

На правах рукописи

Пасько Максим Андреевич

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ РАЗВИТИЯ
ЛОКОРЕГИОНАРНЫХ РЕЦИДИВОВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ
ВЫПОЛНЕНИИ ОРГАНОСОХРАНЯЮЩИХ РЕЗЕКЦИЙ В ЗАВИСИМОСТИ
ОТ КЛИНИКО-МОЛЕКУЛЯРНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК
ПЕРВИЧНОЙ ОПУХОЛИ**

14.01.12 - онкология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва - 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор - член-корр. РАН, профессор Солодкий В.А.)

Научный руководитель:

- доктор медицинских наук, профессор **Боженко Владимир Константинович**

Официальные оппоненты:

- доктор медицинских наук **Зикиряходжаев Азиз Дильшодович**, МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, отделение онкологии, реконструктивно-пластической хирургии молочной железы и кожи, руководитель отделения

- доктор медицинских наук, профессор **Бабкина Ирина Валентиновна**, ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, лаборатория клинической биохимии, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится « 26 » декабря 2016 г. в 16.00 часов на заседании диссертационного совета Д.208.081.01 при ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России по адресу: 117997, Москва, ул. Профсоюзная, д.86.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России по адресу: 117997, Москва, ул. Профсоюзная, д.86 и на сайте: www.rncrr.ru

Автореферат разослан «___» ноября 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

З.С. Цаллагова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

В течение последнего десятилетия рак молочной железы (РМЖ) удерживает лидирующие позиции среди женской онкопатологии. С 2005 по 2015 гг. в России отмечается неуклонный рост заболеваемости РМЖ. Удельный вес пациенток с впервые установленным диагнозом РМЖ достигает 21,2% [Каприн А.Д. и др. 2016]. При этом пациенты с I-II стадия РМЖ составляют 69,5% от всех выявляемых случаев заболевания. Данной категории пациенток наряду с выполнением радикальных мастэктомий (РМЭ) возможно выполнение органосохраняющих резекций (ОСР). В нашей стране наиболее часто выполняемой органосохраняющей операцией является радикальная резекция молочной железы, которая заключается в резекции квадранта или смежных квадрантов молочной железы, отступив от края опухоли на расстояние не менее 2 см и удаления подмышечных, подключичных и подлопаточных лимфоузлов. После выполнения радикальных резекций, обязательным условием является проведение лучевой терапии, с целью снижения риска развития локорегионарных рецидивов. Однако, по данным большинства авторов у данной категории больных в сравнении с пациентами, перенесшими мастэктомию, отмечается более высокая частота локорегионарных рецидивов (ЛРР) [Cao J.Q. et al. 2013; Atalay C. 2012; Van Dongen J. A. et al. 2000].

В настоящее время при оценке риска локорегионарного рецидивирования РМЖ используются морфологические и клинические критерии к которым относят размер первичной опухоли, степень ее дифференцировки, узловой статус, иммуногистохимические параметры, возраст пациенток, а также частоту краев резекции удаляемого сектора [Дружков О.Б и др. 2010; Молодикова Н.Р. и др. 2009; Goldhirsch A. Et al. 2009; Wapnir I.L. et. al. 2006]. При этом пациенткам с I-II стадией заболевания при отсутствии неблагоприятных факторов возможно выполнение как радикальной РМЭ, так и ОСР молочной железы. Единственным значимым различием между данными методами лечения является повышенный риск ЛРР при выполнении ОСР. Однако существующая модель определения риска развития ЛРР не имеет четких критериев. Довольно часто в клинической практике встречаются случаи, когда у 1 пациентки могут обнаруживаться как положительные, так и

отрицательные прогностические признаки, что значительно затрудняет оценку риска ЛРР. При этом перед хирургом возникает проблема выбора метода хирургического лечения, которая в большинстве случаев решается в пользу РМЭ.

В последние годы возрастает роль молекулярно-генетических маркеров, оценивающих биологические свойства опухолей. Проводятся многочисленные исследования по исследованию связи молекулярно-генетических особенностей ткани опухоли и клинически значимых характеристик. В настоящее время разработаны генетические тесты определяющие риски отдаленного метастазирования РМЖ после комплексного лечения. Среди них наиболее известные Oncotype DX, MammaPrint, MammoStart, Prosigna, IHC4, PAM50 и др. [Li J. et al. 2016; Markopoulos C. et al. 2016; Soran A. et al. 2016; Augustovski F. et al. 2015; Stephen J. et al. 2014]. Однако существующие генетические методы прогноза не оценивают риск ЛРР. При этом нельзя отрицать влияние биологических свойств опухоли на развитие ЛРР, что подтверждается случаями возникновения рецидивов после проведения адъювантной лучевой терапии и в случаях с чистыми краями резекции. Поэтому проведение исследования, учитывающего не только морфологические, гистологические и иммуногистохимические данные, но и результаты молекулярно-генетического исследования материала опухоли позволило бы выработать оптимальный персонифицированный подход к лечению ранних форм РМЖ, тем самым исключить существующую проблему выбора тактики хирургического лечения.

Цель исследования

Уточнение тактики хирургического лечения больных I-II стадиями рака молочной железы на основании клинических, морфологических и генетических характеристик первичной опухоли.

Задачи исследования

1. Изучить клинико-морфологические характеристики опухоли у больных РМЖ при выполнении органосохраняющих резекций и их влияние на развитие локорегионарных рецидивов.
2. Изучить взаимосвязь между уровнем экспрессии профиля генов (Ki-67, STK-15, CCNB1, CCND1, MYC, MYBL2, P16INK4A, PTEN, BIRC5, BCL2, BAG1, TERT,

NDRG1, ESR1, PGR, HER2, GRB7, MGB1, MMP11, CTSL2, CD68) и клинико-морфологическими характеристиками опухоли.

3. Изучить влияние биологического подтипа РМЖ на риск развития локорегионарных рецидивов при выполнении радикальных резекций.
4. Выявить критерии, повышающие риск развития локорегионарных рецидивов при выполнении органосохраняющих резекций.
5. Разработать модель, определяющую риск развития локорегионарных рецидивов РМЖ при выполнении органосохраняющих резекций.
6. Модифицировать существующий алгоритм лечения больных РМЖ I и II стадии.

Научная новизна

Впервые обнаружены молекулярно-генетические маркеры, имеющие прямую корреляцию с развитием локорегионарных рецидивов рака молочной железы. Для опухолей с высоким риском развития локорегионарного рецидива выявлены корреляции с повышением уровня экспрессии генов Ki-67, STK15, CTSL2, CD68, а также снижение экспрессии генов BAG1, MYC и PGR. Разработана модель прогноза развития локорегионарных рецидивов для пациенток I-II стадии РМЖ, при выполнении органосохраняющих резекций, базирующаяся на анализе морфологических и генетических показателей первичной опухоли. Отличительной особенностью разработанной модели является высокая точность (95%) определения риска развития локорегионарных рецидивов у больных, подвергающихся органосохраняющему лечению в сравнении с существующими критериями оценки риска. На основании разработанной модели определения риска развития ЛРР был модифицирован алгоритм лечения пациентов с I-II стадий РМЖ.

Практическая значимость

В ходе исследования был модифицирован алгоритм лечения пациентов с РМЖ I-II стадии на основании разработанной модели прогноза риска развития локорегионарных рецидивов. Это позволило индивидуализировать подход к выбору тактики хирургического лечения. При низком риске рекомендовано выполнение органосохраняющей резекции МЖ с последующим проведением

адьювантной лучевой терапии, при высоком риске – выполнение радикальной мастэктомии. Это позволит расширить показания к выполнению органосохраняющих резекций, что приведет к снижению сроков госпитализации пациентов, ускорит социальную и психологическую адаптацию пациенток.

Положения, выносимые на защиту

1. Биологические свойства опухоли оказывают значительное влияние на частоту развития локорегионарных рецидивов. К факторам, увеличивающим риск развития ЛРР, относят размеры опухоли более 2 см, поражение регионарных лимфатических узлов, высокий уровень экспрессии Ki-67, STK15, CTSL2, CD68, а также низкий уровень экспрессии генов BAG1, MYC и PGR.

2. После проведения ОСР существует два временных отрезка, характеризующихся повышенной вероятностью развития ЛРР. Первый интервал соответствует 10-20 месяцам, с момента проведения хирургического лечения; второй - 40-60 месяцам.

Апробация

Результаты диссертации были доложены на Всероссийском Конгрессе с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая практика: диагностика, лечение, профилактика» 4-7 апреля 2016 г., г. Москва; XIII Тихоокеанском медицинском Конгрессе с международным участием (14-15 сентября 2016, г. Владивосток).

Апробация работы состоялась на заседании научно-практической конференции и совета по апробациям кандидатских диссертаций ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России 11 апреля 2016 г.

Публикации

По материалам диссертации опубликованы 5 печатных работ, из них 3 в журналах, рекомендуемых ВАК РФ.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 107 страницах печатного машинописного текста и состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, практических рекомендаций и

списка литературы. Работа содержит 17 рисунков и 16 таблиц. Список литературы содержит 131 источник.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В исследование было включено 98 больных раком молочной железы перенесших органосохраняющее лечение в виде радикальных резекций, квадрантэктоми, широких секторальных резекций с подмышечной лимфаденэктомией. Основную группу составили 33 пациентки, у которых в отдаленном послеоперационном периоде отмечено возникновение локорегионарного рецидива. Группу сравнения составили 65 пациенток с длительностью ремиссии более 5 лет. Средний возраст пациенток в группах прогрессирования и ремиссии составил $50,8 \pm 1,59$ и $49,2 \pm 1,15$ лет, соответственно. В исследование не включались пациентки перенесшие неoadьювантную химиотерапию. Набор материала производился на базе ФБГУ "Российского Научного Центра Рентгенрадиологии Минздрава России" и Онкологического клинического диспансера № 1 г. Москвы. В исследование вошли данные пациенток за период с 2000 по 2011 года.

Стандартный минимальный объем предоперационного обследования включал проведение маммографии обеих молочных желез в двух проекциях, ультразвуковое исследование молочных желез, зон регионарного лимфооттока (подмышечных, надключичных и подключичных лимфатических узлов) и брюшной полости, рентгенологическое исследование органов грудной клетки, а также комплекс дополнительных методов исследования (КТ, МРТ, остеосцинтиграфия и т.д.) по показаниям. Рентгенологическое исследование проводили на маммографической установке "MAMMODIAGNOST US" фирмы "Philips". Ультразвуковое исследование на аппарате «SONOLINE Elegra» фирмы и «Vivid 4» фирмы GE.

Морфологическое исследование опухоли включало следующие этапы: гистологическое исследование опухоли и блока регионарных лимфоузлов. Иммуногистохимическое исследование проводилось в объеме анализа экспрессии рецепторов стероидных гормонов (эстрогенов, прогестерона), эпидермального фактора роста HER2/neu, а также определения уровня Ki-67. Амплификации гена c-erb B2 подтверждалась цитогенетическим анализом, методом FISH.

Молекулярно-генетическое исследование проводилось из материала образцов первичной опухоли. Для исследования использовали архивные образцы парафиновых блоков. РНК извлекали из двух срезов толщиной 10 микрон с использованием наборов «RNeasy FFPE» фирмы Quagen США. Для постановки полимеразной цепной реакции в реальном времени (РВ-ПЦР) использовались реактивы фирмы «ЗАО НПФ ДНК-Технология». Реакции амплификации генов ставили в разных пробирках в двух повторах.

Изучался уровень экспрессии генов, отвечающих за основные биологические процессы в опухолевых клетках - деление (Ki-67, STK-15, CCNB1, CCND1, MYC, PTEN, MYBL2, P16INK4A), апоптоз (BIRC5, BCL2, BAG1, TERT, NDRG1), клеточную дифференцировку (ESR1, PGR, HER2, GRB7, MGB1) и межклеточные взаимодействия (MMP11, CTSL2, CD68).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием методов параметрического и непараметрического анализа. Исследованные количественные показатели представляли в виде средних значений признака (M) и стандартного отклонения (SD). Для сопоставления двух групп по количественным признакам использован T критерий Стьюдента. Различие групп полагали статистически значимым при $P < 0,05$. Обработку полученных результатов проводили в программном пакете StatSoft Statistica 10.0.

Результаты собственного исследования

Оценка влияния клинических факторов на развитие локорегионарных рецидивов РМЖ.

Пациенты были оценены в соответствие с критериями TNM, превалировали пациентки с размерами опухоли до 2 см (69 человек, 70,4 % от общей выборки). Опухоли размерами от 2 до 5 см (T2) встречались у 29 пациенток (29,6% от выборки). В группе прогрессирования у 14 человек (42%) опухоль соответствовала критерию T1, 19 человек (58%) - критерию T2. В группе ремиссии отмечено другое соотношение. Так у 55 человек (85 %) отмечались небольшие опухоли, соответствующие критерию T1 и у 10 человек (15%)– T2. Данные представлены на рисунке 1.



Рисунок 1. Соотношение размеров опухоли в группах прогрессирования и ремиссии

В исследуемой выборке преобладали пациентки без регионарного метастазирования, что составило 65,3 % всех случаев; пациентки с поражением от 1 до 3 лимфоузлов встречались в 20,4% случаях; от 4 до 9 лимфоузлов – в 11,2 % случаев; с поражением более 9 лимфоузлов либо поражением подключичных лимфоузлов составили 3% случаев. В 48% случаев в группе прогрессирования (16 больных) наблюдалось отсутствие поражения регионарных лимфоузлов. У 8 пациентов поражение соответствовало критерию pN1, что составило 25 % случаев; у 6 пациентов - критерию pN2 (18% случаев) и у 3 пациентов - критерию pN3 (9% случаев). (рисунок 2) В группе ремиссии значительно преобладали пациенты с pN0. Они составили $\frac{3}{4}$ от всех пациентов данной группы.



Рисунок 2. Метастазирование в регионарные лимфоузлы в группах прогрессирования и ремиссии

При сравнении двух групп получены статистически значимые различия в размерах первичной опухоли. Для группы прогрессирования оно составило $20,5 \pm 1,8$ мм ($p < 0,05$); для группы ремиссии $14,3 \pm 0,7$ мм ($p < 0,05$).

Мультицентрический рост опухоли выявлен в 3 случаях, в 2 случаях отмечено развитие локальных рецидивов в области послеоперационного рубца, в 1 случае наблюдалась ремиссия. Учитывая, предельно малое количество мультицентрических опухолей в изучаемой выборке, в дальнейших расчетах данный показатель не учитывался.

Было оценено влияние количества хирургических доступов на частоту развития ЛРР. При использовании дополнительного доступа в аксиллярной области на стороне поражения не было выявлено взаимосвязи с развитием локорегионарных рецидивов ($p > 0,05$). Данные по количеству хирургических доступов представлены в таблице 1.

Таблица 1. Частота использования дополнительного хирургического доступа в аксиллярной области.

Исход \ Доступ	Единый (n=75)	С использованием дополнительного доступа (n=23)	Всего (n=98)
Ремиссия	46	19	65
Прогрессирование	29	4	33

Исследование связи метода лечения с развитием локорегионарного рецидива.

Хирургическое лечение в монорежиме было выполнено в 4 случаях в группе ремиссии и в 2 случаях в группе прогрессирования; 22 пациенткам проведено комбинированное (хирургическое + лучевая терапия) в группе ремиссии и 4 пациенткам в группе прогрессирования; комбинированное лечение в виде сочетания хирургического метода с проведением системной химиотерапии было проведено 5 пациенткам в группе ремиссии и 7 пациенткам при прогрессировании; 34 пациенткам в группе ремиссии проведено комплексное лечение, включающее

хирургическое лечение, последующую системную полихимиотерапию и адъювантную лучевую терапию на грудную стенку и регионарные пути лимфооттока. Аналогичное лечение проведено 20 пациенткам в группе прогрессирующего заболевания. Оценивая полученные данные, можно оценить адекватность проведенного лечения согласно с мировыми стандартными лечения данных групп больных. В настоящее время хирургическое лечение в монорежиме, а также комбинированное лечение, включающее хирургическое лечение и системную полихимиотерапию, не входят в стандарты лечения РМЖ. Таким образом, у 9 человек в группе прогрессирующего заболевания (28%) лечение проведено не в полном объеме. В группе ремиссии данное соотношение составляет 14%. (9 человек). На рисунке 3 представлены основные варианты лечения и их удельный вес в исследуемых группах.

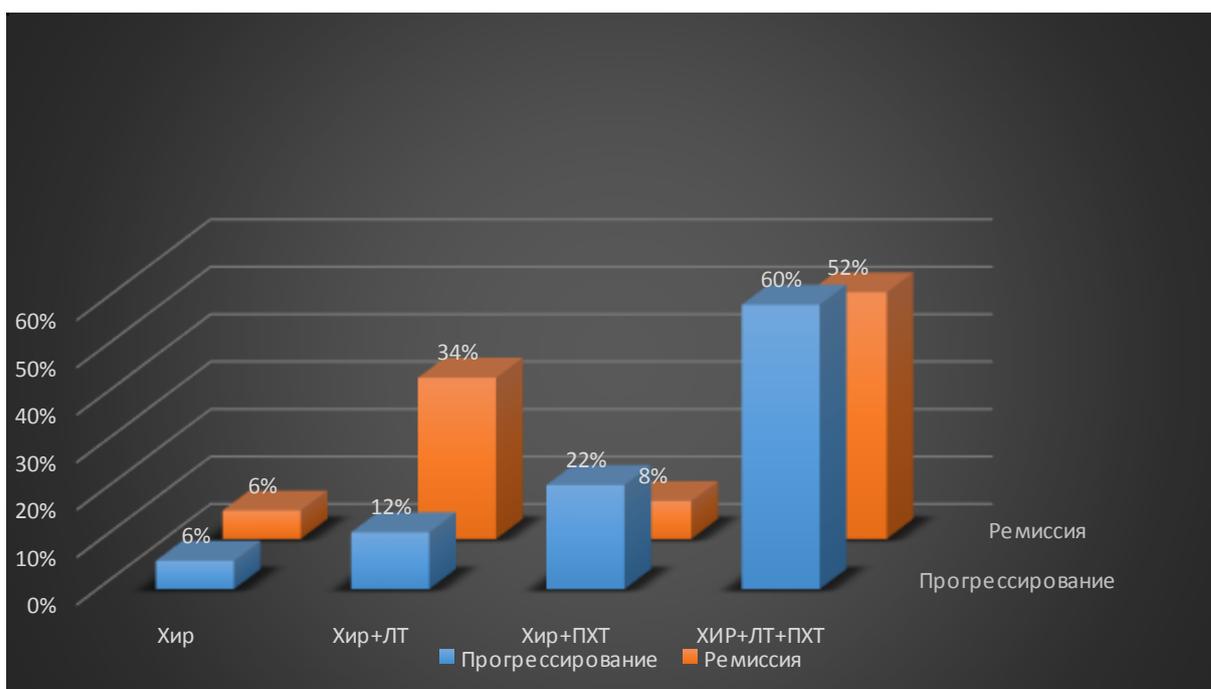


Рисунок 3. Виды лечения в группах ремиссии и прогрессирующего заболевания.
Хир– хирургический метод лечения в монорежиме, **Хир+ ЛТ** – комбинированное лечение (хирургический этап + лучевая терапия), **Хир+ ПХТ** - комбинированное лечение (хирургический этап + системная полихимиотерапия), **Хир+ ЛТ + ПХТ** – Комплексное лечение (хирургический этап + лучевая терапия +системная полихимиотерапия).

Оценка частоты локорегионарного рецидивирования РМЖ в зависимости от биологического подтипа опухоли.

При оценке опухолевого фенотипа было выявлено, что в группе ремиссии опухоли люминального В фенотипа составили более половины процентов всех случаев (53,9%). При этом в 10,7% случаев у данных опухолей определялась экспрессия гена Her2/neu. Опухоли люминального А подтипа составили 33,8 %, “трижды негативного” 10,7% случаев, соответственно. Гормоннезависимые опухоли с экспрессией гена Her2 наблюдались в 1,6% случаев.

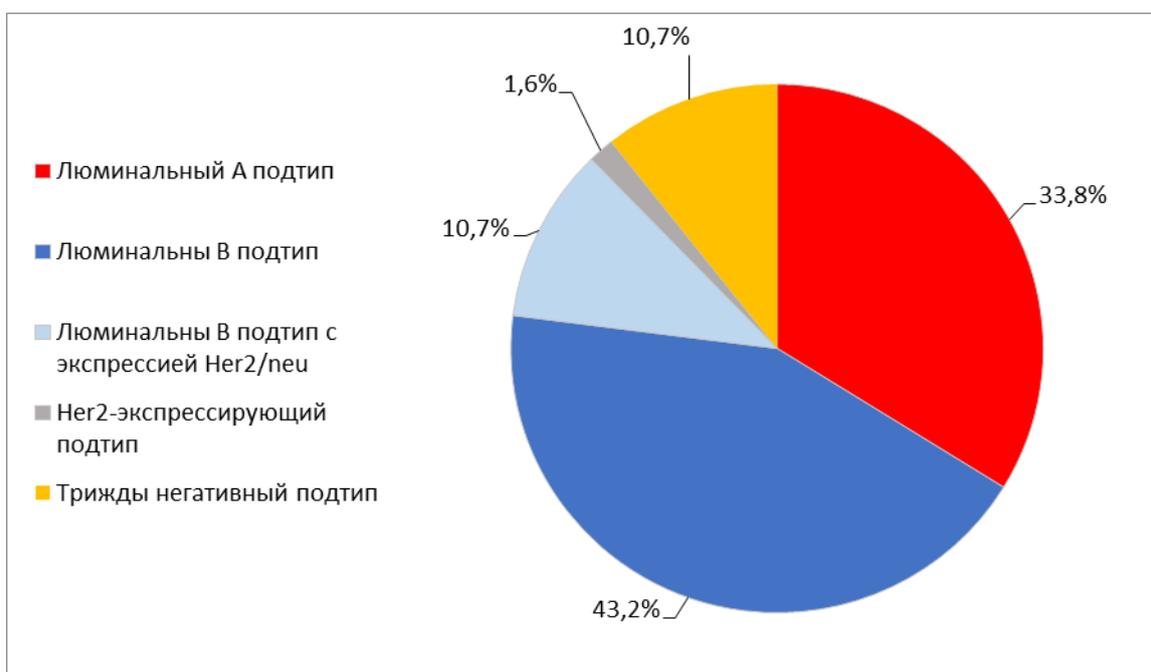


Рисунок 4. Соотношение биологических подтипов РМЖ в группе ремиссии

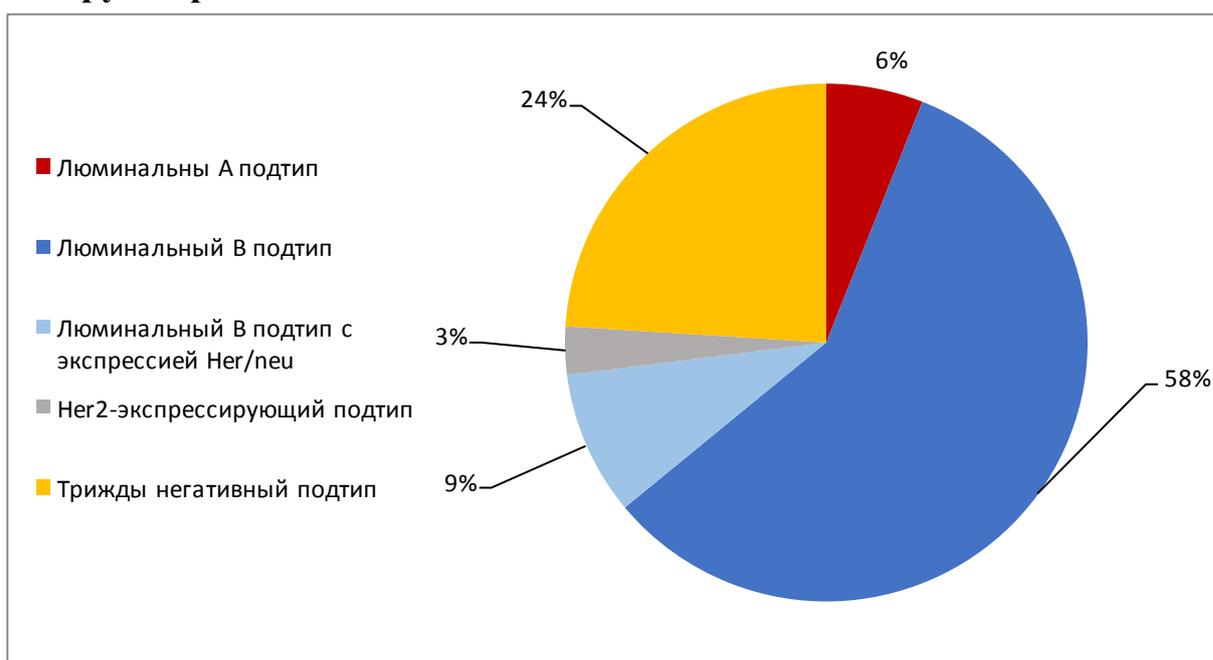


Рисунок 5. Соотношение биологических подтипов РМЖ в группе прогрессирования

В группе прогрессирования также, как и в группе ремиссии, преимущественное большинство составили пациенты с люминальным В фенотипом (67% случаев). Удельный вес пациентов с экспрессией Her2/neu внутри люминального В фенотипа составил 9%. Удельный вес пациентов с “трижды негативным” фенотипом составил 24%. Данные представлены графически на рисунках 4,5.

Изучение соотношения биологических подтипов опухоли с уровнем экспрессии генов в зависимости от размеров опухоли и поражения регионарных лимфоузлов.

Среди опухолей размерами до 2 см преобладали опухоли люминального В типа без экспрессии Her2/neu (42,6%), опухоли люминального А типа составили 33%, “трижды негативный” рак - 13%, люминальный В с экспрессией Her2/neu - 10% и Her2-экспрессирующий подтип РМЖ - 1,4%. При опухолях более 2-х см увеличилась доля люминального В типа (62%), также возрос удельный вес “трижды негативного” рака (21%), люминальный В с экспрессией Her2/neu составил 10 %, доля Her2-экспрессирующего и люминального А подтипов составила по 3,5 %. Уменьшения удельного веса люминального А подтипа было статистически значимым ($p=0,02$), для остальных подвидов РМЖ полученные соотношения не являлись достоверными. Сравнение уровней экспрессии генов по 21-генной сигнатуре показало, что для опухолей размером более 2 см характерно достоверно более высокий ($p<0,05$) уровень экспрессии следующих генов – Ki-67, STK15, CCNB1, MYBL2, CTSL2 и тенденция к повышению уровня экспрессии гена P16INK4A. При этом при увеличении размеров опухоли наблюдается тенденция к снижению экспрессии для гена BCL2. Статистически значимых различий между соотношением биологических подтипов РМЖ и поражением регионарных лимфоузлов у исследуемых больных не выявлено.

Изучение уровня экспрессии генов первичной опухоли при развитии локорегионарного рецидива.

В группе прогрессирования в сравнении с группой ремиссии отмечается достоверно ($p<0,05$) более высокий уровень экспрессии генов-факторов

пролиферации (Ki-67, STK15) и межклеточных взаимодействий (CTSL2, CD68). В тоже время уровень экспрессии генов BAG1, PGR и MYC достоверно ($p < 0,05$) ниже. Выявленная закономерность соответствует более высокой биологической активности опухолей из группы прогрессирования, проявляющаяся высокими показателями митотической активности, а также их способности к инвазивному росту.

Таблица 2 Статистически значимые различия экспрессии генов между группами прогрессирования и ремиссии.

Исследуемые гены	Ремиссия M±SD	Прогрессирование M±SD	P
KI67	7,42 (±2,09)	8,57 (±0,86)	0,003
STK15	6,42 (±1,98)	7,33 (±1,26)	0,018
MYC	4,76 (±1,62)	4,01 (±1,6)	0,032
BAG1	3,3 (±1,22)	2,54 (±0,87)	0,001
PGR	7,64 (±2,32)	6,27 (±3,16)	0,016
CTSL2	5,26 (±1,79)	6,29 (±1,69)	0,007
CD68	5,85 (±1,0)	6,4 (±0,69)	0,005

M – среднее значение экспрессии гена, выраженное в условных единицах
SD – стандартное отклонение.

Многофакторный анализ оценки влияния факторов на развитие ЛЛР.

С целью выявления взаимосвязей между исследуемыми факторами был проведен многофакторный анализ с использованием дисперсионного, факторного, кластерного и дискриминантного видов анализа. Анализировались следующие параметры - возраст пациенток, размеры опухоли, наличие поражения регионарных лимфоузлов, стадия, количество пораженных лимфоузлов, соотношение рецепторов эстрогена и прогестерона) и логарифм значения уровня экспрессии профиля из 21 гена. При этом выявлялись группы факторов со сходным влиянием на риск развития ЛЛР.

Проводя дисперсионный анализ мы провели сравнение вышеуказанных критериев между пациентами из группы ремиссии и прогрессирования. В таблице 3 представлены статистически достоверные изменения ($p < 0,05$). Они были выявлены для всех морфологических критериев, а также следующих генов пролиферации - Ki-

67, STK-15, MYC, апоптоза - BAG1, клеточной дифференцировки -PGR и межклеточных взаимодействий - STCL2 и CD68.

Таблица 3. Дисперсионный анализ клинических и генетических параметров опухоли

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

Проведенный кластерный анализ позволил выделить пять относительно равноудаленных кластеров. Первый из них объединил клинические показатели, такие как размер опухоли (T), количество пораженных лимфатических узлов (N и числовое значение пораженных лимфоузлов). Второй кластер объединил большинство факторов клеточной пролиферации, такие как CCNB1, CCND1, MYC, MYBL2, P16INK4A. В этот же кластер вошли факторы апоптоза (BAG1) и клеточных взаимодействий (CTSL2) В третий кластер были включены разнородные факторы включающие гены апоптоза, пролиферации и межклеточных взаимодействий. (BCL2, Her2, PTEN, CD68). В четвертом кластере сгруппированы факторы пролиферации, Ki-67, STK 15, дифференцировки (BIRC5) и апоптоза (TERT). В пятом кластере сосредоточены факторы благоприятного прогноза, отвечающие за дифференцировку клеток. В данную группу вошли гены экспрессии эстрогена и прогестерона, а также ген GRB7. Можно отметить, что математическая группировка исследуемых признаков в некоторых кластерах объединила сходные между собой прогностические и клинические критерии

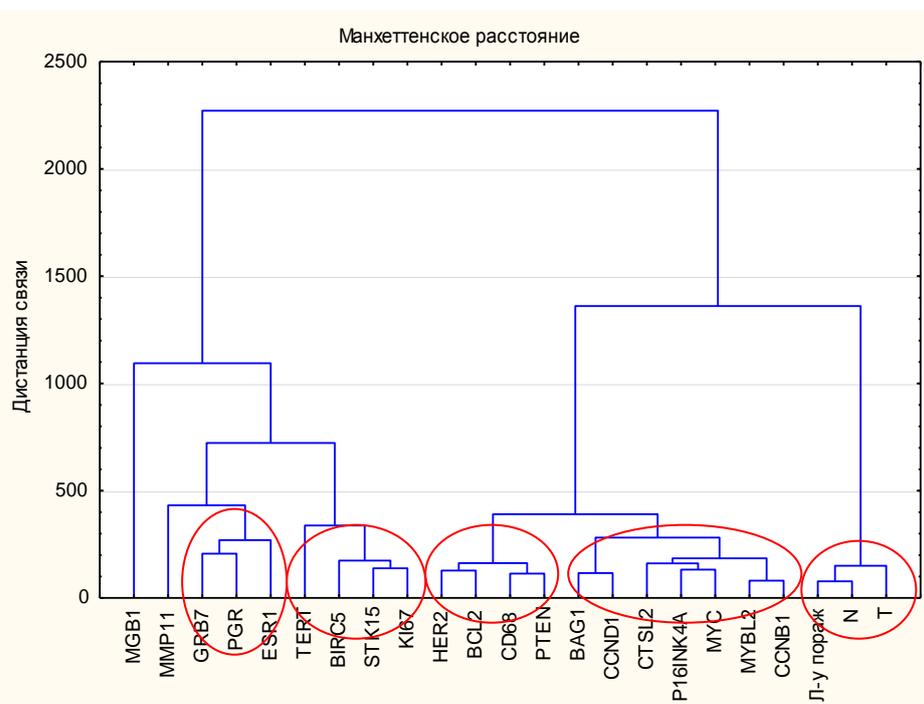


Рисунок 6. Кластерный анализ исследуемых параметров.

Проведя факторный анализ изучаемых параметров удалось выявить 3 главных компоненты. При этом 1 фактор объединил гены, ответственные за дифференцировку, поддержание клеточного гомеостаза и апоптоз. Второй фактор объединил гены влияющих на пролиферативную активность опухолевых клеток. Третий фактор описывает изменения клинических показателей, оценивающих лимфатический статус.

Таблица 4. Собственные значения факторов и процент объясняемой дисперсии.

Показатели Факторы	Собственное значение фактора	Процент объясняемой дисперсии выборки	Кумулятивный процент объясняемой дисперсии
Фактор № 1	6,07	21,7 %	21,7 %
Фактор № 2	4,72	16,9 %	38,6%
Фактор № 3	2,75	9,8 %	48,4%

Для оценки совокупного влияния изучаемых переменных на развитие ЛРР был проведен дискриминантный анализ. При этом общее число исследуемых параметров было сокращено до восьми. Среди них размер опухоли согласно системе TNM (T), процентное соотношение РЭ и ПГ, Cerb-b2, MYBL2, BAG1, MMP11 и STCL2. Указанные переменные были использованы в дискриминантном анализе. Были

получены средние значения дискриминантной функции. Для группы прогрессирующего оно составило -1,7; для группы ремиссии 1,05. Колебания значений дискриминантной функции в группе прогрессирующего составило от -4,5 до 0, в группе ремиссии от -2 до 3,5. В обоих случаях наблюдался нормальный вариант распределения значений функций.

Таблица 7. Прогностические варианты исходов.

Прогностические данные Клинические группы	Прогноз локорегионарного рецидива	Прогноз ремиссии	Процент Исследуемой выборки
ЛРР	21	1	95%
Ремиссия	1	36	97%
Общее количество (n)	22	37	100%

Таким образом, объединяя данные клинического исследования с результатами морфологического, в том числе иммуногистологического и генетического исследований удалось разработать математическую модель, с высокой точностью определяющую вероятность развития ЛРР по материалу первичной опухоли.

Алгоритм планирования хирургической тактики для пациентов с I-II стадией РМЖ.

Полученные нами результаты по прогнозу ЛРР мы использовали для модернизации существующего алгоритма лечения пациенток с I-II стадией РМЖ. На первом этапе предлагается выявление групп пациенток с I-II стадией РМЖ, морфологическое подтверждение диагноза, определение биологического подтипа опухоли на основании иммуногистохимического исследования. Одновременно выявляются факторы неблагоприятного прогноза, такие как мультицентрический рост и/или диффузное скопление микрокальцинатов, молодой возраст пациенток, мутации в генах BRCA 1 и 2. При выявлении хотя бы одного из вышеперечисленных факторов, риск ЛРР расценивается как высокий и рекомендуется выполнение мастэктомии. При отсутствии данных неблагоприятных факторов на амбулаторном этапе производится оценка риска развития ЛРР на основе разработанной математической модели. Выявляются группы пациентов с высоким и низким

риском развития ЛРР. Группе пациентов с низким риском развития ЛРР предлагается выполнять органосохраняющие резекции в комбинации с послеоперационной лучевой терапией, а группе пациентов с высоким риском выполнять радикальные мастэктомии. Это должно снизить риски местного и регионарного рецидива за счет полного удаления органа. В этом случае удаляется не только опухоль с прилежащими тканями молочной железы, но и кожа, внутриорганный лимфатический протоковый аппарат с интрамаммарными лимфоузлами, которые также могут являться источниками опухолевого роста.

Таким образом, данная работа позволила с новой стороны взглянуть на проблему локорегионарного рецидивирования РМЖ. Мы оценили не только морфологические, в том числе и иммуногистохимические параметры первичной опухоли, но и данные экспрессии 21 гена, отвечающие за основные процессы жизнедеятельности клеток – пролиферацию, дифференцировку, апоптоз и межклеточные взаимодействия. Выявленные закономерности позволили разработать мультифакторную математическую модель определения вероятности развития локорегионарных рецидивов РМЖ при выполнении органосохраняющих резекций. Высокая точность в определении риска ЛРР позволила дополнить и модифицировать существующий алгоритм лечения больных РМЖ I-II стадии. Модифицированный алгоритм включает в себя набор пошаговых инструкций, в результате которых определяется риск локорегионарного рецидивирования. При этом исключается субъективный фактор оценки опухолевых параметров, а результат исследования носит числовое значение, которое определяет принадлежность к одной из прогностических групп. Пациентам, отнесенным в группу высокого риска развития ЛРР рекомендуется выполнение мастэктомии, а группе низкого риска прогрессирования – выполнение радикальной резекции. Внедрение данного алгоритма в клиническую практику позволит индивидуально подходить к выбору тактики хирургического лечения.



Рисунок 7. Алгоритм планирования хирургической тактики для пациенток с I-II стадией рака молочной железы.

ВЫВОДЫ.

1. Повышенный риск развития ЛРР РМЖ после выполнения органосохраняющих резекций наблюдается при опухолях размерами более 2 см ($p < 0,001$), а также в случаях поражения регионарных лимфатических узлов ($p < 0,001$). Использование дополнительного хирургического доступа в аксиллярной области при выполнении радикальной резекции не влияет на частоту развития ЛРР ($p < 0,05$).
2. Выявлены прямые корреляции между увеличением размера опухоли и повышением экспрессии маркеров пролиферации -Ki-67, STK15, CCNB1, MYBL2 ($p < 0,05$). При поражении регионарных лимфоузлов наблюдаются обратные корреляции, характеризующиеся снижением экспрессии генов апоптоза (BCL2, BAG1), гена дифференцировки (ESR1) и гена пролиферации CCNB1 ($p < 0,05$). Статистически достоверных данных по изменению уровня экспрессии генов CCND1, MYC, P16INK4A, PTEN, BIRC5, TERT, NDRG1, PGR, HER2, GRB7, MGB1, MMP11, CTSL2, CD68 в зависимости от размера опухоли и поражения регионарных лимфоузлов не получено ($p > 0,05$).

3. Люминальный А подтип РМЖ имеет наиболее низкий риск развития ЛРР в сравнении с другими биологическими подтипами ($p < 0,05$). При опухолях размерами более 2 см значительно снижается удельный вес люминального А подтипа (с 33% до 3,5 %).
4. Выявлены генетические маркеры неблагоприятного прогноза, имеющие прямую корреляцию с вероятностью развития ЛРР. К ним относится высокий уровень экспрессии маркеров пролиферации -Ki-67 ($p=0,003$), STK15 ($p=0,02$); межклеточных взаимодействий -CTSL2 ($p=0,01$), CD68 ($p=0,01$); а также снижение экспрессии гена апоптоза BAG1 ($p=0,001$), гена пролиферации MYC ($p=0,03$) и маркера дифференцировки PGR ($p=0,02$).
5. На основании проведенного дискриминантного анализа разработана восьмифакторная модель определения риска развития ЛРР для больных I-II стадии РМЖ при выполнении радикальных резекций. Данная математическая модель обладает высокой точностью (более 95%), что значительно превышает показатели используемых в настоящее время прогностических факторов.
6. Определение риска развития ЛРР позволяет сформировать индивидуальный подход при выборе тактики хирургического лечения пациентов РМЖ I-II стадии, тем самым дополняя существующий алгоритм лечения пациентов данной клинической группы.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.

Разработанная в процессе настоящего исследования математическая модель определения риска ЛРР может быть использована для уточнения алгоритма лечения пациентов с РМЖ I-II стадии.

При обращении пациентки к хирургу-онкологу проводится стандартное маммологическое обследование, при котором возможно выявление неблагоприятных прогностических факторов, таких как мультицентрический рост и/или диффузное скопление микрокальцинатов, молодой возраст пациенток, мутации в генах BRCA 1 и 2. При выявлении хотя бы одного из вышеперечисленных факторов риск ЛРР расценивается как высокий и рекомендуется выполнение мастэктомии. При отсутствии вышеперечисленных прогностических факторов

пациентке выполняется иммуногистохимическое и генетическое исследование с использованием 21-генного профиля.

Далее полученные значения прогностических факторов обрабатываются при помощи разработанной математической модели и вычисляется оценочный коэффициент. (см. главу 3)

Полученное значение коэффициентов сравнивается со средними значениями пациентов из группы ремиссии (1,05) и группы прогрессирования (-1,77). Чем ближе полученное значение к результатам средних значений соответствующих групп, тем достовернее оно отражает результат прогнозирования.

Результаты проведенного исследования могут быть использованы для оценки тактики хирургического лечения больных РМЖ I-II стадии.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Пасько М.А. Анализ экспрессии генов в фиброаденоме молочной железы. / Боженко В. К., Харченко Н. В., Кудинова Е.А., Пасько М.А., Фролов И.С., Ооржак А. В., Троценко И. Д. // Вестник Российского научного центра рентгено радиологии Минздрава России. - 2013.- № 13
2. Пасько М.А. Генетические особенности рака молочной железы в группах прогрессирования после радикальных мастэктомий и органосохраняющего лечения. / Троценко И. Д., Пасько М.А., Захаренко М.В., Кудинова Е.А., Чхиквадзе В.Д., Боженко В. К. // Вестник Российского научного центра рентгено радиологии Минздрава России. – 2015.- Т. 15, №3
3. Пасько М.А. Морфогистологические, иммуногистохимические и генетические факторы прогноза локорегионарных рецидивов после органосохраняющего лечения при раке молочной железы.// Вестник Российского научного центра рентгено радиологии Минздрава России.- 2015.- Т.15, №4
4. Пасько М.А. Определение риска локорегиональных рецидивов рака молочной железы после органосохраняющего лечения на основе анализа экспрессии генов. / Пасько М.А., Захаренко М.В., Троценко И.Д., Кудинова Е.А, Чхиквадзе В.Д., Боженко В.К. // Вестник Российского научного центра рентгено радиологии Минздрава России. - 2015. -Т. 15, № 4
5. Пасько М.А. Прогностические возможности профиля экспрессии генов в определении риска рецидивирования рака молочной железы после органосохраняющего лечения. /Пасько М.А., Захаренко М.В., Троценко И.Д., Кудинова Е.А, Чхиквадзе В.Д., Боженко В.К. // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. – 2016.- Т. 5, №3. -С.27-32