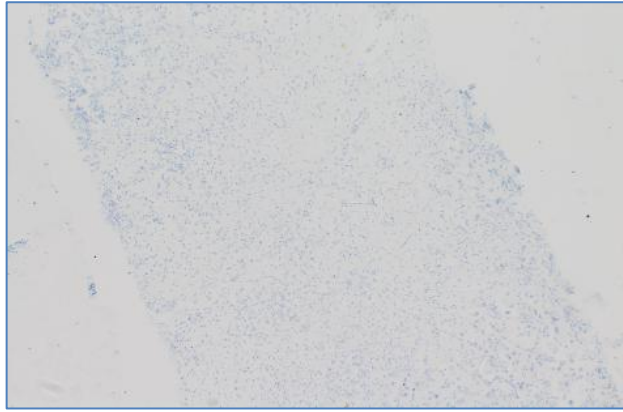


Рисунок 2.2.3.3 – Иммуногистохимический анализ уровня рецепторов прогестерона – 0 баллов (отсутствие коричневого ядерного окрашивания)

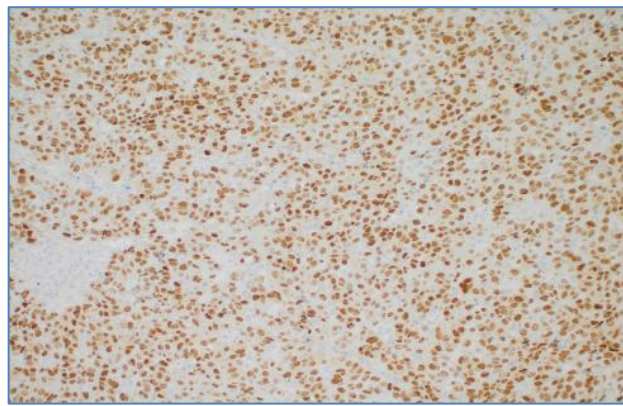


Рисунок 2.2.3.4 – Иммуногистохимический анализ уровня рецепторов прогестерона – 8 баллов (коричневые ядра более 2/3 опухолевых клеток).

Иммуногистохимический анализ уровня рецепторов эпидермального фактора роста 2-го типа (HER2)

Рак молочной железы, в котором выявляется экспрессия HER2, должен отвечать всем пороговым критериям для оценки интенсивности и типа окрашивания мембран клетки (3+ по шкале от 0 до 3+) и процента позитивных опухолевых клеток. Окрашивание должно быть локализовано на мембране и полностью повторять её контур. Иммунное окрашивание может быть представлено и в цитоплазме, однако такой вид реакции не учитывается при оценке HER2-статуса опухоли (таблица 2.2.3.1, рисунки 2.2.3.5–2.2.3.10).

Таблица 2.2.3.1 – Критерии оценки интенсивности и типа иммунного окрашивания мембраны опухолевых клеток рака молочной железы

Характер окрашивания	Оценка в баллах (указывается в заключении)	Оценка HER2 статуса
Отсутствие мембранного окрашивания или наличие слабого окрашивания менее 10% опухолевых клеток	0	негативный
Слабое мембранное окрашивание более 10% опухолевых клеток	+1	негативный
Умеренное мембранное окрашивание более 10% опухолевых клеток или сильное мембранное окрашивание менее 10% опухолевых клеток	+2	неопределённый (рекомендуется провести гибридизацию <i>in situ</i>)
Сильное полное окрашивание мембран более 30% опухолевых клеток	+3	позитивный

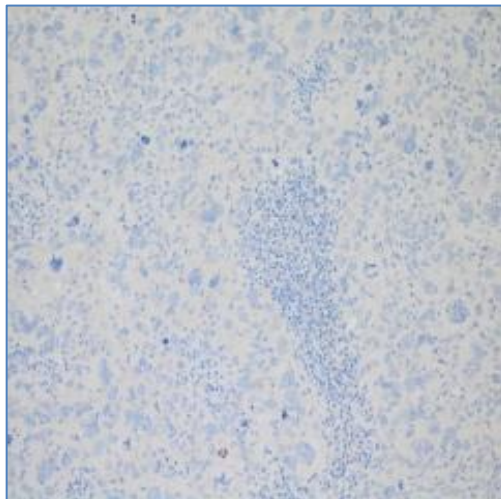


Рисунок 2.2.3.5 – Иммуногистохимический анализ уровня рецепторов эпидермального фактора роста 2-го типа (HER2 [0] отсутствует мембранное окрашивание опухолевых клеток).

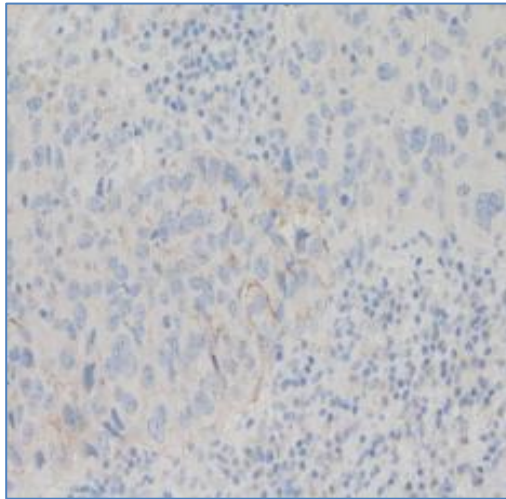


Рисунок 2.2.3.6 – Иммуногистохимический анализ уровня рецепторов эпидермального фактора роста 2-го типа (HER2 [1+]: слабое неполное мембранное окрашивание опухолевых клеток 10% и более).

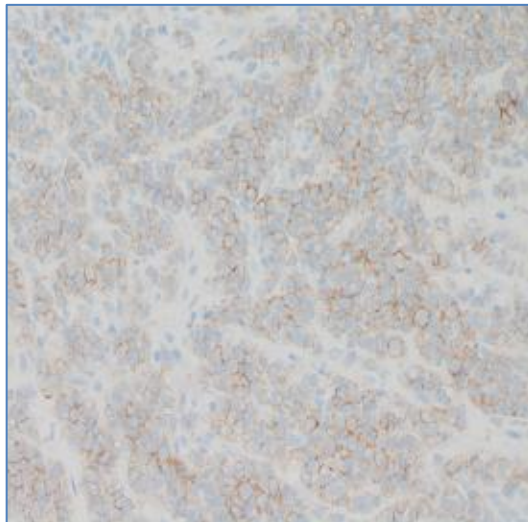


Рисунок 2.2.3.7 – Иммуногистохимический анализ уровня рецепторов эпидермального фактора роста 2-го типа (HER2 [2+]: очерченное неполное мембранное окрашивание слабое и умеренное более 10% опухолевых клеток или полное интенсивное мембранное окрашивание $\leq 10\%$).

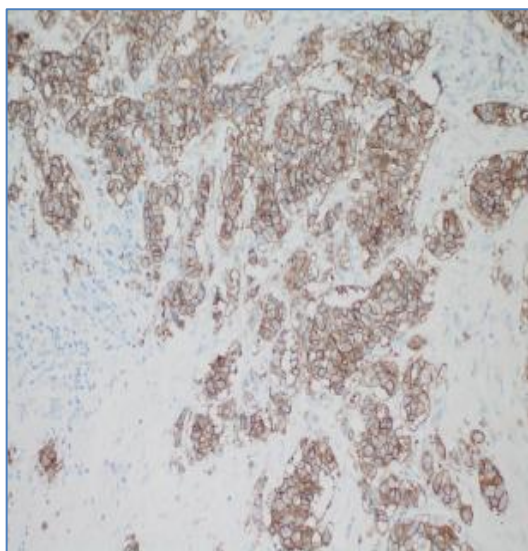


Рисунок 2.2.3.8 – Иммуногистохимический анализ уровня рецепторов эпидермального фактора роста 2-го типа (HER2 [3+]: выраженное полное мембранное окрашивание >10% опухолевых клеток).

При так называемой «серой зоне», когда оценка HER2 составила +2, проводили дополнительный подсчёт числа копий. Амплификация гена HER2 проводилась при помощи метода флуоресцентной гибридизации *in situ* (Fluorescent In Situ Hybridization - FISH), который используется с 1991 года и позволяет проводить количественный анализ в ткани опухоли (рисунки 2.2.17–2.2.18).

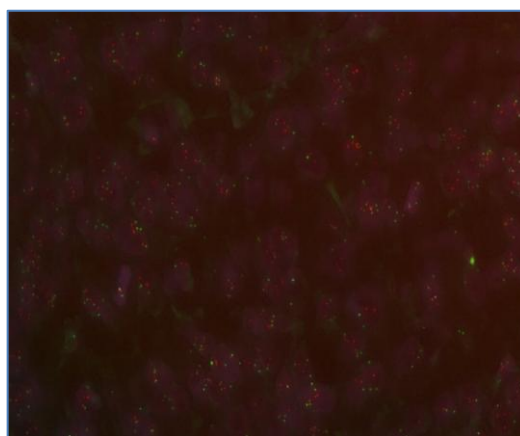


Рисунок 2.2.3.9 – Метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) при HER2 2+. Амплификация гена HER2 отсутствует.

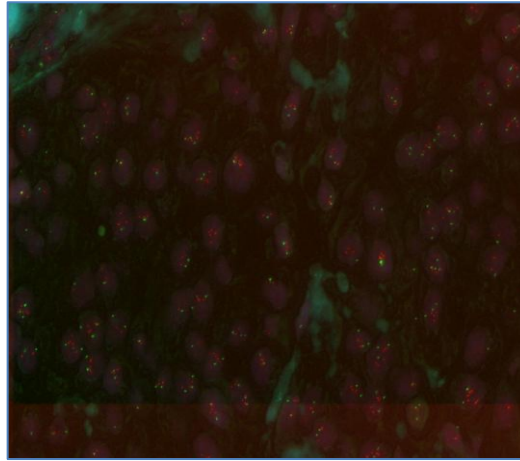


Рисунок 2.2.3.10 – Метод флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) при HER2 2+ . Амплификация гена HER2 присутствует.

После проведенной неoadъювантной химиотерапии статус рецепторов эстрогенов в остаточной опухоли изменился у 14 (9%) из 141 больных местно-распространенным РМЖ:

- изменения с ER-негативного на ER-положительный статуса отмечены у 8 человек (57%) и с положительного ER статуса на ER-негативный – у 6 человек (42%);
- изменения с PR-негативного на PR-положительный – у 6 человек (42%) и с PR-положительного на PR-негативный не наблюдалось; у 8 человек PR не изменились;
- изменения с HER2-негативного на HER2-положительный был изменён у 1 пациентки (7%).

Иммуногистохимический анализ уровня Ki-67

Патоморфологическая оценка опухоли проводилась согласно критериям классификации ВОЗ (2012). При подсчете количества окрашенных визуализирующим агентом ядер клеток опухоли учитывается процентное соотношение окрашенных и неокрашенных ядер клеток на 100 учтенных клеток в 10-ти репрезентативных полях зрения при увеличении $\times 40$. Результат индекса пролиферативной активности выдается с указанием индекса пролиферативной активности (процент клеток, в которых определяется экспрессия ан-

тител к Ki-67). Примеры патоморфологической оценки опухолей представлены на рисунках 2.2.3.11–2.2.3.12).

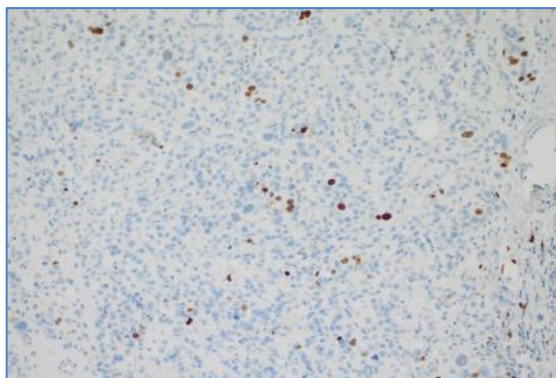


Рисунок 2.2.3.11 – Иммуногистохимический анализ уровня Ki-67 (Ki-67 8%: низкий уровень).

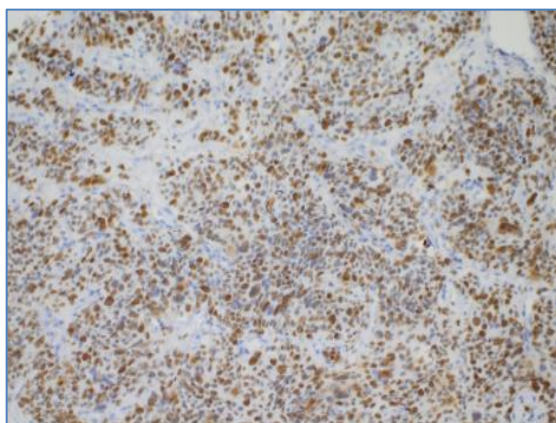


Рисунок 2.2.3.12 – Иммуногистохимический анализ уровня Ki-67 (Ki-67 90%: высокий).

Биологические подтипы РМЖ [Tang P., 2009]

На основании иммуногистохимической оценки выделялись следующие биологические подтипы: (люминальный А; люминальный В (HER2–негативный); люминальный В (HER2–позитивный); трижды негативный; HER2 - позитивный (таблица 2.2.3.2).

Таблица 2.2.3.2– Биологические иммуногистохимические подтипы РМЖ

Подтип	Основная характеристика по данным ИГХ-исследования
Люминальный А	Положительные рецепторы эстрогенов (ER) и рецепторы прогестерона (PR) (по Allred); гиперэкспрессия HER2 отсутствует; низкая (G1) и умеренная (G2) степень злокачественности по Ellis-Elston или Ki 67<20%
Люминальный В	HER2 - негативный: положительные ER и PR; гиперэкспрессия HER2 отсутствует; высокая степень злокачественности (G3) или Ki 67<20%. HER2 – позитивный: положительные ER и PR; гиперэкспрессия HER2.
Трижды негативный/базальноподобный	Отсутствие ER, PR (2 и менее баллов по Allred), отсутствие гиперэкспрессии HER2
HER2+ (гиперэкспрессирующий)	Гиперэкспрессия HER2 и отсутствие определяемых гормональных рецепторов (ER-/PR-)

2.2.4 Молекулярно-генетическое тестирование

Молекулярно-генетическое тестирование на экспрессию генов топоизомеразы II альфа и бета-тубулинов III класса выполнялась методом полуквантитативной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с использованием TaqMan-проб на приборе BioRad CFX96 Real-time PCR Detection System [Imyanitov, 2006]. Показатели экспрессии ниже 20 перцентиля относились к категории «низкой» экспрессии, а выше 80 перцентиля – к категории «высокой».

Из 141 больной, получающей предоперационную химиотерапию, высокая экспрессия бета-тубулинов III класса установлена у 62 человек (44,3%, [95% ДИ 36,1–52,6]), низкая экспрессия бета-тубулинов III класса – у 78 человек (55,7%, [95% ДИ 47,4–63,9]) ($p=0,70$); высокая экспрессия топоизомеразы II альфа – у 73 человек (53,3%, [95% ДИ 44,8–61,6]), низкая экспрессия топоизомеразы II альфа – у 64 человек (46,7%, [95% ДИ 38,4–55,2]) ($p=0,51$).

Анализ мутаций гена BRCA1 выполнялся методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени с использованием флуо-

ресцентного красителя SYBR Green I и термоциклета Bio-Rad. BRCA мутация была обнаружена у 9 (6,4%) из общей группы больных местнораспространенным раком молочной железы.

**Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови
выполнялась по методике, используемой в лаборатории отдела биологии
опухолевого роста под руководством проф. Е.Н. Имянитова
[Имянитов Е.Н., 2007; 2008].**

«Геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов, использовалась при выявлении наследственных мутаций. Выделение из периферической крови лейкоцитов ДНК проводилось посредством модифицированного соль-хлороформного метода. Гипоосмотический лизис эритроцитов достигался после 3-кратного разведения 5 мл крови дистиллированной водой, далее охлажденной до +4 °С. При помощи центрифугирования отделяли лейкоциты, а полученный осадок переводили в суспензию в 1 мл раствора Трис-НСl (рН = 8,3), 1 мМ ЭДТА. С целью разрушения цитоплазматической мембраны клеток к суспензии добавляли Тритон Х-100 в конечной концентрации 1%, а ядра выделяли центрифугированием. Далее осадок вновь ресуспендировали в 1 мл Трис-НСl (рН = 8,3) и лизировали при помощи добавления лаурилсульфата натрия до конечной концентрации 1%. Протеолиз белков и деградация комплексов «белок – ДНК» осуществлялись при помощи инкубации пробы в присутствии протеиназы К (200 мкг/мл) при +60 °С в течение 12 часов, далее к лизату добавляли раствор NaCl до конечной концентрации 1,5 М и равный объем хлороформа. В течение 30 минут при медленном покачивании с целью удаления из раствора ДНК нерастворимых компонентов клеточного лизата – белков и липидов проводилась экстракция. После чего раствор центрифугировали в течение 15 минут, что приводило к образованию в пробирке трех четко различимых фаз. Верхняя водная фаза содержала растворенную ДНК и неорганические соли, промежуточная и нижняя, хлороформные, - гидрофобные компоненты. Для осаждения ДНК к осторожно отобранной верхней фазе добавляли равный объем изопропанола и оставляли на 20 минут при темпе-

ратуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Осадок собирали центрифугированием в течение 5 минут при 15000 g. Для выделения чистого препарата ДНК промывали в 1 мл 70% этанола, после чего отбирали спирт, высушивали осадок и растворяли его в 0,5 мл стерильной воды».

Тестирование наследственных мутаций BRCA1 (5382insC, 185delAG, 4153delA) [Имянитов Е.Н., 2007; 2008]

«Определение наследственных мутаций производилась при помощи аллель-специфической полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени на приборе BioRad CFX96 Real-time PCR Detection System» (рисунок 2.2.4.1).

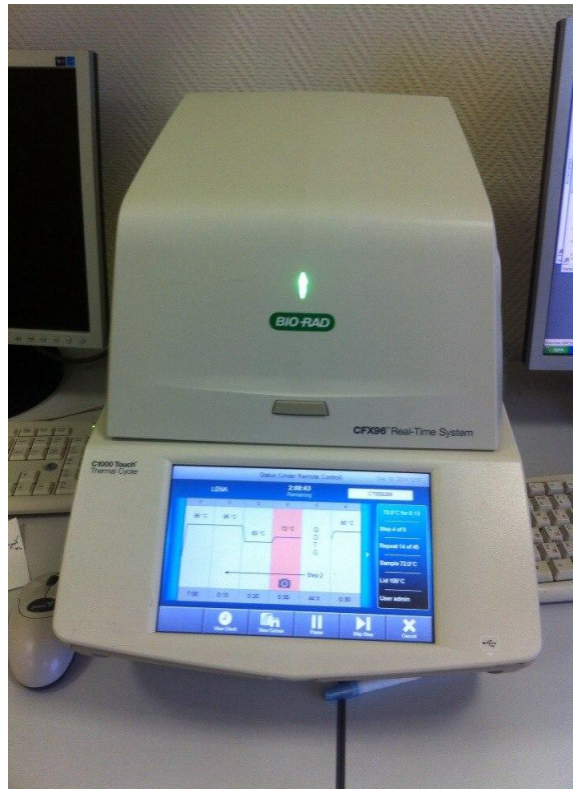


Рисунок 2.2.4.1 – Прибор BioRad CFX96 Real-time PCR Detection System

«В состав реакционной смеси объемом 20 мкл входили: 1 ед. акт. “hot-start” Taq-полимеразы “Thermostar”, однократный ПЦР буфер, примерно 50 нг ДНК, 2,0 mM MgCl_2 , SYBR green I в концентрации 0,2x (исходный раствор 10 000x; Molecular Probes), по 200 мкМ каждого из дезоксинуклеотидтри-

фосфатов (дАТФ, дЦТФ, дГТФ, дТТФ) и 100 нМ каждого праймера. Последовательности праймеров представлены в таблице. Реакция начиналась с активации Taq-полимеразы (95°C, 10 мин.). Последующие 40 циклов ПЦР состояли из фаз денатурации (95°C, 15 с), отжига (60 °C – 65 °C, 30 с) и элонгации (72°C, 30 с). Для оценки специфичности реакции амплификации оценивалась температура плавления ПЦР-продукта». Пример детекции мутации BRCA1 5382insC представлен на рисунке 2.2.4.2.

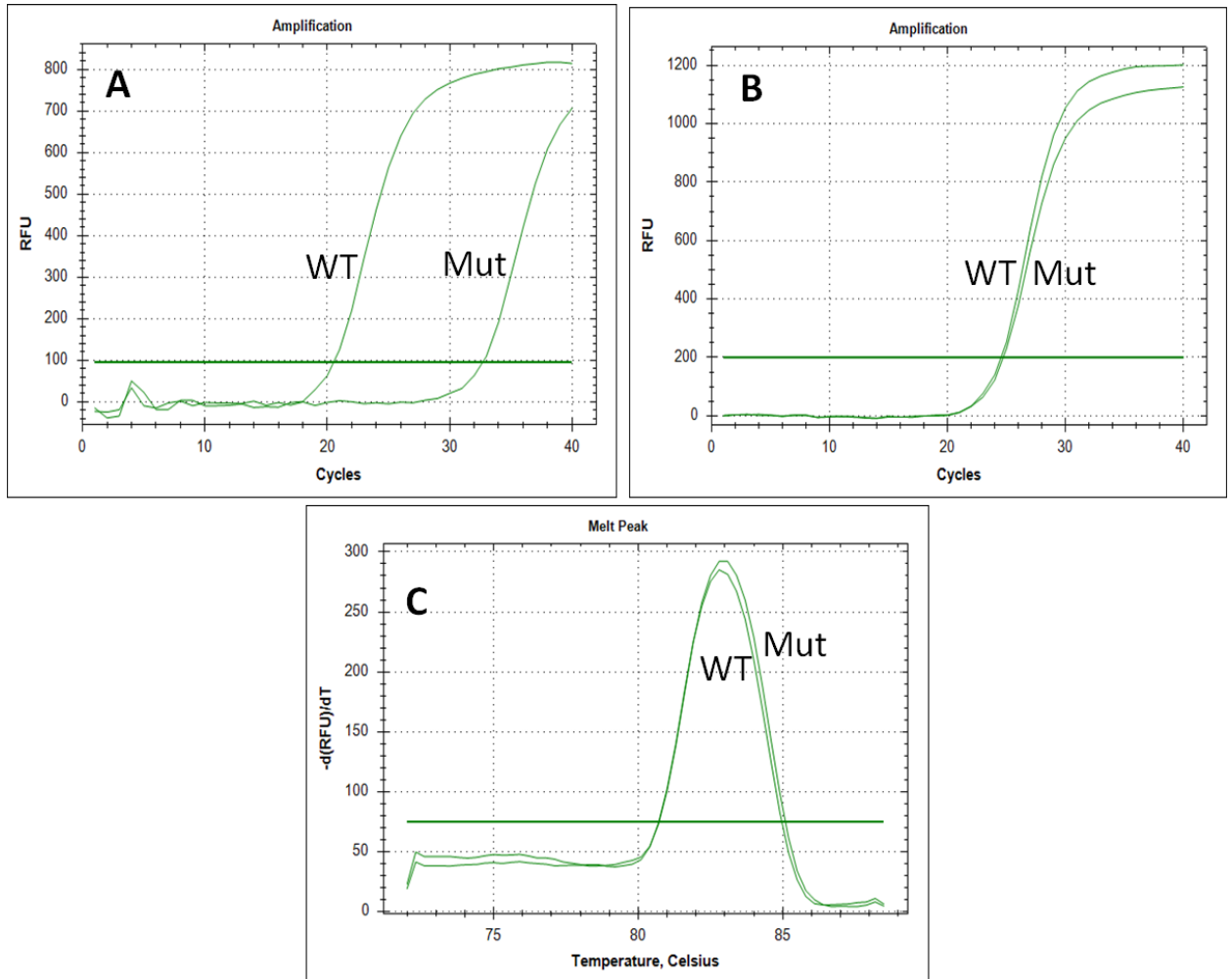


Рисунок 2.2.4.2 – Пример детекции мутации BRCA1 5382insC:

- в случае нормальной гомозиготы (А) наблюдается четкое различие в кинетике амплификации между парами праймеров, специфичными к нормальной (WT) и мутантной (Mut) последовательностям;
- в случае гетерозиготы (В) амплификация фрагментов мутантного и нормального аллелей идет с равной эффективностью; ниже (С) представлены пики плавления образца с мутацией (температура плавления специфического продукта $82,5 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$).

Последовательность праймеров, использованных для аллель-специфической ПЦР, отражена в таблице 2.2.4.1.

Таблица 2.2.4.1 – Последовательности праймеров, использованных для аллель-специфической ПЦР

Мутация	Прай-мер	Последовательность	Длина фрагмента
BRCA1 5382insC	com- mon	5'- AGAACCTGTGTGAAAGTATCTAGCACT G-3'	168 п.о.
	wt	5'-AAGCGAGCAAGAGAATTCCAG-3'	
	mut	5'-AGCGAGCAAGAGAATCCCA-3'	
BRCA1 4153delA	com- mon	5'-GACTGCAAATACAAACACCCA - 3'	134 п.о.
	wt	5'-AGCCCGTTCCTCTTTCTTC - 3'	
	mut	5'-AGCCCGTTCCTCTTTCTCA - 3'	
BRCA1 185delAG	com- mon	5'- CAGTTAAGGAAATCAGCAATTACAAT AGC -3'	173 п.о.
	wt	5'- GCTATGCAGAAAATCTTAGAGTGTCC - 3'	
	Mut	5'- ATGCTATGCAGAAAATCTTAGTGTCC - 3'	

«Источником мРНК служили архивные патоморфологические образцы опухолевой ткани. Выделение мРНК проводилось по изложенной ранее методике [Imyanitov et al., 2006]. С помощью ксилола архивные срезы депарфинизировали, регидратировали путем последовательной инкубации в 96% и 70% этаноле и лизировали на протяжении 16 часов при 60⁰С. Состав лизирующего буфера включал 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 2% SDS, и 500 мкг/мл протеиназы К. Экстракция производилась кислым фенолом (pH 4.0) и хлороформом. Затем мРНК осаждали изопропанолом в присутствии гликогена и промывали 70% этанолом, далее растворяли в воде. Для синтеза комплементарной ДНК (кДНК) в реакции обратной транскрипции использовали полученный раствор РНК. Обратная транскрипция проводится в объеме

20 мкл. В реакции использовали всю РНК, выделенную из 2–3 парафиновых срезов (10–30 мкм), растворенную в 10 мкл воды. В состав реакционной смеси входили также 10x буфер для обратной транскриптазы (2.0 мкл), обратная транскриптаза M-MuLV (Sibenzyme) (150.000 U/ml) (1.0 мкл), смесь dNTP (10мМ каждого) (1.0 мкл), случайные гексапраймеры (конц. 10 ое/мл) (1.0 мкл), ингибитор РНКаз (5 U/мкл) (1.0 мкл). Температурный режим обратной транскрипции: 20 °С – 5 мин, 38 °С – 30 мин, 95 °С – 5 мин».

Определение экспрессии мРНК при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени выполнялась по методике, используемой в лаборатории отдела биологии опухолевого роста под руководством проф. Е.Н. Имянитова [Имянитов Е.Н., 2007; 2008].

«Последовательности кДНК гена-мишени и гена-рефери (SDHA) амплифицировали при помощи специфических праймеров в присутствии TaqMan-зондов (рисунок 2.2.4.3, таблица 2.2.4.2). ПЦР в режиме реального времени проводилась на оборудовании BioRad CFX96 Real-time PCR Detection System.

Мультиплексная ПЦР ставилась в объеме 20 мкл, где содержалось 1 мкл раствора кДНК, 2.0 ед. акт. фермента ДНК-полимеразы ThermoStar, 1-кратный ПЦР-буфер, 2.5 мМ MgCl₂, по 200 мкМ каждого из нуклеотидтрифосфатов, по 300 нМ прямого и обратного праймеров SDHA, 300 нМ TaqMan-зонда SDHA-P, 600 нМ прямого, обратного праймеров и TaqMan-зонда, комплементарных гену-мишени. Использовались следующие условия ПЦР-амплификации: денатурация в течение 20 сек при 95 °С, отжиг и синтез в течение 1 мин при 60 °С, 45 циклов.

Относительная экспрессия каждого гена определялась как показатель « ΔC_t » (delta C_t C_t=Cycle threshold) ($\Delta C_t = C_t$ (ген-мишень) – C_t (ген-рефери, SDHA)). Пороговые значения для разграничения высокого и низкого уровня экспрессии были определены как 20-й и 80-й процентиля относительной экспрессии каждого гена в выборке из 50 опухолей разных локализаций

(РТК, РЛ, РМЖ, РЖ). Случаи с показателем экспрессии ниже 20 перцентиля относились к категории «низкой», а выше 80 перцентиля – к категории «высокой» экспрессии. Промежуточные значения оценивались как «средняя» экспрессия».

Таблица 2.2.4.2– Последовательности праймеров, используемых для определения экспрессии изучаемых генов

Праймер	5'-3'-последовательность	Размер фрагмента, п.о.
SDHA-F	CCACTCGCTATTGCACACC	102
SDHA-R	CACTCCCCGTTCTCCATCA	
SDHA-P	JOE-ACGGTCTCTGCGATATGATACCA-BHQ	
TUBB3-F	CTTTGGACATCTCTTCAGGC	120
TUBB3-R	ACCACATCCAGGACCGAATC	
TUBB3-P	FAM-ACAATTTTCATCTTTGGTCAGAGTGG-BHQ	
Top2a-F	TCACAATTGATCCGGAAAACAA	127
Top2a-R	CTAGAAGTTAGGAGCTGTCCA	
Top2a-P	FAM-GCTGGGACATACATCTTTTCAACT-BHQ	

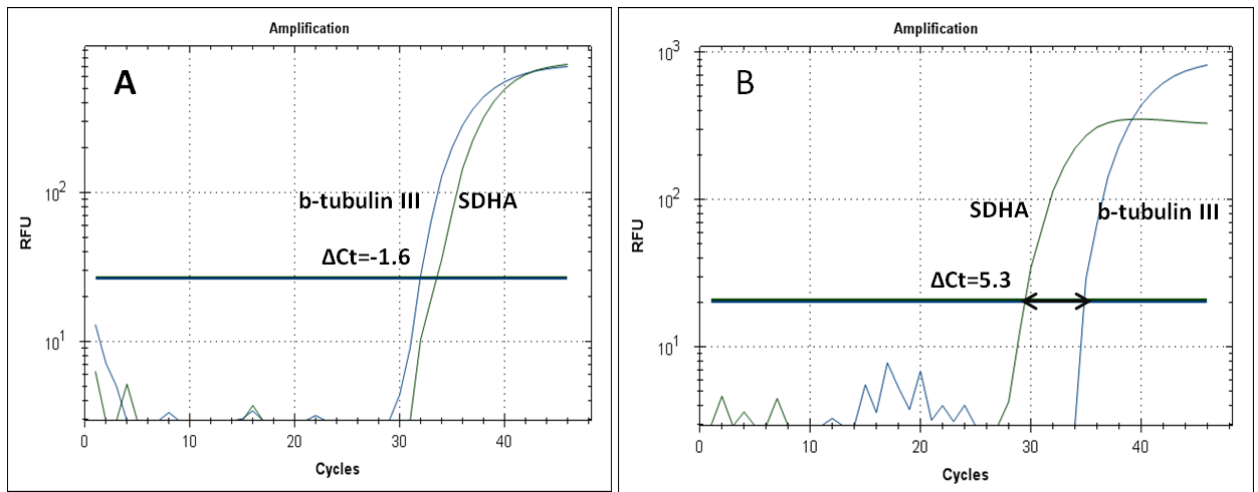


Рисунок 2.2.4.3– Примеры образцов с высокой (А) и низкой (В) экспрессией бета-тубулинов III класса

Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови, выполнялась по методике, используемой в лаборатории отдела биологии опухолевого роста под руководством проф. Е.Н. Имянитова.

«Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови пациенток проводилось посредством модифицированного соль-хлороформного метода (Mullenbach и соавт., 1989). Генотипирование каждого образца требовало постановки двух ПЦР реакций одновременно в разных пробирках. В первой пробирке добавлялся общий праймер и праймер, специфичный к аллелю дикого типа, во второй добавлялся общий праймер и праймер, специфичный мутантному аллелю. Определение генотипа было основано на разнице пороговых циклов».

2.2.5 Клиническая оценка степени регресса опухоли молочной железы и лимфатических узлов.

В рамках рандомизированного исследования оценивались непосредственные результаты сравниваемых схем неoadьювантной терапии больных местно-распространенного РМЖ:

- объективный клинический ответ по средством физикального метода, маммографии, ультразвукового исследования с соноэластографией и маммосцинтиграфии;
- патоморфологический ответ первичной опухоли по Miller-Payne и степень регресса регионарных метастазов в лимфатических узлах.

С целью определения распространенности опухолевого процесса и для оценки ответа опухоли на проводимую неoadьювантную полихимиотерапию проводили ультразвуковое исследование, маммосцинтиграфия, маммография, КТ органов грудной клетки, брюшной полости, малого таза по показаниям, консультацию гинеколога с последующим УЗИ малого таза или МРТ малого таза по показаниям, МРТ головного мозга по показаниям.

Ультразвуковое исследование

Ультразвуковое исследование проводили на аппарате фирмы HITACHI «HI VISION 900» с использованием линейного датчика частотой 13 МГц. Согласно общепринятому описанию молочную железу разделяли на четыре квадранта. Основными признаками рака молочной железы являлись: гипоэхогенная ткань с нечеткими контурами с асимметричной акустической тенью, а также гиперэхогенным ободком вокруг. Поражение подмышечных лимфатических узлов включало: размер более 10 мм в наименьшем диаметре, с изменённой формой и конфигурацией, изменение УЗИ сигнала от кортикального слоя или его расширение, а также исчезновение «жировых ворот» лимфатического узла.

Соноэластография

Оценка динамики изменений в молочной железе после проведенной неоадьювантной химиотерапии выполнялась совместно с к.м.н. Бусько Е.А. [Бусько Е.А., 2014].

После получения информации в В-режиме использовалась опция цветового и/или энергетического доплеровского картирования. Рамка устанавливалась на объект исследования с захватом окружающих тканей не менее 1 см. После обследования образования в В и ЦДК режимах активировалась опция – T-Elasto. Компрессия тканей молочной железы выполнялась датчиком. Контроль правильности выполнения данной манипуляции осуществлялся с помощью шкалы компрессии, показания которой не должны были превышать 4.

«При цветовом и/или энергетическом доплеровском картировании эластограмму оценивали с помощью системы анализа цветовой шкалы, разработанной Itoh и соавт. (2006) (рисунки 2.2.5.1-2.2.5.2):

- 1 эластотипу соответствует зеленый цвет на ультразвуковом изображении;
- 2 эластотипу – зеленый цвет с синими фрагментами (свойственен фибroadеномам);

- 3 эластотипу – синий цвет в центре, а по краю – зеленый (требуется подтверждение диагноза);
- 4 эластотипу – синий цвет (опухолевый очаг);
- 5 эластотипу – синий цвет узла и окружающих его тканей (рак молочной железы)».

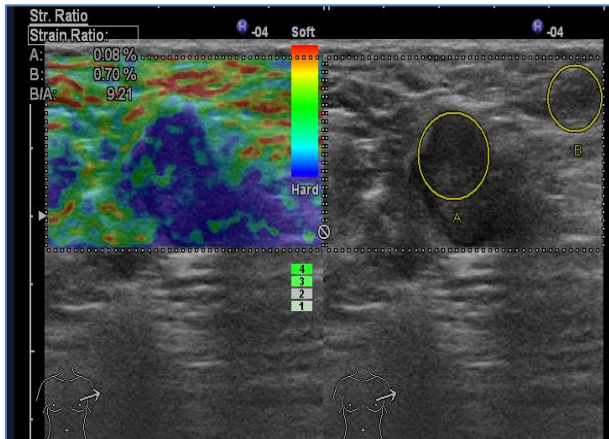


Рисунок 2.2.5.1–
Соноэластография узловой формы
рака левой молочной железы.
Коэффициент жесткости StR 9,21.

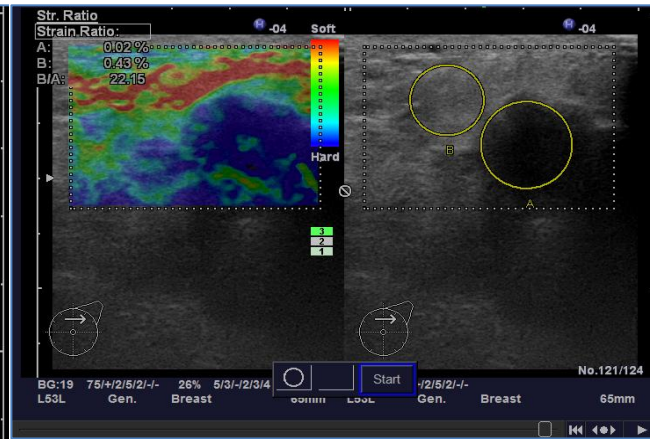


Рисунок 2.2.5.2 –
Соноэластография отёчно-
инфильтративной формы рака
левой молочной железы
Коэффициент жесткости StR 22,15.

Маммография

Маммография проводилась в краниокаудальной и медиолатеральной плоскостях, а при необходимости снимки выполнялись и в латеромедиальных косых плоскостях. Характеристики опухолей молочной железы описывались согласно рекомендациям системы BI-RADS. Наличие двух и более узловых опухолевых образований различной формы и структуры, расположенных в разных квадрантах молочной железы, а также выявление отдельных дополнительных и сгруппированных скоплений микрокальцинатов злокачественного типа (более 15 микрокальцинатов на 1 см²) расценивались как мультицентричная форма рака молочной железы. Пример маммографии отёчно-инфильтративной формы рака левой молочной железы представлен на рисунке 2.2.5.3.

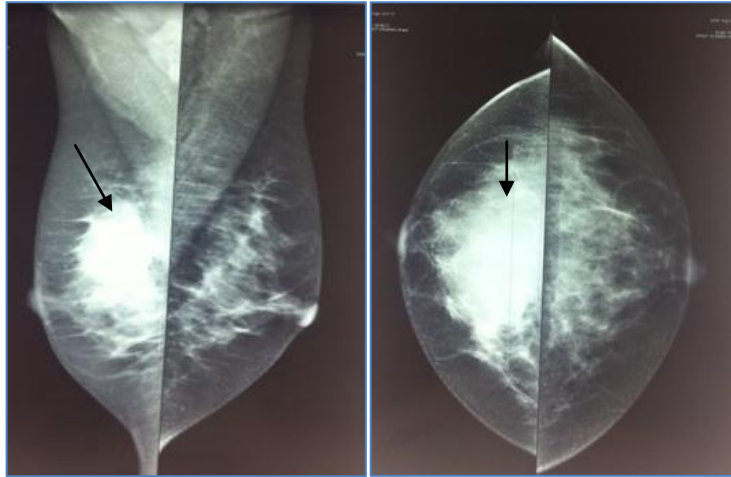


Рисунок 2.2.5.4 – Маммография отёчно-инфильтративной формы рака левой молочной железы.

Позитивная сцинтиграфия молочных желёз и зон регионарного лимфооттока

Оценка динамики изменений в молочной железе после проведенной неoadъювантной химиотерапии выполнялась при участии: д.м.н. С.М. Новикова, д.м.н. Криворотько П.В. и Брянцевой Ж.В. - аспиранта ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России [Криворотько П.В., 2011-2013; Брянцева Ж.В., 2015].

«Позитивная сцинтиграфия молочных желёз и зон регионарного лимфооттока осуществлялась в планарном и томографическом режимах на эмиссионном компьютерном томографе «Forte (Philips)», с двумя прямоугольными детекторами, снабженными низкоэнергетическими, высокочувствительными коллиматорами. Исследование в планарном режиме выполнялось через 10–15 мин после введения 740-860 МБк отечественного туморотропного препарата « ^{99m}Tc -технетрил» в вену. Приготовление туморотропного РФП « ^{99m}Tc -технетрил» осуществлялось согласно инструкции от производителя. Одновременная визуализация обеих молочных желёз в боковых проекциях проводилась в положении лежа на животе. Между молочными железами помещалась специальная подушка со свинцовым вкладышем, а детекторы гамма-камеры, снабженные параллельными высокоразрешающими коллиматорами для энергии 140 КэВ, располагались в боковых проекциях (под углом 90

и 270 градусов) в соприкосновении с обеими МЖ. При невозможности выполнения исследования в положении на животе выполнялась поочерёдная визуализация правой и левой молочной железы в положении на боку.

У всех больных выполнялась однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ) с величиной шага томографического исследования 3–6 градусов, временем экспозиции кадра 30–60 секунд и углом вращения 180 градусов для каждого детектора. Визуализация аксиллярной области в планарном режиме проводилась в боковой (с поднятыми вверх руками) и в передних проекциях (руки за головой) через 10–15 мин после введения препарата». Пример маммосцинтиграфии местно-распространённого рака левой молочной железы представлен на рисунке 2.2.5.5.

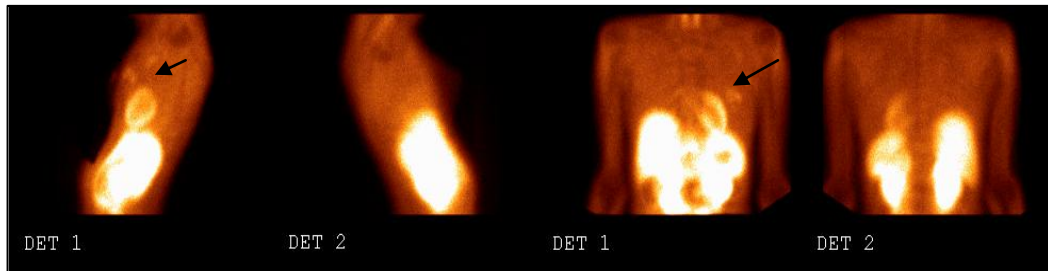


Рисунок 2.2.5.5 – Маммосцинтиграфия: очаг гиперфиксации в левой молочной железе 2,5 см в левой подмышечной 1,0 × 1,5 см. Коэффициент накопления РФП 1,9.

«Обработка полученных результатов обследования осуществлялась с помощью Hanning-фильтра. Параметры фильтра подбирались индивидуально. Толщина восстановленных поперечных срезов колебалась от 2 до 4 пикселей. Оценку полученных изображений проводили по следующим критериями: наличие или отсутствие участков гиперфиксации туморотропного РФП в молочной железе и аксиллярной области, по форме (правильная, неправильная), по характеру границ (четкие, нечеткие), по интенсивности и равномерности распределения РФП в очагах патологической гиперфиксации. Наличие очага патологической гиперфиксации РФП в проекции подмышечной области рассматривалось в качестве основного сцинтиграфического признака поражения подмышечных лимфатических узлов, как при планарном,

так и при ОФЭКТ исследовании. Также учитывалась симметричность накопления РФП в подмышечной области с обеих сторон. При активном поглощении РФП в потовых железах очаги гиперфиксации РФП рассматривались как случаи физиологического накопления. При обнаружении скинтиграфических признаков поражения подмышечных лимфатических узлов изменения характеризовались как вовлечение единичных лимфатических узлов или их множественное поражение».

Оценка эффективности лечения проводилась по четырём основным критериям: частота объективных эффектов, частота клинических эффектов, патоморфологический регресс опухоли в молочной железе и лимфатическом узле и время до события (местный и регионарный рецидив, отдалённые метастазы, возникновение метастатического рака противоположной железы, возникновение первичных опухолей другой локализации, смерть от РМЖ или от любых причин.).

Оценка эффекта от проводимого лечения проводилась каждые 2 цикла в соответствии с критериями RECIST 1.1 при помощи тех же методик, что и перед его началом лечения. Оценка эффекта проводилась по измеримым очагам путем вычисления изменения суммы их максимальных размеров. Исчезновение всех очагов расценивали как полный регресс, уменьшение суммы максимальных размеров очагов на 30% относительно измерения перед началом лечения – как частичный регресс. Увеличение суммы максимальных размеров на 20% и более в процессе лечения или перед ним считалось прогрессированием процесса. Стабилизация определялась как недостаточное уменьшение опухоли для частичного регресса или недостаточное увеличение относительно прогрессирования заболевания.

2.4. Статистический анализ

Результаты динамического наблюдения за пациентами, получившими предоперационную химиотерапию, были введены в созданную в пакете Microsoft Office Excel базу данных и анализировались с применением пакета

прикладных программ для статистического анализа STATISTICA v. 10 и встроенных функций пакета Microsoft Office Excel. Большинство изучаемых показателей являлось качественными, измеренными по номинальной или порядковой шкалам. Для таких переменных проводилась точечная и интервальная оценка распределения частот, при этом в качестве интервальной оценки строился 95% доверительный интервал, который вычислялся с помощью углового преобразования Фишера. В качестве статистического критерия для проверки гипотезы о значимости различий частот в независимых группах использовался критерий χ^2 . При анализе многопольных таблиц его применение считалось корректным, если в таблице ожидаемых частот доля ячеек с частотами, меньшими 5, не превышала 25%, в противном случае проводились попарные сравнения частот критерием χ^2 (при необходимости – с поправкой Йетса), или с помощью точного критерия Фишера.

Количественные переменные, измеренные по непрерывной шкале, представлены в виде среднего арифметического (M) и стандартного отклонения (σ) – при отсутствии значимых отличий от нормального закона (критерий Шапиро–Уилка); медианой, нижним ($Q1$) и верхним ($Q3$) квартилями – в противном случае; соответственно, статистические сравнения выполнялись с помощью критерия Стьюдента или Манна–Уитни.

Для анализа выживаемости больных использовался метод Каплана–Мейера, при этом сравнение выживаемости в группах пациентов осуществлялось лог-ранговым критерием. Как и в большинстве исследований, касающихся оценке эффективности неоадьювантного системного лечения, в работе представлены результаты анализа бессобытийной выживаемости (event free survival) [EFS]. К событиям относятся: местный и регионарный рецидив, отдалённые метастазы, возникновение метакронного рака противоположной железы, возникновение первичных опухолей другой локализации, смерть от РМЖ или от любых причин.

При проведении статистического анализа критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы принимался равным 0,05.

Глава 3

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОВЕДЕННОГО ПРЕДОПЕРАЦИОННОГО ЛЕЧЕНИЯ МЕСТНО- РАСПРОСТРАНЁННОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

3.1 ОБЪЕКТИВНЫЙ И ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЙ ОТВЕТ

За последнее десятилетие сохраняются высокие показатели заболеваемости и смертности больных местно-распространенным раком молочной железы (сT1-2N2-3M0, сT3N1-3M0, сT4N0-3M0). Главными целями предоперационной (неoadьювантной) химиотерапии данной категории больных являются: увеличение удельного веса органосохраняющих операций, ранняя оценка эффективности выбранного режима системного лечения (изучение непосредственных результатов неoadьювантной химиотерапии РМЖ: объективного ответа, степени патоморфологического регресса опухоли и регионарных метастазов, в том числе частоты патоморфологического полного ответа урT0N0), уточнение долгосрочного прогноза в зависимости от степени патоморфологического ответа опухоли на лечение и других маркеров эффективности проводимого лечения.

В рамках исследования оценены результаты сравниваемых схем неoadьювантной терапии больных местно-распространенного РМЖ. Непосредственный объективный клинический ответ оценивался каждые 2 цикла физикальным методом, маммографией, ультразвуковым исследованием с соноэластографией и маммосцинтиграфией. Так в случае стабилизации после 2-х циклов полихимиотерапии по схеме ТС (стабилизация расценивается в неoadьювантном режиме как недостаточный ответ) больные переводились в группу ТАС.

После проведения больным условно-операбельным местно-распространенным РМЖ (сT1-2N2-3M0, сT3N1-3M0, сT4N0-3M0) лекарственной неoadьювантной терапии по схемам ТАС или ТС органосохраняющие

операции или радикальные мастэктомии были выполнены в 100% случаев (таблица 3.1.1).

Таблица 3.1.1 – Частота хирургических вмешательств после неoadьювантной химиотерапии (ТАС против ТС) у больных местнораспространенным РМЖ

Вид хирургического вмешательства	Общая группа (n=141)			ТАС (n=74)			ТС (n=67)			p
	n	%	95% ДИ	n	%	95% ДИ	n	%	95% ДИ	
Органосохраняющая операция	10	7,1	3,4-11,9	6	8,1	3,0-15,5	4	6,0	1,6-13,0	>0,05
Радикальная мастэктомия	131	92,9	88,1-96,6	68	91,9	84,5-97,0	63	94,0	87,0-98,4	

Объективный клинический ответ опухоли на проведение 2-х циклов химиотерапии показал значимое преимущество схемы ТАС перед схемой ТС. На рисунке 3.1.1 представлена частота клинического ответа (%) в зависимости от проведённой схемы химиотерапии.

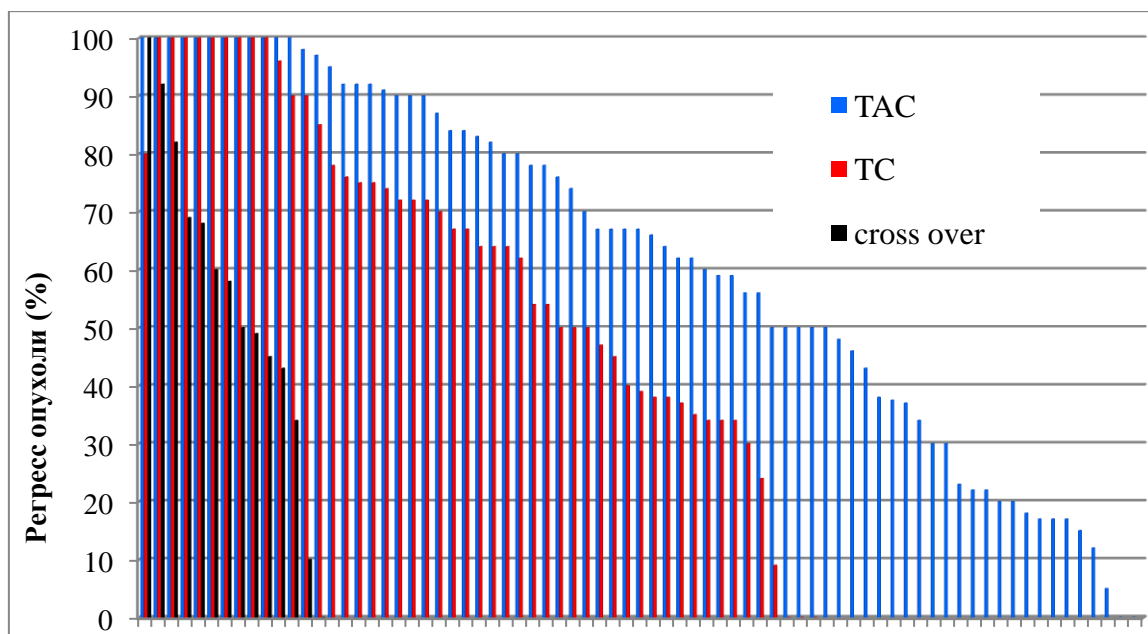


Рисунок 3.1.1 – Частота объективного ответа (%) в зависимости от схемы химиотерапии.

Применение неoadьювантной цитотоксической химиотерапии по схеме ТАС чаще чем по схеме ТС приводит к объективному клиническому ответу

на лечение (**82,9%** [95% ДИ 73,9-90,3] против **67,8%** [95% ДИ], **p=0,04**) (рис. 3.1.2).

Полный патоморфологический ответ (ypT0N0) в ткани молочной железы и регионарных метастазах не выявил достоверных различий между таксан-содержащей химиотерапией с антрациклинами и без антрациклиновых антибиотиков, так как в случае стабилизации после 2-х циклов полихимиотерапии по схеме ТС (стабилизация расценивается в неоадьювантном режиме как недостаточный ответ) больные переводились в группу ТАС (рисунок 3.1.1 и рис. 3.1.2).

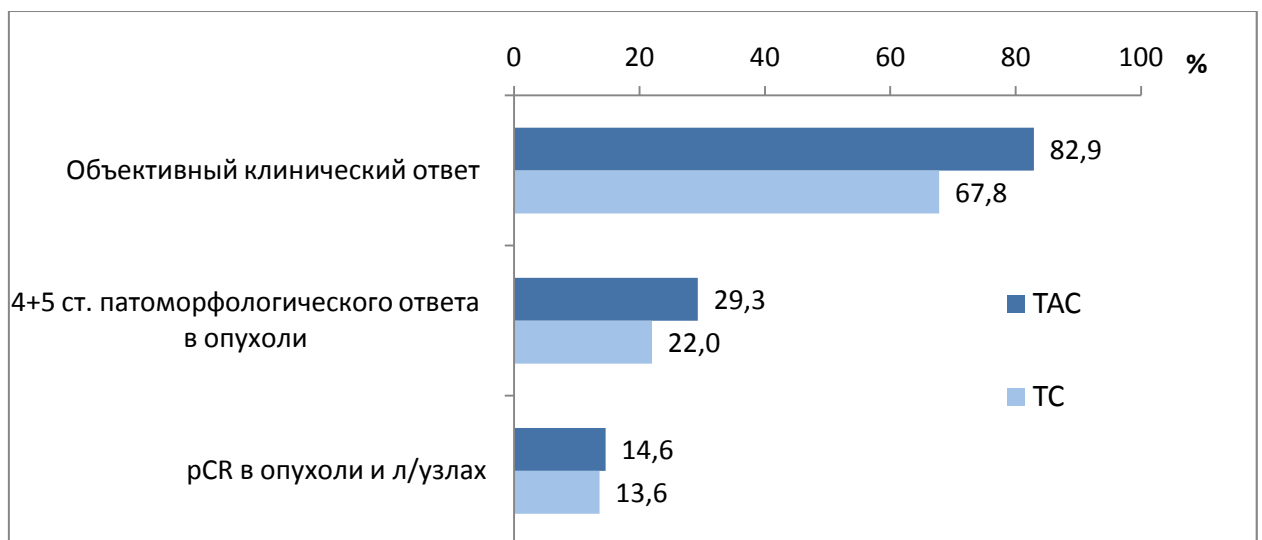


Рис. 3.1.2 – Частота объективного клинического ответа и патоморфологического регресса (ypT0N0) опухоли после неоадьювантной химиотерапии (ТАС vs ТС) у больных местно-распространенным РМЖ

В исследовании отмечено 4-кратное увеличение частоты pCR в группе больных с трижды негативным подтипом опухоли по сравнению с люминальным В подтипом. Частота pCR при сравнении всех подтипов составила 8,5% (95% ДИ 2,7-17,0) при люминальном А подтипе, 6,7% (95% ДИ 0,5-18,8) - при люминальном В, 23,8% (95% ДИ 7,7-45,3) - при HER2-позитивном подтипе и 25,8% (95% ДИ 11,7-43,1) - при трижды-негативном РМЖ (рис. 3.1.3).

В группе больных с люминальным А подтипом значимый патоморфологический ответ (4+5 степень по Miller-Payne) был достигнут у 11 больных,

что составило 18,6% (95% ДИ 9,7-29,7); в группе люминального В подтипа – у 5 больных (16,7%, 95% ДИ 5,4-32,6); в группе HER 2-позитивного подтипа РМЖ – у 9 человек (42,9%; 95% ДИ 21,8-65,4) и в группе базального (трижды негативного) – у 12 человек (38,7%; 95% ДИ 22,0-57,0). Как и ожидалось, частота полного патоморфологического ответа в опухоли и региональных метастатических узлах (урТ0N0M0) и значимого патоморфологического ответа опухоли (4+5 степень по Miller-Payne) на антрациклин- и таксан-содержащую полихимиотерапию была выше в группе трижды негативного и HER2 позитивного РМЖ, по сравнению с люминальными подтипами А и В.

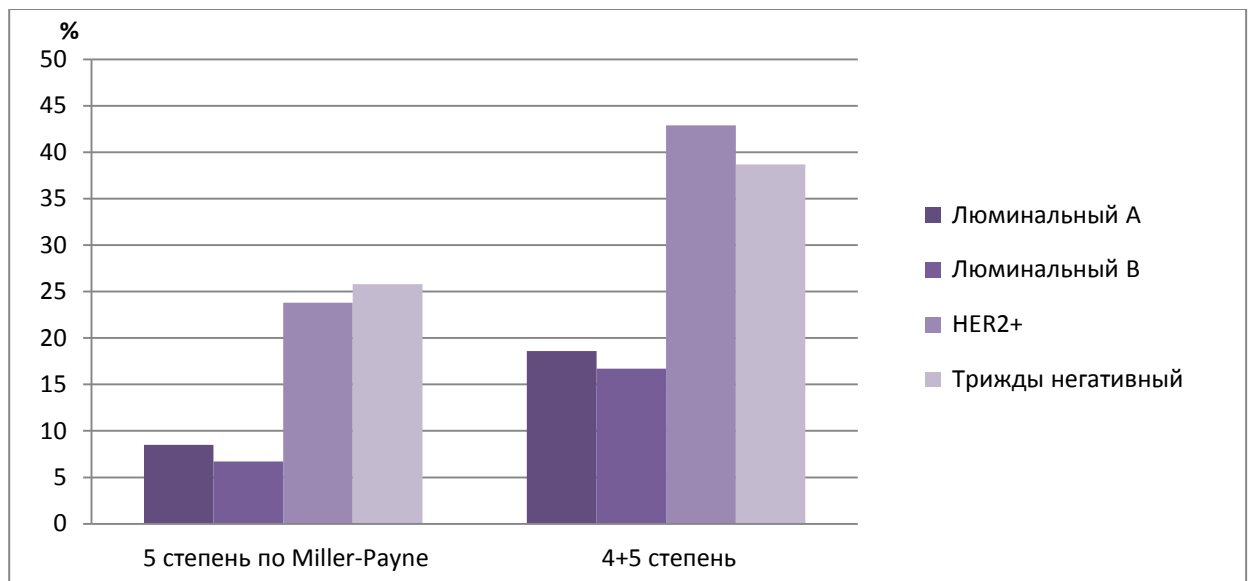


Рисунок 3.1.3 – Частота патоморфологического ответа в зависимости от биологического подтипа опухоли (%).

**3.2. КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ ОТВЕТА НА
НЕОАДЬЮВАНТНУЮ ТАКСАН-СОДЕРЖАЩУЮ
ПОЛИХИМИОТЕРАПИЮ У БОЛЬНОЙ РМЖ С ТРИЖДЫ
НЕГАТИВНЫМ ФЕНОТИПОМ И МУТАЦИЕЙ ГЕНА BRCA1 5382insC.**

КЛИНИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ №1.

Полный объективный ответ,
полный патоморфологический ответ в опухоли и частичный ответ в
метастатических аксиллярных лимфатических узлах
на неоадьювантную таксан-содержащую полихимиотерапию у больной РМЖ
с трижды негативным фенотипом и
мутацией гена BRCA1 5382insC

Больная 56 лет самостоятельно обнаружила увеличенный лимфатический узел в левой подмышечной области.

Наследственность отягощена: у отца рак желудка.

Б-2, А-1, Р-1. Роды в 22 года, грудью не кормила.

Сопутствующие заболевания: не отмечала.

Активных жалоб не предъявляла.

Общее состояние удовлетворительное, ECOG – 0.

Обратилась в НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова 06.02.2012, обследована.

ПЭТ от 17.01.12: SUV 9,0 гиперметаболизма глюкозы очагового характера в проекции левой молочной железы и левой подмышечной области. По данным остеосцинтиграфии накопления РФП не выявлено. При дообследовании установлен диагноз: Рак левой молочной железы (с) T1N2M0.

Гистологическое заключение: инвазивный рак.

Иммуногистохимическое заключение: РЭ - 0б; РП - 0б; HER2 +2; KI-67 30%.

FISH: амплификация гена HER2 не обнаружена.

Молекулярно-генетический анализ: экспрессия TUB 3В высокая, экспрессия TOP 2А – низкая.

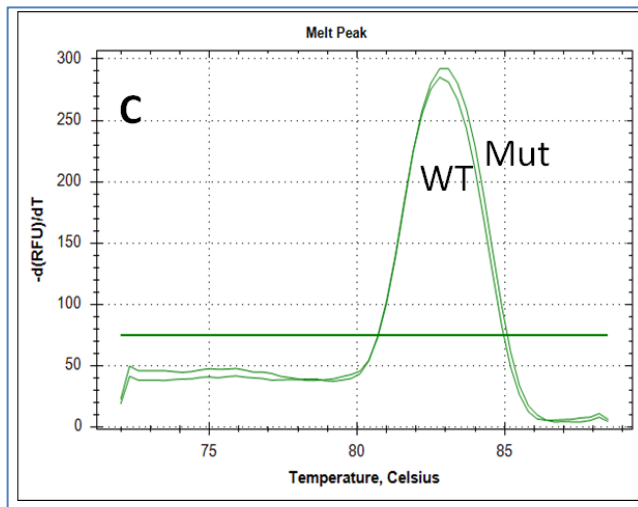
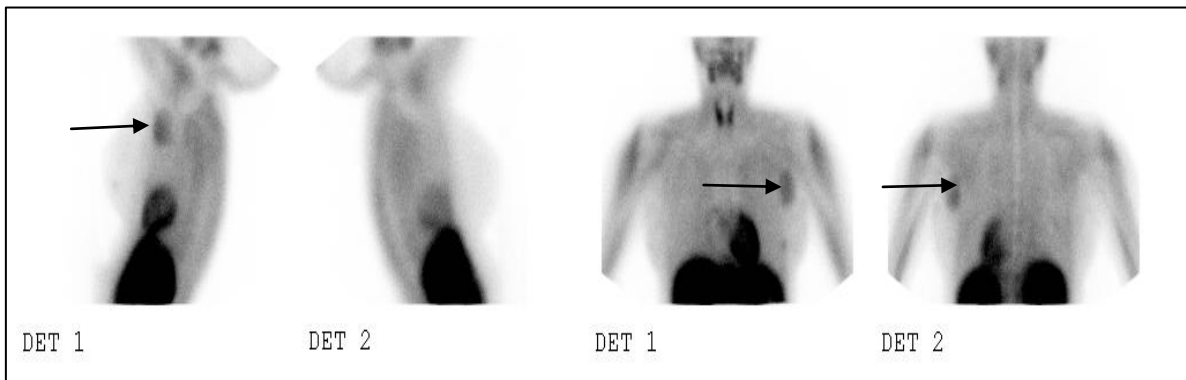
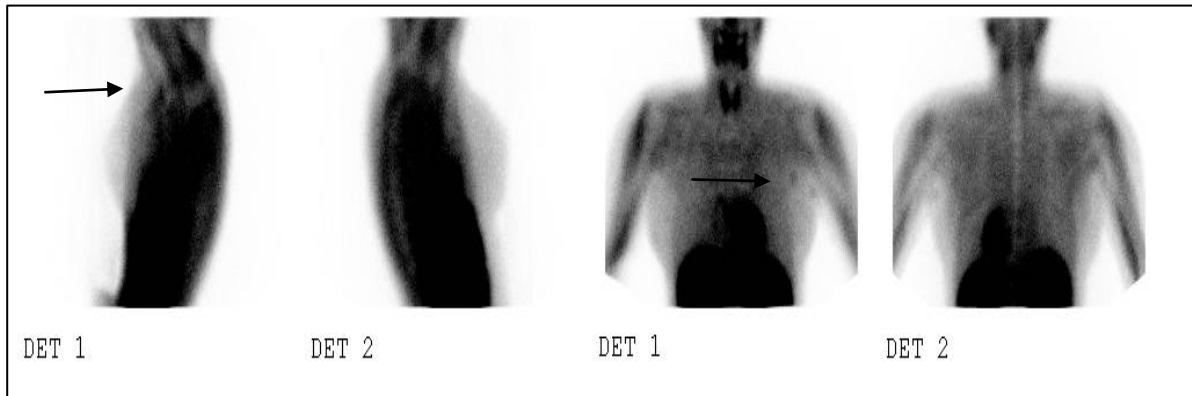


Рисунок 3.2.1 – Обнаружена мутация BRCA1 5382insC.

С 01.03.2012 по 31.05.2012 получила 6 циклов предоперационной химиотерапии по схеме TAC «доцетаксел 75 мг/м² + адриабластин 50 мг/м² + циклофосфамид 500 мг/м²». В молочной железе по данным физикального осмотра, маммографии (рис. 3.2.3), маммосцинтиграфии (рис. 3.2.2) и соноэластографии (рис. 3.2.4) достигнут полный регресс, по аксиллярным лимфатическим узлам – частичный регресс.



А. До лечения.

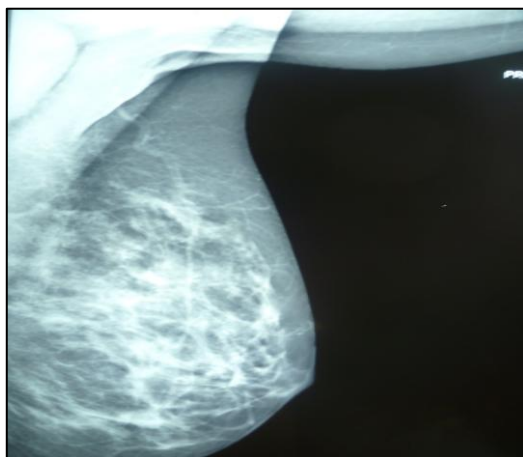


Б. После лечения.

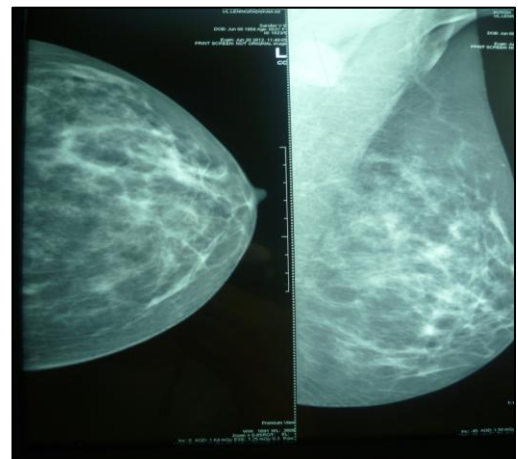
Рисунок 3.2.2 – Маммосцинтиграфия

А. До лечения. Маммосцинтиграфия (до начала лечения) очаг гиперфиксации в левой молочной железе 1,5 см в левой подмышечной 5,6x3,5 см. Коэффициент накопления РФП 1,6.

Б. После лечения. Маммосцинтиграфия (после лечения) сцинтиграфическая картина частичного регресса очага в левой подмышечной области. Коэффициент накопления РФП 1.



А. До лечения.

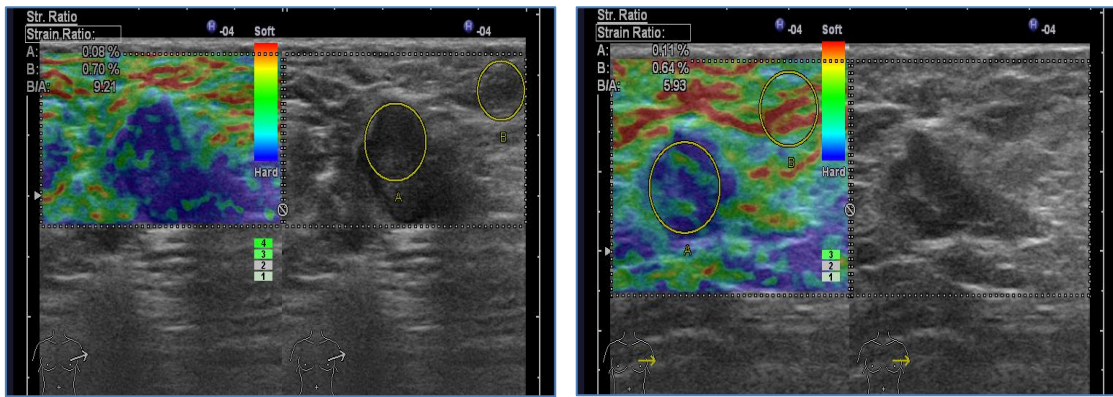


Б. После лечения.

Рисунок 3.2.3 – Маммография

А. Маммография (до начала лечения): в левой молочной железе в нижне-наружном квадранте узел размерами 18x11x12мм. В подмышечной клетчатке слева лимфатические узлы 54x6x61мм.

Б. Маммография (после окончания лечения): в подмышечной клетчатке определяется плотный увеличенный лимфатический 27x20мм.



А. До лечения.

Б. После лечения.

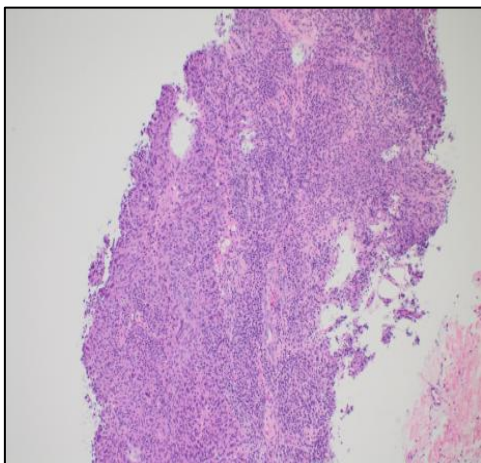
Рисунок 3.2.4 – УЗИ молочных с соноэластографией

А. до лечения: коэффициент жёсткости составил 9,21;

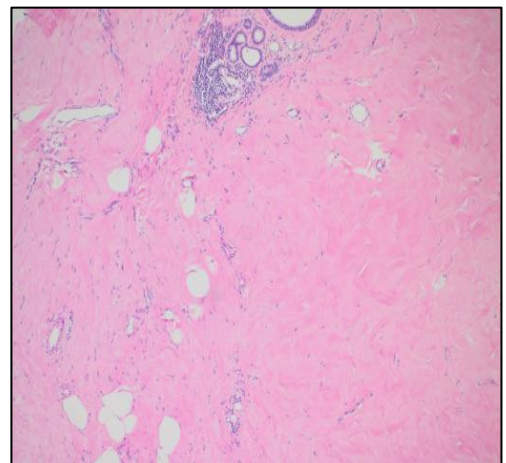
Б. после лечения: коэффициент жёсткости составил 5,93.

03.07.2012 выполнена билатеральная мастэктомии по Пэйти.

Гистологическое заключение: остаточная опухоль молочной железы не обнаружена. Фокусы склерозирующего аденоза. Метастазы инвазивного протокового рака в 2 из 4 лимфатических узлов. 3 кусочка подмышечной клетчатки без депозитов. (p) T0N1M0. ИГХ №311761 ОТ 03.07.2012: РЭ 3б, РП 0б, HER2 0 (негат.) (рисунок 3.2.5).



А. (до лечения)



Б. (после лечения)

Рисунок 3.2.5 – А. До лечения: неспецифицированный рак. Б. После лечения: остаточная опухоль молочной железы не обнаружена. Фокусы склерозирующего аденоза.

В адьювантном режиме больная получила 4 цикла монокимиотерапии капецитабином и лучевую терапию на подмышечную и надподключичную

зоны. При последнем контрольном осмотре от 06.05.2015 данных за рецидив не получено.

Больная 65 лет. Отягощенный онкологический анамнез.

Диагноз: Рак левой молочной железы (c)T1N2M0, (p)T0N1M0.

Инвазивный протоковый рак. Трижды негативный подтип РМЖ. Молекулярно-генетический анализ: экспрессия TUB IIIB высокая, экспрессия TOP PA – низкая. Обнаружена мутация BRCA1 5382insC.

Состояние на фоне комплексного лечения (6 циклов неoadъювантной химиотерапии по схеме TAC, билатеральной мастэктомии по Пэйти, лучевой терапии и монокимиотерапии капецитабином с адъювантной целью).

Бессобытийный период наблюдения составил 3 года и 4 месяца.

КЛИНИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ №2

Полный объективный ответ и полный патоморфологический ответ в опухоли и метастатических лимфоузлах на неoadъювантную таксансодержащую полихимиотерапию у больной РМЖ с трижды негативным фенотипом и мутацией гена BRCA1 5382insC.

Больная 68 лет.

Обнаружила уплотнение в правой молочной железе самостоятельно.

Б-2, А-0, Р-2. Роды первые в 20 лет, грудью кормила каждого ребенка до 6 месяцев.

Наследственность отягощена: у родной сестры и у бабушки по материнской линии - рак молочной железы.

Сопутствующие заболевания: гипертоническая болезнь II ст.

Общее состояние удовлетворительное, ECOG – 0.

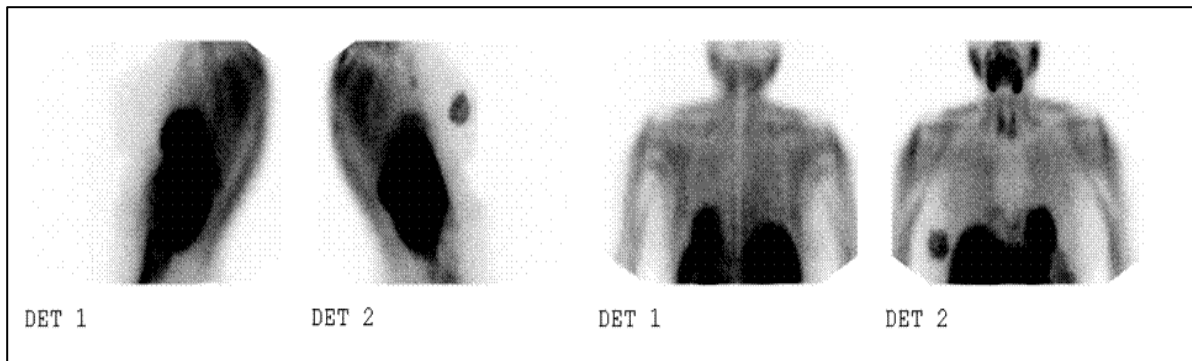
Обратилась в НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова, обследована.

По данным остеосцинтиграфии накопления РФП не выявлено. При КТ органов грудной и брюшной полости и малого таза данных за отдаленные метастазы не получены.

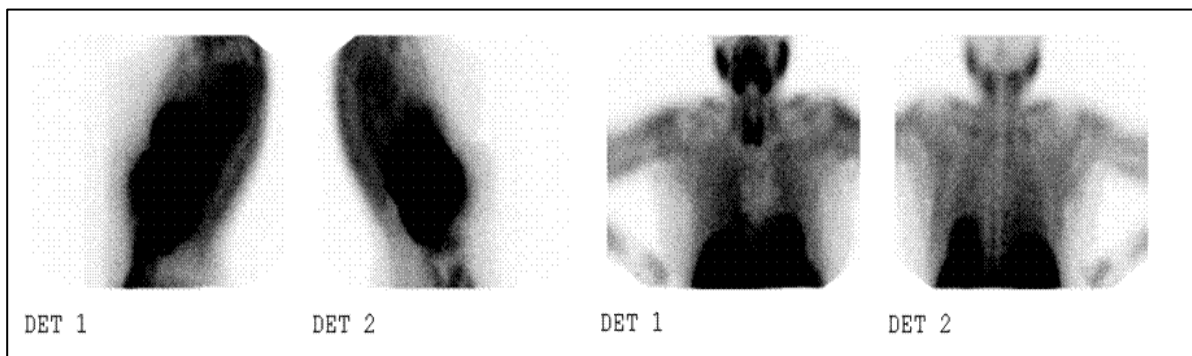
Выполнена трепан-биопсия правой молочной железы. Гистологическое заключение: инвазивный рак. Иммуногистохимическое заключение: РЭ - 0б; РП - 0б; HER2 0; KI-67 25%; степень злокачественности G3.

Молекулярно-генетический анализ: экспрессия TUB IIIB высокая, экспрессия TOP IIА – низкая. Обнаружена мутация BRCA1 5382insC.

С 05.04.2012 по 16.08.2012 получила 6 циклов предоперационной химиотерапии по схеме ТС «доцетаксел 60 мг/м² + циклофосфамид 600 мг/м²». В молочной железе по данным физикального осмотра, маммографии (рис. 3.2.7), маммосцинтиграфии (рис. 3.2.6) и соноэластографии (рис. 3.2.8) достигнут полный регресс в молочной железе и в аксиллярных лимфатических узлах.



А. До лечения.

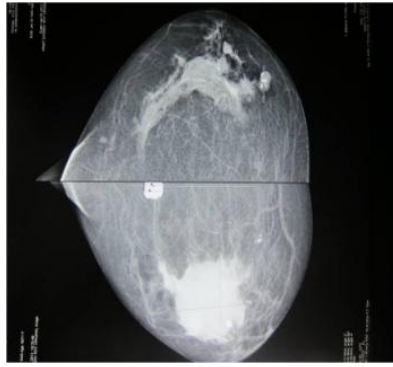


Б. После лечения.

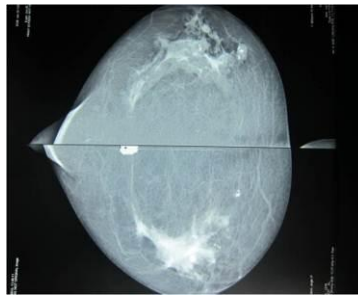
Рисунок 3.2.6 – Маммосцинтиграфия

А. (до лечения): В правой молочной железе на границе верхних квадрантов определяется бугристый опухолевый узел с гиперфиксацией РФП размерами 50x52мм. В подмышечной области лимфатические узлы с повышенной гиперфиксацией РФП.

Б. (после лечения): Полный регресс скintiграфических изменений в проекции первичного очага и регионарных лимфатических узлов.



А. До лечения.

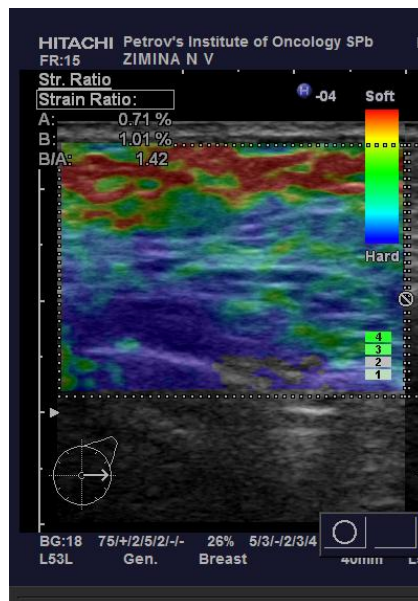
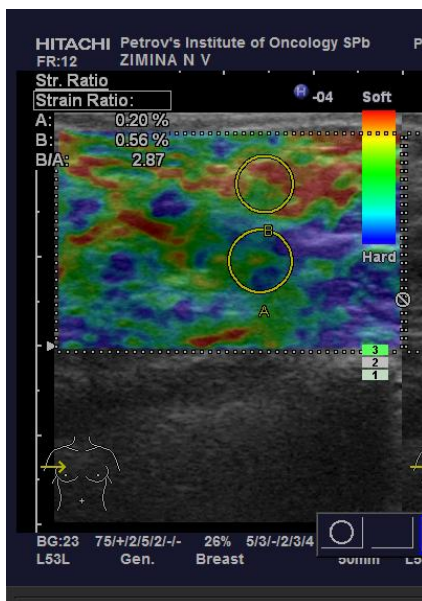


Б. После лечения.

Рисунок 3.2.7 – Маммография

А. До лечения: В правой молочной железе на границе верхних квадрантов выявляется плотный опухолевый узел местами без чётких границ 62х60мм. В подмышечной клетчатке определяются лимфатические узлы различной плотности до 18 мм.

Б. После лечения: В правой молочной железе на месте ранее определяемого инфильтративного узла выявляется фокус некроза, плотность которого уменьшилась. В подмышечной клетчатке справа лимфатические узлы не определяются.



А. До лечения.

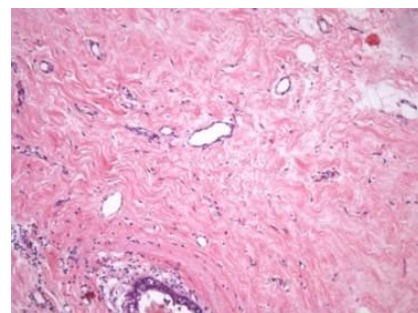
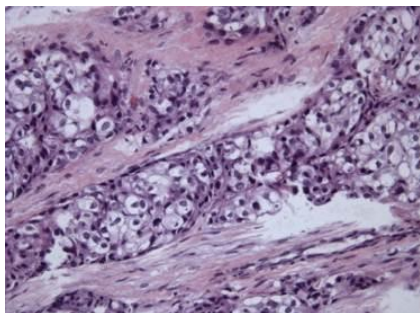
Б. После лечения.

Рисунок 3.2.8 – УЗИ молочных с соноэластографией

А. До лечения: опухолевый узел картируется синим цветом, имеет жесткую структуру (StR=2,87).

Б. После лечения: опухолевый узел картируется сине-зеленым цветом, имеет эластичную структуру (StR= 1,42).

04.09.2012 выполнена билатеральная мастэктомия: мастэктомия по Patey справа и подкожная мастэктомия слева.



А. До лечения.

Б. После лечения.

Рисунок 3.2.9 – А. До лечения (биопсийный материал): Инвазивный рак, степень злокачественности G3. **Б.** После лечения (послеоперационный материал): V степень лечебного патоморфоза по Miller, Payne (нет определяемых инвазивных клеток в секционных срезах из места расположения первичной опухоли). Интрадуктального компонента нет. 5 лимфатических лимфоузлов и 2 фрагмента жировой клетчатки без метастазов.

Больная 68 лет. Отягощенный анамнез по раку молочной железы (материнская линия).

Диагноз: Рак правой молочной железы (с) T4N2M0, (p) T0N0M0.

Инвазивный протоковый рак. Трижды негативный подтип РМЖ. Молекулярно-генетический анализ: экспрессия TUB ПИВ высокая, экспрессия TOP ПА – низкая. Обнаружена мутация BRCA1 5382insC.

Состояние на фоне комбинированного лечения (6 циклов полихимиотерапии по схеме ТС и билатеральной мастэктомии: мастэктомии по Patey справа и подкожной мастэктомии слева).

Бессобытийный период наблюдения составил 3 года и 1 месяц.

ГЛАВА 4.

ПРЕДИКТИВНОЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРЕДОПЕРАЦИОННОЙ ХИМИОТЕРАПИИ МЕСТНО-РАСПРОСТРАНЕННОГО РМЖ

4.1. Препредиктивное значение молекулярных и биологических маркеров чувствительности к антрациклиновым антибиотикам и таксанам

Препаратами выбора в химиотерапии РМЖ по-прежнему остаются антрациклиновые антибиотики и таксаны [Cardoso F., 2014; Орлова Р.В., 2015; Sparano J.A., 2015]. В работах *in vivo* угнетение экспрессии топоизомеразы II альфа приводит к значительному снижению чувствительности опухоли к антрациклиновым антибиотикам [Binaschi, 2001; Bhargava, 2005]. Повышение экспрессии белка бета-тубулина III класса считается важным звеном в механизме развития резистентности к таксанам [Brase, 2010; Arteaga, 2012]. Все большую актуальность приобретает изучение мутации гена BRCA1, которая ассоциируется с высокой пенетрантностью и наследственной предрасположенностью РМЖ [Imyanitov E.N., Hanson K.P., 2004]. В литературе данные о предиктивном и прогностическом значении экспрессии генов топоизомеразы II альфа, бета-тубулина III класса и мутации гена BRCA1 разноречивы.

BRCA1. Из общей группы больных местно-распространенным РМЖ (n=141) мутация BRCA1 5382insC выявлена методом полуколичественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени у 9 (6,4%) больных. При этом трижды негативный фенотип РМЖ зарегистрирован у 6 больных и люминальный А - у 3 больных.

При оценке распределения пациентов с наличием BRCA-мутации в зависимости от возраста установлено, что в основном данная мутация регистрировалась у молодых женщин: у 2-х больных в возрасте до 35 лет и у 6-ти больных в возрасте от 35 до 55 лет.

Установлена высокая эффективность неoadьювантной химиотерапии (ТАС или ТС) с включением циклофосфида (алкилирующего ДНК-повреждающего агента) у больных BRCA1-ассоциированным РМЖ. Объективный клинический ответ наблюдался у 8 больных (88,9%), полный патоморфологический ответ (урT0N0) – у 4 (44,4%), прогрессирования процесса зарегистрировано не было. При этом больные в равной степени отвечали и на комбинацию ТАС и ТС. Перехода из группы ТС в ТАС (cross-over) не было.

Следовательно, мутация в гене BRCA1 является предиктивным маркером высокой чувствительности к неoadьювантной химиотерапии (полный патоморфологический регресс (pCR) зарегистрирован у 44,4% больных).

Экспрессия мРНК гена бета-тубулинов III класса. Предиктивное значение экспрессии мРНК гена бета-тубулинов III класса - маркера чувствительности опухоли к таксанам, изучено у 141 больных местнораспространенным РМЖ. Низкая экспрессия бета-тубулинов III класса в опухоли зарегистрирована у 79 больных (56,4%), высокая экспрессия – у 61 (43,6%) больной. В каждой из групп оценивался полный патоморфологический ответ (урT0N0) и значимый патоморфологический ответ опухоли по Miller-Payne (4+5 степень) как критерии эффективности таксан-содержащей химиотерапии.

Достоверно чаще полный морфологический регресс (урT0N0) достигался в группе больных с низкой экспрессией бета-тубулинов III класса в опухоли. В группе больных с низкой экспрессией бета-тубулинов III класса урT0N0 был достигнут – у 18 человек (23,1%; 95% ДИ 14,3–33,2); значимая степень патоморфологического ответа была достигнута – у 31 человека (39,7%; 95% ДИ 29,1–50,9). При этом в группе больных с низкой экспрессией бета-тубулинов III класса (n=79) урT0N0 был отмечен – у 18 больных (23,1%; 95% ДИ 14,3–33,2), а в группе больных с высокой экспрессии бета-тубулинов III класса урT0N0 зарегистрирован только у 1 больной (p<0,001) (рисунок 4.1.1).

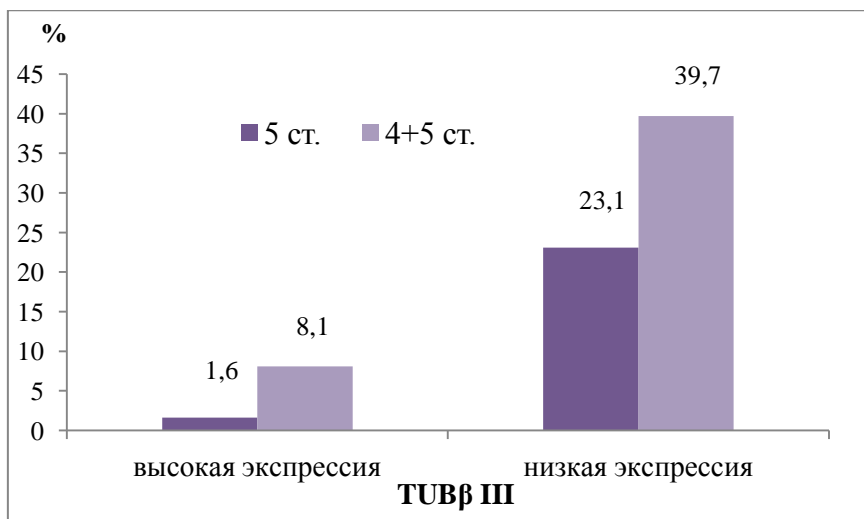


Рисунок 4.1.1 – Распределение значимого и полного патоморфологического регресса в самой опухоли и л/у в зависимости от экспрессии бета-тубулинов III класса

Схожая корреляция между низким уровнем экспрессии бета-тубулинов III класса и эффективностью лечения достигнута и в подгрупповом анализе ТАС/ТС.

В группе больных (n=90), получивших режим химиотерапии по схеме ТАС + cross over (ТС-ТАС), с низкой экспрессией бета-тубулинов III класса (n=48) урT0N0 был отмечен у 10 больных (20,8%; 95% ДИ 10,4–33,7), а в группе высокой экспрессии бета-тубулинов III класса урT0N0 - у 1 больной (2,4%; 95% ДИ 0,0–9,6) (p<0,005).

В группе больных, получивших химиотерапию по схеме ТС (n=51), с низкой экспрессией бета-тубулинов III класса урT0N0 был отмечен у 8 больных (26,7%; 95% ДИ 12,1–44,4), а в группе высокой экспрессии бета-тубулинов III класса урT0N0 – только у 1 больной (p<0,005).

Таким образом, по данным исследования, низкая экспрессия мРНК гена бета-тубулина III класса в ткани РМЖ является достоверным предиктивным признаком достижения полного патоморфологического ответа (урT0N0) на таксан-содержащую химиотерапию.

Экспрессия мРНК гена топоизомеразы II альфа. Предиктивное значение топоизомеразы II альфа, как маркера чувствительности опухоли к антрациклиновым антибиотикам, изучено в группе больных (n=87), получав-

ших режим химиотерапии по схеме ТАС + cross over. У больных в группе с низкой экспрессией гена топоизомеразы II альфа (n=38) в ответ на предоперационную полихимиотерапию с включением антрациклиновых антибиотиков урТОН0 был достигнут у 1 больной (1,6%); в группе высокой экспрессии (n=49) – у 18 больных (24,7%) (p<0,001). В группе больных с высокой экспрессией топоизомеразы II альфа значимая степень патоморфологического ответа была достигнута у 33 человек (45,2 %; 95% ДИ 33,8–56,8), p<0,001 (рисунок 4.1.2).

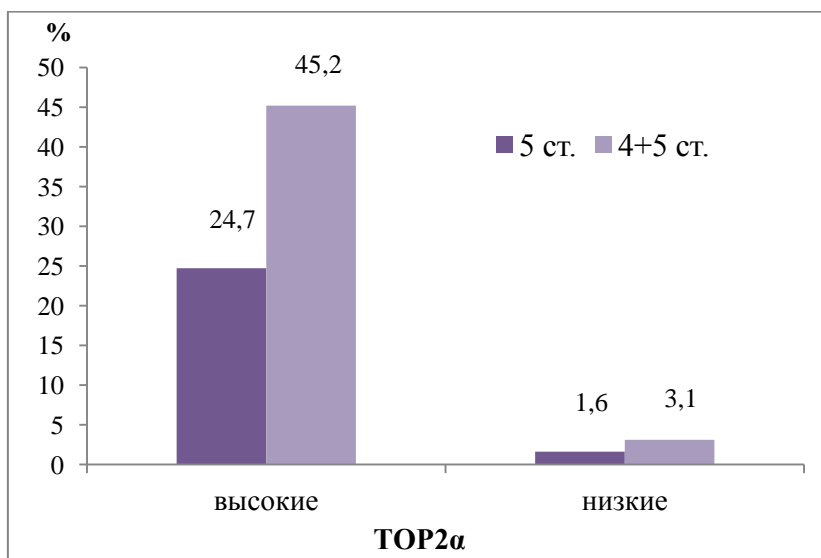


Рисунок 4.1.2 – Распределение клинического регресса опухоли в зависимости от экспрессии топоизомеразы II альфа

Таким образом, по данным исследования, высокая экспрессия топоизомеразы II альфа в ткани РМЖ является достоверным предиктивным признаком достижения полного патоморфологического ответа (урТОН0) на антрациклин-содержащую химиотерапию.

Сочетание высокой экспрессии топоизомеразы II альфа и низкой экспрессии бета-тубулинов III класса. В случае детекции высокой экспрессии топоизомеразы II альфа в комбинации с низкой экспрессией бета-тубулинов III класса значимый патоморфологический ответ в группе «ТАС+cross over» (n=90) был достигнут у 20 больных (64,5%; 95% ДИ 46,4–80,7), в группе больных, получающих химиотерапию по схеме ТС (n= 51) – у 9 человек из 51 (56,3%; 95% ДИ 30,0–80,7) (p=0,58) (рисунок 4.1.3).

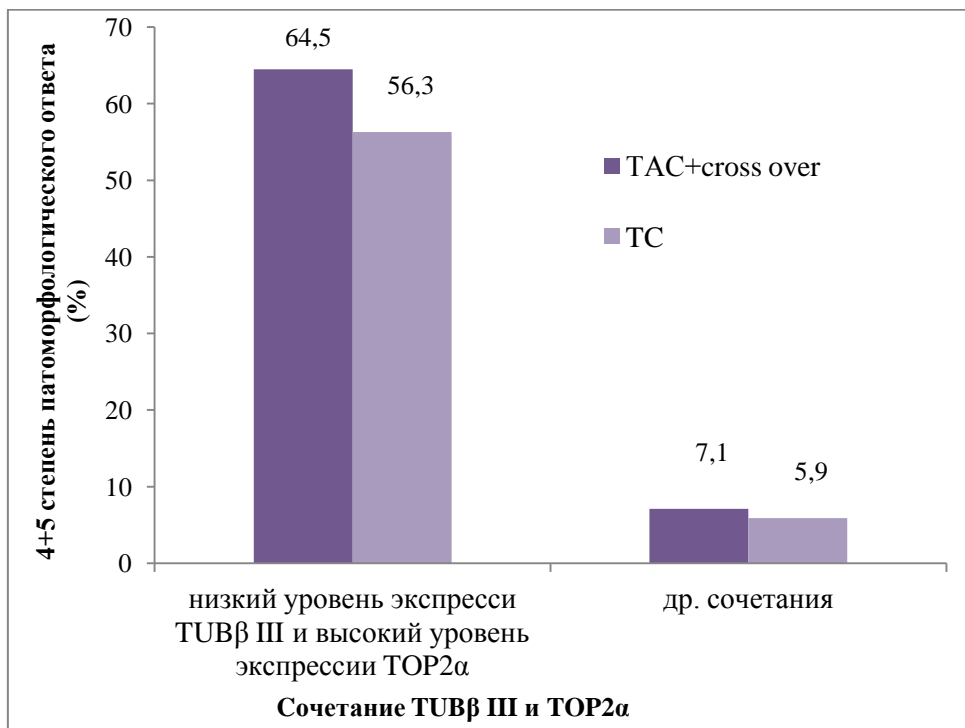


Рисунок 4.1.3 – Степень значимого патоморфологического ответа в зависимости от сочетания высокой экспрессии топоизомеразы II альфа и низкой экспрессии бета-тубулинов III класса

Сочетание высокой экспрессии топоизомеразы II альфа и низкой экспрессии бета-тубулинов III класса в отношении достижения урТОН0 показало, что в группе «TAC и cross over» (n=90) 5 степень патоморфологического ответа достигнута у 10 больных (32,3%; 95% ДИ 16,7–50,2), а в группе получающих химиотерапию по схеме TC (n= 51) – у 7 человек из 51 (43,8%; 95% ДИ 19,3-70,0) (рисунок 4.1.4).

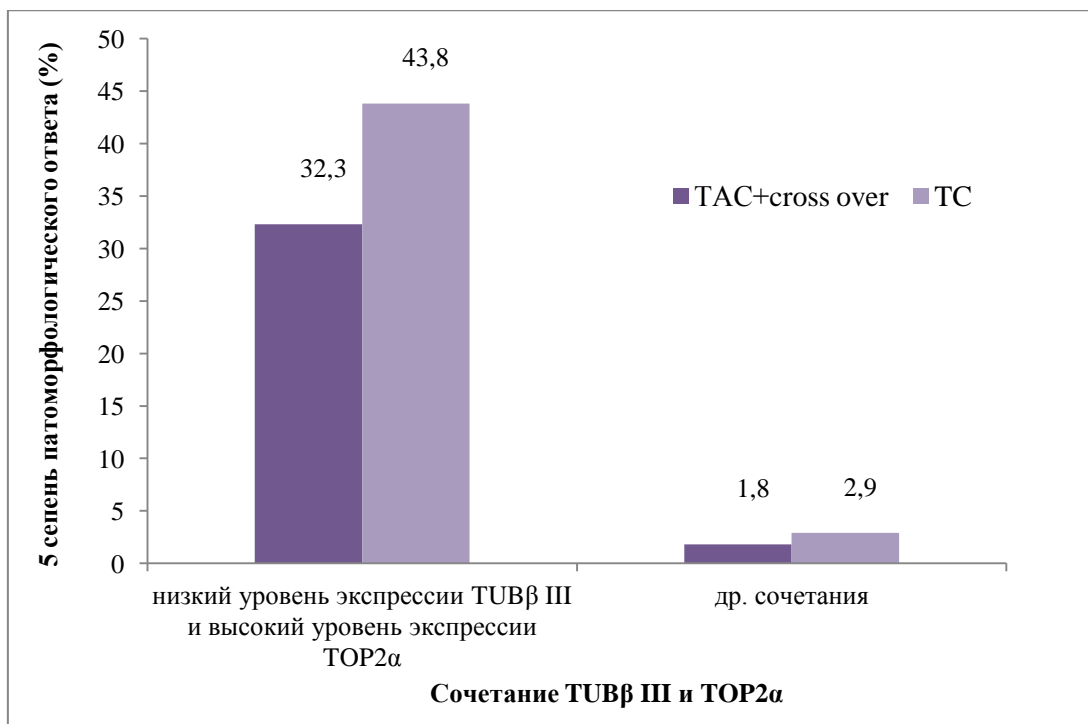


Рисунок 4.1.4 – Зависимость высокой экспрессии топоизомеразы II альфа и низкой экспрессии бета-тубулинов III класса в отношении достижения урТ0N0 в группах получающих химиотерапию по схемам TAC+cross over и TC.

Таким образом, комбинация детекции высокой экспрессии топоизомеразы II альфа с низкой экспрессии бета-тубулинов III класса является достоверным предиктивным признаком достижения полного патоморфологического ответа (урТ0N0) на таксан-содержащую химиотерапию.

4.2. Чувствительность, специфичность, диагностическую точность, предсказательную ценность положительного и отрицательного результатов достижения pCR с помощью ПЦР экспрессии генов топоизомеразы II альфа и бета-тубулинов III класса

В эру «молекулярной медицины» проведение неоадьювантной лекарственной терапии больным местно-распространенным РМЖ позволяет оценить непосредственные ее результаты, в частности клинический объективный ответ и, главное, патоморфологический ответ опухоли. Оценка непосредственной эффективности неоадьювантной химиотерапии позволяет косвенно оценить наличие или отсутствие системного ответа, а полный патоморфологический ответ – это еще и суррогатный маркер увеличения показателей безрецидивной и общей выживаемости.

В литературе данные о предиктивном значении экспрессии генов топоизомеразы II альфа, бета-тубулина III класса в оценки эффективности неоадьювантной химиотерапии местно-распространенного рака молочной железы крайне скудны и разноречивы. В связи с чем была одной из задач исследования являлось определение чувствительности, специфичности, диагностической точности, предсказательной ценности положительного и отрицательного результатов достижения полного патоморфологического регресса (pCR) с помощью полуколичественной полимеразной цепной реакции в реальном времени экспрессии генов топоизомеразы II альфа и бета-тубулинов III класса.

Молекулярно-генетическое тестирование на экспрессию генов топоизомеразы II альфа и бета-тубулинов III класса выполнялась методом полуколичественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с использованием TaqMan-проб на приборе BioRad CFX96 Real-time PCR Detection System [Имьянитов, 2006]. Показатели экспрессии ниже 20 перцентиля относились к категории «низкой» экспрессии, а выше 80 перцентиля – к категории «высокой».

С помощью данного метода в реальном времени экспрессия генов топоизомеразы II альфа была определена у 137 больных, тогда как экспрессия генов бета-тубулинов III класса – у 140 больных местно-распространенным рМЖ.

В таблице 4.2.1 отражены точечные и интервальные оценки диагностической эффективности разных уровней экспрессии маркеров бета-тубулинов III класса, топоизомеразы II альфа и их сочетаний в прогнозировании полного патоморфологического ответа; данные для расчета этих показателей представлены в 4-польных таблицах 4.2.2–4.2.6.

Таблица 4.2.1 – Чувствительность, специфичность, диагностическая точность, предсказательная ценность положительного и отрицательного результата низкой экспрессии бета-тубулинов III класса, высокой топоизомеразы II альфа и их сочетания в прогнозировании урТОН0 (полного патоморфологического ответа)

Диагностические показатели	Низкая экспрессия TUB3B (%, 95%ДИ)	Высокая экспрессия TOP2A (%, 95%ДИ)	↓ TUB3B +↑ TOP2A (%, 95%ДИ)	p
Чувствительность	94,7 [73,9–99,1]	94,7 [73,9–99,1]	89,5 [66,8–98,4]	$p_{1,3}=1,0$ $p_{2,3}= 1,0$ $p_{1,2}= 1,0$
Специфичность	50,4 [41,2–59,6]	53,4 [44,0–62,6]	74,6 [65,7–82,1]	$p_{1,3}=0,0001$ $p_{2,3}= 0,0007$ $p_{1,2}=0,64$
Диагностическая точность	56,4 [47,8–64,8]	59,1 [50,4–67,4]	76,6 [68,7–83,4]	$p_{1,3}=0,0004$ $p_{2,3}= 0,0019$ $p_{1,2}=0,65$
Предсказательная ценность положительного результата	23,1 [14,3–34,0]	24,7 [15,3–36,1]	36,2 [22,7–51,5]	$p_{1,3}=0,11$ $p_{2,3}= 0,18$ $p_{1,2}=0,82$
Предсказательная ценность отрицательного результата	98,4 [91,3–99,7]	98,4 [91,6–99,7]	97,8 [92,2–99,7]	$p_{1,3}=0,79$ $p_{2,3}= 0,77$ $p_{1,2}=0,98$

Различия в группах при урТОН0 в зависимости от низкой и высокой экспрессии топоизомеразы II альфа высоко значимы ($p < 0,001$). Чувствительность, специфичность, общая точность высокой экспрессии топоизомеразы II альфа в прогнозировании урТОН0 (полного патоморфологического ответа) составили 94,7%, 53,4%, 59,1%, соответственно (таблицы 4.2.1; 4.2.2; 4.2.3).

Таблица 4.2.2 – Распределение истинно положительных, ложно положительных; ложно отрицательных и истинно отрицательных результатов при достижении полного патоморфоза в зависимости от высокой экспрессии топоизомеразы II альфа

ТОРПА	урТОН0		Всего
	есть	нет	
высокие	18 (ИП)	55 (ЛП)	73
др.	1 (ЛО)	63 (ИО)	64
Всего	19	118	137

Таблица 4.2.3 – Распределение истинно положительных, ложно положительных; ложно отрицательных и истинно отрицательных результатов при достижении полного патоморфоза в зависимости от низкой экспрессии топоизомеразы II альфа

ТОРПА	урТОН0		Всего
	есть	нет	
низкие	1 (ИП)	63 (ЛП)	64
др.	18 (ЛО)	55 (ИО)	73
Всего	19	118	137

Различия в группах при урТОН0 низкой и высокой экспрессии бета-тубулинов III класса высоко значимы ($p < 0,001$). Чувствительность, специфичность, общая точность низкой экспрессии бета-тубулинов III класса составили 94,7%, 50,4%, 56,4% соответственно (таблицы 4.2.1, 4.2.5, 4.2.6).

Таблица 4.2.4 – Распределение истинно положительных, ложно положительных; ложно отрицательных и истинно отрицательных результатов при достижении полного патоморфоза в зависимости от низкой экспрессии бета-тубулинов III класса

TUB3B	урT0N0		Всего
	есть	нет	
низкая экспрессия	18 (ИП)	60 (ЛП)	78
др.	1 (ЛО)	61 (ИО)	62
Всего	19	121	140

Таблица 4.2.5 – Распределение истинно положительных, ложно положительных; ложно отрицательных и истинно отрицательных результатов при достижении полного патоморфоза в зависимости от низкой экспрессии бета-тубулинов III класса

TUB3B	урT0N0		Всего
	есть	нет	
высокая экспрессия	1 (ИП)	61 (ЛП)	62
др.	18 (ЛО)	60 (ИО)	78
всего	19	121	140

Важно, что вероятность полного патоморфологического ответа (урT0N0) при низкой экспрессии бета-тубулинов III класса в комбинации с высокой экспрессией топоизомеразы II альфа оказалась значимо выше: чувствительность – 89,5%, специфичность – 74,6%, общая точность – 76,6%, предсказательная ценность положительного и отрицательного результатов 36,2% и 97,8% соответственно (таблицы 4.2.1, 4.2.6, 4.2.7).

Таблица 4.2.6 – Распределение истинно положительных, ложно положительных; ложно отрицательных и истинно отрицательных результатов при достижении полного патоморфоза в зависимости от низкой экспрессии бета-тубулинов III класса и вы высокой экспрессии топоизомеразы II альфа

Уровни экспрессии маркеров	урT0N0		Всего
	есть	нет	
низкая экспрессия TUB3B +высокая экспрессия TOP2A	17 (ИП)	30 (ЛП)	47
др. сочетания	2 (ЛО)	88 (ИО)	90
Всего	19	118	137

Различия в группах при значимом патоморфологическом ответе (Rayne Miller 4+5 степени) в зависимости от низкой и высокой экспрессии топоизомеразы II альфа высоко значимы ($p < 0,001$). Чувствительность, специфичность, общая точность высокой экспрессии топоизомеразы II альфа составили 94,3%, 60,8%, 69,3% соответственно (таб. 4.2.7; 4.2.8; 4.2.9).

Таблица 4.2.7 – Чувствительность, специфичность, диагностическая точность, предсказательная ценность положительного и отрицательного результата низкой экспрессии бета-тубулинов III класса, высокой экспрессии топоизомеразы II альфа и их сочетания в достижении клинически значимого патоморфологического ответа 4+5 степени

Диагностические показатели	Низкая экспрессия ТУВШВ %, 95%ДИ	Высокая экспрессия ТОРПА %, 95%ДИ	↓ ТУВШВ +↑ ТОРПА %, 95%ДИ	p
Чувствительность	86,1 [70,5–95,3]	94,3 [80,8–99,1]	82,9 [66,3–93,4]	$p_{1,3}=0,70$ $p_{2,3}=0,13$ $p_{1,2}=0,25$
Специфичность	54,8 [44,7–64,6]	60,8 [50,6–70,3]	82,4 [73,6–89,2]	$p_{1,3} < 0,0001$ $p_{2,3}=0,0006$ $p_{1,2}=0,38$
Диагностическая точность	62,9 [54,3–70,9]	69,3 [60,9–76,9]	82,5 [75,1–88,4]	$p_{1,3}=0,003$ $p_{2,3}=0,010$ $p_{1,2}=0,25$
Предсказательная ценность положительного результата	39,7 [28,8–51,5]	45,2 [33,5–57,3]	61,7 [46,4–75,5]	$p_{1,3}=0,017$ $p_{2,3}=0,078$ $p_{1,2}=0,50$
Предсказательная ценность отрицательного результата	91,9 [82,2–97,3]	96,9 [89,1–99,5]	93,3 [86,0–97,5]	$p_{1,3}=0,37$ $p_{2,3}=0,98$ $p_{1,2}=0,23$

Таблица 4.2.8 – Распределение истинно положительных, ложно положительных; ложно отрицательных и истинно отрицательных результатов при достижении полного и значимого патоморфологического ответа в зависимости от высокой экспрессии топоизомеразы II альфа

ТОРПА	Значимый патоморфологический ответ опухоли (4+5 степени), N0		
	есть	нет	всего
высокая экспрессия	33 (ИП)	40 (ЛП)	73
др.	2 (ЛО)	62 (ИО)	64
всего	35	102	137

Таблица 4.2.9 – Распределение истинно положительных, ложно положительных; ложно отрицательных и истинно отрицательных результатов при достижении полного и значимого патоморфологического ответа в зависимости от низкой экспрессии топоизомеразы II альфа

ТОРПА	Значимый патоморфологический ответ опухоли (4+5 степени)		
	есть	нет	всего
низкая экспрессия	2 (ИП)	62 (ЛП)	64
др.	33 (ЛО)	40 (ИО)	73
всего	35	102	137

Различия в группах с значимым патоморфологическим ответом опухоли (Paine Miller 4 и 5 степени) при низкой и высокой экспрессии бета-тубулинов III класса высоко значимы ($p < 0,001$). Чувствительность, специфичность, общая точность низкой экспрессии бета-тубулинов III класса составили 86,1%, 54,8%, 62,9 %, соответственно (таблицы 4.2.7; 4.2.10; 4.2.11; 4.2.12).

Таблица 3.2.10 – Распределение истинно положительных, ложно положительных; ложно отрицательных и истинно отрицательных результатов при достижении полного и значимого патоморфологического ответа в зависимости от низкой экспрессии бета-тубулинов III класса

TUBШВ	Значимый патоморфологический ответ опухоли (4+5 степени)		Всего
	есть	нет	
низкая экспрессия	31 (ИП)	47 (ЛП)	79
др.	5 (ЛО)	57 (ИО)	61
всего	36	104	140

Таблица 3.2.11 – Распределение истинно положительных, ложно положительных; ложно отрицательных и истинно отрицательных результатов при достижении полного и значимого патоморфологического ответа в зависимости от высокой экспрессии бета-тубулинов III класса

TUBШВ	Значимый патоморфологический ответ опухоли (4+5 степень)		Всего
	есть	нет	
высокая экспрессия	5 (ИП)	57 (ЛП)	61
др.	31 (ЛО)	47 (ИО)	79
всего	36	104	140

Также значимые чувствительность, специфичность, общая точность, предсказательная ценность положительного и отрицательного результатов выявлены при диагностике клинически значимого патоморфологического ответа (4+5 степени) при низкой экспрессии бета-тубулинов III класса в комбинации с высокой экспрессией топоизомеразы II альфа: 82,9%, 82,4 %, 82,5%, 61,7% и 93,3%, соответственно (таблицы 4.2.7; 4.2.12).

Таблица 4.2.12 – Распределение истинно положительных, ложно положительных; ложно отрицательных и истинно отрицательных результатов при достижении полного и значимого патоморфологического ответа в зависимости от низкой экспрессии бета-тубулинов III класса и высокой экспрессии топоизомеразы II альфа

Уровни экспрессии маркеров	Значимый патоморфологический ответ опухоли (4+5 степень)		Всего
	есть	нет	
низкая экспрессия TUBIII + высокая экспрессия TOPIIA	29 (ИП)	18 (ЛП)	47
др. сочетания	6 (ЛО)	84 (ИО)	90
всего	35	102	137

4.3 Прогностическое значение молекулярных и биологических маркеров

Доказано, что наиболее важный критерий оценки эффективности неoadьювантной химиотерапии – полный патоморфологический регресс опухоли (ypT0N0). Данный критерий рассматривается как суррогатный маркер увеличения показателей выживаемости больных местно-распространенным РМЖ (для люминального В без экспрессии HER2, трижды негативного и HER2-позитивного). В исследовании отмечена тенденция к увеличению показателей 2-х летней EFS у больных, достигших ypT0N0 в сравнении с больными с остаточной опухолью – 75,0% против 70,2% (рис. 4.3.1).

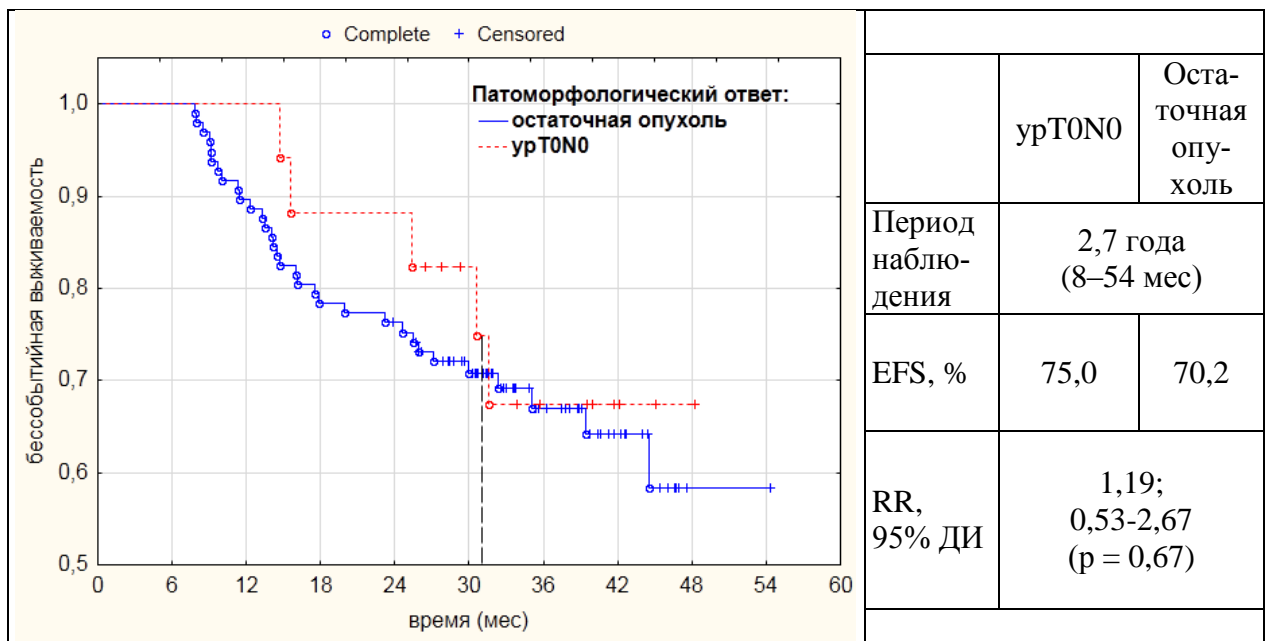


Рис. 4.3.1 – 2-х летняя EFS больных местно-распространенным РМЖ в зависимости от наличия ypT0N0 или остаточной опухоли (метод Kaplan-Meier, $p = 0,67$) ($n=141$).

Анализ 2-летней EFS ($n=141$) так же показал, что отсутствие экспрессии рецептора прогестерона (рис. 4.3.2), как и молодой возраст больных (до 35 лет) (рис. 4.3.3), являются важными факторами неблагоприятного прогноза у больных местно-распространенным РМЖ. В других возрастных категориях значимых различий в показателях 2-летней EFS выявлено не было.

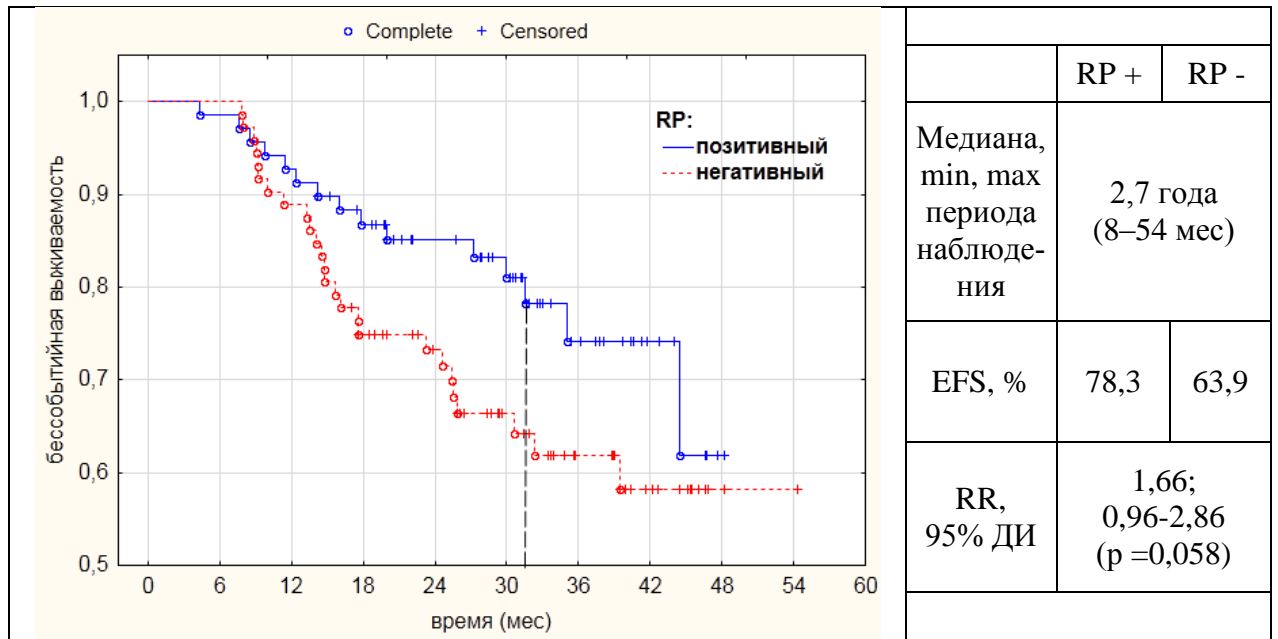


Рисунок 4.3.2 – 2-х летняя EFS больных местно-распространенным РМЖ в зависимости от экспрессии прогестеронов рецепторов (метод Kaplan-Meier, $p=0,058$) в общей группе больных ($n=141$).

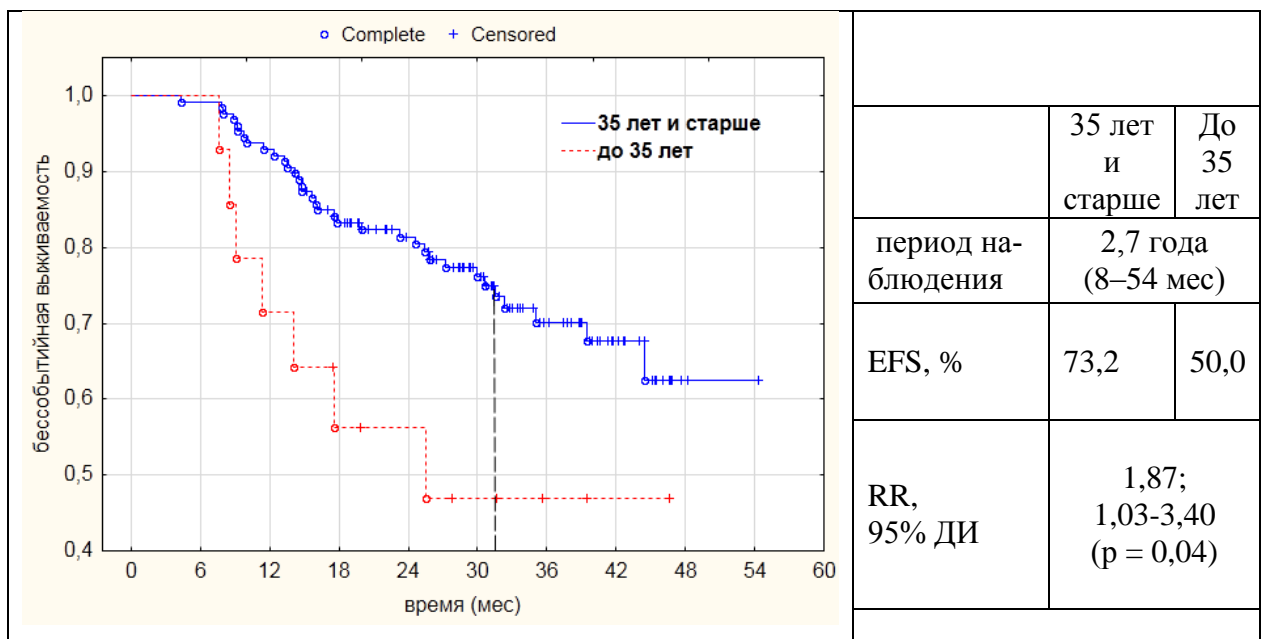


Рис. 4.3.3 – 2-х летняя EFS больных местно-распространенным РМЖ в зависимости от возраста больных (метод Kaplan-Meier, $p=0,04$) в общей группе больных ($n=141$).

Что касается экспериментальных молекулярных маркеров, то у больных местно-распространенным РМЖ ($n=141$) с низким уровнем экспрессии гена бета-тубулина III класса в опухоли до начала неoadъювантной химиотерапии, отмечается явное улучшение бессобытийной 2-летней EFS по сравне-

нию с больными, у которых экспрессия гена бета-тубулина III класса была высокой (83,3 против 54,8 %, $p=0,0006$) (рис. 4.3.4).

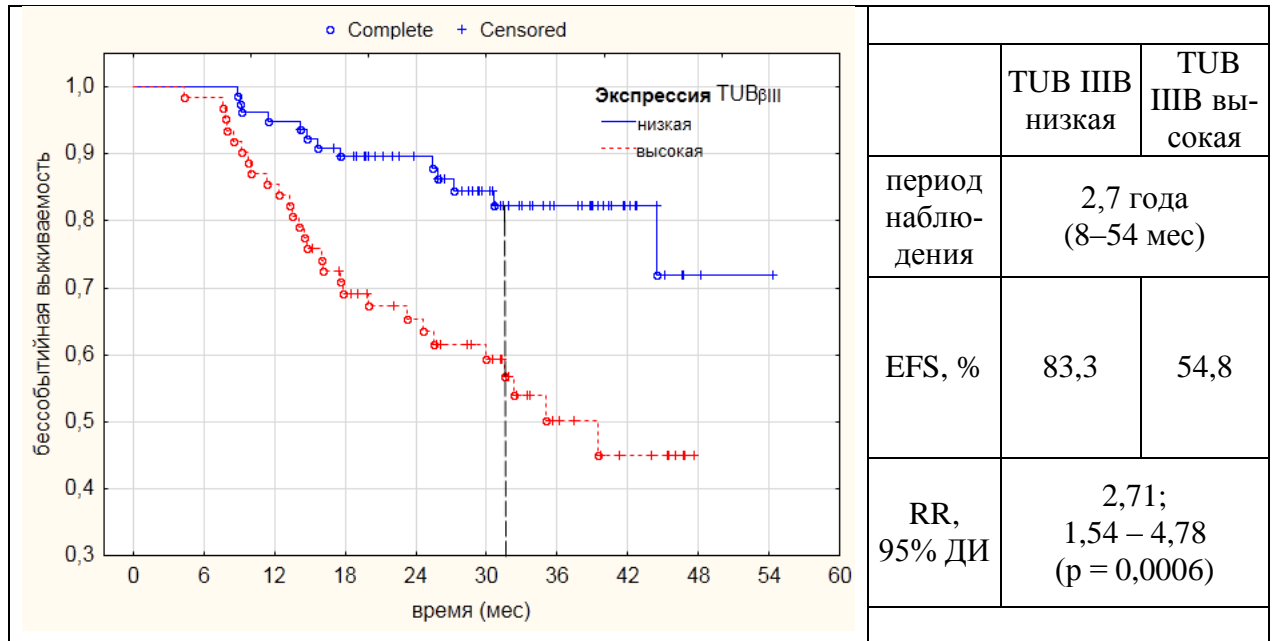


Рис. 4.3.4 – 2-х летняя EFS больных местно-распространенным РМЖ в зависимости от экспрессии бета-тубулина III класса (метод Kaplan-Meier, $p=0,0006$) в общей группе больных ($n=141$).

У больных местно-распространенным РМЖ с высоким уровнем экспрессии гена топоизомеразы II альфа в опухоли до начала лечения показатели 2-летней EFS были так же значимо выше (рис. 4.3.5).

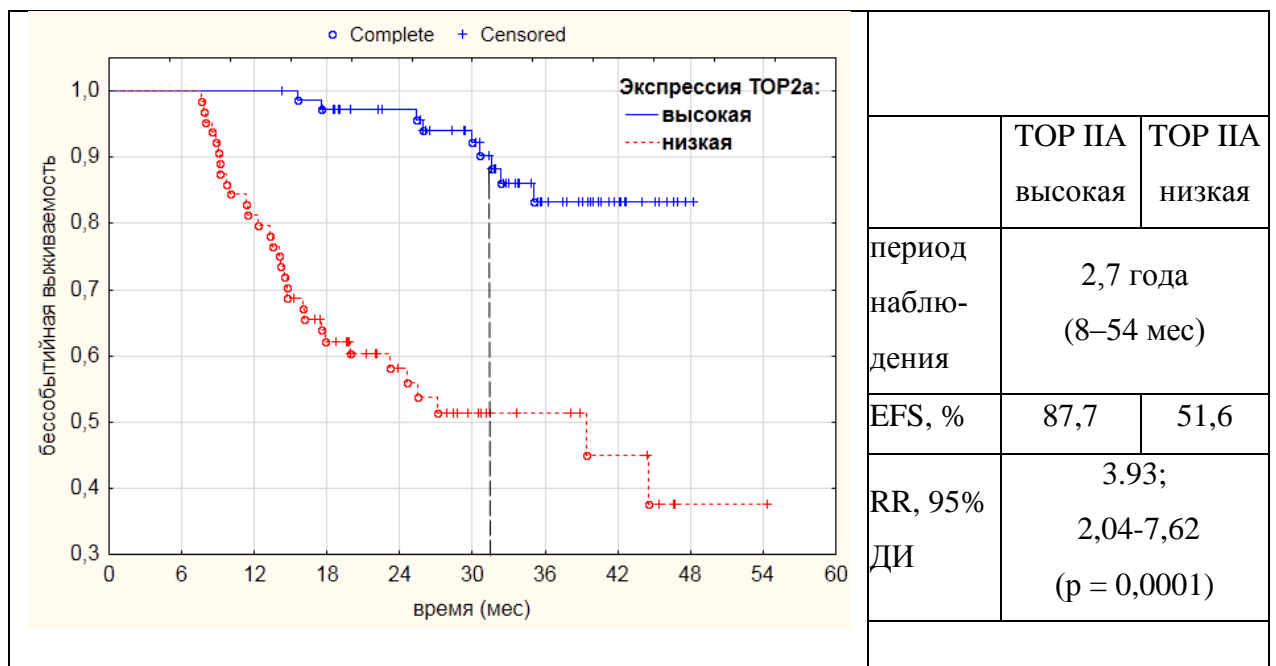


Рисунок 4.3.5. – 2-х летняя EFS больных местно-распространенным РМЖ в зависимости от экспрессии топоизомеразы II альфа (метод Kaplan-Meier, $p=0,0001$) ($n=141$).

При анализе частоты возникновения рецидивов так же были обнаружены достоверные отличия 2-летней EFS между больными с низкой (G1+G2) против высокой (G3) степенью злокачественности (рис. 4.3.6).

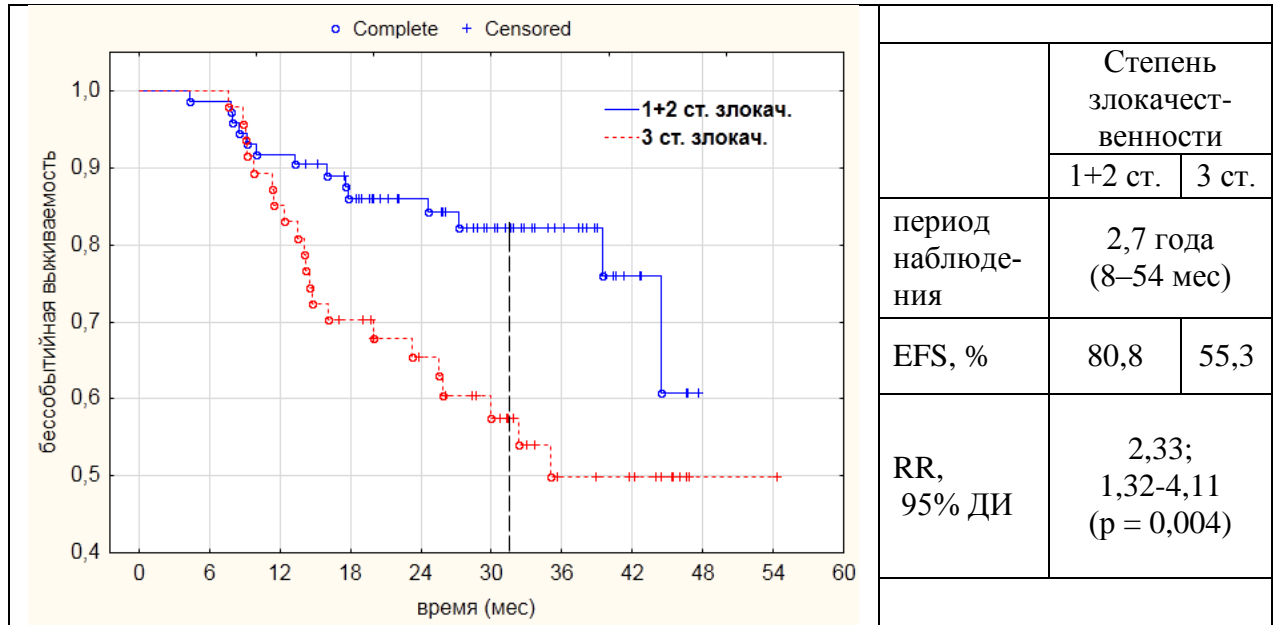


Рисунок 4.3.6 – 2-летняя EFS больных местно-распространенным РМЖ в зависимости от степени злокачественности опухоли (метод Kaplan-Meier, $p = 0,004$) ($n=141$).

У больных местно-распространенным РМЖ с высоким уровнем экспрессии гена топоизомеразы II альфа и низкой экспрессией бета-тубулинов III класса в опухоли до начала лечения сравнении против др. сочетаний этих признаков – 89,7% против 55,4% , $p=0,003$ (рис. 4.3.7).

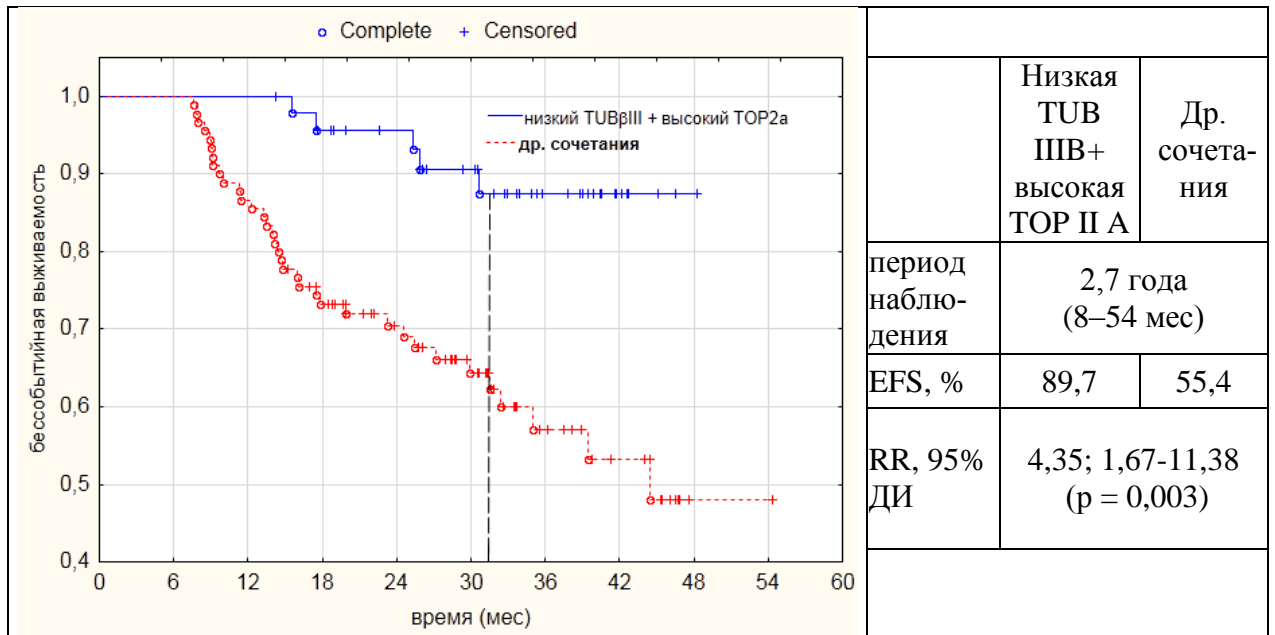


Рис. 4.3.7 – 2-х летняя EFS больных местно-распространенным РМЖ в зависимости от сочетания низкой экспрессии бета-тубулинов III класса и высокой экспрессии топоизомеразы II альфа (метод Kaplan-Meier, $p=0,003$) ($n=141$).

Мутация в гене BRCA1 является предиктивным маркером высокой чувствительности к неoadъювантной химиотерапии (полный патоморфологический ответ (зарегистрирован у 44,4% больных), но достоверно не прогнозирует улучшение показателей бессобытийной выживаемости (рис. 4.3.8).

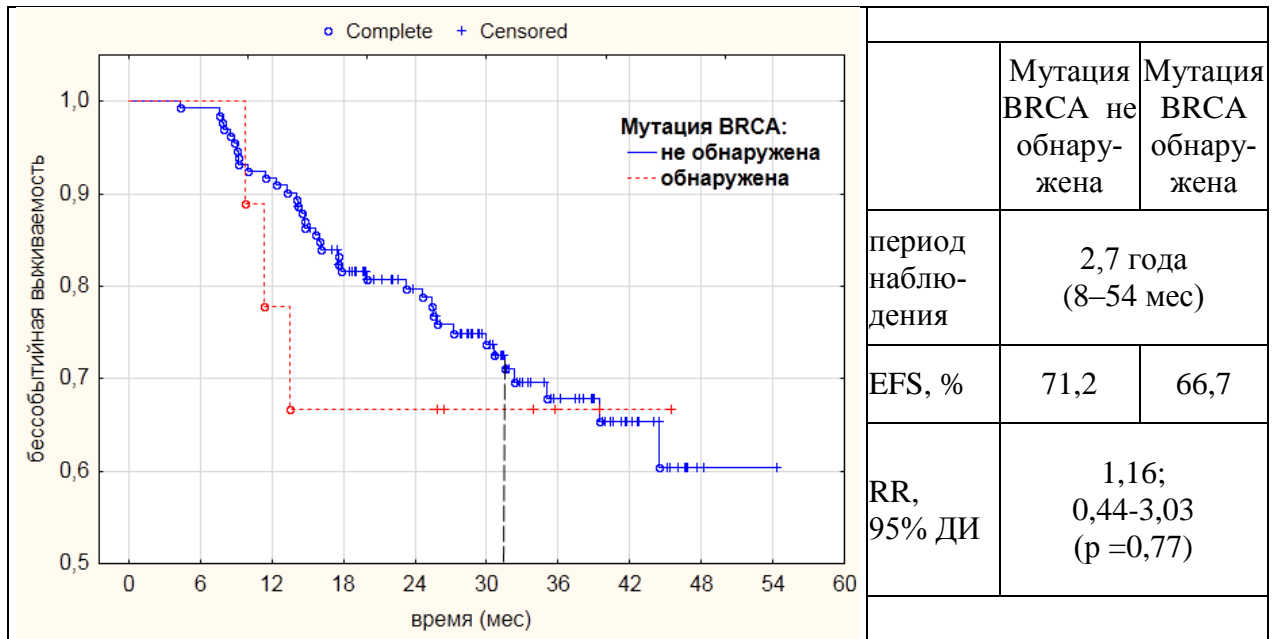


Рис. 4.3.8 – 2-х летняя EFS больных местно-распространенным РМЖ в зависимости от наличия BRCA1 мутации (метод Kaplan-Meier, $p=0,77$) ($n=141$).

Таким образом, при выборе предоперационной лекарственной терапии местно-распространенного РМЖ наравне с имеющимися стандартами следует использовать оценку экспрессии генов топоизомеразы II альфа и бета-тубулинов III класса, а так же анализ на мутацию гена BRCA1 в качестве прогностических и предиктивных маркеров.

Глава 5**ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ
И ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В структуре онкологической заболеваемости женского населения России РМЖ занимает первое место 20,1%. Удельный вес РМЖ в структуре смертности женщин от злокачественных новообразований составляет 17,41% [Чиссов В.И. и др., 2011, Мерабишвили В.М., 2011]. Рост смертности не уступает темпам роста заболеваемости. Поэтому любые аспекты проблемы лечения РМЖ сохраняют актуальность.

Современные подходы к лечению местно-распространённого рака молочной железы включают неоадьювантную системную терапию, хирургическое лечение, а также дополнительное использование лучевой терапии, с последующей адьювантной химиотерапией и гормонотерапией, если имеется чувствительность. Предоперационная химиотерапия, позволяющая за короткий срок продемонстрировать свою эффективность – достижение полного патоморфологического ответа (pCR), является моделью для подбора адьювантной системной терапии. Безусловно, что первоначальная химиотерапия с последующим хирургическим удалением опухоли и регионарных лимфатических узлов является основным компонентом лечения местно-распространённых форм РМЖ. Многолетние наблюдения продемонстрировали, что у значительной части (от 30 до 80%) больных неоперабельными формами РМЖ довольно рано развиваются отдаленные метастазы опухоли независимо от характера местного лечения.

Быстрое течение местно-распространённого РМЖ может объясняться существованием скрытых гематогенных микрометастазов уже к моменту установления первичного диагноза РМЖ. Поэтому значительная часть больных РМЖ имеют системное заболевание, потенциально излечимое только с помощью эффективной системной терапии, дополняющей локальное хирургическое и лучевое лечение [Семиглазов В.Ф., 2005].

Основная цель изучения предоперационной химиотерапии заключается в том, чтобы найти потенциально значимые «суррогатные» маркеры, для подбора системной терапии с целью улучшения показателей выживаемости.

Важнейшие биологические отличия между различными подтипами РМЖ, заключающиеся в экспрессии биомаркеров: рецепторов эстрогенов и прогестерона, HER2, Ki-67 (или патоморфологическая оценка степени злокачественности) в клинической практике позволяют индивидуализировать лечение. В целом, больные с опухолями, экспрессирующими РЭ и РП, являются кандидатами для антиэстрогенной терапии, особенно женщины в постменопаузе, в то время как больные с опухолями, экспрессирующими HER2, являются кандидатами для анти-HER2-терапии. Больные с опухолями не экспрессирующими указанные три маркера – так называемые “трижды-негативные” или базально-подобный РМЖ, являются кандидатами для химиотерапии.

Препаратами выбора в неoadъювантной химиотерапии РМЖ по-прежнему остаются антрациклиновые антибиотики и таксаны [Cardoso F., 2014; Орлова Р.В., 2015; Sparano J.A., 2015]. С появлением экспериментальных маркеров (бета-тубулинов III класса, топоизомеразы II альфа, мутации в гене BRCA1) появилась возможность предварительно спрогнозировать эффективность предоперационной химиотерапии. Молекулярно-генетическое тестирование на экспрессию генов топоизомеразы II альфа и бета-тубулинов III класса выполнялась методом полуколичественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с использованием TaqMan-проб на приборе BioRad CFX96 Real-time PCR Detection System [Imyanitov, 2006]. Показатели экспрессии ниже 20 перцентиля относились к категории «низкой» экспрессии, а выше 80 перцентиля – к категории «высокой».

В период с 2010 г. по 2014 г. в исследование по изучению корреляции между уровнем молекулярных маркеров (стандартных и экспериментальных) и эффективностью предоперационной химиотерапии была 141 больная местнораспространённым РМЖ. Больные получали предоперационную химиоте-

рапию по схемам ТАС (доцетаксел+доксорубицин+циклофосфан) или ТС (доцетаксел+циклофосфан) в стандартных дозировках. Больным HER2+РМЖ одновременно с химиотерапией назначалась таргетная терапия трастузумабом в стандартных дозах. Анализ частоты объективных ответов опухоли на проведенное предоперационное лечение показал статистически достоверное преимущество схеме ТАС против ТС (частота объективных ответов составила 82,9 против 67,8% соответственно, $p < 0,05$). В исследовании отмечено 4-кратное увеличение частоты pCR в группе больных с трижды негативным подтипом опухоли по сравнению с люминальным В подтипом. Частота pCR при сравнении всех подтипов равнялась 8,5%, 6,7%, 23,8% и 25,8%, соответственно

Наличие BRCA 1 мутации выявлено у 9 из 141 человек, что составило около у 6,4% больных: у 5 (55%) больных диагностирован трижды негативный подтип и у 4 (45%) - люминальный А подтип РМЖ. Установлена высокая эффективность неoadъювантной химиотерапии (ТАС или ТС) с включением циклофосфида (ДНК-повреждающего алкилирующего агента) у больных BRCA1-ассоциированным РМЖ. Объективный клинический ответ наблюдался у 8 больных (88,9%), полный патоморфологический ответ (урT0N0) – у 4 (44,4%), прогрессирования процесса зарегистрировано не было. При этом больные в равной степени отвечали и на комбинацию ТАС и ТС.

Резистентность к препаратам таксанового ряда, воздействующих на микротрубочки, обусловлена гиперэкспрессией бета-тубулина III класса (Kamath K., 2005). Достоверно чаще полный морфологический регресс (урT0N0) достигался в группе больных с низкой экспрессией бета-тубулинов III класса в опухоли. В группе больных с низкой экспрессией бета-тубулинов III класса ($n=79$) урT0N0 был отмечен – у 18 больных (23,1%; 95% ДИ 14,3–33,2), а в группе больных с высокой экспрессии бета-тубулинов III класса урT0N0 зарегистрирован у 1 больной ($p < 0,001$). Схожая корреляция между низким уровнем экспрессии бета-тубулинов III класса и эффективностью ле-

чения достигнута в подгрупповом анализе ТАС/ТС. Чувствительность, специфичность, общая точность, предсказательная ценность положительного и отрицательного результатов урТ0N0 при низкой экспрессии бета-тубулинов III класса составили 94,7%, 50,4 %, 56,4%, 23,1% и 98,4%, соответственно.

Эффективность антрациклиновых антибиотиков, более вероятна при активации мишени для препаратов этой группы – топоизомераза II альфа [Coon J., 2002; Di Leo A., 2002; MacGrogan G., 2003]. У больных в группе с низкой экспрессией гена топоизомеразы II альфа в ответ на предоперационную полихимиотерапию с включением антрациклиновых антибиотиков урТ0N0 был достигнут у 1 больной (1,6%); в группе высокой экспрессии – у 18 больных (24,7%) ($p < 0,001$). Чувствительность, специфичность, общая точность высокой экспрессии топоизомераза II альфа составили 94,7%, 53,4%, 59,1% соответственно. При этом вероятность полного патоморфологического ответа (урТ0N0) при низкой экспрессии бета-тубулинов III класса в комбинации с высокой экспрессией топоизомераза II альфа оказалась значимо выше: чувствительность – 89,5%, специфичность – 74,6%, общая точность – 76,6%, предсказательная ценность положительного и отрицательного результатов 36,2% и 97,8% соответственно. Также значимые чувствительность, специфичность, общая точность, предсказательная ценность положительного и отрицательного результатов выявлены при диагностике клинически значимого патоморфологического ответа (4+5 степени) при низкой экспрессии бета-тубулинов III класса в комбинации с высокой экспрессией топоизомеразы II альфа: 82,9%, 82,4 %, 82,5%, 61,7% и 93,3%, соответственно.

Подтверждено, что наиболее важный промежуточный критерий эффективности неоадьювантной химиотерапии является полный патоморфологический регресс опухоли (урТ0N0). Данный критерий рассматривается как суррогатный маркер увеличения показателей выживаемости больных местнораспространенным РМЖ (особенно для люминального В HER2 негативного, трижды негативного и HER2-позитивного РМЖ). В исследовании отмечена тенденция к увеличению показателей 2-х летней бессобытийной выживаемо-

сти у больных, достигших урТ0N0 в сравнении с больными с остаточной опухолью – 75% против 70,2% (95% ДИ 0,53-2,67).

Анализ 2-летней EFS подтвердил тот факт, что молодой возраст больных (до 35 лет) является важным фактором неблагоприятного прогноза у больных местно-распространенным РМЖ

Полный патоморфологический регресс опухоли (pCR – 0N0M0), рассматривается как суррогатный маркер увеличения показателей выживаемости больных местно-распространенным РМЖ (для люминального В без экспрессии HER2, трижды негативного и HER2-позитивного) [Wolmark, 2001; Bear, 2003; Gianni L., 2010; von Minckwitz, 2012; Esserman L., 2012; Cortazar P., 2012]. В исследовании отмечена тенденция к увеличению показателей 2-х летней безрецидивной выживаемости у больных достигших pCR 70,6% (95% ДИ 45,4-90,4) в сравнении с больными с остаточной опухолью 67% (95% ДИ 57,3-76,1).

Анализ 2-летней безрецидивной выживаемости так же показал, что отсутствие экспрессии рецептора прогестерона, как и молодой возраст больных (до 35 лет) являются важными факторами неблагоприятного прогноза у больных местно-распространенным РМЖ [Gaudet MM, 2011]. В других возрастных категориях значимых различий в показателях 2-летней безрецидивной выживаемости выявлено не было. Получены достоверные различия 2-летней бессобытийной выживаемости между больными с низкой (G1+G2) и с высокой (G3) степенью злокачественности (80,8% против 55,3%, $p = 0,004$).

Что касается экспериментальных молекулярно-генетических маркеров, то у больных местно-распространенным РМЖ, находившихся под наблюдением 2 и более года, с низким уровнем экспрессии гена бета-тубулина III класса опухоли отмечается явная тенденция к улучшению показателей безрецидивной 2-летней выживаемости по сравнению с больными, у которых экспрессия гена бета-тубулина III класса была высокой (83,3 против 54,8%, $p < 0,0002$). У больных местно-распространенным РМЖ с высоким уровнем экспрессии гена топоизомеразы II альфа в опухоли до начала лечения показа-

тели безрецидивной 2-летней выживаемости были так же значимо выше. Важно, что при низком уровне экспрессии бета-тубулина III класса и высокой экспрессии гена топоизомеразы II альфа в опухоли до начала химиотерапии отмечается значительное увеличение показателей EFS по сравнению др. сочетаниями этих признаков (89,7% против 55,4%, $p=0,003$).

Таким образом, при выборе предоперационной лекарственной терапии местно-распространенного РМЖ наравне с имеющимися стандартами и определением биологического подтипа РМЖ следует использовать оценку экспрессии генов топоизомеразы II альфа и бета-тубулина III класса, а так же анализ на мутацию гена BRCA1 в качестве прогностических и предиктивных маркеров, что и позволит, в конечном итоге, назначить «правильное лечение для правильного больного».

В целом в результате проведенной научно-исследовательской работы на большом клиническом материале достигнута цель исследования и выполнены поставленные задачи, на основе полученных результатов сформулированы следующие выводы.

ВЫВОДЫ

1. У больных местно-распространенным раком молочной железы применение неoadъювантной цитотоксической химиотерапии по схеме ТАС чаще чем по схеме ТС приводит к объективному клиническому ответу на лечение (82,9% против 67,8%, $p=0,04$).
2. Наименьшая частота патоморфологического полного регресса опухоли (урT0N0) в ответ на неoadъювантную таксан-содержащую химиотерапию наблюдались при люминальном А и люминальном В подтипах РМЖ (8,5% и 6,7%). Наиболее высокая частота pCR в ответ на такое же лечение наблюдались при трижды-негативном и HER2 позитивном РМЖ (23,8 и 25,8%).

3. Мутация в гене BRCA1 является предиктивным маркером высокой чувствительности к неoadьювантной химиотерапии (полный патоморфологический регресс (pCR) зарегистрирован у 44,4% больных).
4. Низкий уровень экспрессии бета-тубулина III класса определяет группу больных РМЖ с повышенной чувствительностью к таксан-содержащей химиотерапии с частотой полных патоморфологических ответов (pCR) до 24,1%
5. У больных местно-распространенным РМЖ с низким уровнем экспрессии гена бета-тубулин III класса опухоли до начала химиотерапии отмечается явная тенденция к улучшению показателей бессобытийной (EFS) 2-летней выживаемости по сравнению с больными, у которых экспрессия гена бета-тубулина III класса была высокой (80,3% против 54,8%, $p < 0,05$).
6. В группе больных с низкой экспрессией топоизомеразы II альфа полный патоморфологический ответ (pCR) на полихимиотерапию с включением антрациклиновых антибиотиков был достигнут лишь в 1,6% случаев, тогда как в группе высокой экспрессии – у 24,7% больных ($p < 0,05$).
7. У больных местно-распространенным РМЖ с высоким уровнем экспрессии гена топоизомеразы II альфа опухоли до начала химиотерапии показатели бессобытийной (EFS) 2-летней выживаемости оказались значительно выше, по сравнению с больными РМЖ с низкой экспрессией гена TOP2 α (87,7 против 51,6% , $p = 0,001$).
8. Вероятность выраженного патоморфологического ответа (IV-V Miller-Raune) и полного патоморфологического ответа (pCR) на предоперационную таксан-содержащую химиотерапию заметно повышается при низкой экспрессии бета-тубулина III класса в комбинации с высокой экспрессией TOP2 α : чувствительность теста равняется 89,5% и 82,9%; специфичность – 74,6% и 82,4%; общая точность – 76,6% и 82,5%, соответственно.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

При планировании лечения местно-распространённого РМЖ целесообразно определение биологического подтипа рака молочной железы, а также маркеров чувствительности к антрациклиновым антибиотикам и таксанам.

Выбор лекарственного лечения с учетом детекции высокой экспрессии гена топоизомеразы II альфа, а также низкой экспрессии генов бета-тубулина III класса и мутации BRCA1, морфологических и биологических особенностей местно-распространённого РМЖ позволяет улучшить непосредственные результаты, вплоть до выполнения органосохраняющих операций и улучшить показатели выживаемости этих пациентов.

ДИ – доверительный интервал
ИГХ – иммуногистохимический анализ
ОВ – общая выживаемость
ОО – объективный ответ
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РМЖ – рак молочной железы
СМЖ – скintiграфия молочных желез
СЭГ – соноэластография
ADC – конъюгат антитела и цитостатического агента
АКТ – серин-протеиновая киназа
с-KIT – рецептор фактора стволовых клеток
EFS - бессобытийная выживаемость больных
FGFR – рецептор фактора роста фибробластов
ER – рецепторы эстрогенов
HDAC – гистоновые деацетилазы
HER2 – рецептор эпидермального фактора роста 2 типа
IAP – ингибитор апоптоза протеинов
IGF – инсулиноподобный фактор роста
MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа
mTOR – мишень рапамицина у млекопитающих
Mut – праймер, специфичный к мутированному аллелю
PARP – поли(аденозин дифосфат рибоза) полимеразы
pCR (pT0/is pN0 M0) – полный патоморфологический ответ
PI3K – фосфатидилинозитол 3-киназа
PR – рецепторы прогестерона
RR – (Relative Risk) – относительный риск
SRC – связанная с мембраной нерцепторная тирозинкиназа
StR – коэффициент жесткости
TIL - инфильтрация опухоли лимфоцитами

TOP2 α – топоизомераза II α

TUB β III – β -тубулины класса III

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

Wt – праймер, специфичный к нормальному аллелю

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. HER2-позитивный рак молочной железы: стандартное и двойное таргетное лечение / В.Ф. Семиглазов, А.А. Божок, Т.Ю. Семиглазова, А.Г. Васильев, А.Г. Манихас, В.В. Семиглазов, А.А. Бессонов, К.С. Николаев // *Вопр. онкологии.* – 2013. – Т. 59, № 3. – С. 341–346.
2. Биологическое обоснование планирования лечения рака молочной железы / В.Ф. Семиглазов, В. Семиглазов, Р. Палтуев, Т. Семиглазова, Г. Дашян // *Врач.* – 2012. – № 11. – С. 2–4.
3. Волченко Н.Н. Комплекс морфологических и прогностических факторов при раке молочной железы: пособие для врачей / Н.Н. Волченко, Г.А. Франк; Моск. науч.-исслед. онкол. ин-т им. П. А. Герцена. – М., 2000. – 19 с.
4. Гершанович, М.Л. Современные возможности лечения диссеминированного рака молочной железы, резистентного к антрациклинам и доцетакселу / М.Л. Гершанович, Т.Ю. Семиглазова // *Гормонозависимые опухоли : материалы IX Всероссийской конференции онкологов России.* – СПб., 2002. – С. 121–124.
5. Герштейн, Е.С. Тканевые маркёры как факторы прогноза при раке молочной железы / Е.С. Герштейн, Н.Е. Кушлинский // *Практическая онкология / под ред. С.А. Тюляндина, В.М. Моисеенко.* – СПб. : Центр ТОММ, 2004. – С. 41–50.
6. Злокачественные новообразования в России в 2012 году (заболеваемость и смертность) / Ред. А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова. – М., 2014 – 250с.
7. Значение молекулярных маркеров при выборе неоадьювантной химиотерапии местно-распространенного рака молочной железы / Т.Ю. Семиглазова, В.В. Семиглазов, Л.В. Филатова, П.В. Криворотько, В.В. Клименко, В.Г. Иванов, С.М. Новиков, М.Л. Гершанович, Е.Н. Имянитов, В.Ф. Семиглазов // *Вопр. онкологии.* – 2013. – Т. 59, № 17. – Приложение : материалы конференции (Санкт-Петербург, 2013). – С. 57.

8. Значение молекулярных маркеров при выборе неоадьювантной химиотерапии местно-распространенного рака молочной железы / Т.Ю. Семиглазова, В.В. Клименко, П.В. Криворотько, В.В. Семиглазов, Л.В. Филатова, Е.Н. Имянитов, В.Ф. Семиглазов // Фарматека. – 2013. – № 17. – С. 57–64.
9. Значение радионуклидных методов в диагностике и определении степени распространенности рака молочной железы / С.Н. Новиков, С.В. Канаев, В.Ф. Семиглазов, П.В. Криворотько, П.И. Криживицкий, Т.Ю. Семиглазова, Е.А. Туркевич, Ю.Ф. Негусторов // Вопр. онкологии. – 2013. – Т. 59, № 3. – Приложение : материалы VIII Съезда онкологов. – С. 311.
10. Изменение соноэластографических показателей жесткости как критерий оценки эффективности неоадьювантной химиотерапии рака молочной железы / Е.А. Бусько, Т.Ю. Семиглазова, В.В. Клименко, А.В. Комяков, А.В. Мищенко, В.В. Семиглазов // Учёные записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. – 2014. – Т. XXI, № 1. – С. 62–63.
11. Иммуногистохимические методы : руководство / ed. by George L. Kumar, Lars Rudbeck / пер. с англ. под ред. Г.А. Франка, П.Г. Малькова. – М., 2011, – 224 с.
12. Имянитов, Е.Н. Молекулярная онкология: клинические аспекты / Е.Н. Имянитов, К.П. Хансон. — СПб., 2007. – 211 с.
13. Имянитов, Е.Н. Применение молекулярно-генетического анализа для выбора противоопухолевой терапии / Е.Н. Имянитов, В.М. Моисеенко // Вопр. онкологии. – 2008. – Т. 54, № 2. – С. 121–132.
14. Индивидуализация адьювантной терапии рака молочной железы / В.Ф. Семиглазов, В.В. Семиглазов, Р.М. Палтуев, Г.А. Дашян, А.Г. Манихас, К.Д. Пеньков, Т.Ю. Семиглазова, Т.Т. Табагуа, А.Г. Васильев, В.В. Коларькова, П.В. Криворотько, И.В. Никитина // Фарматека. – 2011. – №7 (220). – С. 8–13.
15. Инновационные таргетные препараты при метастатическом раке молочной железы / Т.Ю. Семиглазова, В.В. Семиглазов, Л.В. Филатова,

П.В. Криворотько, Р.М. Палтуев, Д.Х. Латипова, М.Л. Гершанович // Онкология : Журнал им. П.А. Герцена. – 2012. – № 2. – С. 94–99.

16. К вопросу о возможности применения маммосцинтиграфии для контроля эффективности неoadьювантной полихимиотерапии больных раком молочной железы / С.В. Канаев, П.В. Криворотько, С.Н. Новиков, В.Ф. Семиглазов, Т.Ю. Семиглазова, Е.А. Туркевич, Л.А. Жукова, В.Ф. Климашевский, А.О. Иванцов, Р.В. Донских, В.В. Клименко, Ж.В. Брянцева // Вопр. онкологии. – 2013. – № 1. – С. 52–58.

17. К вопросу об интерпретации результатов сцинтиграфии с ^{99m}Tc -Технетрилом у больных РМЖ / П.В. Криворотько, С.М. Новиков, С.В. Канаев, В.Ф. Семиглазов, П.И. Крыжевицкий, О.В. Зотова, Л.А. Жукова, Т.Ю. Семиглазова, Ж.В. Брянцева // Эффективная фармакотерапия. – 2013. – Т. 6 :Онкология, гематология и радиология. – № 1. – С. 24–32.

18. Комбинированное использование сцинтиграфии с ^{99m}Tc -Технетрилом и эхографии в диагностике метастатического поражения лимфатических узлов у больных раком молочной железы / С.В. Канаев, С.Н. Новиков, П.В. Криворотько, В.Ф. Семиглазов, П.И. Крживицкий, Л.А. Жукова, И.И. Семенов, Т.Ю. Семиглазова, Ю.Ф. Негусторов // Вопр. онкологии. – 2013. – Т. 59, № 3. – С. 328–334.

19. Критерии оценки эффективности и токсичности предоперационной химиотерапии местно-распространенного рака молочной железы (РМЖ) / Т.Ю. Семиглазова, В.В. Клименко, П.В. Криворотько, Л.В. Филатова, С.Н. Новиков, Е.А. Бусько, В.А. Чубенко, Ф.В. Моисеенко, В.В. Семиглазов, В.Г. Иванов, Г.А. Дашян, Е.А. Туркевич, Р.В. Донских, В.Ф. Семиглазов, Е.Н. Имянитов, М.Л. Гершанович // Материалы XVIII Российского онкологического конгресса. – М., 2014. – С. 180–181.

20. Кушлинский, Н.Е. Биохимические критерии прогноза и гормоночувствительности рака молочной железы: сравнительный анализ клинического значения исследования рецепторов стероидных гормонов и рецепторов эпи-

дермального фактора роста в опухолях/ Н.Е.Кушлинский, Е.С. Герштейн // Маммология. – 1996. – № 3. – С. 15–25.

21. Кушлинский, Н.Е. Современные возможности молекулярно-биохимических методов оценки биологического «поведения» рака молочной железы / Н.Е. Кушлинский, Е.С. Герштейн // Вестн. РАМН. – 2001. – № 9. – С. 65–70.

22. Маммосцинтиграфия как маркер эффективности неoadъювантного лечения рака молочной железы для различных биологических подтипов рака молочной железы / Ж.В. Брянцева, С.В. Канаев, С.Н. Новиков, В.Ф. Семиглазов, П.В. Криворотько, Т.Ю. Семиглазова, Л.А. Жукова, Е.С. Труфанова, В.В. Клименко // Материалы конгресса российской ассоциации радиологов. – СПб., 2014. – С. 75–76.

23. Маркеры эффективности предоперационной таксансодержащей химиотерапии местно-распространенного рака молочной железы / Т. Ю. Семиглазова, В. В. Клименко, Л. В. Филатова, В. А. Чубенко, П. В. Криворотько, В. Г. Иванов, Е. А. Туркевич, А. О. Иванцов, С. Н. Новиков, В. В. Семиглазов, Р. В. Донских, Ф. В. Моисеенко, Е. А. Бусько, Ж. В. Брянцева, М. А. Осипов, М. Л. Гершанович, Е. Н. Имянитов, В. Ф. Семиглазов // Вопр. онкологии. – 2013. – Т. 59, № 3. – С. 363–367.

24. Мерабишвили В.М. Онкологическая служба Санкт-Петербурга оперативная отчётность за 2010 год, углублённая разработка базы данных регистра по международным стандартам). Ежегодник Популяционного ракового регистра (№17) / под ред. Ю.А. Щербука, А.М. Беляева. – СПб., 2011 – 336 с.

25. Методические аспекты радионуклидной диагностики рака молочной железы с помощью ^{99m}Tc -Технетрила/ С.В. Канаев, С.Н. Новиков, П.В. Криворотько, В.Ф. Семиглазов, П.И. Крживицкий, О.В. Зотова, Л.А. Жукова, Т.Ю. Семиглазова // Вопр. онкологии. – 2012. – Т. 58, № 6. – С. 768–772.

26. Молекулярные маркёры эффективности предоперационной химиотерапии местно-распространённого рака молочной железы / Т. Ю. Се-

миглазова, В. В. Клименко, Л. В. Филатова, П. В. Криворотько, В. А. Чубенко, В. Г. Иванов, Е. А. Туркевич, А. О. Иванцов, С. Н. Новиков, В. В. Семиглазов, Л. И. Мельник, Р. В. Донских, М. Л. Гершанович, Е. Н. Имянитов, В. Ф. Семиглазов // *Вопр. онкологии.* – 2013. – Т. 59, № 3. – Приложение : материалы VIII Съезда онкологов и радиологов (СПб., 2013). – С. 67.

27. Мутация 5382insC в гене BRCA1 – новый маркёр эффективности таксансодержащей неоадьювантной химиотерапии местно-распространённого рака молочной железы? / Т. Ю. Семиглазова, В. В. Клименко, Л. В. Филатова, В. А. Чубенко, П. В. Криворотько, В. Г. Иванов, Е. А. Туркевич, А. О. Иванцов, С. Н. Новиков, В. В. Семиглазов, Р. В. Донских, Е. А. Бусько, Ж. В. Брянцева, М. А. Осипов, М. Л. Гершанович, Е. Н. Имянитов, В. Ф. Семиглазов // *Вопр. онкологии.* – 2013. – Т. 59, № 3. – Приложение : материалы VIII Съезда онкологов и радиологов (Санкт-Петербург, 2013). – С. 123.

28. Неоадьювантная системная терапия рака молочной железы. Руководство для врачей / В.Ф. Семиглазов, А.Г. Манихас, Т.Ю. Семиглазова, А.А. Бессонов, В.В. Семиглазов. – СПб. : Аграф+, 2012. – 112 с.

29. Неоадьювантная таргетная терапия рака молочной железы / В.Ф. Семиглазов, Т.Ю. Семиглазова, А.А. Божок, А.Г. Манихас, А.Г. Васильев, В.В. Семиглазов, И.В. Никитина, К.С. Николаев. // *Эффективная фармакотерапия.* – 2013. – Т. 6 : Онкология, гематология и радиология. – № 1. – С. 12–18.

30. Неоадьювантная терапия гормонозависимого рака молочной железы / В.Ф. Семиглазов, В.В. Семиглазов, А.Г. Манихас, Г.А. Дашян, В.Г. Иванов, Т.Ю. Семиглазова, Р.М. Палтуев // *Злокачественные опухоли.* – 2012. – Т. 2, № 2. – С. 6–11.

31. Новое в таргетной терапии HER2-позитивного рака молочной железы / Т.Ю. Семиглазова, В.В. Семиглазов, Л.В. Филатова, И.В. Никитина, П.В. Криворотько, В.В. Клименко, М.А. Осипов, М.Л. Гершанович // *Эффективная фармакотерапия.* – 2013. – Т.6: Онкология, гематология и радиология. – № 1. – С. 6–12.

32. Новые подходы и новые препараты в таргетной терапии рака молочной железы / Т.Ю. Семиглазова, В.В. Семиглазов, Л.В. Филатова, Д.Х. Латипова, М.Л. Гершанович, В.А. Чубенко, В.С. Лукьянчикова, Г.А. Дашян, Р.М. Палтуев // Проблемы диагностики и лечения рака молочной железы : материалы VIII международной ежегодной конференции. – СПб., 2011. – С. 188–199.
33. Новые таргетные препараты в лечении рака молочной железы / Т.Ю. Семиглазова, В.В. Семиглазов, Л.В. Филатова, М.Л. Гершанович, В.А. Чубенко, Д.Х. Латипова, В.С. Лукьянчикова, Г.А. Дашян, Р.М. Палтуев // Вопр. онкологии. – 2011. – Т. 57, № 5. – С. 592–600.
34. Омельчук Н.Н., Волкова Л.В. Определение пролиферативной активности при диагностике рака молочной железы // Успехи современного естествознания. – 2014. – № 10. – С. 15.
35. Оптимизация предоперационной химиотерапии местнораспространённого рака молочной железы на основе молекулярно-генетических маркёров / В.В. Клименко, М.А. Осипов, М.М. Крамчанинов, В.А. Клюге // Материалы IV Международного молодёжного медицинского Конгресса. – СПб., 2013. – С. 57.
36. Опухолевые маркеры при раке молочной железы / В.Ф. Семиглазов, В.В. Семиглазов, Г.А. Дашян, А.А. Бессонов, Р.М. Палтуев, Т.Ю. Семиглазова, А. Васильев, А.Г. Манихас // Врач. – 2011. – № 12. – С. 2–7.
37. Опухоли репродуктивной системы / В.Ф. Семиглазов, Р.М. Палтуев, Т.Ю. Семиглазова, В.В. Семиглазов, Г.А. Дашян, А.Г. Манихас. – М.: Рекламно-издательская группа МегаПро, 2013. – 236 с.
38. Патологоанатомическая диагностика опухолей человека. Руководство : в 2 т. / под ред. Н.А. Краевского, А.В. Смольяникова. – М. : Медицина, 1993. – Т. 1. – С. 130–158.
39. Предоперационная (неoadьювантная) эндокринотерапия рака молочной железы / В.Ф. Семиглазов, В.В. Семиглазов, Г.А. Дашян, В.Г. Иванов, А.Е. Клетсель, Е.К. Жильцова, Р.В. Донских, Т.Ю. Семиглазова, Д.Е. Мацко,

Ж.В. Брянцева, И.В. Никитина, Д.Е. Щедрин, Л.М. Берштейн // Эффективная фармакотерапия. – 2013. – Т. 6: Онкология, гематология и радиология. – № 1. – С. 18–24.

40. Ранний рак молочной железы: прогностическое значение биологических подтипов (Анализ кумулятивной базы данных ФГБУ «НИИ Онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздравсоцразвития) / В.Ф. Семиглазов, Р.М. Палтуев, В.В. Семиглазов, А.Г. Манихас, К.Д. Пеньков, К.Ю. Зернов, И.В. Никитина, А.А. Божок, Д.Е. Щедрин, Т.Ю. Семиглазова, А.М. Ермаченкова, И.А. Гречухина, Г.А. Дашян // Злокачественные опухоли. – 2012. – Т. 2, № 2. – С. 12–18.

41. Рекомендации международной группы экспертов по неoadьювантной (первичной) системной терапии операбельного рака молочной железы / M. Kaufman, G.N. Hortobagyi, A. Goldhirsch [et al.] // J. Clin. Oncol. (Русское издание). – 2007. – Т. 1, № 1. – С. 68–76.

42. Роль молекулярных маркеров в оценке результатов исследования «Таксаны в комбинации с антрациклинами (ТАС) и без антрациклинов (ТС) в неoadьювантном лечении больных местно-распространенным раком молочной железы»/ Т.Ю. Семиглазова, В.В. Клименко, Л.В. Филатова, П.В. Криворотько, В.Г. Иванов, Е.А. Туркевич, А.О. Иванцов, С.Н. Новиков, В.В. Семиглазов, Р.В. Донских, Е.А. Бусько, Ж.В.Брянцева, М.А. Осипов, М.Л. Гершанович, Е.Н. Имянитов, В.Ф. Семиглазов// Материалы III конференции Общества специалистов по опухолям органов репродуктивной системы. – М., 2013. – С. 64–65.

43. Роль сцинтиграфии молочных желёз с ^{99m}Tc – технетрилом для прогнозирования патоморфологического статуса регионарных лимфатических узлов у больных местно-распространенным раком молочной железы после проведения неoadьювантной химиотерапии / Ж.В. Брянцева, С.В. Канаев, В.Ф. Семиглазов, С.Н. Новиков, П.В. Криворотько, В.В. Клименко, Е.С. Труфанова, З.С. Котова, А.В. Чёрная, Е.А. Туркевич, Т.Ю. Семиглазова // Вопр. онкологии. – 2015. – Т 61, №2. – С. 185–188.

44. Семиглазов, В.Ф. Обоснование показаний к различным видам терапии ранних стадий рака молочной железы (по материалам Сан-Галлена, 2009) / В.Ф. Семиглазов, В.В. Семиглазов, Г.А. Дашян. – М., 2009. – 62с.
45. Семиглазова Т.Ю. Метастатический рак молочной железы: инновационные таргетные препараты 2012 года / Т.Ю. Семиглазова // Материалы II конференции Общества специалистов по опухолям органов репродуктивной системы. – М., 2012. – С. 77.
46. Стратегия лечения рака молочной железы, основанная на выделении биологических подтипов / В.Ф. Семиглазов, В.В. Семиглазов, Г.А. Дашян, Т. Семиглазова, А. Манихас // Врач. – 2011. – № 12. – С. 28–34.
47. Таксотер в неоадьювантном лечении рака молочной железы / В.В. Семиглазов, Р.В. Донских, Т.Ю. Семиглазова, А.А. Божок, Д.Е. Мацко // Вопр. онкологии. - 2011. - Т. 57, № 5.-С. 645–650.
48. Таргетная терапия в лечении местно-распространенного и диссеминированного рака молочной железы с гиперэкспрессией HER2 / Т.Ю. Семиглазова, Л.В. Филатова, М.Л. Гершанович и соавт. // Вопр. онкологии. – 2011. – Т. 57, № 6. – С. 789–790.
49. Таргетная терапия рака молочной железы (новые направления) / В.Ф. Семиглазов, Г.А. Дашян, В.В. Семиглазов, Р.М. Палтуев, А.Г. Манихас, А.А. Бессонов, А.М. Ермаченкова, Д.Е. Щедрин, Т.Т. Табагуа, И.А. Гречухина, П.В. Криворотько, Р.В. Донских, Т.Ю. Семиглазова, В.В. Коларькова // Фарматека. – 2011. – № 7 (220). – С. 14–20.
50. Химиотерапия злокачественных опухолей: проблемы и перспективы / Р.В. Орлова, Р.И. Вазьян, А.К. Иванова, Е.К. Тихонова, Е.Ю. Зорина // Вопр. онкологии. – 2015. – Т. 61, № 2. – С. 244-251.
51. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factor in tamoxifen-treated estrogen receptor – positive breast cancer / T.O. Nielsen, J.S. Parker, S. Leung [et al.] // Clin. Res. – 2010. – Vol. 16. – P. 5222–5232.

52. A majority of low (1-10%) ER positive breast cancers behave like hormone receptor negative tumors / Prabhu J. S. [et al.] // *Journal of Cancer*. – 2014. – Vol.5. (2). – P. 156.
53. Abstract S1-09: A phase Ib study of pembrolizumab (MK-3475) in patients with advanced triple-negative breast cancer/ Nanda R. [et al.] // *Cancer Research*. – 2015. – T. 75. – Vol. 9 Supplement. – C. S1-09-S1-09.
54. Aka J.A. Comparison of Functional Proteomic Analyses of Human Breast Cancer Cell Lines T47D and MCF7 / J.A. Aka, S.X. Lin // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7(2). – P. e31532.
55. Alkaline single cell gel electrophoresis (comet assay): a simple technique to show genomic instability in sporadic breast cancer / S. Colleu-Durel [et al.] // *Europ. J. Cancer*. – 2004. – Vol. 40. – P. 445–451.
56. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer / L. Harris, H. Fritsche, R. Menzel [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2007. – Vol. 25 (33). – P. 5287–5312.
57. Amplification and overexpression of topoisomerase II alpha predict response to anthracycline-based therapy in locally advanced breast cancer / J.S. Coon, E. Marcus, S. Gupta-Burt [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2002 Apr. – Vol. 8(4). – P. 1061–1067.
58. Amplification of topoisomerase II alpha is a strong predictor of response to epirubicin-based chemotherapy in HER-2/neu positive metastatic breast cancer : Program and abstracts of the 23rd Annual San Antonio Breast Cancer Symposium; December 6-9, 2000; San Antonio, Texas. Abstract 21 / J.J. Isola, M. Tanner, K. Holli [et al.] // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2000. – Vol. 64. – P. 31
59. Anthracyclines: selected new developments / M. Binaschi, M. Bigioni, A. Cipollone [et al.] // *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*. – 2001. – Vol. 1, № 2. – P. 113–130.
60. Apple S.K. How do we measure a residual tumor size in histopathology (the gold standard) after neoadjuvant chemotherapy? / S.K. Apple, F. Suthar // *Breast*. – 2006. – Vol. 15(1). – P. 370–376.

61. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies / A. Antoniou [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2003. – Vol. 72. – P. 1117–1130.
62. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype / M.C. Cheang, D. Voduc, C. Bajdik [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2008. – Vol. 14. – P. 1368–1376.
63. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy / R. Rouzier [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2005. – Vol. 11(16). – P. 5678–5685.
64. Breast cancer sensitivity to neoadjuvant therapy in BRCA1 and CHEK2 mutation carriers and non-carriers. / Pfeifer W., Sokolenko A., Potapova O., Bessonov A., Ivantsov A., Laptiev S., Zaitseva O., Yatsuk O., Matsko D., Semiglazova T., Togo A., Imyanitov E. // *Breast Cancer Research and Treatment.* – 2014. – Vol. 148(3). – P. 675-83.
65. Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial / J. Hugh, J. Hanson, M.C. Cheang [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2009. – Vol. 27 (8). – P. 1168–1176.
66. Bühler, H. Transfection of keratin 18 gene in human breast cancer cells causes induction of adhesion proteins and dramatic regression of malignancy in vitro and in vivo / H. Bühler, G. Schaller // *Mol. Cancer Res.* – 2005. – Vol. 3(7). – P. 365–71.
67. Castaneda C.A. Prolonged Disease Control in a Patient With Anthracycline- and Taxane-Resistant Breast Cancer / C.A. Castaneda, H.L. Gomez // *Clin. Breast Cancer.* – 2009. – Vol. 9 (4). – P. B1-E3.
68. Cell biological prognostic factors in breast cancer: a review / J.A. Foekens, H.A. Peters, H. Portengen [et al.] // *J. Clin. Immunoassay.* – 1991. – Vol. 14. – P. 184–196.

69. Cianfrocca, M. New Molecular Classifications of Breast Cancer / M. Cianfrocca, W. Gradishar // *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. – 2009. – Vol. 59, № 5. – P. 303.
70. CK8/18 expression, the basal phenotype, and family history in identifying BRCA1-associated breast cancer in the Ontario site of the breast cancer family registry / A.M. Mulligan, D. Pinnaduwege, A.L. Bane [et al.] // *Cancer*. – 2011. – Vol. 117(7). – P. 1350–1359.
71. Class III beta-tubulin overexpression is a marker of poor clinical outcome in advanced ovarian cancer patients / G. Ferrandina, G.F. Zannoni, E. Martinelli [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2006 May 1. – Vol. 12(9). – P. 2774–2779.
72. Classical and novel prognostic markers for breast cancer and their clinical significance / T. Pankaj, M. Dejan, K. Fumitake [et al.] // *Clin. Med. Insights Oncol.* — 2010. – P. 15–34.
73. Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy/ Kuerer HM, Newman LA, Smith TL [et al.] // *J Clin Oncol.*- 1999.- Vol. 17 (2). – P. 441–4.
74. Clinical significance of class III beta-tubulin expression and its predictive value for resistance to docetaxel-based chemotherapy in gastric cancer / N. Urano, Y. Fujiwara, Y. Doki [et al.] // *Int. J. Oncol.* – 2006 Feb. – Vol. 28(2). – P. 375–381.
75. Comparison of apolipoprotein D determination methods in breast cancer / H. Søyland, I. Skaland, E.A. Janssen [et al.] // *Anticancer Res.* – 2008. – Vol. 28(2B). – P. 1151–1160.
76. Comparison of the prognostic significance of Chevallier and Sataloff's pathologic classifications after neoadjuvant chemotherapy of operable breast cancer / F. Penault-Llorca, C. Abrial, I. Raoelfils [et al.] // *Hum. Pathol.* – 2008. – Vol. 39. – P. 1221–1228.

77. Comparison of topoisomerase II alpha gene status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites / V. Durbecq, A. Leo, F. Cardoso [et al.] // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2003. – Vol. 77. – P. 199–20430.
78. Correlation between topoisomerase-II alpha gene amplification and protein expression in HER-2 amplified breast cancer / V. Durbecq, C. Desmed, M. Paesmans[et al.] // *Int. J. Oncol.* – 2004. – Vol. 25. – P. 1473–1479.
79. CTCAE v3.0: development of a comprehensive grading system for the adverse effects of cancer treatment / Trotti A, Colevas AD, Setser A [et al.] // *Semin Radiat Oncol.* – 2003. – Vol.13(3). – P. 176-81.
80. DeVries, T.J. The plasminogen activation system in tumour invasion and metastasis / T.J. DeVries, G.N. vanMuijen, D.J. Ruiter // *Pathol. Res. Pract.* – 1996. – Vol. 192. – P. 718–733.
81. Differential response of neoadjuvant chemotherapy with taxane-carboplatin versus taxane-epirubicin in patients with locally advanced triple-negative breast cancer / Wang J. [et al.] // *ASCO Annual Meeting Proceedings.* – 2014. – Vol. 32(15)_suppl. – P. 1105.
82. DNA topoisomerase II alpha immunoreactivity as a marker of tumor aggressiveness in invasive breast cancer / L. Nakopoulou, A.C. Lazaris, N. Kavantzias [et al.] // *Pathobiology.* – 2000. – Vol. 68. – P. 137–143.
83. DNA topoisomerase IIalpha expression and the response to primary chemotherapy in breast cancer / G. MacGrogan, P. Rudolph, Id. I.Mascarel [et al.] // *Br. J. Cancer.* – 2003 Aug 18. – Vol. 89(4). – P. 666–671.
84. Does pathologic complete predicts for outcome in BRCA mutation carriers with triple-negative breast cancer? / Paluch-Shimon S. [et al.] // *ASCO Annual Meeting Proceedings.* – 2014. – T. 32. – Vol. 15_suppl. – C. 1023.
85. Downregulation of Hsp27 (HSPB1) in MCF-7 human breast cancer cells induces upregulation of PTEN / N. Cayado-Gutiérrez, V.L. Moncalero, E.M. Rosales [et al.] // *Cell Stress Chaperones.* – 2013. – Vol. 18(2). – P. 243–249.

86. Dual role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human breast cancer / E. Verjans, E. Noetzel, N. Bektas [et al.] // *BMC Cancer*. – 2009. – Vol. 9. – P. 230.
87. Effect of preoperative chemotherapy on local/regional disease in women with operable breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18 / B. Fisher, A. Brown, E. Mamounas [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 1997. – Vol. 15. – P. 2483–2493.
88. Effects of chemotherapy on pathologic and biologic characteristics of locally advanced breast cancer / A.H. Honkoop, H.M. Pinedo, J.S. De Jong [et al.] // *Am. J. Clin. Pathol.* – 1997. – Vol. 107. – P. 211–218.
89. EGFR and cancer prognosis / R.I. Nicholson, J.M. Gee, M.E. Harper // *Europ. J. Cancer*. – 2001. – Vol. 37 (Suppl. 4). – P. 9–15.
90. EGFR associated expression profiles vary with breast tumor subtype / K.A. Hoadley, V.J. Weigman, C. Fan [et al.] // *BMC Genomics*. – 2007. – Vol. 8. – P. 258.
91. Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways / P.O. Hackel, E. Zwick, N. Prenzel, A. Ullrich // *Current Opinion on Cell Biology*. – 1999. – Vol. 11. – P. 184–189.
92. ERBB2 and TOP2A in breast cancer: a comprehensive analysis of gene amplification, RNA levels, and protein expression and their influence on prognosis and prediction / J. Brase, M. Schmidt, T. Fischbach [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2010. – Vol. 16, № 8. – P. 2391–2401.
93. ESO-ESMO 2nd international consensus guidelines for advanced breast cancer / Cardoso F., Costa A., Norton L. [et al.] (ABC2) // *The Breast*. – 2014. – Vol. 23(5). – C. 489-502.
94. Evaluation of chemotherapy efficacy in patients with breast cancer by tumor visualization with ^{99m}Tc-MIBI / S.N. Novikov, S.V. Kanaev, T.Y. Semiglazova, P.V. Krivorotko, V.F. Semiglazov, L.A. Jukova // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. – 2012. – Vol. 39 (Suppl. 2). – P. 1130. – S610.

95. Evaluation of ER, PgR, Her-2 and Ki-67 as predictors of response to neoadjuvant anthracycline chemotherapy for operable breast cancer / R.J. Burcombe, A. Makris, P.I. Richman [et al.] // *Br. J. Cancer.* – 2005. – Vol. 92(1). – P. 147–155.
96. Evolution of chemotherapy efficacy in patients with advanced breast cancer: high accuracy of breast scintigraphy / S.N. Novikov, S.V. Kanaev, P.V. Krivorotko, T.Y. Semiglazova, V.F. Semiglazov, L.A. Jukova, E.A. Turkevich // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* – 2013. – Vol.40. – Suppl. 2. – P235. – S357.
97. Expression of class III beta-tubulin is predictive of patient outcome in patients with non-small cell lung cancer receiving vinorelbine-based chemotherapy / P. Seve, S. Isaac, O. Tredan [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2005 Aug 1. – Vol. 11(15). – P. 5481–5486.
98. Fatty acid synthase phosphorylation: a novel therapeutic target in HER-2 overexpressing breast cancer cells / J. Quanri, L.X. Yuan, D. Boulbes [et al.] // *Breast Cancer Res.* – 2010. – Vol. 12(6). – P. R96.
99. Fisher, E.R. Pathobiology of preoperative chemotherapy: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel (NSABP) protocol B-18/ Fisher E.R., Wang J., Bryant J. // *Cancer.* – 2002. – Vol. 95. – P. 681–695.
100. Gasparini, G. Clinical significance of determination of surrogate markers of angiogenesis in breast cancer / G. Gasparini // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* – 2001. – Vol. 37(2). – P. 97–114.
101. Gradishar, W. Management of advanced breast cancer with the epothiloneB analog, Ixabepilone / W. Gradishar // *Drug Des. Devel. Ther.* – 2009. – Vol. 3. – P. 163–171.
102. Growth regulatory peptide production by human breast carcinoma cells / M.E. Lippman, R.B. Dickson, E.P. Gelmann [et al.] // *J. Steroid Biochem.* – 1988. – Vol. 30. – P. 53–61.
103. Hamilton, A. The contribution of molecular markers to the prediction of response in the treatment of breast cancer: a review of the literature on HER-2, p53

and BCL-2 / A. Hamilton, M. Piccart // *Ann. Oncol.* – 2000. – Vol. 11(6). – P. 647–663.

104. Harris, A.L. Anti-angiogenesis therapy and strategies for integrating it with adjuvant therapy / A.L. Harris // *Recent Results Cancer Res.* – 1998. – Vol. 152. – P. 341–352.

105. Hazard of recurrence and adjuvant treatment effects over time in lymph node-negative breast cancer / J.J. Digman, V. Dukic, S.T. Anderson [et al.] // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2009. – Vol. 116. – P. 595–602.

106. HER 2/neu and Topoisomerase II alpha Gene Amplification and Protein Expression in Invasive Breast Carcinomas / R. Bhargava, P. Lal, B. Chen [et al.] // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2005. – Vol. 123. – P. 889–895.

107. HER-2 amplification and topoisomerase IIalpha gene aberrations as predictive markers in node-positive breast cancer patients randomly treated either with an anthracycline-based therapy or with cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil / A. Di Leo, D. Gancberg, D. Larsimont [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2002a. – Vol. 8(5). – P. 1107–1116.

108. Her-2/neu and breast cancer / S. Kaptain, L.K. Tan, B. Chen // *Diagn. Mol. Pathol.* – 2001. – Vol. 10(3). – P. 139–152.

109. Hortobagyi G.N. Locally advanced breast cancer / G.N.Hortobagyi, S.E. Singletary, T.A. Buchholz // In: *Advanced therapy of breast disease.* – Sec. ed. – London : BC Decker Inc Hamilton.-2004.– P. 498–508.

110. [http://www.oncoconferences.ch/mm/%5Cmm001/SG-BCC 2015 Vienna Consensus Voting Results Answers in -.pdf](http://www.oncoconferences.ch/mm/%5Cmm001/SG-BCC%202015%20Vienna%20Consensus%20Voting%20Results%20Answers%20in%20.pdf)

111. Identification of biomarkers to predict response to single-agent platinum chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC): Correlative studies from TBCRC009/ Isakoff S. J. [et al.] // *ASCO Annual Meeting Proceedings.* – 2014. – Vol.32.(15)_suppl. – P. 1020.

112. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma / T.O. Nielsen, F.D. Hsu, K. Jensen [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2004. – Vol. 10, № 16. – P. 5367–5374.

113. Impact of the addition of carboplatin and/or bevacizumab to neoadjuvant once-per-week paclitaxel followed by dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide on pathologic complete response rates in stage II to III triple-negative breast cancer: CALGB 40603 (Alliance)/ Sikov W. M. [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2015. – T. 33. – №. 1. – C. 13-21.
114. Imyanitov E.N. Breast cancer therapy for BRCA1 carriers: moving towards platinum standard? / E.N. Imyanitov // *Hered Cancer Clin. Pract.* – 2009. – Vol. 7, №1. – P. 8.
115. Imyanitov E.N. Mechanisms of breast cancer / E.N. Imyanitov, K.P. Hanson // *Drug Discov. Today*. – 2004. – Vol. 1. Mech. – P. 235–245.
116. Inflammatory breast cancer. Pilot study of intensive induction chemotherapy (FEC-HD) results in a high histologic response rate / B. Chevallier, H. Roche, J.P. Olivier [et al.] // *Am. J. Clin. Oncol.* – 1993. – Vol. 16. – P. 223–228.
117. International Ki-67 in Breast Cancer Working Group. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group / M. Dowsett, T.O. Nielsen, R. A'Hern [et al.] // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2011. – Vol. 103 (22). – P. 1656–1664.
118. Intrinsic subtypes, PIK3CA mutation, and the degree of benefit from adjuvant trastuzumab in the NSABP B-31 trial / Pogue-Geile KL, Song N, Jeong JH [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2015. – Vol. 33(12). – P. 1340-7.
119. Järvinen T.A.H. HER-2/neu and Topoisomerase II α – simultaneous drug targets in cancer / T.A.H. Järvinen, E.T. Liu // *Comb. Chem. High Throughput Screen* 6. – 2003. – P. 79–99.
120. Ki67 expression and docetaxel efficacy in patients with estrogen receptor-positive breast cancer / F. Penault-Llorca, F. Andre, C. Sagan [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2009. – Vol. 27 (17). – P. 2809–281.
121. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential / R. Yerushalmi, R. Woods, P.M. Ravdin [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2010. – Vol. 11 (2). – P. 174–183.

122. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer / M.C. Cheang, S.K. Chia, D. Voduc [et al.] // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2009. – Vol. 101. – P. 736–750.
123. Lehmann B. D. Identification and use of biomarkers in treatment strategies for triple-negative breast cancer subtypes / Lehmann B. D., Pietenpol J. A. // *The Journal of pathology.* – 2014. – Vol. 232(2). – P. 142-150.
124. Long-Term Follow-Up of the E1199 Phase III Trial Evaluating the Role of Taxane and Schedule in Operable Breast Cancer / Sparano J. A. [et al.] // *Journal of Clinical Oncology.* – 2015. – C. JCO. 2015.60. 9271.
125. Management of advanced breast cancer with the epothiloneB analog, Ixabepilone / W. Gradishar // *Drug Des. Devel. Ther.* – 2009. – Vol. 3. – P. 163–171.
126. McGuire, W.L. Hormone receptors: their role in predicting prognosis and response to endocrine therapy / W.L. McGuire // *Semin. Oncol.* – 1978. – Vol. 5. – P. 428–433.
127. Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy / Symmans W.F., Peintinger F., Hatzis C. [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2007. – Vol. 25. – P. 4414–4422.
128. Melchor, L. An integrative hypothesis about the origin and development of sporadic and familial breast cancer subtypes / L. Melchor, J. Benítez // *Carcinogenesis.* – 2008. – Vol. 29. – P. 1475–1482.
129. Mignatti, P. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis / P. Mignatti, D.B. Rifkin // *Enzyme Protein.* – 1996. – Vol. 49. – P. 117–137.
130. Miller, I.D. A new histological grading system to assess response of breast cancer to primary chemotherapy / I.D. Miller, S. Payne, K.N. Ogston // *Int. J. Oncol.* – 2002. – Vol. 20(4). – P. 791–796.
131. Moghal, N. Multiple positive and negative regulators of signaling by the EGF-receptor / N. Moghal, P.W. Sternberg // *Current Opinion on Cell Biology.* – 1999. – Vol. 11. – P. 190–196.

132. Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis / Tanioka T., Nakatani Y., Semmyo N. [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275 (42). – P. 32775–32782.
133. Molecular profile of ductal carcinoma in situ of the breast in BRCA1 and BRCA2 germline mutation carriers / P. van der Groep, P.J. van Diest, F.H. Menko[et al.] // *J. Clin. Pathol.* – 2009. – Vol. 62, № 10. – P. 926–930.
134. Molecular subtypes of breast cancer are associated with characteristic DNA methylation patterns / K. Holm, C. Hegardt, J. Staaf [et al.] // *Breast Cancer Res.* – 2010. – Vol. 12, № 3. – P. 36.
135. Mueller R. Amplification of the TOP2A gene does not predict high levels of topoisomerase II alpha protein in human breast tumor samples, genes, chromosomes / R. Mueller // *Cancer.* – 2004. – Vol. 39. – P. 288–297.
136. Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER-2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial von Minckwitz G. [et al.] // *The lancet oncology.* – 2014. – T. 15. – №. 7. – C. 747-756.
137. Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: Significantly enhanced response with docetaxel / I.C.Smith, S.D.Heys, A. W. Hutcheon [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2002. – Vol. 20. – P. 1456–1466.
138. Neoadjuvant versus adjuvant chemotherapy for triple negative breast cancer / Kennedy CR, Gao F, Margenthaler JA // *J Surg Res.* - 2010. -Vol.163. - P. 52-57.
139. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non–Small-Cell Lung Cancer / Brahmer J. [et al.] // *New England Journal of Medicine.* – 2015.
140. p53 and vascular-endothelial-growth-factor (VEGF) expression predicts outcome in 833 patients with primary breast carcinoma / B. Linderholm, B. Lindh, B. Tavelin [et al.] // *Int. J. Cancer.* – 2000. – Vol. 89(1). – P. 51–62.
141. Pardoll D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy // *Nature Reviews Cancer.* – 2012. – T. 12. – Vol. 4. – C. 252-264.

142. Park K. Topoisomerase II-alpha (topoII) and HER2 amplification in breast cancers and response to preoperative doxorubicin chemotherapy / K. Park, J. Kim, S. Lim, S. Han // *Eur. J. Cancer.* – 2003 Mar. – Vol. 39(5). – P. 631–634.
143. Pathologic complete response rates in young women with BRCA1-positive breast cancers after neoadjuvant chemotherapy / T. Byrski, J. Gronwald, T. Huzarski [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2010. – Vol. 28. – P. 375–379.
144. Pathologic response to induction chemotherapy in locally advanced carcinoma of the breast: a determinant of outcome / D.M. Sataloff, B.A. Mason, A.J. Prestipino [et al.] // *J. Am. Coll. Surg.* – 1995. – Vol. 180. – P. 297–306.
145. Perou C. Molecular classification of breast cancer and its emerging clinical relevance. T7ze / C. Perou // *Breast.* – 2011. – March. – Vol. 20 (suppl. 1). P. S2-S3. – ISSN 0906-9776.
146. Perou CM. Molecular stratification of triple-negative breast cancers / Perou CM. // *Oncologist* 2011.- Vol. 16 (Suppl 1).-P. 61–70.
147. Phenotypic evaluation of the basal" like subtype of invasive breast carcinoma / C.A. Livasy, G. Karaca, R. Nanda [et al.] // *Mod. Pathol.* – 2006. – Vol. 19. – P. 264–271.
148. PIK3CA mutations are associated with decreased benefit to neoadjuvant human epidermal growth factor receptor 2-targeted therapies in breast cancer / Majewski IJ, Nuciforo P, Mittempergher L [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2015. – Vol. 33(12). P. 1334-9.
149. Pilot and feasibility study: comparative proteomic analysis by 2-DE MALDI TOF/ TOF MS reveals 14-3-3 proteins as putative biomarkers of response to neoadjuvant chemotherapy in ER-positive breast cancer / V.C. Hodgkinson, V. Agarwal, D. EL Fadl [et al.] // *J. Proteomics.* – 2012. – Vol. 75(9). – P. 2745–2752.
150. Predictive factors for the effectiveness of neoadjuvant chemotherapy and prognosis in triple-negative breast cancer patients / H. Masuda [et al.] // *Cancer. Chemotherapy. Pharmacology.* – 2011. – Vol. 67. – P. 911–917.

151. Predictive value of tumor cell proliferation in locally advanced breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. / Aas T, Geisler S, Eide GE [et al.] // *Eur J Cancer.* - 2003. - Vol.39 (4). – P.438–46.
152. Predictive value of tumor Ki-67 expression in two randomized trials of adjuvant chemoendocrine therapy for node-negative breast cancer / G. Viale, M.M. Regan, M.G. Mastropasqua[et al.] // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2009. – Vol. 100 (3). –P. 207–212.
153. Prevalence of amplification of the oncogenes c-myc, HER2/neu and int-2 in one thousand human breast tumors: correlation with steroid receptors / P.M.J.J. Berns, J.G.M. Klijn, I.L. Van Staveren [et al.] // *Europ. J. Cancer.* – 1992. – Vol. 28. – P. 697–700.
154. Prevalence of BRCA mutations among women with triple-negative breast cancer (TNBC) in a genetic counseling cohort / Greenup R. [et al.] // *Annals of surgical oncology.* – 2013. – T. 20. – №. 10. – C. 3254-3258.
155. Primary versus adjuvant chemotherapy in premenopausal patients with tumor considered too large for breast conserving surgery: preliminary results of a randomized trial / S.M. Scholl, A. Fouquet, B. Asselain [et al.] // *Europ. J. Cancer.* – 1994. – Vol. 30A. – P. 645–652.
156. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis / Allred D.C., Harvey J.M., Berardo M. [et al.] // *Mod pathol.* - 1998. – Vol.11(2) – P. 155-68.
157. 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 randomized trial / K.S. Albain, W.E. Barlow, S. Shak [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2010. – Vol. 11. – P. 55–65.
158. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199 / Adams S. [et al.] // *Journal of Clinical Oncology.* – 2014. – Vol. 32(27). – P. 2959-2966.

159. Proliferation markers predictive of the pathological response and disease outcome of patients with breast carcinomas treated by anthracycline-based preoperative chemotherapy / Vincent-Salomon A, Rousseau A, Jouve M [et al.] // *Eur J Cancer*.- 2004.-Vol. 40 (10). - P. 1502–8.
160. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study / L.A. Carey, C.M. Perou, C.A. Livasy [et al.] // *JAMA*. – 2006. – Vol. 295. – P. 2492–2502.
161. Randomized phase II study of weekly paclitaxel with or without carboplatin followed by cyclophosphamide/epirubicin/5-fluorouracil as neoadjuvant chemotherapy for stage II/IIIA HER-2-negative breast cancer/ Tamura K. [et al.] // *ASCO Annual Meeting Proceedings*. – 2014. – T. 32. – №. 15_suppl. – C. 1017.
162. Randomized Trial of Dose-Dense Versus Conventionally Scheduled and Sequential Versus Concurrent Combination Chemotherapy as Postoperative Adjuvant Treatment of Node-Positive Primary Breast Cancer: First Report of Intergroup Trial C9741; Cancer and Leukemia Group B Trial 9741 / M.L. Citron, D.A. Berry, C. Cirincione [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2003. – Vol. 21. – P. 1431–1439.
163. Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: an update / M. Kaufmann, G.N. Hortobagyi, A. Goldhirsch [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2006. – Vol. 24. – P. 1940–1949.
164. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets / T. Sorlie, R. Tibshirani, J. Parker [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2003. – Vol. 100. – P. 8418–8423.
165. Ribas A.. Gauging the Long-Term Benefits of Ipilimumab in Melanoma /Ribas A., Flaherty K. T. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2015. – C. JCO. 2014.59. 5041.
166. Risk factors by molecular subtypes of breast cancer across a population-based study of women 56 years or younger/ Gaudet MM, Press MF, Haile RW, [et al.] // *Breast Cancer Res Treat.* – 2011.- Vol.130(2).-P. 587-97.

167. Role of TRAP1 and estrogen receptor alpha in patients with ovarian cancer – a study of the OVCAD consortium / S. Aust, A. Bachmayr-Heyda, P. Pateisky [et al.] // *Mol. Cancer*. – 2012. – Vol. 11. – P. 69.
168. Schnitt, S.J. Breast cancer in the 21st century: new opportunities and new challenges / S.J. Schnitt // *Mod. Pathol.* – 2001. – Vol. 14(3). – P. 213–218.
169. Searching for cancer-associated gene polymorphisms: promises and obstacles / E.N. Imyanitov [et al.] // *Cancer Lett.* – 2004. – Vol. 204. – P. 3–14.
170. Seve P. The role of beta III tubulin in predicting chemoresistance in non-small cell lung cancer / P. Seve, T. Reiman, C. Dumontet // *Lung Cancer*. – 2010. – Vol. 67. – P. 136–143.
171. Significant allelic loss of ANX7 region (10q21) in hormone receptor negative breast carcinomas / X. Leighton, V. Srikantan, H.B. Pollard [et al.] // *Cancer Lett.* – 2004. – Vol. 210(2). – P. 239–244.
172. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 10869–10874.
173. Stress-induced phosphoprotein 1 as a secreted biomarker for human ovarian cancer promotes cancer cell proliferation / T.H. Wang, A. Chao, C.L. Tsai [et al.] // *Mol. Cell Proteomics*. – 2010. – Vol. 9(9). – P. 1873–1884.
174. Stromal Tumor-infiltrating lymphocytes (Str-TILs): in the Alliance N9381 trial Str-TILs are associated with chemotherapy benefit but not associated with trastuzumab benefit / Perez E.A. [et al.] // *SABCS*.- 2014.- abstract S1-06.
175. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes / J.S. Parker, M. Mullins, M.C. Cheang [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2009. – Vol. 27. – P. 1160–1167.
176. Synergistic up-regulation of prostaglandin E synthase expression in breast cancer cells by 17 beta-estradiol and proinflammatory cytokines / J. Frasor, A.E. Weaver, M. Pradhan, K. Mehta // *Endocrinology*. – 2008. – Vol. 149(12). – P. 6272–6279.

177. The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGFR) in human breast cancer: a review on 5232 patients / J.G. Klijn, P.M. Berns, P.I. Schmitz [et al.] // *Endocrin. Rev.* – 1992. – Vol. 13. – P. 3–17.
178. The estrogen receptor: a model for molecular medicine / E.V. Jensen, V.C. Jordan // *Clin. Cancer Res.* – 2003. – Vol. 9. – P. 1980.
179. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms / Z.Hu, C.Fan, D.S. Oh [et al.] // *BMC Genomics.* – 2006. – Vol. 7. – P. 96.
180. The prognostic potential of keratin 18 in breast cancer associated with tumor dedifferentiation, and the loss of estrogen and progesterone receptors / S.A. Ha, Y.S. Lee, H.K. Kim [et al.] // *Cancer Biomark.* – 2011. – Vol. 10(5). – P. 219–231.
181. The role of topoisomerase II alpha and HER-2 in predicting sensitivity to anthracyclines in breast cancer patients / C. Oakman, E. Moretti, F. Galardi [et al.] // *Cancer Treat. Rev.* – 2009. – Vol. 35, № 8. – P. 662–667.
182. Theillet, C. What do we learn from HER2 positive breast cancer genomic profiles? / C. Theillet // *Breast Cancer Res.* – 2010. – Vol. 12, № 3. – P. 107.
183. TRAP1 and the proteasome regulatory particle TBP7/Rpt3 interact in the endoplasmic reticulum and control cellular ubiquitination of specific mitochondrial proteins / M.R. Amoroso, D.S. Matassa, G. Laudiero [et al.] // *Cell Death. Differ.* – 2012. – Vol. 19(4). – P. 592–604.
184. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: planned joint analysis of overall survival from NSABP B-31 and NCCTG N9831 / Perez E.A., Romond E., Suman V.J. [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2014.- Vol. 32. – P. 3744-3752.
185. Triple-negative breast cancer subtypes and pathologic complete-response rate to neoadjuvant chemotherapy: Results from the GEICAM/2006-2003 study/ Santonja A. [et al.] // *ASCO Annual Meeting Proceedings.* – 2014. – T. 32. – №. 15_suppl. – C. 1024.

186. Triple-negative breast cancer: BRCAness and concordance of clinical features with BRCA1-mutation carriers / Lips E. H. [et al.] // *British journal of cancer*. – 2013. – T. 108. – №. 10. – C. 2172-2177.
187. Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial /Loi S. [et al.] // *Annals of Oncology*. – 2014. – T. 25. – №. 8. – C. 1544-1550.
188. Tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: Ready for prime time? /Ocaña A. [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2015. – C. JCO. 2014.59. 7286. *Journal of Clinical Oncology*.-2015.- Vol. 33 (11). – P.1298-1299.
189. Tung N. M., Winer E. P. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Response to Platinum in Triple-Negative Breast Cancer/ Tung N. M., Winer E. P. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2015. – C. JCO. 2014.59. 6031. *Journal of Clinical Oncology*. – 2015.-Vol 33(9).-P. 969-971.
190. Unfavorable pathological complete response rate of neoadjuvant chemotherapy epirubicin plus taxanes for locally advanced triple-negative breast cancer/ Yin Y. [et al.] // *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*. – 2013. – T. 33. – C. 262-265.
191. Urruticoechea A. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer / A. Urruticoechea, I.E. Smith, M. Dowsett // *J. Clin. Oncol* 2005. – Vol. 23(28). – P. 7212–7220.
192. Vasseur, S. DJ-1/PARK7 is an important mediator of hypoxia-induced cellular responses / S. Vasseur, S. Afzal, J. Tardivel-Lacombe // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2009. – Vol. 106(4). – P. 1111–1116.
193. Walker, L.C. Cytokeratin KRT8/18 expression differentiates distinct subtypes of grade 3 invasive ductal carcinoma of the breast / L.C. Walker, G.C. Harris, A.J. Holloway // *Cancer Genet. Cytogenet.* – 2007. – Vol. 178(2). – P. 94–103.