

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«РОССИЙСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РЕНТГЕНРАДИОЛОГИИ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**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**

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

**Научный руководитель:**

**д.м.н. проф. Боженко В.К.**

**Москва 2016**

## Оглавление

Список сокращений .....	3
Введение.....	5
ГЛАВА 1. ОСОБЕННОСТИ ОРГАНОСОХРАНЯЮЩЕЙ ХИРУРГИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ. РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ В ПРОГНОЗИРОВАНИИ РАЗВИТИЯ ЛОКОРЕГИОНАРНЫХ РЕЦИДИВОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ). .....	10
1.1 Морфологические предпосылки для развития локорегионарных рецидивов после органосохраняющего лечения РМЖ. ....	12
1.2 Отечественные и зарубежные клинические рекомендации по органосохраняющему лечению при ранних формах РМЖ .....	13
1.3 Иммуногистохимические факторы прогноза локальных рецидивов после органосохраняющего лечения ранних форм РМЖ.....	16
1.4 Роль лучевой терапии при органосохраняющем лечении РМЖ.....	21
1.5 Анализ влияния генетических факторов на прогноз при РМЖ. ....	29
1.6 Особенности полимеразной цепной реакции в реальном времени. (ОТ- ПЦР).....	33
1.7 Обоснование необходимости изучения механизмов развития локорегионарных рецидивов. ....	39
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	41
2.1 Общая характеристика исследуемых групп, описание используемых диагностических методов.....	41
2.2 Клинико-морфологическая характеристика исследуемых групп .....	42
2.3 Методика определения уровня экспрессии мРНК.....	45
2.4. Статистические методы анализа полученных результатов .....	47
ГЛАВА 3. ОЦЕНКА ВЗАИМОСВЯЗИ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ С КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ ПЕРВИЧНОЙ ОПУХОЛИ. РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ ПРОГНОЗА РАЗВИТИЯ ЛОКОРЕГИОНАРНЫХ РЕЦИДИВОВ (РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ). .....	51
3.1.1 Оценка влияния клинических факторов на развитие ЛРР.....	51
3.1.2 Исследование связи метода лечения с развитием локорегионарного рецидива. ....	55
3.1.3 Оценка частоты локорегионарного рецидивирования РМЖ в зависимости от биологического подтипа опухоли. ....	55

3.2 Сравнение профиля экспрессии генов с данными клинического и иммуногистохимического исследования.....	60
3.2.1 Анализ уровня экспрессии генов в зависимости от возраста пациенток.....	60
3.2.2 Изучение соотношения биологических подтипов опухоли с уровнем экспрессии генов в зависимости от размеров опухоли и поражения регионарных лимфоузлов.....	60
3.2.3 Анализ экспрессии генов в зависимости от биологического подтипа опухоли.....	63
3.2.3 Изучение уровня экспрессии генов первичной опухоли при развитии локорегионарного рецидива.....	66
3.3 Многомерный анализ факторов прогноза локорегионарных рецидивов.....	67
3.3.1. Дисперсионный анализ морфологических и генетических факторов прогноза.....	67
3.3.2. Кластерный анализ данных.....	68
3.3.3. Факторный анализ данных.....	69
3.3.4. Разработка модели определения риска ЛРР на основании уравнения дискриминантного анализа.....	72
3.3.5 Алгоритм планирования хирургической тактики для пациентов с I-II стадии РМЖ.....	78
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	82
ВЫВОДЫ.....	91
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	93
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	94

## Список сокращений

ФГБУ “РНЦРР” – Федеральное государственное бюджетное учреждение  
“Российский Научный Центр Рентгенорадиологии” Министерства  
Здравоохранения Российской Федерации

РМЖ – рак молочной железы

ЛРР- локорегионарный рецидив

ЛР – локальный рецидив

РМЭ – радикальная мастэктомия

ОСО- органосохраняющая операция

ОСР –органосохраняющая резекция

ЛТ – лучевая терапия

ИГХ – иммуногистохимическое исследование

ЭР– рецепторы эстрогена

РП – рецепторы прогестерона

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения

NSABP(National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project) –Национальный  
хирургический проект адьювантной терапии рака молочной железы и  
кишечника (США)

ESMO (European Society for Medical Oncology) - европейское общество  
медицинской онкологии

NCCN (National comprehensive cancer network) –национальная  
всеобъемлющая сеть рака.

EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer)–  
Европейская организация по исследованию и лечению рака

МЖ – молочная железа

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ОТ-ПЦР –полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

РВ-ПЦР - полимеразная цепная реакция в реальном времени

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

## Клеточные и генетические маркеры

Ki-67 – ядерный белок, определяемый в S, G1, G2 и M -фазах митоза.

HER2/neu (Human Growth Factor Receptor 2) - Рецептор человеческого эпидермального фактора роста 2

STK-15 (Serine/threonine-protein kinase 15)– Серин/треонин-протеин киназа 15.

CCNB1(CyclinB1) циклин B1

CCND1(CyclinD1) циклин D1

MYC – регуляторный ген, участвует в процессе транскрипции.

MYBL2 (Myeloblastosis oncogene-like 2) – онкоген миелобластома 2 типа.

P16INK4A – ген-регулятор, циклин-зависимого ингибитора киназы 4A

PTEN (phosphatase and tensin homolog) –гомолог фосфатазы итензина, генопухолевой супрессии.

BIRC5 (Vaccinostatatin inhibitor of apoptosis repeat-containing 5) Бакуловирусный ингибитор ответа апоптозных повторов 5/ Сурвивин.

BCL2 (B-cell lymphoma 2) ген В-клеточной лимфомы 2, регулятор апоптоза.

BAG1 (BCL2-Associated Athanogene) BCL2-ассоциированный антагонист, регулятор апоптоза.

TERT (Telomerase reverse transcriptase) ген обратной транскриптазы, препятствующей укорочению теломер в процессе деления.

NDRG1 (N-Myc Downstream Regulated) N-Мусподавляющий ген.

GRB7 (Growth factor receptor-bound protein 7) ген рецептор-связанного фактора роста 7

ESR1 – ген экспрессии рецепторов эстрогена

PGR– ген экспрессии рецепторов прогестерона

MGB1 –ген экспрессии маммаглобина

MMP11 (matrix metalloproteinase 11) ген матричной металлопептидазы 11

CTSL2 (Cathepsin L2) ген, регулирующий активность катепсина L2

CD68 (Cluster of Differentiation 68) кластер дифференцировки 68, макросиалин

## Введение

Рак молочной железы занимает первое место в структуре заболеваемости и смертности при онкологических заболеваниях женщин. С 2005 по 2015 гг. отмечается неуклонный рост заболеваемости РМЖ, при этом наблюдается увеличение удельного веса пациенток с I и II стадией заболевания. Так, за 2015 г. пациентки с I-II стадий РМЖ составили 69,5% от всех впервые выявленных случаев данного заболевания [11]. В тоже время увеличение количества ранних стадий РМЖ способствует более широкому внедрению органосохраняющих операций (ОСО). 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). [45,57,123] В литературе описаны клиничко-морфологические факторы, влияющие на развитие локорегионарных рецидивов. К ним относят размеры опухоли, молодой возраст, гистологический тип опухоли и степень ее дифференцировки, статус краев резекции, соотношение размеров опухоли и молочной железы [8,26,57,126]. Однако мнения различных авторов расходятся при оценке прогностической значимости каждого из критериев.

Одним из основных направлений в современной онкологии является изучение молекулярно-генетических особенностей опухоли, влияющих на такие свойства, как чувствительность к химиотерапии, лучевой терапии, способность опухоли к местному и отдаленному рецидивированию. Ранее в исследованиях, проведенных в Российском Научном Центре

Рентгенорадиологии (ФБГУ “РНЦРР” Минздрава России) установлено [2, 3, 34], что профиль экспрессии генов в ткани злокачественной опухоли молочной железы отличается как от профиля экспрессии генов в нормальной ткани молочной железы (МЖ), так и ткани доброкачественных пролиферативных заболеваний МЖ. Полученные данные также показывают высокую степень гетерогенности молекулярно-генетических свойств внутри нозологических групп. При этом наибольшие различия в уровне экспрессии генов характерны для РМЖ.

Исследования по изучению возможного клинического применения особенностей молекулярно-генетических свойств ткани РМЖ ведутся во многих отечественных и зарубежных научных центрах [9, 13, 24]. В настоящее время существует несколько прогностических индексов, целью которых является оценка риска рецидивирования РМЖ. Наиболее известные среди них - Oncotype DX, MammaPrint, Mammotest, IHC4 и др. [41, 64, 104]. Oncotype DX (21-генная сигнатура), получило широкое распространение и используется в некоторых многопрофильных клиниках США и Европы. Согласно Сент-Галленским рекомендациям 2015 г. Oncotype DX и MammaPrint могут быть использованы клиницистами для оценки необходимости назначения адъювантной химиотерапии [60]. Однако существующие методы прогноза не оценивают риск ЛРР.

В настоящее время перед хирургами существует проблема выбора вида хирургического лечения для пациентов с I-II стадией РМЖ заключающаяся в том, что при отсутствии отягощающих факторов возможно выполнение как радикальной мастэктомии (РМЭ), так и органосохраняющей резекции (ОСР) молочной железы (МЖ). Клинически значимым различием между вышеуказанными методиками является повышенный риск ЛРР при выполнении ОСР. При этом врачам предлагается использование перечня клинических и иммуногистохимических факторов, тем или иным образом влияющих на частоту развития ЛРР, однако не существует четких критериев по которым можно было бы достоверно оценить риск развития ЛРР.

Поэтому, проведение исследования, учитывающего не только морфологические, гистологические и иммуногистохимические данные, но и результаты 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 адъювантной 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 ОСП существует два временных отрезка, характеризующихся повышенной вероятностью развития ЛПП. 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 108 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.

## **ГЛАВА 1. ОСОБЕННОСТИ ОРГАНОСОХРАНЯЮЩЕЙ ХИРУРГИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ. РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ В ПРОГНОЗИРОВАНИИ РАЗВИТИЯ ЛОКОРЕГИОНАРНЫХ РЕЦИДИВОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).**

Рак молочной железы (РМЖ) является самым распространенным онкологическим заболеванием среди женщин. По статистическим данным за 2014 г. [10] заболеваемость РМЖ в России составила 21,2 % случаев или 1/5 среди всей вновь выявляемой онкопатологии среди женщин. Общая заболеваемость составляет 82,9 случаев на 100 тыс. человек. Абсолютные цифры свидетельствуют о приросте заболеваемости РМЖ. Так, в 2003 г. заболеваемость составляла 46 тыс. вновь выявленных случаев, в 2007 - 51 тыс. случаев, к 2014 г. этот показатель поднялся до 65 тыс. вновь выявленных случаев. Средний возраст пациенток составляет 61,2 г. По статистике с увеличением возраста женщин увеличивается риск возникновения заболевания [29]. Высокими остаются показатели смертности. За 2012 г. в мире отмечено 320 тыс. случаев смерти от РМЖ, в структуре смертности среди онкологических больных данная патология устойчиво занимает второе место, уступая лишь раку легкого [66,93]. Все это создает предпосылки для дальнейшего изучения проблемы возникновения и развития заболевания, а также совершенствования хирургического, лучевого и химиотерапевтического методов лечения. По данным ESMO (European Society for Medical Oncology) в странах европейского союза от 60 до 80 % вновь выявленных случаев РМЖ подлежат органосохраняющему лечению (ОСЛ) [118]. Так, в Великобритании за период с 2005 по 2008 гг 58% случаев первично выявленных опухолей молочной железы (МЖ) подвергалось органосохраняющему лечению [86]. Данный вид лечения может выполняться в объеме секторальных резекций (лампэктомий), радикальных резекций (широких резекций, включающих квадрантэктомию, биквадрантэктомию) с обязательным проведением во всех случаях послеоперационной лучевой терапии (ЛТ) на грудную стенку. При этом отдаленные результаты общей выживаемости между группами пациентов после радикальных мастэктомий и

органосохраняющих резекций между собой статистически не отличаются [74,79,104].

Органосохраняющие операции (ОСО) имеют ряд преимуществ в сравнении с радикальными мастэктомиями. Так, сокращаются сроки пребывания пациенток в стационаре, данные операции характеризуются малой травматичностью и лучшим косметическим эффектом. Их использование позволяет избежать постмастэктомического синдрома, включающего инвалидизацию пациента, затруднение движений и появление отека верхней конечности на стороне операции, отсутствие синдрома передней лестничной мышцы, характеризующегося плекситами и иррадиацией болевых ощущений, а также более быстрой социальной адаптаций пациенток [8, 22, 38,76, 87].

Одним из факторов, ограничивающих широкое использование органосохраняющих операций в клинической практике, является повышенный риск локального и регионарного рецидивирования у данной категории больных в сравнении с радикальными мастэктомиями [45,89,117]. В отечественной и зарубежной литературе нет унифицированного понятия локального рецидива (ЛР). Идентичным для всех авторов являются описания ЛР как опухоли, возникающей после хирургического вмешательства на соответствующей стороне поражения, идентичной по гистологическому строению первичной опухоли [18,27,37]. Локальный рецидив может возникнуть в оставшейся части молочной железы, в области послеоперационного рубца, а также в мягких тканях грудной стенки на стороне поражения. Он может быть одиночным или множественным, узловым или диффузным. Также выделяют регионарные рецидивы (РР), развивающиеся в зонах регионарного метастазирования опухоли (надключичная, парастеральная и аксиллярная области). Согласно международным исследованиям более 50% локорегионарных рецидивов развиваются в течение первых 3 лет после хирургического лечения; за период от 3 до 5 лет возникает около 20% от общего числа рецидивов. В

отдаленном периоде более 5 лет частота появления ЛРР значительно снижается и не превышает 1/3 от общего числа рецидивов [4,16,64,130].

### **1.1 Морфологические предпосылки для развития локорегионарных рецидивов после органосохраняющего лечения РМЖ.**

Среди факторов, влияющих на риск развития локальных и локорегионарных рецидивов, особое место занимает качество выполняемых радикальных резекций, заключающееся в достаточном отступе от краев опухоли [55, 82, 108]. В исследовании Povoskic соавторами [109] определяли частоту возникновения локорегионарных рецидивов (ЛРР) после органосохраняющих операций, а также сопоставляли полученные данные с результатами гистологического исследования краев резекции опухоли. В исследовании приняло участие 204 пациентки за период 2003-2007 гг. У 24 пациенток в послеоперационном периоде развился локальный рецидив, что составило 11,8% от общей группы пациенток. При оценке краев резекции у 9 пациенток с локальными рецидивами края резекции проходили в непосредственной близости от опухоли (менее 1 мм от границы опухоли).

Также согласно многочисленным отечественным и зарубежным исследованиям [5,14,17,19,36,81,91,104,115] можно выделить следующие основные неблагоприятные факторы, способствующие развитию ЛРР:

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

-гистологический класс опухоли (риск ЛРР увеличивается при G2-3).

Размер опухолевого узла имеет первостепенное значение при оценке вероятности развития локорегионарного рецидива. Во многих работах отечественных и зарубежных авторов даются различные варианты размеров опухоли, при которых возможно проведение органосохраняющего лечения. Так, встречаются данные о повышении риска развития ЛРР при опухолях более 2 см, 3,5 см, 4 см и 5 см.

Необходимо отметить, что одним из устоявшихся противопоказаний к выполнению органосохраняющих резекций является молодой возраст пациенток [71, 101]. РМЖ у лиц моложе 40 лет встречается в 5-7%, в то же время данный показатель в некоторых странах Ближнего Востока достигает 20% случаев [46]. В многочисленных зарубежных исследованиях РМЖ в молодом возрасте характеризуется большими размерами опухоли, высокой частотой поражения регионарных лимфоузлов (около 50% случаев), низкой степенью дифференцировки опухолевых клеток, а также высокой смертностью при сравнении с пациентками старше 35 лет [47,70, 114].

Эти положения были также подтверждены на международной Сент-Галленской конференции в 2015г. [60].

## **1.2 Отечественные и зарубежные клинические рекомендации по органосохраняющему лечению при ранних формах РМЖ**

Во всех рассматриваемых рекомендациях за последние 10 лет указано, что ОСО (лампэктомия, широкая секторальная резекция, квадрантэктомия, биквадрантэктомия) с подмышечной лимфодиссекцией при ранних формах РМЖ (I-II стадии), является полноценной альтернативой выполнению радикальных мастэктомий. Лечение должно проходить в высокоспециализированном учреждении, в процессе лечения пациентки на разных этапах в обязательном порядке участвует группа врачей – хирург, радиолог, онколог, рентгенолог, патоморфолог. Дополнительно могут привлекаться следующие специалисты – пластический хирург, физиотерапевт, психолог, медицинский генетик [118].

Клинический протокол ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России по лечению рака молочной железы от 2010 г., регламентирует случаи и стадии заболевания, при которых возможно выполнение органосохраняющих резекций. Так, органосохраняющие операции выполняются при 0, I и II стадиях заболевания, при этом размеры опухолевого узла не должны превышать 2,5 см (3 см при раке *in situ*). При опухолях размерами от 2,6 до 3,5 см предусмотрена возможность выполнения субтотальной резекции МЖ. Во всех случаях проводится интраоперационное гистологическое исследование чистоты краев резекции. Мультицентрический опухолевый рост, а также диффузные рассеянные микрокальцинаты в молочной железе являются абсолютными противопоказаниями к выполнению ОСП. К другим неблагоприятным факторам прогноза при РМЖ отнесены – молодой возраст пациенток (моложе 35 лет), высокая степень злокачественности (G 3), отсутствие в опухоли РЭ и РП, амплификация гена HER 2/neu. В послеоперационном периоде пациентам проводится конформная лучевая терапия на грудную стенку и регионарные пути лимфооттока.

Аналогичные рекомендации предлагает Российское общество онкомамологов (РООМ). К вышеописанным абсолютным противопоказаниям дополнительно относят невозможность проведения адьювантной лучевой терапии, мутации в генах BRCA1 и/или BRCA2, отек молочной железы, размеры опухоли (T3) и конгломерат спаянных лимфоузлов в подмышечной области (N2).

В практических рекомендациях российского общества клинической онкологии (RUSSCO) описана возможность выполнения органосохраняющих резекций при больших размерах опухоли (T3) и поражении регионарных подмышечных лимфоузлов (N1). Рассматриваются стадии - T2N1M0, T3N0M0, T3N1M0 после проведения нескольких курсов предоперационной химиотерапии и при наличии положительного эффекта в виде уменьшения размеров опухоли и исчезновения ранее выявляемых лимфоузлов.

В британских руководствах общества хирургической онкологии

(BASO) детально описывается методика определения чистоты краев резекции. При этом минимально допустимым краем, определяемым микроскопическим путем, считается отступ от опухоли не менее 2 мм, в то же время рекомендуемый отступ около 2 см от предполагаемого края опухоли. При этом допускается уменьшение отступа резекции на границе с кожей и грудной стенкой. Также большое значение уделяется интраоперационной рентгенографии удаленного сектора молочной железы. В рамках данных рекомендаций, в течение 20 минут после удаления сектора оперирующий хирург должен получить рентгенологическое заключение, в котором указывается, насколько радикально удален интересующий участок молочной железы [51].

Американские рекомендации NCCN (National Comprehensive Cancer Network) по лечению РМЖ от 2016 года определяют следующие абсолютные и относительные противопоказания к ОСЛ.

К абсолютным противопоказаниям относятся:

- проведенная ранее лучевая терапия во время беременности;
- диффузные изменения в молочной железе подозрительные на злокачественный процесс, диффузные микрокальцинаты;
- большая распространенность опухоли, которая не позволяет выполнить органосохраняющую операцию через единственный разрез, невозможность добиться удовлетворительного косметического эффекта;
- опухоль-позитивные края резекции;

Относительными противопоказаниями являются:

- ранее проведенная лучевая терапия на грудную стенку и молочную железу;
- системные заболевания кожи и соединительной ткани, такие как системная красная волчанка и склеродерма;
- размеры опухоли более 5 см (уровень доказательности 2B);
- фокусы опухолевого роста в краях резекции;
- женщины с генетической предрасположенностью к РМЖ (мутации в

генах BRCA 1/2), в данной группе больных существует повышенный риск развития рецидива в ипсилатеральных и контрлатеральных лимфоузлах, а также развития РМЖ в противоположной молочной железе. В данных случаях рекомендовано выполнение двусторонней мастэктомии.

### **1.3 Иммуногистохимические факторы прогноза локальных рецидивов после органосохраняющего лечения ранних форм РМЖ.**

В настоящее время механизмы патогенеза РМЖ изучены достаточно подробно и описаны в большом количестве как экспериментальных, так и клинических исследований, однако многие фундаментальные вопросы остаются дискуссионными. В настоящее время процесс канцерогенеза РМЖ рассматривают как мультифакторный с различными путями активации. Каждый из рассмотренных ниже факторов в отдельности и совокупности являются факторами риска при РМЖ.

Гормональные факторы (рецепторы эстрогена и прогестерона) являются наиболее изученными и широко применяются для диагностики и лечения РМЖ. В 1896 г. шотландский хирург Дж. Битсон [50] выполнил двустороннее удаление яичников пациентки с неоперабельной опухолью молочной железы, добившись частичной регрессии опухоли. Объяснение данного клинического эффекта нашлось после открытия рецепторов эстрогена (РЭ) и прогестерона (РП) в тканях молочной железы во второй половине XX века. Кроме молочной железы, рецепторы определяются во многих органах – матке, яичниках, жировой ткани и др. [30]. В настоящее время известно, что рецепторы эстрогена неоднородны по своей структуре. Большое значение в развитии РМЖ придают ER $\alpha$  и ER- $\beta$  рецепторам, активируемым 17-бетаэстрадиолом. Данные рецепторы располагаются в люминальном эпителии, миоэпителиальных клетках, фибробластах и лимфоцитах [90]. 17-бетаэстрадиол, один из наиболее активных эстрогенов, соединяясь с рецепторами эстрогена на ядерной оболочке оказывает влияние на экспрессию эстроген-зависимых генов. Приблизительно в 58 % опухолей МЖ удается выявить оба вида рецепторов эстрогена, в 18% определяется

экспрессия только ER- $\beta$  рецепторов и в 14 % случаях - ER $\alpha$ [99].

В исследованиях ученых Норр и Нонна [78,80] показано, что высокая экспрессия рецепторов ER- $\beta$  из материалов опухоли МЖ обуславливает хороший ответ к лечению антиэстрогенными препаратами и увеличивает продолжительность жизни. Также значимость определения рецепторного статуса опухоли подтверждают данные мультицентровых исследований NSABP-14 и B-20, в ходе которых доказано, что применение тамоксифена у пациенток с гормонозависимым РМЖ без поражения региональных лимфатических узлов (РЛУ) снижает частоту отдаленных рецидивов и увеличивает продолжительность жизни [67].

В исследовании Седакова И.Е. [30] показана закономерность метастазирования РМЖ в зависимости от менструальной функции женщин. При сохраненной менструальной функции опухоли с отрицательным рецепторным статусом имели более высокий риск отдаленного метастазирования. В то же время, в рамках данного исследования не выявлено статистически значимой разницы при отдаленном метастазировании у женщин в постменопаузе.

Ядерный белок Ki-67 наряду с РЭ и ПГ используется в клинической практике для определения прогноза при РМЖ. Данный белок был открыт Gerder с соавт. при исследовании лимфомы Ходжкина в 1980 г. Он выявляется в клетках, находящихся в различных фазах митоза S, G1, G2 и M, при этом не обнаруживается в G0 фазу и его количество может быть выражено в процентах. В исследовании Inwald E.C. с соавт. [84] была изучена взаимосвязь Ki-67 с общей и безрецидивной выживаемостью после хирургического лечения у больных РМЖ. Полученные данные свидетельствуют о снижении показателей выживаемости при повышении уровня Ki-67. Так, при значениях Ki-67 менее 15% 5-летняя безрецидивная и общая выживаемость составили 86,7% и 89,3% случаев, соответственно. При высоких значениях Ki-67 от 15 до 45% выживаемость снижалась и составила 75,8% и 82,8% случаев, соответственно.

Открытие группы японских исследователей [103] выявило статистически значимые различия между уровнем Ki-67 в первично резецированной опухоли и развившемся в отдаленном периоде локальным рецидивом, при этом высокое значение Ki-67 в рецидивной опухоли напрямую коррелировало с уменьшением времени до возникновения отдаленных рецидивов.

Поиск факторов, способных прогнозировать отдаленные результаты, привел к созданию классификация РМЖ, основанной на определении иммуногистохимических маркеров. Впервые в 1982 г. Moll предложил разделять карциномы молочной железы на люминальные и базальные в зависимости от экспрессии цитокератинов. Открытие новых прогностических факторов привело к расширению и к углублению данной классификации [20]. В 2011 г. прошла XII международная конференция в городе Сент Галлен, на которой было рекомендовано введение в клиническую практику биологической классификация РМЖ. В том же году данная классификация была одобрена Европейским онкологическим обществом ESMO. Принятая классификация учитывает основные морфогистохимические и генетические особенности РМЖ, такие как наличие экспрессии РЭ, РП, маркера клеточной пролиферации Ki-67, эпидермального фактора роста 2 (Her2/neu), цитокератинов и др. [32].

В данной классификации выделяют 4 биологических подтипа РМЖ – люминальный А, люминальный В, HER2-позитивный и базальноподобный (“Трижды негативный”).

Люминальный А подтип, наиболее часто встречаемый (30-45% от всех случаев РМЖ), характеризуется относительно благоприятным течением в сравнении с другими типами РМЖ, высоким уровнем рецепторов ЭР и ПР, уровнем Ki-67 менее 14%, отсутствием амплификации гена Her2/neu. При генетическом исследовании выявляется высокая экспрессия генов ESR1, XBP1, FOXA1, GATA3, TTF3, LIV3, HER4, PIK3RI, люминальных цитокератинов (KRT8/18). [23,97] У пациентов с опухолями данного

фенотипа значительно реже, чем в общей популяции наблюдаются отдаленные и локорегионарные рецидивы. При анализе кумулятивной базы данных пациентов ФГБУ «НИИ Онкологии им. Н.Н. Петрова» [31] в группах местного и регионарного рецидивирования с люминальным А подтипом риск развития рецидива составил 0,6% (3 пациента из 461).

При люминальном В подтипе (частота выявления составляет 14-18%) выделяют 2 подгруппы, в зависимости от экспрессии гена Her2/neu. Кроме этого, данная группа характеризуется положительным гормональным статусом, значением Ki-67 более 14 %. В генетическом профиле можно отметить высокую экспрессию следующих генов - ESR1, CCNB1, MKI67, MYBL, CCNE1, ERBB2, GRB7, HRAS [75].

В 2012 г. были обобщены данные 12 крупных международных исследований, проводивших изучение связи биологического вида опухоли и послеоперационной смертности. При анализе результатов установлено, что люминальные подтипы опухолей без амплификации гена Her2/neu имеют наилучшую 5-ти и 10-летнюю выживаемость в сравнении с трижды негативным и Her2/neu сверхэкспрессирующими подтипами при соответствии стадии заболеваний [53].

Базальноподобный и “трижды негативный” вариант РМЖ представляет группу с отрицательным гормональным статусом, отсутствием амплификации гена Her2/neu и характеризуется плохим прогнозом. Опухоли экспрессируют NRAS, KRAS, SKIT, кадхерин P (CDH3), ламинин альфа/гамма (LAMA5, LAMC1), MCM3/4/7, базальные цитокератины (KRT5/6/17) [70]. В 80% случаев базальноподобный и “трижды негативный” РМЖ совпадают между собой, однако, “трижды негативный” РМЖ может включать в себя и некоторые особые гистологические типы, такие как медуллярная и железисто-кистозная карциномы с низким риском развития отдаленных метастазов.

В исследовании [68] проведено соотношение биологического вида опухоли и рисков развития локальных и отдаленных рецидивов после

органосохраняющих операций, дополненных послеоперационной лучевой терапией. 753 пациентки с I-III стадиями РМЖ были разделены на 3 группы - 1 - группа опухоли с положительным гормональным статусом без амплификации гена Her2; во 2 группу включены опухоли с отрицательными гормональными рецепторами, сверхэкспрессией гена Her2; в третью - опухоли с трижды негативным фенотипом. При оценке распределения локальных и отдаленных метастазов при 5-летнем периоде наблюдения получены следующие данные: риск развития локальных рецидивов составил 2,3%, 4,6% и 2,2%, что соответствует 1,2,3 клиническим группам, статистически значимой разницы не получено. Однако при оценке риска отдаленных рецидивов во второй и третьей группах отмечается статистически значимое увеличение их частоты (12% и 7%, соответственно) в сравнении с первой группой (3%). Также были выявлены следующие закономерности – во второй и третьей группах опухоль чаще выявлялась уже на 2 стадии, чаще имела 3 степень злокачественности, была более характерна для пациенток черной расы, чаще встречались некрозы опухоли.

В 2011 г. N. D. Arvold с соавторами опубликовали результаты исследования по изучению частоты развития локорегионарных рецидивов после выполнения органосохраняющих операций среди различных биологических подтипов РМЖ (люминальный А, люминальный В, базальноподобный и Her2/neu положительный) [44]. Ретроспективно были изучены данные 1434 пациентки, перенесших органосохраняющее лечение с 1997 по 2006 гг. Все пациентки проходили послеоперационную лучевую терапию, 91% получали системную полихимиотерапию, трастузумаб (герцептин) не применялся. Медиана наблюдения составила 85 месяцев. При пятилетнем наблюдении общий риск локорегионарных рецидивов составил 2,1% случаев. По результатам в подгруппах - риск локорегионарных рецидивов при люминальном А типе составил 0,8%, при люминальном В – 2,3%, при Her2 экспрессирующем – 1,1%, при трижды негативном – 10,8%.

Также исследователями был проведен статистический анализ риска

развития ЛРР в различных возрастных группах. Так в возрасте от 23 до 46 лет риск составил 5%, от 47 до 54 – 2,2%, от 55 до 63 - 0,9%, 64-88 – 0,6 %.

В тоже время описаны высокие риски ЛРР и для Her2 экспрессирующего подтипа РМЖ. В исследовании W.-J. Jia с соавт. этот риск составил 9,5% при общей пятилетней выживаемости 87,4%[85].

#### **1.4 Роль лучевой терапии при органосохраняющем лечении РМЖ.**

Впервые в 1922 г. английский хирург Джеффри Кейнс предложил облучать область операции после резекций при РМЖ. Однако внедрение данной методики в клиническую практику произошло лишь в 80-е годы XX века[92]. Согласно современным рекомендациям (ASCO, ESMO, NCCN) и данным независимым исследований после проведения органосохраняющего лечения при РМЖ, рекомендовано проведение лучевой терапии на грудную стенку и регионарные пути лимфооттока. Это снижает частоту развития ЛРР с 32% до 5-11% [12, 62, 106,129].Эффективность адьювантной лучевой терапии после органосохраняющих операций демонстрируют данные клинического протокола NSABP B-6. [45] Это наиболее крупное рандомизированное ретроспективное исследование, включающее 1851 человека. В исследование вошли пациентки с РМЖ I и II стадий после хирургического лечения с подмышечной лимфаденэктомией 1-2 уровня. Пациенты были разделены на 3 группы – первая состояла из пациенток перенесших радикальные мастэктомии; вторая группа включала пациенток после лампэктомий; третья – лампэктомии дополненные адьювантной лучевой терапией. При оценке и сравнении результатов лечения внутри групп, выявлена более высокая частота риска развития локальных рецидивов после лампэктомий, составившая 39,2% при 10-летнем периоде наблюдения. В то же время, в группе лампэктомий с адьювантной лучевой терапией и группе мастэктомий получены сопоставимые данные (14,3 %). При этом во всех группах показаны почти одинаковые показатели общей и безрецидивной выживаемости. Аналогичные данные для РМЖ insitu показывает протокол NSABP B-17[125] при оценке уровня локального контроля между группами

лампэктомий и лампэктомий с послеоперационной ЛТ. Показатели локального контроля характеризуются рисками развития ЛРР в 31,7% случаев после лампэктомий и 15,7 % при комбинированном лечении.

В 2000-х гг. стандартом лучевой терапии являлась облучение в традиционном режиме фракционирования при разовой очаговой дозе (РОД) в 2 Гр. до суммарной очаговой дозы (СОД) 50 Гр. В 2010 г. совет экспертов американского общества радиационной онкологии (ASTRO) предложил проводить лучевую терапию на грудную стенку в режиме гипофракционирования в дозе 42,5 Гр за 16 фракции [122]. В опубликованном исследовании режим гипофракционирования сопоставимо эффективен у пациенток соответствующим следующим критериям:

- Возраст старше 50 лет
- Размеры опухоли менее 5 см
- Отсутствие ранее проведенной химиотерапии
- Колебания дозы при облучении грудной стенки и подмышечной области не должны превышать 7 %

При изучении закономерности возникновения локальных рецидивов установлено, что 85-90% рецидивов возникают в зоне первичной опухоли и послеоперационного рубца. Учитывая этот факт, облучению ложа опухоли отводится особое место. Предложены методики внутритканевой брахитерапии, интраоперационная или адьювантная дистанционная лучевая терапия ложа первичной опухоли. Как правило, подводимая доза находится в рамках 10-16 Гр. [35]

U. Veronesi с соавторами [124] показывают эффективность интраоперационной ЛТ (ИОЛТ) на большом клиническом материале (1246 пациенток РМЖ I-II ст). Лечение проводилось с использованием аппарата для электронной ЛТ – ELIOT, подводимая доза соответствовала 21 Гр. Медиана наблюдения составила 26 месяцев, при этом локальный контроль достигался в 98% случаев. В нашей стране ИОЛТ используется в крупных онкологических центрах, таких как ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России

(Обнинск), в МНИОИ им. П.А. Герцена (Москва) и ТНЦ СО РАН (Томск), при этом достигались похожие результаты по снижению риска развития ЛПП. Однако, при применении ИОЛТ в 22,7% отмечался отек молочной железы, также в сравнении послеоперационной ЛТ, чаще отмечался выраженный фиброз в аксиллярной области. Тем не менее, несмотря на повышение показателей локального контроля, широкое применение ИОЛТ в клинической практике ограничивает отсутствие на момент облучения данных планового гистологического исследования и потеря косметического эффекта у ряда пациенток.

В рекомендациях DEGRO [116] указывается, что пожилой возраст не является критерием для отказа от послеоперационной ЛТ. Во всех группах исследования с применением ЛТ отмечено повышение уровня локального контроля. Также уделяется большое внимание облучению ложа опухоли, что позволяет снизить частоту локальных рецидивов, при этом наибольший эффект от данного вида лечения наблюдается у женщин до 60 лет. В мультицентровом исследовании EORTC [48] изучено влияние дополнительного облучения ложа опухоли. В исследовании были включены данные 5318 пациенток с ранними формами (T1-T2N0-1M0) РМЖ, перенесших органосохраняющее лечение. Все пациентки были разделены на группы – первая группа состояла из пациенток, перенесших лучевую терапию в режиме стандартного фракционирования (СОД 50 Гр. на весь объем молочной железы), вторая с дополнительным облучением ложа опухоли в дозе 16 Гр. Медиана наблюдения составила 10,8 лет. Получены следующие данные – во второй группе пациенток с дополнительным облучением ложа опухоли определялось снижение частоты местного рецидива до 6,2% против 10,2% в первой группе. При этом общая 10-летняя выживаемость в обеих группах совпадала и составила 82%. Однако оценивая косметические результаты, отмечено повышение количества грубых деформирующих рубцов во второй группе (4,4% против 1,6%)

Большой интерес представляют работы авторов, изучающих влияние

лучевой терапии при различных подтипах РМЖ – люминальном, Her2 экспрессирующем и “трижды негативном”. В исследовании британской ассоциации хирургической онкологии (BASO) [52] показаны результаты органосохраняющего лечения (ОСЛ) люминальных опухолей РМЖ 1 стадии с благоприятным клиническим прогнозом (отсутствие опухоли в краях резекции, отсутствие поражения регионарных лимфатических узлов, уровень злокачественности G1, гормоноположительные опухоли с отсутствием Her2/neu.) Пациентам проводилось лечение по трем направлениям – адъювантная гормонотерапия (ГТ) в монорежиме, лучевая терапия на грудную стенку без ГТ и комбинированное лечение ЛТ +ГТ. Результаты десятилетнего наблюдения показали снижение риска развития локального рецидива до 0,2% при комбинированном лечении, 0,8% и 2,2% при ЛТ и ГТ в монорежиме соответственно. Похожие результаты приводит К. S. Hughes [83], в группах рассматривая отдаленные результаты лечения 636 пациенток старше 70 лет с гормонозависимым РМЖ после ОСЛ. При 10-летнем наблюдении локальный контроль в группе комбинированного лечения был достигнут в 98% случаев, в то же время в группе пациенток получающих тамоксифен в монорежиме он составил 90%. Сравнивая данные результаты с группами радикальных мастэктомий, автор не выявил статистически значимой разницы в общей безрецидивной выживаемости. Учитывая пожилой возраст пациенток, она составила 67 и 66% в обеих группах.

При “трижды негативном” раке отдаленные результаты после ОСЛ соответствуют плохому клиническому прогнозу в сравнении с люминальными типами. [33,41] В исследовании В. S. Abdulkarim [41] сравнивались отдаленные результаты “трижды негативного” РМЖ при ранних стадиях (T1-2N0M0) в группах после ОСЛ с адъювантной ЛТ, радикальных мастэктомий (РМЭ) и группа РМЭ с адъювантной ЛТ. Прогрессирование заболевания отмечено у 155 человек из 768, при этом локальные рецидивы отмечены в 10% (77 человек), а отдаленные у 13% (103 пациентки). Из них 123 пациентки погибли в результате прогрессирования

заболевания. При медиане наблюдения 7,2 года, 5-летняя общая безрецидивная выживаемость составила 81%, а общий уровень локального контроля оставил 89%. При оценке уровня локального контроля в группах ОСЛ+ ЛТ, РМЭ и РМЭ + ЛТ получены следующие результаты - 94%, 85% и 87% соответственно отобранным группам. Роль лучевой терапии в развитии локорегионарных рецидивов демонстрируют наихудшие показатели (85%) в группе РМЭ без адъювантной ЛТ. В исследовании описаны факторы, повышающие и понижающие риск развития локорегионарных рецидивов (ЛРР). Так, к факторам, повышающим риск развития ЛРР, относят размер опухоли (более 2 см), 2-3 степень злокачественности, поражение регионарных лимфатических узлов (л/у), лимфоваскулярную инвазию опухоли. К факторам, понижающим риск ЛРР при “трижды негативном” РМЖ относят проведение адъювантной химиотерапии.

В своем исследовании группа французских ученых показала данные локорегионарного контроля при Her-2 экспрессирующем РМЖ. [113]. Риск развития ЛРР даже при небольших размерах опухоли (T1a-bN0M0) значительно повышается в группе Her2 зависимого рака. 10-летняя общая выживаемость Her2-экспрессирующего РМЖ составила 84% против 94% основной группы, общая безрецидивная выживаемость 73% против 89% и уровень локального контроля 9% и 98% соответственно.

При этом, большое значение предается количеству пораженных регионарных л/у. При поражении 4 и более л/у является обязательным облучение ложа опухоли, грудной стенки, аксиллярной, над-, подключичной областей. Также на усмотрение врача-радиолога облучение парастернальных л/у. При поражении от 1 до 3-х лимфатических узлов обязательным является облучение грудной стенки, ложа опухоли. Над-, подключичные и парастернальные л/у могут быть облучены на усмотрение врача-радиолога. При отсутствии поражения регионарных л/у проводится лучевая терапия только на ложе опухоли и грудную стенку. Возможно облучение дополнительных зон при плохом прогнозе.

На представленной ниже схеме (рис. 1) показан алгоритм назначения и объем облучения после выполнения ОСР при РМЖ.

Несмотря на снижении риска возникновения ЛРР после проведения лучевой терапии, назначение последней может вызвать развитие ряда осложнений. Так, облучение грудной стенки в области сердца может привести к сердечно-сосудистым осложнениям (ишемия сердечной мышцы, инфаркт миокарда, сердечно-сосудистая недостаточность). [6,25]. При стандартном фракционировании на область сердца попадает от 1 до 5 Гр, а риск сердечно-сосудистых осложнений увеличивается на 7,4% случаев на каждый дополнительный Гр. попавший на область сердца. Другим редким, но опасным осложнением ЛТ является интерстициальная послелучевая пневмония, характеризующаяся тяжелым, длительным течением [105].

Оценивая косметические результаты у 3186 пациенток, перенесших ОСЛ с последующей ЛТ, выявляются следующие пропорции– отличные, без деформации молочной железы и развития фиброза составили 54%; хорошие – при незначительной деформации железы и/или возникновении негрубого фиброза, выявлены в 41% случаев; результаты, расцениваемые как неудовлетворительные, выявлялись в 5% случаев, характеризовались грубой или умеренной деформацией молочной железы в сочетании с фиброзом. Случаи умеренного и выраженного послеоперационного фиброза наблюдались в 11% случаев в течении 5 лет и 17% по прошествии 10 лет [100].

Таким образом, проведение лучевой терапии на область послеоперационного рубца, грудную стенку и регионарные лимфоузлы является одним из основных методов локального контроля, который в комплексе с органосохраняющими резекциями МЖ заметно снижает риск развития ЛРР. При этом достигаются сопоставимые результаты с радикальными мастэктомиями. Однако в ряде случаев ЛТ может приводить к развитию осложнений, что требует коррекции плана лечения. Тем не менее, при строгом отборе пациентов для проведения ОСО и современной





**Рисунок 1. Схема органосохраняющего лечения РМЖ в стадии I, Ia, Ib или T3N1M0. (NCCN 2016)**

конформной ЛТ, процент осложнений не превышает соответствующий риск для пациенток после радикальных мастэктомий.

### **1.5 Анализ влияния генетических факторов на прогноз при РМЖ.**

К 2003 году в рамках проекта “Геном человека” учеными было выделено около 25 тыс. генов отвечающих за синтез специфических белков, обеспечивающих жизнедеятельность организма. Среди большого генетического разнообразия в последнее десятилетие удается выделить потенциально опасные гены, избыточная активность которых может приводить к сбою биологических функций клеток и, как следствие этого, возникновению опухолей [38]. Ниже приведены некоторые онкогены и их основные функции.

Ген STK15 отвечает за синтез Aurora A киназы (центросомальной серин/треонин киназы) – фермента, участвующего в разделении хромосом. Данный ген локализуется в 20-й хромосоме 20q13. Сверхэкспрессия данного гена приводит к центросомным аномалиям и хромосомной нестабильности, проявляющейся отменой ДНК-обусловленного сигнала к апоптозу. Таким образом, создаются условия для сохранения генетически измененных клеток. Также в литературе описаны данные о связи высокого уровня Aurora A с развитием рака молочной железы, толстой кишки, яичников и поджелудочной железы. В исследовании Yamamoto и соавт. [128] показана связь сверхэкспрессии AuroraA с высоким уровнем Ki-67, при этом наиболее часто сверхэкспрессия AuroraA наблюдалась при “трижды негативном” раке. В трех независимых исследованиях (Mainz, Rotterdam и TRANSBIG) показано, что высокая экспрессия Aurora A в 75% случаев связана с уменьшением общей и безрецидивной выживаемости после радикального лечения РМЖ. [119].

Ген CCNB1, кодирующий белок циклин B1, также может быть отнесен к онкогенам. Данный белок в комплексе с белком CDK1 участвует в инициации перехода из фазы G2 в метафазу митоза. Сверхэкспрессия данного гена приводит к неконтролируемому делению клеток и, как

следствие, появлению опухоли. В исследованиях [40,58] показана высокая экспрессия данного гена в клетках опухолей при РМЖ была ассоциирована с большим размером опухоли, молодым возрастом пациенток, поражением регионарных лимфатических узлов, высокой степенью злокачественности, гормоннезависимыми опухолями, высоким уровнем Ki-67 и положительным Her-2 статусом.

Семейство BCL-2 генов включает Bcl-2, Bcl-xL и белки Bax, Bad и Bak и регулирует механизмы апоптоза. Существует 2 пути активации апоптоза – клеточно-рецепторный и митохондриальный. Гены BCL-группы осуществляют контроль проницаемости митохондриальной мембраны и, тем самым, регулируют выход цитохрома C в цитоплазму. Нарушение экспрессии этих генов приводит к изменению баланса между запрограммированной гибелью клеток и их делением. Изменение экспрессии BCL-2 генов наблюдается при раке молочной железы, меланоме, раке простаты, легкого и лейкемии [63,88,131].

Ген BIRC5 также относится к семейству ингибиторов апоптоза. Экспрессия гена наиболее выражена в фетальных тканях и клетках опухолей, а также обнаруживается в плаценте, тимусе, селезенке, костном мозге и молочных железах. Белок, кодируемый данным геном способен ингибировать каспазу 3 и 7. Также ген участвует в делении клетки при переходе из G2 в M –фазу митоза. Сверхэкспрессия данного гена может приводить непосредственно к блокировке сигналов к апоптозу, а также вызывать генетическую нестабильность в делящихся клетках, что может способствовать возникновению опухоли и ее прогрессии [54].

Ген TERT, ответственный за экспрессию фермента теломеразы, также относится к онкогенам. Данный фермент обнаруживается в стволовых, половых, эмбриональных и опухолевых клетках, обеспечивая им возможность неограниченного количества делений. В остальных соматических клетках экспрессия данного фермента не наблюдается. При делении соматических клеток концевые участки хромосом (теломеры)

укорачиваются вследствие неспособности ДНК-полимеразы синтезировать дочернюю цепочку ДНК с самого начала, из-за отсутствия, подходящего праймера в начале цепочки. При этом происходит укорочение цепочки ДНК, в каждом клеточном цикле теряется от 3 до 6 нуклеотидных последовательностей [59, 127]. В 1961 г. Хейнклиф установил лимит количества делений для соматических клеток человека равный 52 клеточным циклам. В настоящее время укорочение теломер в процессе деления рассматривают как одну из теорий старения клеток. Теломераза в процессе деления добавляет к концевому участку ДНК последовательность нуклеотидов TTAGGG, тем самым удлиняя цепочку ДНК и предотвращая потерю нуклеотидов. Таким образом, клетки с теломеразной активностью приобретают свойства иммортальности и способны к неограниченному делению, что справедливо для большинства опухолевых клеток. В исследовании [94] изучена активность теломеразы в клетках рака молочной железы. Активность теломеразы выявлялась в 53 % опухолей. У пациентов с высокой уровнем теломеразы, определялись большие размеры первичной опухоли, чаще заболевание относились к III и IV стадии, также данные пациенты характеризовались высоким риском отдаленного метастазирования и высокими показателями смертности. Изучение активности теломеразы в клетках опухоли является одним из перспективных направлений создания таргетной противоопухолевой терапии [56,77]. Американскими учеными [116] было проведено исследование по изучению влияния длины теломер опухолевых клеток на выживаемость при РМЖ. Результаты проведенного исследования показывают, что длина теломер не связана с общей выживаемостью, размером опухоли, степенью дифференцировки, рецепторами эстрогена и прогестерона, при этом имеется корреляция длины теломеры с экспрессией Her2/neu – чем длиннее теломера, тем выше встречаемость Her2-экспрессирующего варианта опухоли.

Значимую роль в регуляции жизнедеятельности клетки обеспечивает ген PTEN, локализующийся в 10 хромосоме 10q23. Ген кодирует 403-

аминокислотный протеин, обладающий фосфотазной активностью. В результате деятельности данного гена контролируются практически все сферы клеточной активности, направленные на поддержание клеточного и тканевого гомеостаза - транскрипция, трансляция, клеточная миграция, ангиогенез, апоптоз [96]. Ген является супрессивным для опухолей, подавляя их активность. Основное действие гена реализуется за счет подавления активности фосфоинозитид-3-киназы (PI3K), одного из начальных факторов сигнального пути PI3K/AKT/mTOR. Мутации в данном гене и посредниках данного сигнального пути могут приводить к возникновению опухолей. Установлена связь между ослаблением активности гена и возникновением РМЖ, рака эндометрия, простаты и щитовидной железы. В исследовании [73] получены данные о выраженном снижении или отсутствии активности гена PTEN в клетках опухолей при РМЖ в 35% случаев. Также отмечается закономерность, проявляющаяся снижением уровня гормональных рецепторов опухолей РМЖ при отсутствии активности PTEN, преобладание “трижды негативного” и HER2-позитивного вариантов РМЖ.

Учитывая плохие отдаленные результаты при лечении Her2 позитивного РМЖ, большой интерес представляет изучение гена GRB7. Ген локализуется в длинном плече 17 хромосомы, обеспечивает передачу медиаторных сигналов при возникновении Her2 экспрессирующего РМЖ [95]. Ген продолжает сохранять высокую экспрессию и в тех случаях, когда опухоль оказывается устойчива к действию трастузумаба. В исследовании Nadleri Pradip с соавтр. [100,110] показана высокая корреляция между амплификацией обоих (Her2/neu и GRB7) генов, а также снижение общей безрецидивной выживаемости при повышении экспрессии GRB7. Таким образом, данный ген может быть использован для создания таргетной терапии при Her2-зависимом РМЖ, в то же время оценка уровня его экспрессии может быть использована как показатель ответа на проводимую терапию при Her2-зависимом РМЖ.

В настоящее время актуальной задачей является изучение молекулярно-генетических особенностей опухолей и выявление новых генетических факторов прогноза течения онкологического процесса. Разработаны и активно внедряются в клиническую практику генные «сигнатуры» Oncotype Dx, MammaPrint, The Breast Bio Classifier, The Rotterdam Signature и др. [1,43, 49, 72, 112].

В 2012 г. было проведено генетическое исследование по изучению частоты развития локорегионарных рецидивов после органосохраняющих операций и их корреляции с уровнем экспрессии генов по 21-генной сигнатуре [121]. Исследование проводилось в рамках крупного многоцентрового исследования –Eastern Cooperative Oncology Group E2197. В данное проспективное исследование были включены 388 пациенток с медианой наблюдения 9,7 лет, после проведенного комбинированного органосохраняющего лечения. Частота развития локорегионарных рецидивов за 10-летний период наблюдения составила 6,6%. Частота локорегионарных рецидивов при низком, среднем и высоком рисках, установленных при генетическом исследовании составила – 3,1%, 2,9 %, 7,6% случаев, соответственно.

Основным методом исследования в большинстве вышеуказанных исследований являлась полимеразная цепная реакция в реальном времени. (ОТ-ПЦР)

#### **1.6 Особенности полимеразной цепной реакции в реальном времени. (ОТ-ПЦР)**

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – это метод увеличения количества копий исследуемых участков ДНК за счет повторяющихся температурных циклов в результате которых последовательно происходят процессы денатурации и синтеза дочерних ДНК (амплификация). Увеличение количества генетического материала носит экспоненциальный характер. При этом нужно отметить, что рост количества генетического материала носит точечный характер, т.е. увеличивается количество только

исследуемых участков ДНК. И это происходит только в том случае, если генетический материал присутствует в исследуемом образце.

Впервые принципы ПЦР, а также состав реакционных смесей описал Клерре с соавторами в 1971 г. Однако автором ПЦР считает нобелевский лауреат К. Mullins, описавший ее в 1983 г. В связи с обнаружением микроорганизмов, живущих в гейзерах и выделение из них термофильных ДНК-полимераз, произошло широкое внедрение данного метода в исследовательскую деятельность. Изначально предполагалось регистрация полученных результатов после проведения исследования. Для этого использовали электрофорез в геле, гибридизационно-ферментный анализ, флуоресцентная детекция после проведения ПЦР (FLASH). Однако оценивая процесс в динамике, ученые могут получить больше информации, в том числе о скорости амплификации исследуемого участка ДНК, а также оценить его количество в любом промежутке времени. Данная методика, получившая название ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР), была использована в настоящем исследовании. В процессе реакции исследователь получает наглядную графическую и цифровую информацию количестве молекул мРНК исследуемых генов в образце, что позволяет косвенно судить об уровне экспрессии этих генов. Сравнивая результаты экспрессии генов в опухолевой ткани пациентов с длительной ремиссией с группой пациентов с развившимися ЛРР, мы попытались выделить значимые генетические маркеры неблагоприятного прогноза для дальнейшей математической обработки. В настоящее время методика ПЦР в реальной времени считается “золотым стандартом” для количественного определения содержания фрагментов ДНК в исследуемых образцах, обладая исключительно высокой точностью и специфичностью.

Перед проведением ПЦР необходимо подготовить исследуемый биологический материал, для чего производят выделение молекул мРНК и синтез на их матрице комплементарной ДНК (кДНК). Данный этап связан с

некоторыми особенностями ПЦР, не дающими возможности непосредственной работы с мРНК.

Выделение мРНК проводится согласно лабораторным протоколам, либо с использованием коммерческих наборов выделения. В нашем исследовании мы использовали набор для выделения РНК R Neasykit фирмы Qiagen USA. Процесс выделения мРНК из исследуемых тканей носит стандартизированный характер. Изначально производится гомогенизация ткани в растворе гуанидина сульфата, далее полученную смесь подвергаю фильтрации в различных буферных системах, либо на мембранных фильтрах.

Необходимость синтеза кДНК на матрице РНК обусловлена отсутствием способности взаимодействия термофильных ДНК-полимераз с мРНК. Данный процесс носит название обратной транскрипции, в природе он наблюдается у некоторых микроорганизмов, впервые описан для ретровирусов. В искусственных условиях исследователь имеет возможность контролировать реакцию путем направленной избирательной транскрипции генов-мишеней за счет подбора олигонуклеотидных последовательностей праймеров, играющих роль затравки для синтеза транскрибируемого фрагмента нуклеиновой кислоты. Именно достаточная длина мРНК позволяет подбирать праймеры, комплементарная последовательность которых лежит на границе экзонов РНК-матрицы, что исключает случайную транскрипцию ДНК вследствие наличия в ней интронов.

После получения кДНК становится возможным проведение ОТ-ПЦР. Для ее протекания необходимы три ключевых компонента.

Основным компонентом является молекула кДНК которая служит матрицей для дальнейшего протекания реакции.

Не менее важное значение имеют термофильная Taq ДНК-полимераза, а также смесь нуклеотидов, используемых ДНК-полимеразой для удлинения нуклеотидной цепи.

Также для проведения ОТ-ПЦР необходимы два праймера– олигонуклеотидные (обычно они составляют последовательности из 15-20

оснований) фрагменты, комплементарные участку начала исследуемого фрагмента ДНК. Комплементарно присоединяясь к этому фрагменту, праймеры позволяют запустить синтез ДНК.

Таким образом, если в исследуемом материале присутствует искомая кДНК, то запускается процесс амплификации ДНК. Для многократного повторения реакции необходимо циклическое изменение температуры. Данный процесс проводится в специальных приборах – амплификаторах. В нашем исследовании использовались ПЦР-амплификаторы с дополнительной оптической насадкой, позволяющей фиксировать уровень флюоресценции в закрытой пробирке. Каждый цикл амплификации повторяет три этапа, описанных ниже.

1. Денатурация. На данном этапе происходит нагревание реакционной смеси до температуры 93-96 градусов по С. При этом происходит разрыв водородных связей между двухцепочечными молекулами ДНК. Таким образом, происходит разрушение двухцепочечной молекулы ДНК на 2 однонитевых фрагмента.

2. Отжиг праймеров. Полученные однонитевые фрагменты ДНК в дальнейшем выполняют роль матрицы. Температура реакционной смеси опускается до 40-70 градусов, при этом происходит комплементарное взаимодействие праймеров с фрагментами одноцепочечной ДНК-мишени. Данный процесс носит название «отжиг». Праймеры подбираются таким образом, чтобы они ограничивали искомый фрагмент и были комплементарны противоположным цепям ДНК. Функциональная роль праймеров в данном случае не отличается от обратной транскрипции.

Отжиг происходит в соответствии с правилом комплементарности Чаргаффа, которое гласит, что в двухцепочечной молекуле ДНК аденину комплементарно соответствует тимин, а гуанин –цитозину. Количество пуриновых оснований (аденин, гуанин) равно количеству пиримидиновых оснований (тимин, цитозин).

После отжига праймеров Taq-полимераза начинает достраивание второй цепи ДНК, начиная с 3'-конца праймера.

3. Элонгация (удлинение). На данном этапе температуру в реакционной смеси доводят до оптимума работы Taq-полимеразы, и синтез второй цепи продолжается с максимальной эффективностью. Taq ДНК-полимераза представляет собой полипептид массой около 95 кДа. Он был впервые выделен из бактерий *Thermus Aquaticus*. Особенностью данного фермента является то, что он сохраняет свою активность при 95 градусах по С.

В дальнейшем этапы денатурации, отжига и элонгации многократно повторяются (30 и более раз). На каждом цикле количество синтезированных копий фрагмента ДНК удваивается.

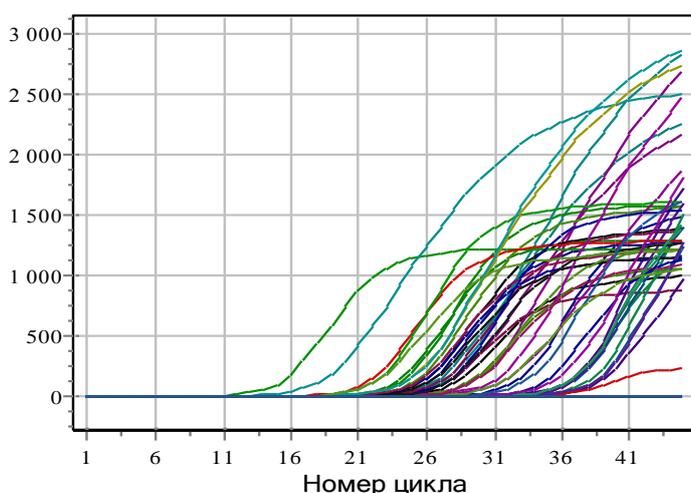
Для количественной оценки содержания мРНК в образце использовалась ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР), принципиальной особенностью которой является возможность детекции накопления продуктов амплификации непосредственно во время проведения амплификации. Известно, что кинетика накопления продуктов амплификации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

Пространственная конформация зонда, молекулы флюоресцентной метки и гасителя сконструирована таким образом, что определенного момента квантовая активность флюорофора подавляется гасителем. На этапе гибридизации зонд комплементарно связывается с нитью матрицы ДНК, с которой одновременно транскрибируется дочерняя нить. В основе активации

флюоресценции лежит 5`-3` экзонуклеазная активность полимеразы, которая при построении дочерней цепи понуклеотидно фрагментирует зонд. При этом флюорофор высвобождается из-под давления гасителя и активируется. Данные системы флюоресценции обладают значительно большей специфичностью по сравнению с интеркалирующими красителями.

В современных системах амплификации для возбуждения флюоресценции использует излучение в соответствующей области спектра с последующей детекцией изменения длины волны. Как только сила сигнала превысит некоторый пороговый уровень шума, его изменение будет графически отображаться в формате реального времени в форме экспоненциальной кривой, поднимающейся выше уровня изолинии. Именно точка пересечения кривой с осью ОХ и является так называемым пороговым циклом, относительным значением, отражающим концентрацию транскрипта в растворе. Графический интерфейс программы ОТ-ПЦР представлен на рисунке 2.

С целью стандартизации методики ОТ-ПЦР и для получения воспроизводимого алгоритма расчета результатов необходимо введение внешних или внутренних стандартов, относительно которых будет производиться количественная оценка реакции. Одним из возможных вариантов является одновременное определение экспрессии так называемых



**Рисунок 2. Интерфейс программы ОТ-ПЦР.**

«референсных» генов, экспрессия которых не зависит от различных специфических условий.

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

### **1.7 Обоснование необходимости изучения механизмов развития локорегионарных рецидивов.**

Исходя из вышеописанного, можно выделить 2 группы причин, приводящих к развитию ЛРР. Во-первых, это качество хирургического лечения и организация лечебного процесса в клинике. При выборе хирургической тактики необходимо учитывать следующие критерии – возраст, размер железы и размер опухоли, их соотношение, мультицентрический рост, поражение регионарных лимфатических узлов. Не менее важным моментом является организация лечебного процесса, включающая обязательный контроль краев резекции удаленного материала. Также на возникновение локорегионарных рецидивов влияют биологические свойства опухоли, такие как степень дифференцировки, уровень Ki-67, гормональный статус и амплификация Her2 neu. Высокая частота развития ЛРР после ОСЛ наблюдается при клеточной дифференцировке G2-3, высоком Ki-67, “Трижды негативном” и Her2-экспрессирующем подтипах РМЖ.

В настоящее время одним из перспективных направлений в диагностике РМЖ является изучение опухолевого генотипа. В России и за рубежом проводятся многочисленные исследования по выявлению генетических маркеров отдаленного метастазирования. В тоже время, проблеме локорегионарного рецидива уделяется недостаточное внимание. Известно, что от 20 до 40% случаев развития ЛРР предшествуют отдаленному метастазированию. Этот факт придает клиническую значимость разработке методов раннего выявления и профилактики развития локорегионарных рецидивов. Клинические и иммуногистохимические

показатели не дают четких критериев, которые позволили бы выделить группы высокого риска локорегионарного рецидивирования. Можно предположить, что генетические маркеры “ответственные” за развитие отдаленных рецидивов, могут оказывать влияние и на возникновение ЛРР. Выявление групп пациентов высокого риска локорегионарного рецидивирования на основе экспрессии онкогенов откроет новые возможности для скрининга и оптимизации хирургического лечения.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Общая характеристика исследуемых групп, описание используемых диагностических методов.

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

После фиксации в растворе нейтрального 10% буферного формалина и стандартной проводки материал биоптата заключался в парафин. Срезы толщиной 3-5 мкм депарафинировали, окрашивали растворами гематоксилина и эозина по стандартной методике.

Гистологические заключения давались в соответствии с гистологической классификацией опухолей молочной железы (ВОЗ, 2003г.). Оценка степени злокачественности рака молочной железы давалась в соответствии с критериями Elston-Ellis.

Для проведения иммуногистохимического исследования использовался материал, предварительно фиксированный в 10% нейтральном буферном формалине и заключенный в парафин. Срезы толщиной 3-5 мкм окрашивали на иммуногистостейнере Bond-Max, Leica Microsystems. Проявочная система – Bond Polymer Refine Detection, Leica Microsystems.

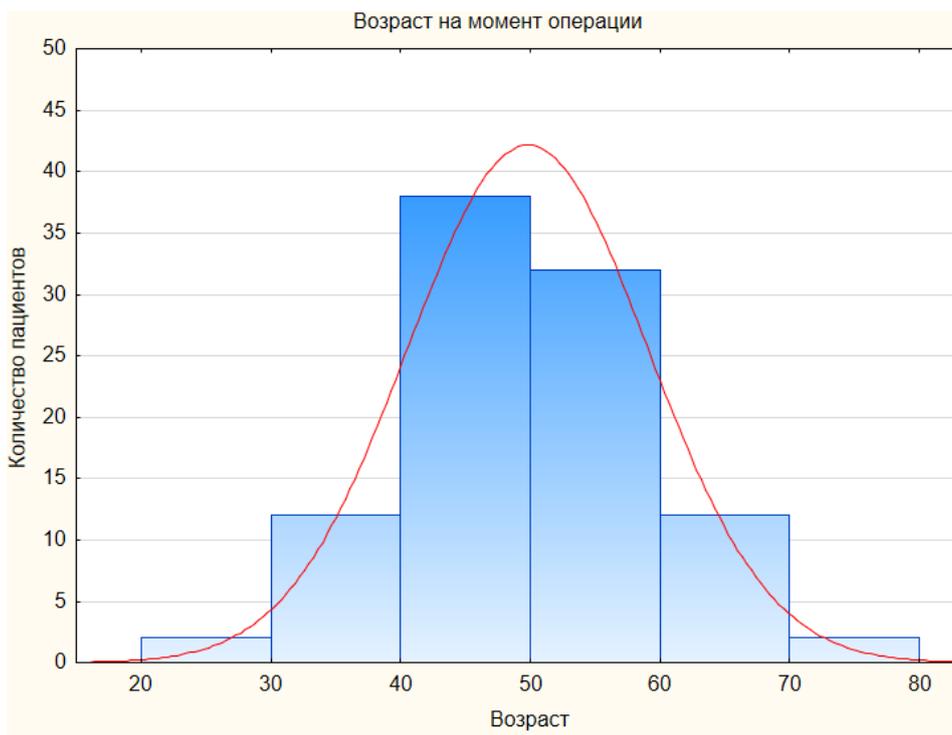
Для оценки экспрессии рецепторов стероидных гормонов использованы антитела к рецепторам эстрогена (PA0151, клон 6F11, Leica Microsystems), прогестерона (PA0312, клон 16, Leica Microsystems). Результаты иммуногистохимических реакций экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона оценивались полуколичественным способом. Пролиферативная активность подсчитывалась в ядрах опухолевых клеток, экспрессирующих Ki-67 (антитела PA0118, клон MM1, Leica Microsystems),

Для определения экспрессии онкобелка HER2/neu использованы моноклональные мышиные антитела c-erbB-2(A0485, Dako, Дания). Оценка экспрессии онкобелка HER2/neu выполнялась согласно рекомендациям А. С. Wolffa и соавторами.

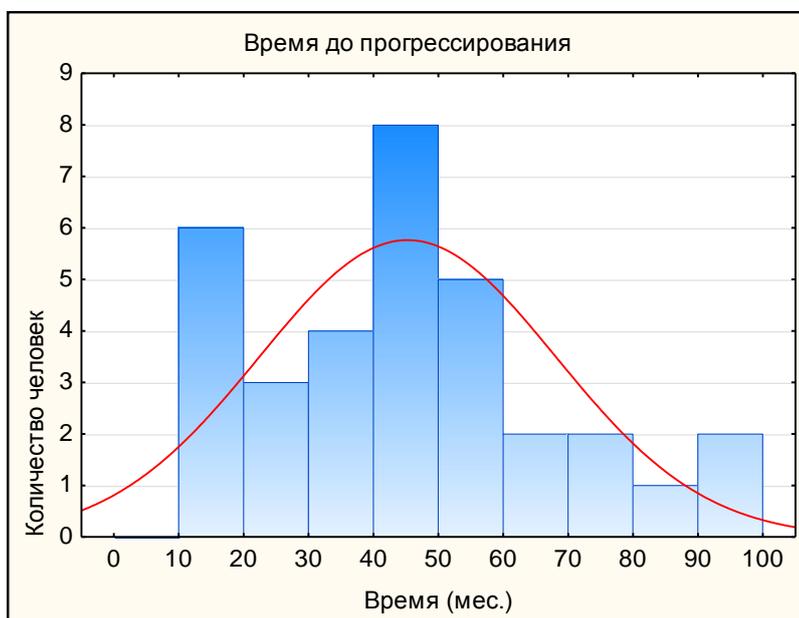
## **2.2 Клинико-морфологическая характеристика исследуемых групп**

Возраст пациенток в исследовании варьировался от 25 до 72 лет, среднее значение для выборки составило  $49,8 \pm 0,93$  лет. Средний возраст в

группах прогрессирования и ремиссии составил  $50,8 \pm 1,59$  и  $49,2 \pm 1,15$  лет, соответственно. Распределение пациентов по возрасту показано на рисунке 3.



**Рисунок 3. Распределение пациентов по возрасту.**



**Рисунок 4. Распределение пациентов по времени возникновения рецидивов.**

Распределение пациентов по времени возникновения рецидивов показано на рис.5. При этом определяются 2 пика рецидивирования – первый пик от 10 до 20 месяцев, второй пик 40-60 месяцев. Среднее время до

прогрессирования составило  $45,2 \pm 3,9$  мес. Длительность наблюдения в группе ремиссии составило  $79,3 \pm 2,3$  мес.

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

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

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

Произведена оценка возраста женщин на момент операции, выделено 3 группы пациенток – до 40 лет, от 40 до 50 и старше 50 лет.

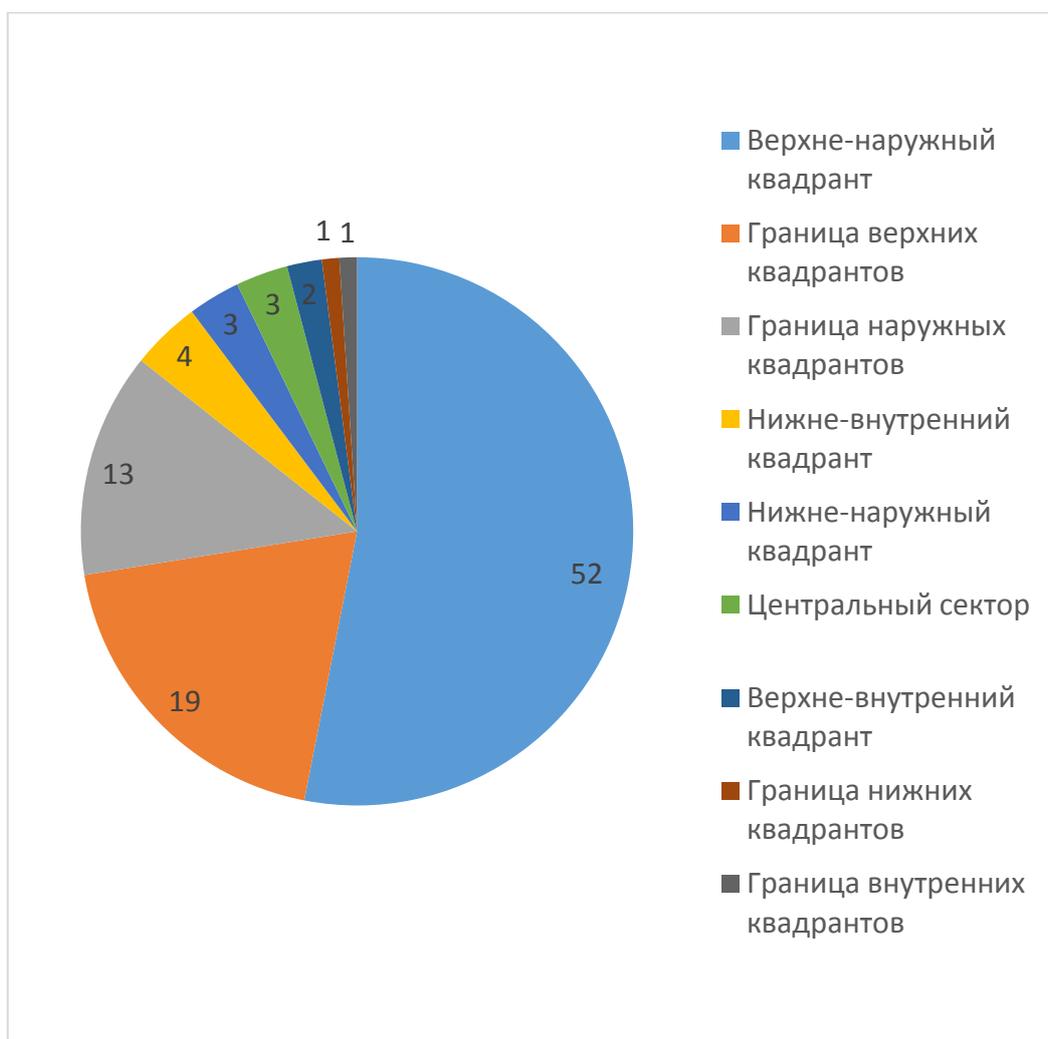
В группу прогрессирования входили 4 (12%) женщины моложе 40 лет, 14 (42%) пациенток в возрасте от 40 до 50 лет и 15 (46%) пациенток старше 50 лет.

В группе ремиссии отмечены похожие показатели – 10 пациенток в возрасте моложе 40 лет (15%), 24 пациентки в возрасте от 40 до 50 лет (37%) и 31 пациентка старше 50 лет (48%).

Также произведен расчет времени до прогрессирования в зависимости от возраста. Для пациенток молодого возраста время наблюдения до прогрессирования составило  $37,3 \pm 16,7$  мес. (медиана наблюдения 22,8 мес), для женщин от 40 до 50 лет –  $45,2 \pm 3,9$  мес. Для пациенток старше 50 лет среднее время до прогрессирования составило  $47,4 \pm 6,9$  мес.

Локализация опухоли в молочной железе представлена на рисунке 5. Как видно из представленного графика опухоли верхне-наружного квадранта молочной железы составили больше половины всех случаев в исходной выборке. Органосохраняющее лечение в области верхне-наружного и границы верхних квадрантов выполнялось в 71,4% случаев. В 13,2% случаев

(у 13 пациенток) опухоль располагалась на границе наружных квадрантов. Частота локализации опухоли в других квадрантах не превышает 10% случаев.



**Рисунок 5. Локализация опухоли в молочной железе (количество пациенток).**

### **2.3 Методика определения уровня экспрессии мРНК.**

Для постановки ПЦР использовались реактивы фирмы «ЗАО НПФ ДНК-Технология». Контроль отсутствия реакции на геномной ДНК ставили с образцами, не прошедшими реакцию обратной транскрипции, которые разводили в ТЕ-буфере в конечной концентрации эквивалентной конечной концентрации кДНК. ДНК-зонды, использовавшиеся для детекции продуктов амплификации исследуемых и нормировочных генов, были помечены FAM. Реакции амплификации генов ставили в разных пробирках в двух повторах. Оптимальную температуру отжига праймеров и зондов подбирали

экспериментально с использованием режима «градиента температур», для всех тест-систем температура была унифицирована и составила 64°C. Амплификацию осуществляли в режиме “реального времени” в объеме 35 мкл по следующей программе: 1 цикл - 80°C 30 сек, 94°C 1 мин; 50 циклов - 94°C 10 сек, 64°C 20 сек, использовали приборы “ДТ-322” и “ДТ-964” производства фирмы ЗАО “НПФ ДНК-Технология”. Измерение уровня флуоресценции проводили на каждом цикле при температуре 64°C.

Уровень экспрессии мРНК измеряли в относительных единицах, определяемых методом сравнения индикаторных циклов ( $C_p$ ) согласно принципам, предложенным Vad (), используя несколько формул:

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

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

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

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

2 – эффективность амплификации.

$$NF_{HKG1} = 2^{C_{p \text{ hkg}1} - C_{p \text{ hkg}1 \min}} \quad (\text{формула 2})$$

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

$C_{p \text{ hkg}1}$  - значение индикаторного цикла в нормировочном образце 1,

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

2 – эффективность амплификации.

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

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

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

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

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

где  $C_{NF}$ – уровень экспрессии гена с учетом нормировочного фактора,  
где  $C_I$ – уровень экспрессии гена без учета количества материала,  
NF- нормировочный фактор с учетом всех нормировочных генов.

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

где  $C_{NF}$ – уровень экспрессии гена с учетом нормировочного фактора,  
 $C_{NF\ min}$ – значение в образце с минимальным уровнем экспрессии.

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

В настоящем исследовании использовалась генная сигнатура, в которой оценивался уровень экспрессии 21 гена (Ki-67, STK-15, CCNB1, CCND1, MYC, MYBL2, P16INK4A, PTEN, BIRC5, BCL2, BAG1, TERT, NDRG1, ESR1, PGR, HER2, GRB7, MGB1, MMP11, CTSL2, CD68). Данный набор генов позволил оценить основные биологические функции опухолевых клеток, включающие процессы деления (Ki-67, STK-15, CCNB1, CCND1, MYC, PTEN, MYBL2, P16INK4A), апоптоза (BIRC5, BCL2, BAG1, TERT, NDRG1), клеточной дифференцировки (ESR1, PGR, HER2, GRB7, MGB1) и межклеточных взаимоотношений (MMP11, CTSL2, CD68).

#### **2.4. Статистические методы анализа полученных результатов**

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.

Также полученные результаты были оценены путем многомерного статистического анализа – произведен факторный, кластерный и дискриминационный анализ полученных данных.

В основе кластерного анализа лежит идея о последовательном объединении различных факторов (или объектов) в более крупные кластеры с целью установления математической связи между исследуемыми объектами. Математическая связь может быть выражена в виде расстояния между значениями факторов (или объектами). С этой целью в кластерном анализе может применяться Евклидово расстояние, манхэттенское расстояние, сюрремум-норма, расстояние Махалонобиса и др. Для графического изображения используют дендрограммы – диаграммы, на которых происходит последовательное объединение факторов в единый кластер, напоминающий перевернутое вниз кроной дерево. Группировка изучаемых факторов в кластеры происходит на основе ближайшего расстояния между факторами. Точки расстояния, в которых происходит объединение в единый кластер, называются узлами. При объединении кластеров происходит постепенная редукция их количества до тех пор, пока не остается один обобщающий кластер.

Также, как и кластерный, факторный анализ позволяет редуцировать количество исследуемых переменных, посредством их объединения, основываясь на предположении, что исследуемые переменные являются линейной комбинацией гипотетически предполагаемых факторов. При этом если переменные описывают одну общую характеристику, то возможно их объединение. Объединение переменных в факторы происходит в зависимости от сходности коэффициентов корреляции.

Дискриминантный анализ позволяет исследователю разделять рандомизированные крупные выборки по ранее известному заданному параметру. Как правило, данный вид анализа применим к выборкам, состоящим из большого количества переменных. Результат достигается за счет определения дискриминаций (различий) между переменными, находится

относительно небольшая группа переменных различие между которыми определяет межгрупповое различие. Метод оценивает вероятностный характер соответствия значений переменных для исследуемых объектов. В качестве объекта исследования может выступать предмет, признак, момент времени, а также любое измеряемое событие. В нашем исследовании объектом являлось наличие либо отсутствие ЛРР в послеоперационном периоде у пациенток после органосохраняющего лечения при РМЖ. В основе данного метода лежит построение дискриминантной функции, оценивающей различия между исследуемыми группами в виде уравнения дискриминантного анализа. В данном уравнении значение дискриминантной функции соответствует положению исследуемого признака на оси условных координат. При этом, для двух изучаемых признаков значение дискриминантной функции носит линейный характер, соответствующий положению оси X. Для изучения трех признаков, расположение возможно представить в виде двухосевой системы координат из значений дискриминантных функций.

Значение дискриминантной функции рассчитывается по формуле:

$$\text{ЗДФ} = A + B_1 * X_1 + B_2 * X_2 + B_3 * X_3 \dots + B_m * X_m, \text{ где}$$

ЗДФ – значение дискриминантной функции,

B–коэффициенты дискриминантной функции,

X – значение изучаемого признака,

A- константа,

M – количество используемых переменных.

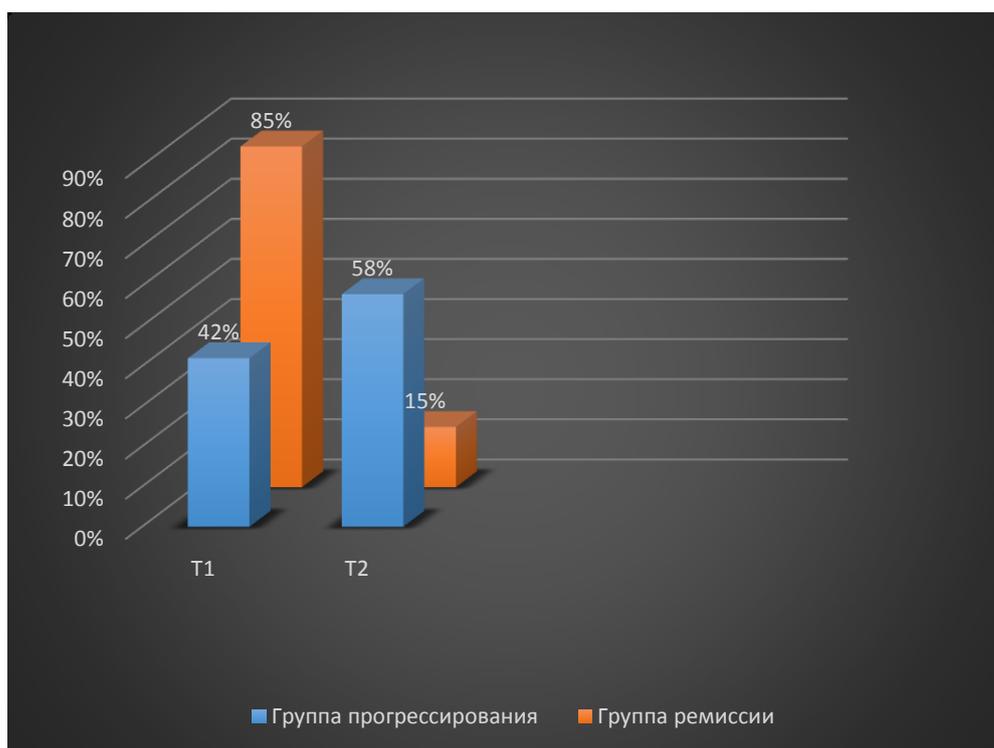
Для проведения многомерных статистических методов использовалось 30 количественных и качественных признаков. Исследуемые признаки включали клинические данные (Критерии T и N, стадию заболевания, возраст пациенток, размеры опухоли в миллиметрах), иммуногистохимические параметры (соотношение рецепторов эстрогена и прогестерона, сам факт их наличия в опухоли, а также определение белка Cerb-b2) и 21-генную сигнатуру. Факторный и кластерный анализы

проведены для всей совокупной выборки. Дискриминантный анализ в полном объеме проведен для 59 человек. Среди этих пациентов 22 человека из группы прогрессирования и 33 пациентки из группы ремиссии.

### ГЛАВА 3. ОЦЕНКА ВЗАИМОСВЯЗИ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ С КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ ПЕРВИЧНОЙ ОПУХОЛИ. РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ ПРОГНОЗА РАЗВИТИЯ ЛОКОРЕГИОНАРНЫХ РЕЦИДИВОВ (РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ).

#### 3.1.1 Оценка влияния клинических факторов на развитие ЛРР.

Пациенты были оценены в соответствии с критериями TNM, преобладали 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. (рис. 6)



**Рисунок 6. Соотношение размеров опухоли в группах прогрессирования и ремиссии**

Было оценено количественное распределение опухолей в группе соответствующему критерию T1. Согласно МКБ10 выделяют следующие подгруппы – T1a опухоли размером менее 5 мм; T1b – размеры опухоли от 5

до 10 мм; T1c – опухоли от 1 до 2 см. (таб.1)

**Таблица 1. Размеры опухолей менее 2 см в группах прогрессирования и ремиссии**

Размеры Исход	T1a (n=3)	T1b (n=24)	T1c (n=42)
Ремиссия	2	17	36
Прогрессирование	1	7	6

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 3 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).

(рис.7)



**Рисунок 7. Метастазирование в регионарные лимфоузлы в группах прогрессирования и ремиссии**

В группе ремиссии значительно преобладали пациенты с pN0. Они составили  $\frac{3}{4}$  от всех пациентов данной группы

Пациенты были распределены по системе TNM в зависимости от прогноза заболевания. (таб.2,3)

**Таблица. 2 Распределение пациентов согласно TNM в группе прогрессирования**

T \ N	N0 (n=16)	N1 (n=8)	N2 (n=6)	N3 (n=3)	Всего (n=33)
T1	6	4	3	2	15
T2	10	4	3	1	18

**Таблица. 3 Распределение пациентов согласно TNM в группе ремиссии**

T \ N	N0 (n=48)	N1 (n=12)	N2 (n=5)	N3 (n=0)	Всего (n=65)
T1	40	11	4	0	55
T2	8	1	1	0	10

Оценивая данные таблиц, можно отметить, что в группе ремиссии преобладали пациенты с опухолевыми параметрами эквивалентными T1N0-1 (86% случаев). В группе прогрессирования соотношение размеров опухоли, соответствующих критериям T1 и T2 составило 15 и 18 человек, соответственно. При этом около половины пациентов (48% случаев) составили пациенты без регионарного метастазирования. Оценивая размеры опухоли в мм, мы получили средние значения для исследуемых групп. 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 ( $p < 0,05$ ).

Пациенты в группах прогрессирования и ремиссии были разделены по

стадиям, согласно МКБ 10. (таб.4)

**Таблица. 4 Распределение пациентов по клиническим стадиям**

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

В группе ремиссии преобладали пациенты с I-IIa стадией заболевания, что составило 90% случаев, в группе прогрессирования большинство составили пациенты со IIa стадией (42% случаев) и 27,2% случаев составили пациентки с III стадией заболевания (N2-3). (таб. 4)

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 5.

**Таблица. 5 Частота использования дополнительного хирургического доступа в аксиллярной области.**

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

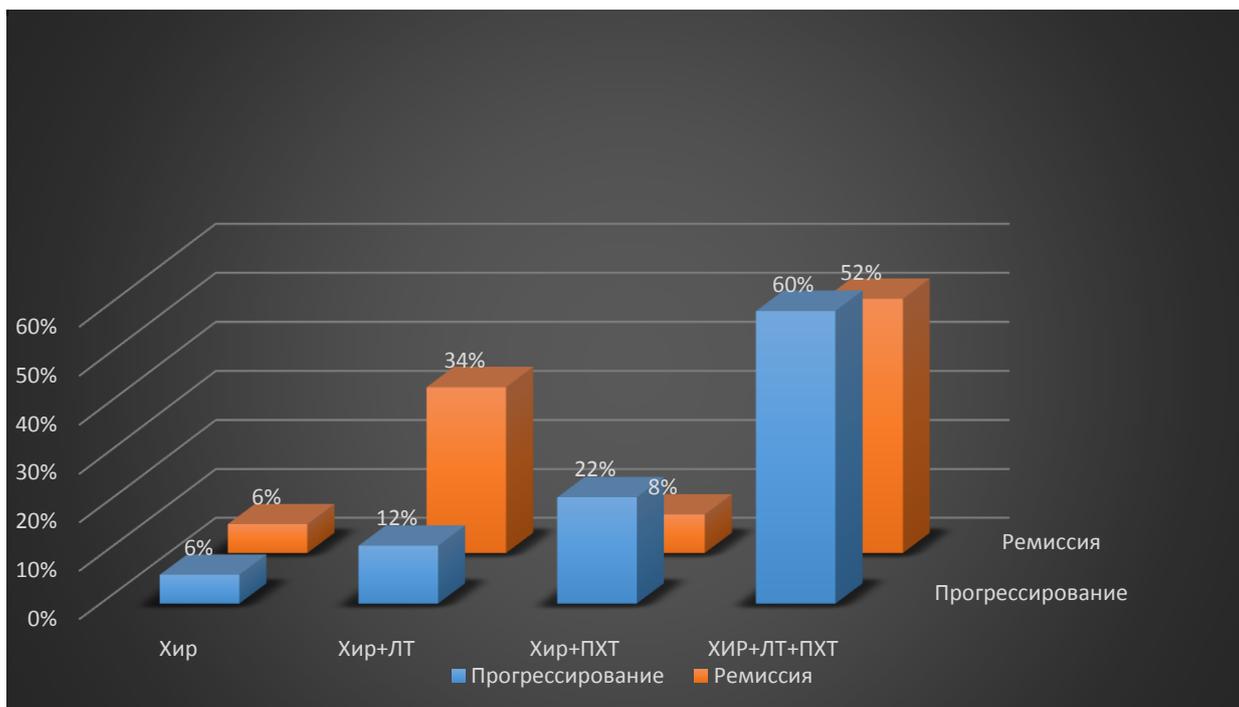
### **3.1.2 Исследование связи метода лечения с развитием локорегионарного рецидива.**

Мы изучили варианты хирургического лечения у пациентов в группах прогрессирования и ремиссии. Так, хирургическое лечение в монорежиме проведено 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 прогрессирования.

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 прогрессирования (28%) лечение проведено не в полном объеме. В группе ремиссии данное соотношение составляет 14% (9 человек). На рисунке 8 представлены основные варианты лечения и их удельный вес в исследуемых группах.

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

Для всех пациентов групп прогрессирования и ремиссии были определены пороговые значения экспрессии генов Ki-67, рецепторов эстрогена, прогестерона и Her2/neu. Анализ пороговых значений проведен с учетом сравнения данных уровня экспрессии вышеуказанных генов с

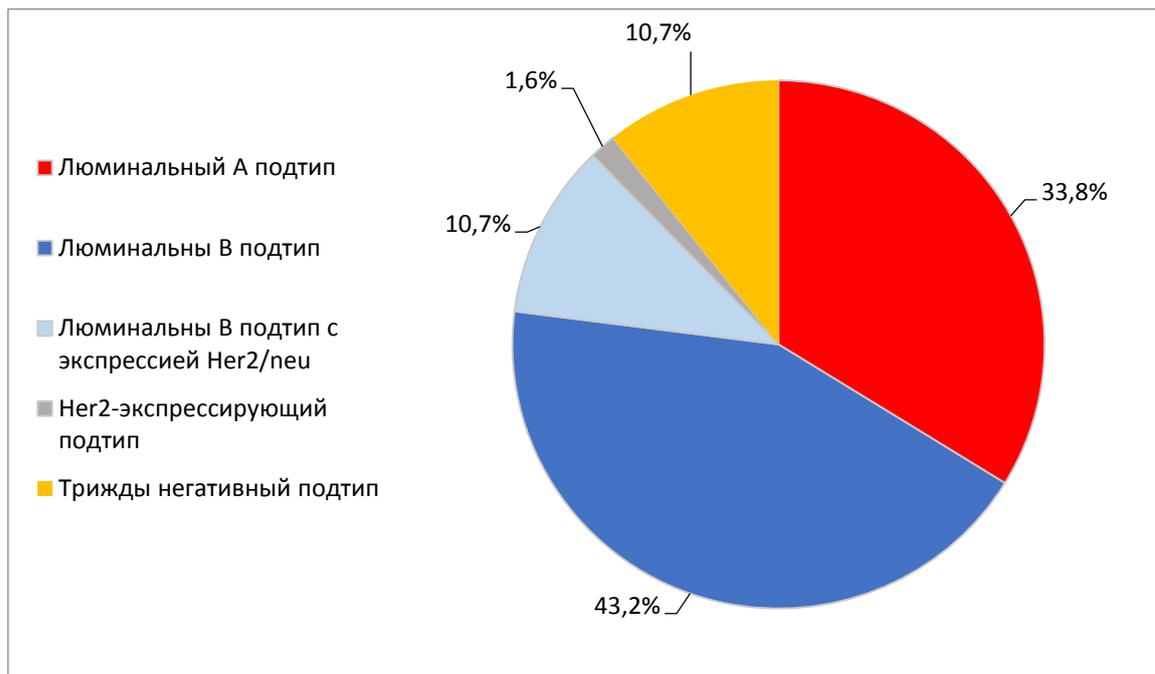


**Рисунок 8. Виды лечения в группах ремиссии и прогрессирования.** Хир– хирургический метод лечения в монорежиме, Хир+ ЛТ – комбинированное лечение (хирургический этап + лучевая терапия), Хир+ ПХТ - комбинированное лечение (хирургический этап + системная полихимиотерапия), Хир+ ЛТ + ПХТ – Комплексное лечение (хирургический этап + лучевая терапия + системная полихимиотерапия).

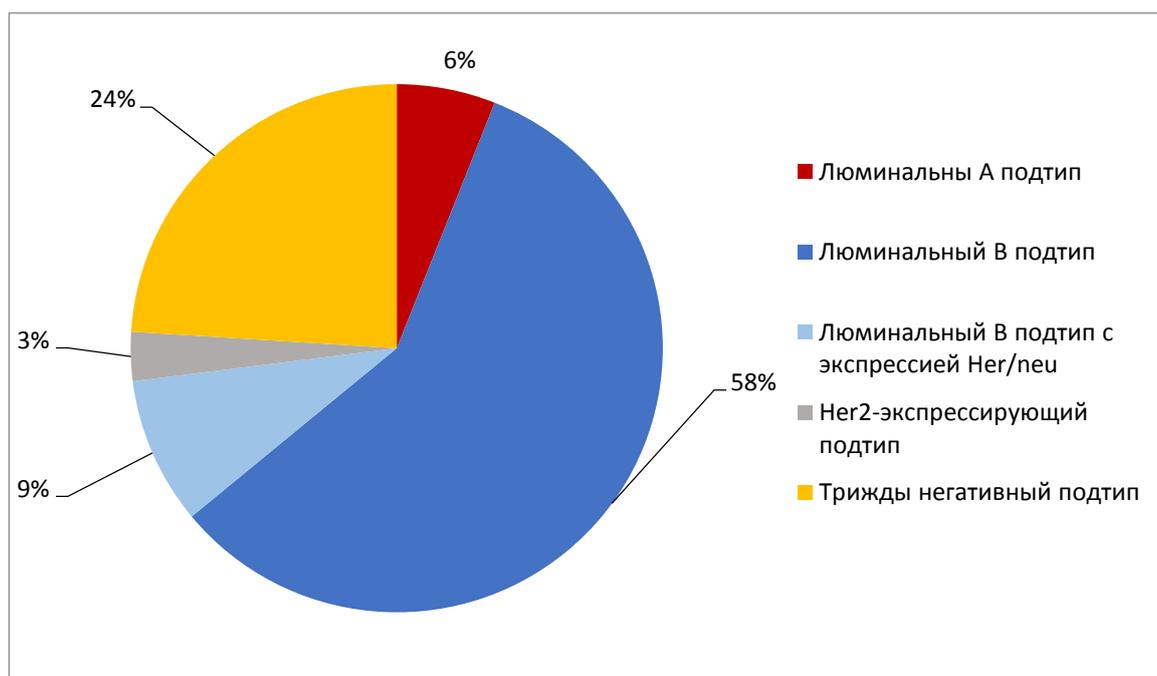
данными иммуногистохимического исследования. Далее мы соотнесли данные биологического вида опухоли с ее размерами, а также поражением регионарных лимфатических узлов и сравнили эти показатели для пациентов из групп прогрессирования и ремиссии. На рисунке 9 представлена диаграмма долевого соотношения фенотипов опухоли в группе ремиссии. Установлено, что 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 1,6% случаев.

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% (рис 10).



**Рисунок 9. Соотношение биологических подтипов РМЖ в группе ремиссии**



**Рисунок 10. Соотношение биологических подтипов РМЖ в группе прогрессирования.**

В сравнении с группой ремиссии резко уменьшилось количество пациентов с люминальным А подтипом РМЖ, среди 33 пациентов, всего лишь у 2 (6%) пациентов данные экспрессии генов соответствовали указанному типу. Также отмечен 1 случай (3%) Her2-экспрессирующего типа

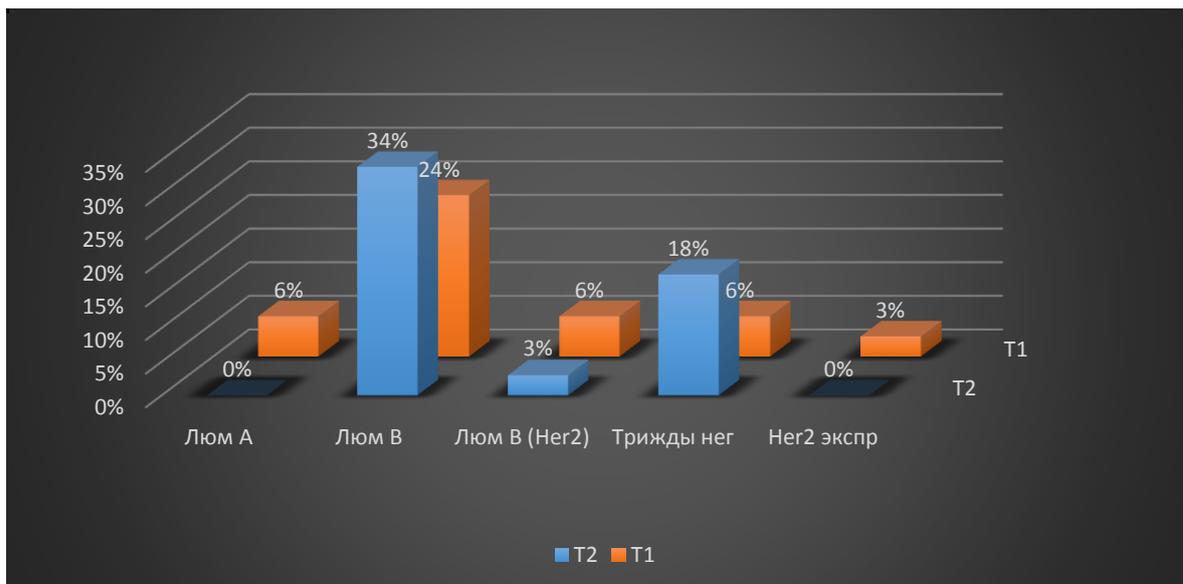
РМЖ. Тем не менее, экспрессия гена Her2/neu при сравнении в группах ремиссии и прогрессирования оказалась сопоставимой 13% и 12%, соответственно.

При изучении размеров опухоли и их соотношения с различными биологическими подтипами РМЖ выявлены следующие закономерности – опухоли соответствующие T1 при люминальном А подтипе встречались у 23 больных, и у 1 больного с опухолью более 2 см. Люминальный В подтип без экспрессии Her2/neu при T1 встречался у 30 больных, при T1 – у 17 пациентов. Люминальный В фенотип с экспрессией Her2/neu выявлен у 10 больных, из них у 7 пациентов опухоли размерами до 2 см и 3 пациентов соответствующие критерию T2. Опухоли с “трижды негативным” фенотипом РМЖ размерами до 2 см выявлены у 9 пациентов, от 2 до 5 см у 6 человек. Her2 экспрессирующий подтип РМЖ наблюдался в 3 случаях, у 1-ой пациентки с размерами опухоли до 2 см, в 2-х случаях с размерами от 2 до 5 см. Распределение соотношений размеров опухоли в зависимости от фенотипа РМЖ представлено на рисунке 11.

В группе прогрессирования пациенты с люминальным В подтипом без экспрессии Her2/neu составили более половины от всех пациентов группы прогрессирования (58% случаев). Среди них 24% случаев размеры опухоли соответствовали критерию T1 и 34% - критерию T2. При этом люминальный А, люминальный В с экспрессией Her2/neu и “трижды негативный” фенотипы РМЖ при размерах опухоли до 2 см встречались в 6% случаев, для каждого из фенотипов. Опухоли, соответствующие критерию T2 встречались в 18% случаев при “трижды негативном” фенотипе и при люминальном В типа с экспрессией Her2/neu – 3% случаев. При размерах опухоли более 2 см в группе прогрессирования пациентов с люминальным А фенотипом выявлено не было. Her2 экспрессирующий подтип РМЖ был выявлен только у 1 пациента с размерами опухоли до 2 см, что составило 3% случаев от всей группы.

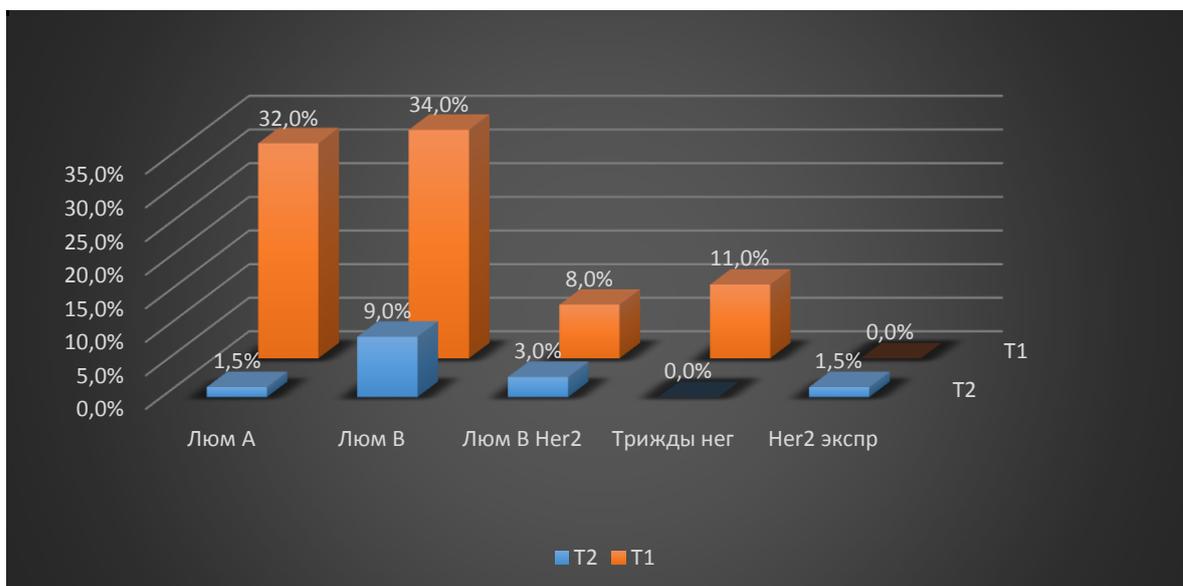
В группе ремиссии преобладали пациенты с люминальным А и

люминальным В фенотипом без экспрессии Her2/neu. Так, пациенты с



**Рисунок 11. Размеры опухоли при различных биологических подтипах РМЖ в группе прогрессирования.**

Люм А– люминальный А подтип РМЖ, Люм В– люминальный В подтип РМЖ, Люм В (Her2) – люминальный В подтип с экспрессией гена Her2/neu, Трижды нег. – Трижды негативный фенотип РМЖ, Her2 экспр.- Her2-экспрессирующий подтип РМЖ.



**Рисунок 12. Размеры опухоли при различных биологических подтипах РМЖ в группе ремиссии.**

Люм А– люминальный А подтип РМЖ, Люм В– люминальный В подтип РМЖ, Люм В (Her2) – люминальный В подтип с экспрессией гена Her2/neu, Трижды нег. – Трижды негативный фенотип РМЖ, Her2 экспр- Her2-экспрессирующий подтип РМЖ.

люминальным В подтипом составили 43% случаев, среди них опухоли соответствующие критерию T1 составили 34% и T2 – 9%, соответственно.

Среди люминального А подтипа преобладали пациенты с размерами опухоли, соответствующей критерию T1 (32%) и лишь в 1,5% случаев отмечались размеры более 2 см. У пациентов с люминальным В фенотипом с экспрессией Her2/neu опухоли размерами менее 2 см встречались 8% случаев, более 2 см – в 3% случаев. Все опухоли “трижды негативного” фенотипа в группе ремиссии имели размер менее 2 см. (11% от пациентов группы). Также в данной группе в 1,5% случаях определялся Her2 экспрессирующий фенотип опухоли (рис.12).

### **3.2 Сравнение профиля экспрессии генов с данными клинического и иммуногистохимического исследования.**

#### **3.2.1 Анализ уровня экспрессии генов в зависимости от возраста пациенток.**

В исследовании были оценены изменения генетического профиля среди 2 групп пациентов до 40 и старше сорока лет. В группу пациенток молодого возраста вошло 14 человек, у 4 из них в отдаленном периоде возникли ЛРР. При этом у пациенток молодого возраста было получено статистически значимое увеличение экспрессии P16INK4A ( $p=0,02$ ), тенденция к увеличению экспрессии гена MYBL2 ( $p=0,07$ ), а также тенденция к уменьшению экспрессии гена активатора апоптоза BCL2 ( $p=0,09$ ). Статистически значимых различий в соотношении биологических типов опухолей между двумя группами не было выявлено. При изучении влияния молодого возраста на риск развития ЛРР, убедительных статистических данных получено не было.

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

Была изучена взаимосвязь размера опухоли, поражения регионарных лимфатических узлов с генетическим профилем опухолевой ткани. При этом выявлены следующие закономерности.

В группе 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.

При изучении клинического показателя N, мы сравнили процентное соотношение подтипов РМЖ для каждой из подгрупп поражения лимфоузлов (таб.6).

**Таблица 6. Частота метастазирования в регионарных лимфоузлах при различных биологических подтипах РМЖ**

Биологические подтипы РМЖ	N0, % случаев	N1, % случаев	N2, % случаев	N3, % случаев
Люминальный А	22,2%	42,8%	20%	-
Люминальный В (Her2-)	50,8%	33,2%	60%	33,3%
Люминальный В (Her2+)	11,1%	9,5%	-	33,3%
Трижды Негативный	14,3%	14,5%	10%	33,3%
Her2-экспрессирующий	1,6%	-	10%	-

Статистически значимых различий между соотношением биологических подтипов РМЖ и поражением регионарных лимфоузлов у исследуемых больных не выявлено.

Оценивая уровень экспрессии генов, обнаружено что для опухолей с показателем N0 в отличии от подгрупп пациентов с поражением регионарных лимфатических узлов, характерна более высокая ( $p < 0,05$ ) экспрессия генов CCNB1, BCL2, BAG1, ESR1 и отмечается статистически значимое снижение экспрессии гена BAG1.

При сравнении уровня экспрессии между опухолями с N0 и N2 различия более выражены. Кроме снижения экспрессии BAG1, происходит снижение активности генов PTEN, BCL2, ESR1 ( $p < 0,05$ ). (таб. 7).

**Таблица 7. Статистически значимые различия в уровне экспрессии генов при поражении регионарных лимфоузлов.**

Исследуемые гены	N0 уровень экспрессии усл. ед.	N1 уровень экспрессии усл. ед.	N2 уровень экспрессии усл. ед.
<b>PTEN</b>	5,8	5,4	5,1
<b>BCL2</b>	5,9	5,2	4,5
<b>BAG1</b>	3,3	2,7	2,4
<b>ESR1</b>	10,1	9,2	8,3
<b>CTSL2</b>	5,5	9,2	8,3

Учитывая незначительное количество пациентов с поражением регионарных лимфоузлов, соответствующих критерию N3 (3 человека), наиболее рациональным представляется сравнение первых трех клинических показателей. При переходе от N0 к N1 и N2 происходит последовательное снижение уровня экспрессии BAG1, PTEN, BCL2, ESR1 ( $p < 0,05$ ). Данная закономерность свидетельствует о том, что с увеличением количества пораженных лимфоузлов изменяется генотип опухоли. Таким образом, в опухолях с поражением регионарных лимфоузлов в сравнении с опухолями без метастатических лимфоузлов отмечается низкая экспрессия проапоптатических генов, снижение уровня дифференцировки клеток (ESR1) и увеличение активности межклеточных взаимодействий (CTSL2).

### **3.2.3 Анализ экспрессии генов в зависимости от биологического подтипа опухоли.**

Люминальный А подтип был выбран в качестве референсного при сравнении с другими типами опухоли, т.к. среди всех рассматриваемых подтипов он имеет наиболее благоприятный прогноз длительной ремиссии.

В таблице 8 представлена сравнительная оценка экспрессии генов в первичных опухолях для различных биологических подтипов РМЖ.

При сравнении люминального А и люминального В подтипа без экспрессии Her2/neu отмечено статистически значимое повышение ( $p < 0,05$ ) экспрессии генов пролиферации (KI67, STK15, CCNB1, MYBL2) и ингибиторов апоптоза (BIRC5, TERT). При этом отмечается статистическое значимое ( $p < 0,05$ ) снижение экспрессии прогестерона.

При сравнении с люминальным В подтипом с экспрессией Her2/neu, наблюдаются сходные изменения генетического профиля, при этом к вышеописанным изменениям добавляется повышение ( $p < 0,05$ ) экспрессии пролиферативных генов CCND1, P16INK4A генов межклеточных взаимодействий MMP11, CTSL2; а также пары генов ответственных за экспрессию Her2/neu (Her2 и GRB7)

“Трижды негативный” подтип РМЖ статистически значимо ( $p < 0,05$ ) отличается от люминального А подтипа по уровню экспрессии 18 из 20 рассматриваемых генов. Повышается экспрессия таких генов ответственных за пролиферацию клеток, как Ki-67, STK-15, CCNB1, CCND1, MYBL2, P16INK4A, за исключением MYC и PTEN. PTEN - антионкоген, ответственный за торможение PI3K/AKT/mTOR-сигнального пути развития опухоли. При “трижды негативном” РМЖ отмечается значимое снижение экспрессии данного гена по сравнению с другими типами. Также “Трижды негативный” вариант РМЖ также характеризуется снижением ( $p < 0,05$ ) экспрессии всех проапоптотических генов (BCL2, BAG1) и повышением ( $p < 0,05$ ) уровня экспрессии генов ингибиторов апоптоза (TERT, BIRC5). Предельно низкие значения экспрессии были получены для генов клеточной

**Таблица 8. Различия уровня экспрессии профиля генов в зависимости от биологического подтипа опухоли.**

Изучаемые гены	Люминальный А фенотип М±SD	Люминальный В фенотип М±SD	Люминальный В (HER2+) фенотип М±SD	Трижды негативный фенотип М±SD	HER2-экспрессирующий фенотип М±SD
KI67	5,6 (±2,23)	8,4 (±0,71)	8,7 (±1,27)	8,8 (±1,03)	9,1 (±1,11)
STK15	5,1 (±2,18)	7,1 (±1,19)	7,8 (±1,13)	7,2 (±1,79)	7,7 (±1,47)
CCNB1	3,3 (±0,91)	4,6 (±0,75)	5,1 (±0,47)	4,2 (±1,1)	4,8 (±0,87)
CCND1	3,7 (±0,74)	4,3 (±1,36)	4,9 (±2,33)	2,4 (±1,38)	3,9 (±0,48)
MYC	4,5 (±1,51)	4,6 (±1,6)	4,8 (±2,37)	4,0 (±0,94)	3,7 (±2,18)
MYBL2	2,6 (±1,21)	4,9 (±1,08)	5,5 (±0,84)	5,5 (±0,94)	6,5 (±0,36)
P16INK4A	4,7 (±0,98)	5,1 (±1,32)	5,7 (±1,29)	5,7 (±2,3)	5,4 (±1,79)
PTEN	5,7 (±0,85)	5,6 (±0,74)	6,2 (±0,75)	5,0 (±0,75)	5,6 (±1,22)
BIRC5	4,4 (±3,25)	7,3 (±2,46)	7,2 (±0,63)	7,7 (±2,84)	7,6 (±1,89)
BCL2	5,9 (±1,53)	5,7 (±1,54)	6,9 (±2,26)	3,9 (±1,13)	3,0 (±1,82)
BAG1	3,3 (±0,94)	3,1 (±0,97)	4,2 (±1,7)	2,0 (±0,74)	2,3 (±0,58)
TERT	3,3(±3,2)	5,3 (±3,19)	6,9 (±2,9)	5,9 (±2,96)	2,5 (±3,2)
ESR1	10,5 (±1,9)	10,5 (±1,91)	11,8 (±2,56)	4,9 (±1,51)	4,9 (±1,82)
PGR	8,6 (±1,2)	7,8 (±1,88)	8,0 (±3,19)	2,9 (±1,31)	2,9 (±3,41)
HER2	5,8 (±1,04)	5,4 (±1,37)	8,8 (±1,12)	3,7 (±1,59)	9,9 (±1,01)
GRB7	8,5 (±0,86)	8,6 (±1,22)	11,4 (±1,29)	6,6 (±2,39)	13,6 (±0,27)
MGB1	16,9 (±2,86)	15,6 (±4,11)	17,2 (±3,96)	9,4 (±4,93)	17,7 (±6,67)
MMP11	10,6 (±4,38)	11,7 (±2,45)	14,3 (±1,34)	9,7 (±4,32)	9,9 (±3,38)
CTSL2	4,8 (±2,37)	5,4 (±1,35)	6,6 (±1,08)	6,6 (±1,7)	5,8 (±2,1)
CD68	5,9 (±1,02)	5,9 (±0,86)	5,5 (±1,04)	6,7 (±0,56)	6,4 (±0,13)

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

дифференцировки (ESR1, PGR, HER2, GRB7, MGB1). Одновременно установлено повышение ( $p < 0,05$ ) активности генов межклеточных взаимодействий (CTSL2, CD68).

HER2-сверхэкспрессирующий вариант РМЖ, кроме ожидаемого высокого уровня экспрессии генов HER2, GRB7 и низкой экспрессии стероидных гормонов, характеризуется высокой активностью гена Ki-67, MYBL2 и снижением активности BCL2.

Перекрестное сравнение “агрессивно-текущих” биологических подтипов РМЖ с целью выявления индивидуальных свойств каждого из типов. Выявлены следующие закономерности. При сравнении подтипов люминального В вида с и без экспрессии Her2/neu, помимо статистически значимого ( $p < 0,05$ ) различия в экспрессии HER2 и GRB7, в первом случае выявлено снижение активности гена апоптоза BAG1. В остальном, статистически значимых различий между этими двумя видами не получено, что доказывает биологическое сходство данных групп опухолей.

При сравнении люминального В и “Трижды негативного” вариантов РМЖ выявлены значимые различия. (таб.9)

**Таблица9. Статистически значимые ( $p < 0,05$ ) различия экспрессии генов между люминальным В и “Трижды негативным” подтипами РМЖ.**

Исследуемые гены	Люминальный В подтип, уровень экспрессии усл. ед.	“Трижды негативный” подтип, уровень экспрессии усл. ед.	P
CCND1	4,2	2,4	0,00
MYBL2	4,9	5,5	0,04
PTEN	5,6	5,0	0,02
BCL2	5,7	3,9	0,00
BAG1	3,0	2,0	0,00
ESR1	10,4	4,9	3,6
PGR	7,8	2,9	0,00
HER2	5,2	3,8	0,00
GRB7	8,5	6,7	0,00
MGB1	15,4	9,4	0,00
MMP11	11,6	9,7	0,03
CTSL2	5,4	6,6	0,01
CD68	6,0	6,7	0,01

При люминальном В подтипе отмечается более низкое значение экспрессии MYBL2, PTEN, CTSL2 и CD68. В тоже время для него характерна более высокая активность циклина D1, PTEN, BCL2, BAG1, ESR1, PGR, Her2, GRB7, MGB1 и MMP11 ( $p < 0,05$ ).

Сравнение люминального В типа с экспрессией гена Her2 и Her2-экспрессирующего вариантов РМЖ, кроме общеизвестных различий в уровнях экспрессии стероидных гормонов показало, что при Her2-экспрессирующем варианте РМЖ статистически значимо ( $p < 0,05$ ) повышен уровень экспрессии GRB7 и ниже экспрессия BCL2, MMP11.

Сравнение “Трижды негативного” и Her2-экспрессирующего вариантов РМЖ выявило статистически значимое ( $p < 0,05$ ) различие в уровне экспрессии генов Her2/neu и GRB7 и тенденцию к уменьшению экспрессии маммаглобина в клетках опухолей “Трижды негативного” типа РМЖ. Таким образом, за исключением экспрессии эпидермального фактора роста 2 и количества маммаглобина, не выявлено существенных различий между этими двумя биологическими типами, что может лежать в основе их прогностически неблагоприятное течение в сравнении с люминальными типами РМЖ. Соотношение уровней экспрессии рецепторов стероидных гормонов и гена Her2/neu характерны для рассматриваемых биологических типов и совпадают с описываемыми в литературе [28, 67].

### **3.2.3 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 (таб.10). Выявленная закономерность соответствует более высокой биологической активности опухолей из группы прогрессирования, проявляющаяся высокими показателями митатической активности, а также их способности к инвазивному росту.

**Таблица 10. Статистически значимые различия экспрессии генов между группами прогрессирования и ремиссии.**

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

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

### **3.3 Многомерный анализ факторов прогноза локорегионарных рецидивов.**

#### **3.3.1. Дисперсионный анализ морфологических и генетических факторов прогноза.**

Для проведения дисперсионного анализа и выявления потенциальных факторов, влияющих на развитие локорегионарных рецидивов использованы клинико-морфологические данные (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. В дисперсионном анализе оценивается внутригрупповая и межгрупповая изменчивость признаков. С этой целью определяется сумма квадратов отклонений и F-критерий Фишера для групп прогрессирования и ремиссии (таб.11).

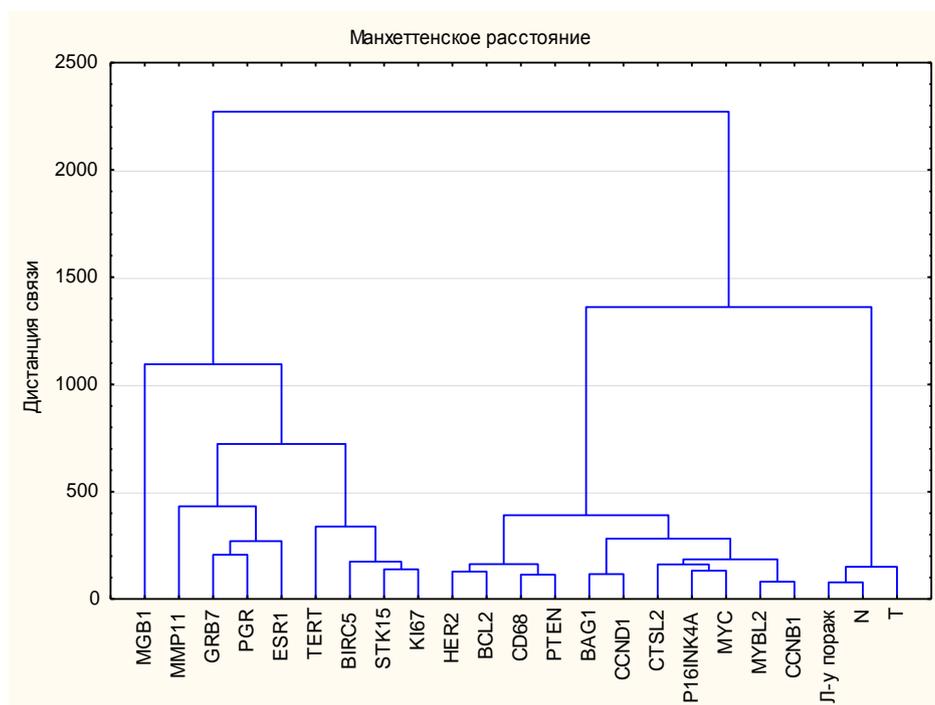
Как видно из приведенной таблицы статистически достоверные изменения ( $p < 0,05$ ) наблюдались для всех морфологических критериев, а также следующих генов пролиферации - Ki-67, STK-15, MYC, апоптоза - BAG1, клеточной дифференцировки -PGR и межклеточных взаимодействий - STCL2 и CD68.

**Таблица 11. Дисперсионный анализ клинических и генетических параметров опухоли**

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

### 3.3.2. Кластерный анализ данных.

Проведен кластерный анализ данных, полученный результат представлен на рисунке 13.



**Рисунок 13. Кластерный анализ исследуемых параметров.**

На представленном графике определяется пять крупных относительно равноудаленных кластеров. Формирования кластеров основывалось на методике определения ближайшей связи между изучаемыми факторами.

Первый кластер сгруппировал клинические данные, такие как размер опухоли (T), количество пораженных лимфатических узлов (N) и числовое значение пораженных л/у).

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.

Обобщая результаты проведенного кластерного анализа, можно отметить, что математическая группировка исследуемых признаков в некоторых кластерах объединила сходные между собой прогностические и клинические критерии. Так, первый кластер включает исключительно клинические данные о размерах опухоли и поражения регионарных лимфатических узлов. Четвертый и пятый кластеры объединили предиктивные маркеры агрессивного и благоприятного течения заболевания. Не менее важным является показатель удаленности данных кластеров друг от друга, что указывает на их самостоятельную предиктивную функцию.

### **3.3.3. Факторный анализ данных.**

Учитывая большое количество изучаемых факторов в нашем исследовании, с целью их редукции и выявления общих закономерностей, мы использовали факторный анализ. Для анализа использовались те же самые переменные, которые применялись в кластерном анализе. В основе данного статистического метода лежит идея о том, что исследуемые переменные

являются линейной комбинацией гипотетически предполагаемых факторов. При этом если переменные описывают одну общую характеристику, то возможно их объединение. Используя данный метод, мы попытались редуцировать количество используемых переменных, объединяя их в группы в зависимости от сходности коэффициентов корреляции. Это позволило выделить три основных фактора. Полученные данные представлены в таблице 12 и рисунке 14.

**Таблица 12. Собственные значения факторов и процент объясняемой дисперсии.**

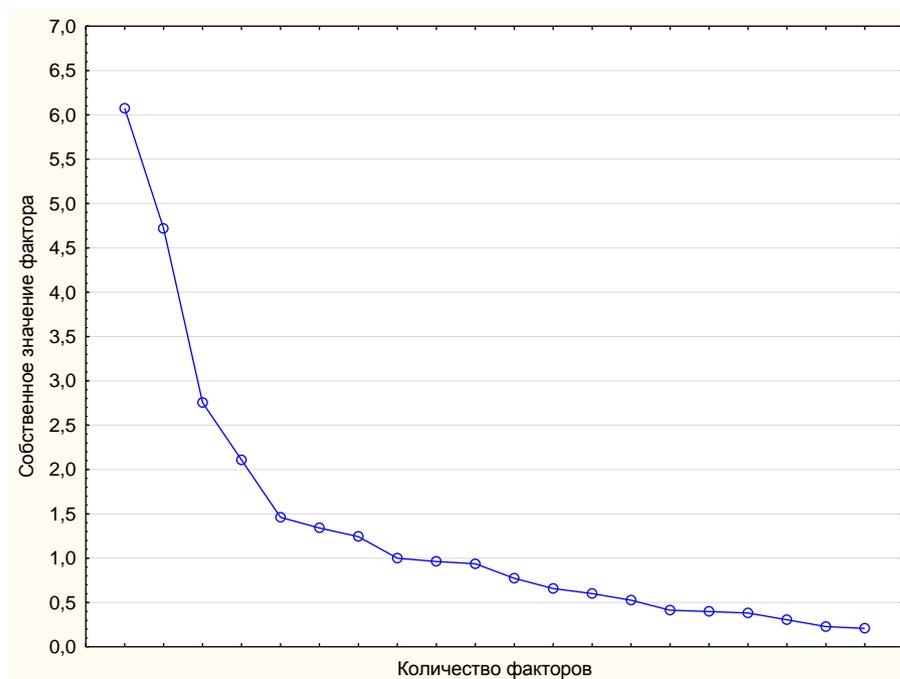
Показатели Факторы	Собственное значение фактора	Процент объясняемой дисперсии выборки	Кумулятивный процент объясняемой дисперсии
Фактор № 1	6,07	21,7 %	21,7 %
Фактор № 2	4,72	16,9 %	38,6%
Фактор № 3	2,75	9,8 %	48,4%

В сумме получившиеся 3 фактора объясняют 48% дисперсии всех показателей выборки. Первый фактор объединяет наибольшее количество переменных и обладает наибольшей значимостью.

Представленный график (рис.13) демонстрирует тот факт, что первые 3 фактора и объединенные в них переменные являются наиболее значимыми. Объединение оставшихся переменных в дополнительные факторы имеет малую ценность, что отражено на графике в виде пологого основания.

При сравнительной оценке мы видим, что основными компонентами 1 фактора являются гены PGR, ESR1, BAG1, BCL2, Her2, GRB7, MGB1, MYC, CCND1, имеющие наибольшие значения. Для 2-го фактора такими показателями являлись –T, Ki-67, MYBL2, STK15, CCNB1, P16INK4A, BIRC5, TERT, MMP11, CTSL2, для третьего фактора – показатели, оценивающие поражение регионарных лимфоузлов (количество, соотношение между нормальными и метастатически пораженными лимфоузлами, критерий N).

Остальные используемые для анализа переменные занимают промежуточное значение и могут быть объединены в другие факторы. Однако уровень объясняемой дисперсии данных факторов, намного меньше чем у представленных.



**Рисунок 14. Собственные значения факторов. График “каменистой осыпи”.**

Если сравнить полученные данные с уровнем экспрессии соответствующих генов при прогрессировании и ремиссии, становится ясно, что 1 фактор объединил гены, уровень экспрессии которых снижается при прогрессировании (кроме Her2, значение данного гена одинаково для группы прогрессирования и ремиссии), тогда как 2 фактор объясняет повышение экспрессии объединяемых генов. Выявляемая закономерность соответствует биологической функции исследуемых генов. Фактор 1 сгруппировал гены, ответственные за дифференцировку, поддержание клеточного гомеостаза и апоптоз. Второй фактор объединил гены опухолевой агрессии. Третий фактор описывает изменения клинических показателей, оценивающих лимфатический статус(таб.13).

**Таблица. 13 Значение факторов для используемых переменных. Основные компоненты факторов помечены \*.**

<b>Переменные</b>	<b>Фактор № 1</b>	<b>Фактор № 2</b>	<b>Фактор № 3</b>
<b>T</b>	-0,098	0,56*	-0,12
<b>N</b>	-0,13	-0,05	-0,92*
<b>Размеры опухоли в мм</b>	-0,14	0,57	-0,17
<b>Возраст</b>	0,13	-0,29	0,04
<b>Кол-во удаленных лимфоузлов</b>	0,02	0,01	-0,33
<b>Количество пораженных лимфоузлов</b>	-0,08	0,01	-0,93*
<b>KI67</b>	-0,16	0,79*	-0,01
<b>STK15</b>	0,16	0,78*	0,12
<b>CCNB1</b>	0,21	0,71*	0,03
<b>CCND1</b>	0,66*	0,13	0,19
<b>MYC</b>	0,57*	0,19	-0,07
<b>MYBL2</b>	-0,12	0,81*	-0,01
<b>P16INK4A</b>	0,29	0,51*	0,07
<b>PTEN</b>	0,62*	-0,01	0,16
<b>BIRC5</b>	-0,07	0,61*	0,07
<b>BCL2</b>	0,75*	-0,12	0,21
<b>BAG1</b>	0,85*	0,01	0,14
<b>TERT</b>	-0,05	0,47*	0,06
<b>NDRG1</b>	-0,01	-0,17	0,04
<b>ESR1</b>	0,82*	-0,15	0,22
<b>PGR</b>	0,68*	-0,28	0,07
<b>HER2</b>	0,76*	0,2	0,01
<b>GRB7</b>	0,68*	0,3	-0,11
<b>MGB1</b>	0,65*	-0,15	-0,13
<b>MMP11</b>	0,49	0,45*	0,11
<b>CTSL2</b>	0,19	0,46*	-0,32
<b>CD68</b>	-0,4	0,03	0,03

### **3.3.4. Разработка модели определения риска ЛРР на основании уравнения дискриминантного анализа.**

Для выявления дискриминации (различий) между изучаемыми группами оценены следующие параметры - лямбда Уилкса, частная лямбда Уилкса, F-критерий исключения, р-значение, толерантность.

Лямбда Уилкса определяется отношением внутригрупповой изменчивости признака к общей изменчивости. Она может принимать любые значения в пределах от 0 до 1. Уменьшение или стремление к 0 данного показателя свидетельствует о том, что исследуемый признак обладает высокой предиктивной способностью к дискриминации (различию между

**Таблица. 14 Дискриминантный анализ групп «прогрессирования – без прогрессирования»**

Статист. критерии	Лямбда Уилкса	Частная лямбда Уилкса	F-критерий исключения	p-значение	Толерантность	(1-толер)
<b>Переменные</b>						
<b>T</b>	0,27	0,87	4,04	0,05	0,14	0,86
<b>N</b>	0,24	0,98	0,70	0,41	0,15	0,85
<b>Стадия</b>	0,25	0,95	1,49	0,23	0,09	0,91
<b>Размеры опухоли (мм)</b>	0,25	0,92	2,27	0,14	0,22	0,78
<b>Возраст</b>	0,23	0,99	0,01	0,93	0,38	0,62
<b>Eg %</b>	0,29	0,79	7,29	0,01	0,26	0,74
<b>Pg%</b>	0,23	0,99	0,04	0,85	0,24	0,76
<b>Cerb-b2</b>	0,25	0,92	2,29	0,14	0,29	0,71
<b>KI67</b>	0,24	0,97	0,99	0,33	0,15	0,85
<b>STK15</b>	0,24	0,99	0,32	0,57	0,12	0,88
<b>CCNB1</b>	0,23	0,98	0,42	0,52	0,08	0,92
<b>CCND1</b>	0,23	0,99	0,14	0,71	0,39	0,61
<b>MYC</b>	0,23	0,99	0,10	0,75	0,19	0,81
<b>MYBL2</b>	0,24	0,94	1,50	0,23	0,07	0,93
<b>P16INK4A</b>	0,23	0,99	0,24	0,63	0,29	0,71
<b>PTEN</b>	0,24	0,97	0,75	0,39	0,35	0,65
<b>BIRC5</b>	0,23	0,99	0,09	0,76	0,26	0,74
<b>BCL2</b>	0,23	0,99	0,02	0,89	0,17	0,83
<b>BAG1</b>	0,26	0,88	3,46	0,073	0,22	0,78
<b>TERT</b>	0,23	0,99	0,05	0,83	0,34	0,66
<b>NDRG1</b>	0,23	0,99	0,06	0,80	0,28	0,72
<b>ESR1</b>	0,24	0,99	0,12	0,73	0,15	0,85
<b>PGR</b>	0,23	0,99	0,11	0,74	0,21	0,79
<b>HER2</b>	0,25	0,95	1,48	0,23	0,06	0,94
<b>GRB7</b>	0,25	0,93	2,18	0,15	0,07	0,93
<b>MGB1</b>	0,23	0,99	0,02	0,90	0,44	0,56
<b>MMP11</b>	0,4	0,99	0,21	0,65	0,17	0,83
<b>CTSL2</b>	0,28	0,83	5,70	0,02	0,29	0,71
<b>CD68</b>	0,23	0,99	0,15	0,70	0,32	0,68

группами). И, следовательно, чем больше и ближе к единице значение Лямбды Уилкса, тем меньший вклад в дискриминацию вносит исследуемая признак. Среди исследуемых признаков, значение Лямбды Уилкса колебалось от 0,23 до 0,4. При этом, большинство признаков имели равнозначный вклад в дискриминацию.

Более точным показателем дискриминации является частная лямбда Уилкса. Она рассчитывается как отношение лямбды Уилкса к сумме исходной лямбды Уилкса с изучаемой переменной. При этом если переменная вносит какой-либо вклад в разделение групп, после ее добавления лямбда Уилкса уменьшается и чем меньше ее значение, тем более значима дискриминация. Среди исследуемых параметров, наиболее низкие значения частной лямбды получены для критерия T (0,87), процентного количества рецепторов эстрогена (0,79) и CTSL2 (0,83). При этом, последние 2 критерия также являются статистически значимыми ( $p < 0,05$ ).

F-критерий - это значение полученное, при исключении данного признака из дискриминантного анализа. При оценке F-критерия и P-уровня определялся вклад переменной в процедуру дискриминации, при этом чем больше значение F-критерия, тем более значимую роль играет переменная. Высокие значения F-критерия получены для параметра T (4,04), процентного количества рецепторов эстрогена (7,29), BAG1 (3,46) и CTSL2 (5,7). Таким образом эти 4 показателя являются наиболее важными для дискриминации пациентов в группы прогрессирования и ремиссии.

Также изучен параметр, характеризующий избыточность признака в процессе дискриминации. Таким критерием является параметр толерантности. Она рассчитывается по формуле:  $1 - R^2$ , где  $R^2$  — коэффициент множественной корреляции данного признака с признаками, использованными в анализе. Чем ниже толерантность, тем сильнее данный признак связан со всеми остальными. Низкие значения толерантности ( $< 0,15$ ) получены для критериев T, N, KI67, STK15, CCNB1, MYBL2, ESR1 и GRB7.

В последнем столбце (таб. 15) показан коэффициент множественной регрессии, который обратно пропорционален показателю толерантности. Чем выше данный показатель, тем сильнее исследуемый параметр связан с остальными.

Следующим этапом была проведена редукция исходных данных. При сокращении количества признаков учитывался личный вклад каждой переменной в процесс дискриминации, а также возможность оценки переменной на догоспитальном этапе. Было получено уравнение дискриминантного анализа с 8 переменными в которое вошли размеры опухоли по системе TNM(T), процентное соотношение РЭ и ПГ, Cerb-b2, MYBL2, BAG1, MMP11 и STCL2.

Для вышеуказанных переменных произведен расчет значения дискриминантной функции в группах прогрессирования и ремиссии, а также определены коэффициенты дискриминантной функции. Так, среднее значение дискриминантной функции для группы прогрессирования составило -1,7; для группы ремиссии 1,05. Коэффициенты исследуемых параметров представлены в таблице 16. Колебания значений дискриминантной функции в группе прогрессирования составило от -4,5 до 0, в группе ремиссии от -2 до 3,5. В обоих случаях наблюдался нормальный вариант распределения значений функций. (таб.15)

**Таблица 15. Значение коэффициентов дискриминантной функции**

<b>Критерий</b>	<b>Коэффициент</b>
<b>T</b>	-2,25
<b>РЭ (процентное соотношение)</b>	-0,03
<b>ПГ (процентное соотношение)</b>	0,007
<b>Cerb-b2</b>	-0,07
<b>MYBL2</b>	0,23
<b>MMP11</b>	-0,15
<b>CTSL2</b>	-0,32
<b>BAG1</b>	0,69
<b>Константа</b>	4,1

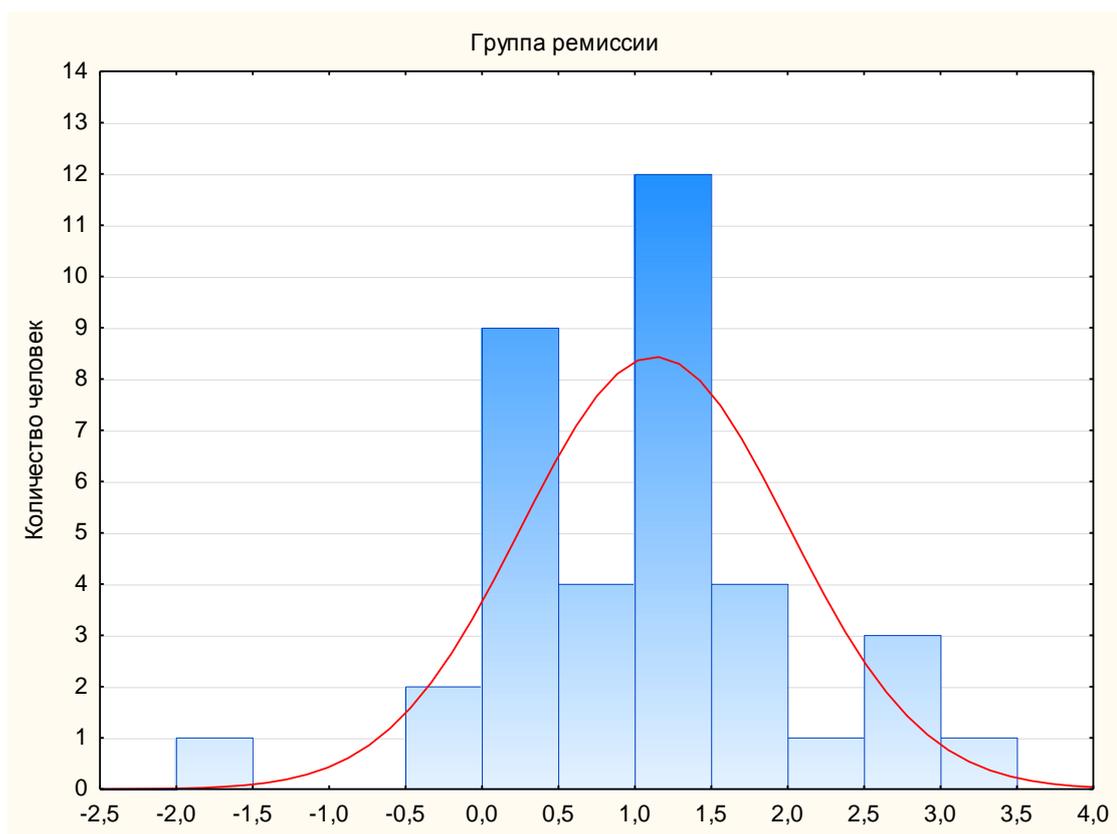
На представленных ниже графиках (рис. 15,16) показано распределение пациентов согласно полученным данным дискриминантной функции. Наложение значений дискриминантной функции в группах ремиссии и прогрессирования происходит на участке значений от  $-0,5$  до  $0$ , за исключением 1 случая из группы ремиссии в котором значение расчетной дискриминантной функции составило  $-2$ . В промежуток от  $-0,5$  до  $0$  вошли 3 пациентки. В 2 случаях программа ошибочно определила прогноз развития ЛРР.



**Рисунок 15. Распределение значений дискриминантной функции в группе прогрессирования.**

На основании результатов расчетной функции были получены данные, позволяющие предсказать появление в последующем развитие локорегионарного рецидива в 95% случаев, а также его отсутствие его развития в 97% случаев (таб.16).

Учитывая тот факт, что классификация TNM обладает высокими предиктивными возможностями и в настоящее время является определяющей при выборе тактики хирургического лечения, выполнен дискриминантный анализ с использованием 2-х параметров - размера опухоли и поражения



**Рисунок 16. Распределение значений дискриминантной функции в группе ремиссии.**

**Таблица. 16 Прогностические варианты исходов.**

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

регионарных лимфатических узлов. Прогноз развития ЛРР был правильно определен только в 63,6 % случаев, а прогноз длительной ремиссии - в 84,6 % случаев. Использование комбинации клинических и ИГХ данных увеличивают вероятность верного прогноза в группе ремиссии до 87%, однако обладают такой же низкой чувствительностью по отношению к ЛРР. Изолированное, без использования клинических и ИГХ данных, применение 21-генной сигнатуры правильно определяет риск развития ЛРР в 77,7% случаев, выявляет пациентов из группы ремиссии в 95 % случаев.

Таким образом, объединяя данные клинического исследования с результатами морфологического, в том числе иммуногистологического и генетического исследований удалось разработать математическую модель, способную предсказывать вероятность развития ЛРР по материалу первичной опухоли с точностью до 95%.

### **3.3.5 Алгоритм планирования хирургической тактики для пациентов с I-II стадии РМЖ.**

Полученные в ходе нашего исследования закономерности возникновения локорегионарных рецидивов у больных РМЖ I-II стадии могут быть использованы для оптимизации алгоритма обследования и лечения пациентов данной клинической группы. Существующий в настоящее время алгоритм базируется на 2-х основополагающих исследованиях.

Первое из них объединяет методы комплексного маммологического и клинического обследования, включающего в себя маммографию, рентгенографию органов грудной клетки, УЗИ молочных желез, УЗИ органов брюшной полости и периферических лимфатических узлов. При этом выявляются клинические группы пациентов с I и II стадией заболевания, а также факторы, значительно повышающие риск локорегионарного рецидивирования. В настоящее время доказано, что молодой возраст пациенток (моложе 35 лет), мутации в генах BRCA1/2, мультицентрический рост опухоли и/или диффузные микрокальцинаты, выявляемые при маммографии являются факторами, значительно повышают риск ЛЛР. Согласно международным рекомендациям (ESMO, NCCN) при выявлении данных факторов рекомендуется выполнять мастэктомию.

Вторым ключевым исследованием является морфологическое изучение опухолевого материала с определением следующих критериев прогноза – гистологического типа опухоли, степени ее злокачественности, уровня экспрессии рецепторов эстрогена, прогестерона, Ki-67 и Her2/neu. При необходимости проводится FISH исследование для определения амплификации гена Her2/neu. При выборе тактики хирургического лечения

морфологическое исследования носит уточняющий характер.

Согласно данным полученным в ходе настоящего исследования, классификация TNM обладает довольно высокими предиктивными свойствами, ее общая чувствительность по выявлению локальных рецидивов составляет 77,5%. В сочетании с данными ИГХ исследования чувствительность к распознаванию ЛРР понимается до 83%.

Тем не менее в клинической практике встречаются случаи, когда у хирурга остаются сомнения по поводу тактики хирургического лечения. В качестве примера можно привести случаи с небольшими (менее 2 см) размером опухоли с “трижды негативным” фенотипом или опухоли экспрессирующей Her2/neu, а также довольно большие (от 3 до 5 см) опухоли люминального А и люминального В фенотипов.

Изучение 21-генного профиля выявило новые закономерности ЛРР. На основании данных экспрессии генов нами разработана математическая модель с использованием 8 маркеров – размера опухоли, процентного РЭ и РП, количества белка Serb-b2, а также экспрессии MYBL2, BAG1, MMP11, CTSL2.

После определения всех прогностических факторов, указанных выше, исходные значения подставляются в разработанную математическую модель. После обработки, полученное значение дискриминантной функции соотносится со значениями дискриминантной функции для группы пациентов с ремиссией и локорегионарными рецидивами. Чем ближе полученное значение к одной из рассматриваемых групп, тем выше вероятность соответствующего прогноза. Для группы прогрессирования среднее значение дискриминантной функции имело отрицательное значение (-1,77), для группы ремиссии положительное - (1,05). Ниже представлен общий вид используемой формулы, а также частный вид формулы на основании проведенных нами исследований с рассчитанными коэффициентами для 8 прогностических факторов (таб. 15).

## Общий вид формулы

**Значение дискриминантной функции** =  $a + b_1 \cdot x_1 + b_2 \cdot x_2 + \dots + b_m \cdot x_m$

где  $a$  является константой,  $b_1 \dots b_m$  являются коэффициентами регрессии,  $x_1 \dots x_m$  – значения факторов.

## Частный вид формулы

**Значение дискриминантной функции** =  $4,1 + T \cdot (-2,25) + ESR1\% \cdot (-0,03) + PGR\% \cdot (0,007) + Cerb-b2 \cdot (-0,074) + MYBL2 \cdot (0,23) + BAG1 \cdot (0,69) + MMP11 \cdot (-0,15) + CTSL2 \cdot (-0,32)$

Где - 4,1 – значение константы;

$T$  – размеры опухоли по системе TNM (от 1 до 2)

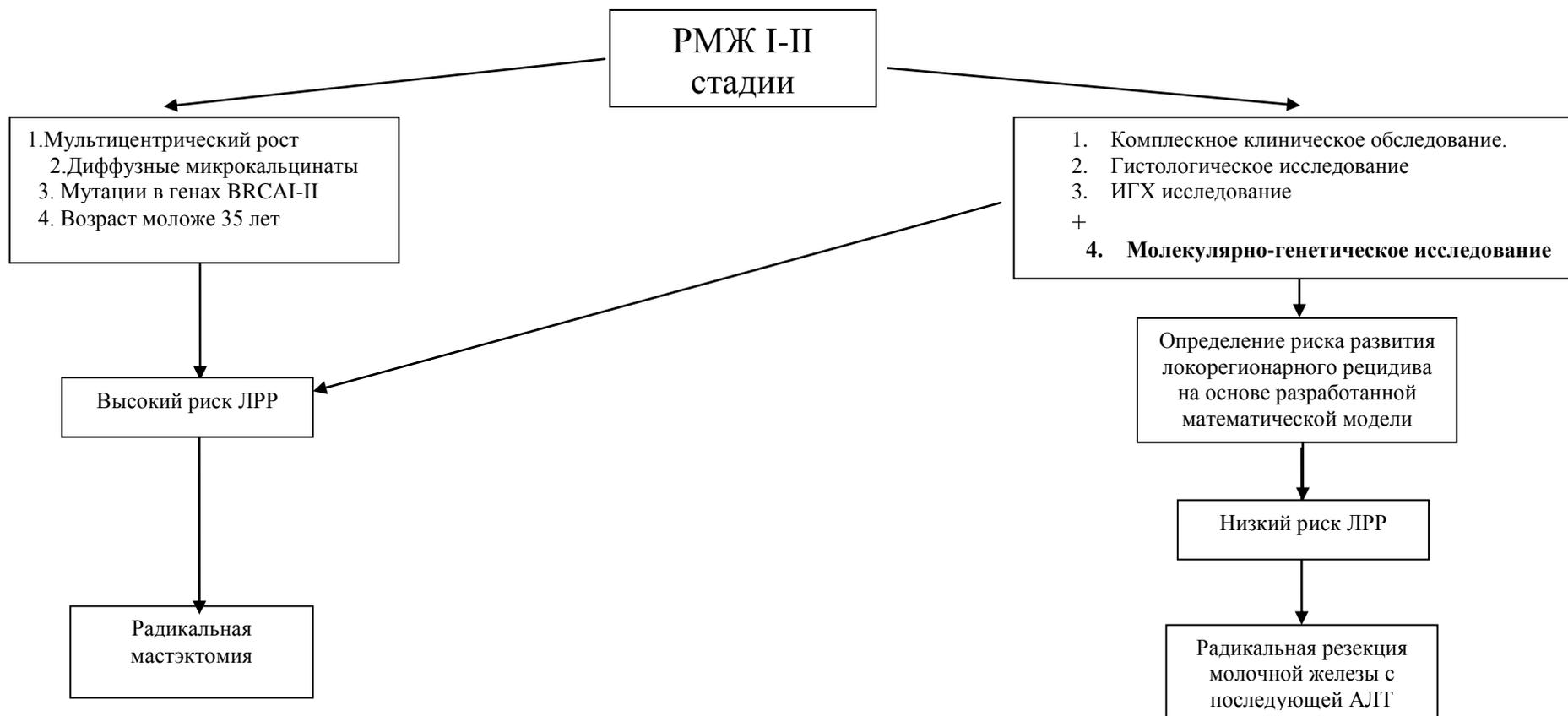
ESR1% - относительное количество рецепторов эстрогена, выраженное в процентах;

PGR% - относительное количество рецепторов прогестерона, выраженное в процентах;

Cerb-b2 – уровень белка Cerb-b2 (значения от +1 до +3),

MYBL2, BAG1, MMP11, CTSL2 – экспрессия соответствующих генов, выраженная в условных единицах.

Таким образом, при оценке риска локорегионарного рецидива необходимо подставить в формулу соответствующие значения факторов. Далее производится сравнение полученного значения со средним значением дискриминантной функции для групп прогрессирования (-1,77) и ремиссии (1,05). При промежуточных значениях дискриминантных функций (от -0,4 до 0), когда невозможно достоверно отнести значение к какой-либо из групп, мы рекомендуем расценивать их как группу высокого риска прогрессирования. Пациентам группы низкого риска, при отсутствииотягощающих факторов, рекомендуется выполнять органосохраняющее лечение в объеме радикальной резекции молочной железы с последующим обязательным проведением лучевой терапии. Группе высокого риска развития ЛРР мы рекомендуем выполнять радикальные мастэктомии.



**Рисунок 17. Алгоритм планирования хирургической тактики для пациенток cI-II стадией рака молочной железы.**

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

В течение последнего десятилетия наблюдается стойкий рост заболеваемости РМЖ. Так, по данным отечественных авторов за период с 2003 по 2014 гг в РФ число впервые установленных диагнозов РМЖ возросло с 46 тыс. до 65 тыс. случаев. Ежегодный прирост заболеваемости колеблется в пределах 2,5%. Данная закономерность совпадает с общемировой тенденцией к повышению заболеваемости РМЖ. При этом число пациентов с I-II стадией РМЖ достигает 69,5%. Прогноз 5-летней безрецидивной выживаемости находится в тесной зависимости от стадии заболевания. Так, при I стадии РМЖ после проведенного лечения, 5-летняя безрецидивная выживаемость достигает 90%, а при II стадии этот показатель снижается до 80%.

Органосохраняющие резекции при I-II стадиях РМЖ могут являться полноценной альтернативой выполнению радикальных мастэктомий. Данный вид хирургического вмешательства в обязательном порядке сочетается с послеоперационной лучевой терапией, что позволяет достигать сопоставимых результатов по общей выживаемости в сравнении с РМЭ. В то же время метод сочетает такие важные параметры как радикализм и минимальную травматичность. Его неоспоримыми преимуществами перед РМЭ являются отсутствие психологической травмы, а также быстрая функциональная реабилитация пациенток в послеоперационном периоде. При этом снижается стоимость лечения, сроки госпитализации пациенток, а также количество послеоперационных осложнений. Учитывая тот факт, что органосохраняющему лечению, как правило, подвергаются пациентки с ранними (I- II) стадиями РМЖ, отдаленные результаты лечения во многом благоприятные и статистически не отличаются от результатов лечения пациенток после РМЭ.

Необходимо отметить, что данный метод хирургического лечения имеет и ряд недостатков. Одним из основных недостатков является более высокий риск локорегионарного рецидивирования. Это объясняется

несколькими причинами – нерадикальностью хирургического вмешательства, распространением опухоли по лимфатическим сосудам молочной железы и кожи, а также устойчивостью опухоли к лучевой терапии. Выявление локорегионарного рецидива после комбинированного органосохраняющего лечения в большинстве случаев приводит к повторной операции – завершающей мастэктомии. Также после возникновения локорегионарного рецидива значительно повышается риск отдаленного метастазирования в паренхиматозные органы и кости.

Не вызывает сомнений тот факт, что РМЖ является неоднородным заболеванием с различными путями активации, патогенеза, течения. Классификация РМЖ в системе TNM основывается на определении морфологических (размер опухоли, поражение регионарных лимфатических узлов) критериев. Также к часто оцениваемым критериям относят гистологический вид опухоли, степень ее злокачественности, фактор мультицентричности. Нельзя отрицать большой прогностической значимости данных критериев. Однако течение болезни при одних и тех же стадиях у разных пациентов может сильно отличаться. Появление местных рецидивов при органосохраняющих резекциях молочных желез во многом можно объяснить качеством и хирургического лечения и предоперационной диагностикой. По причине нерадикальности хирургического лечения в молочной железе сохраняются участки опухолевого роста, дальнейшее развитие которых со временем приводит к появлению рецидива. Однако, при этом довольно сложно объяснить случаи местного и регионарного рецидивирования при чистых краях резекции удаляемого сектора, при большом (более 2 см) отступе от опухоли. Появлению ЛРР в данных случаях указывает на различие в биологических свойствах опухолей, в том числе их способностям к раннему метастазированию, распространению по лимфатическим путям, сосудам кожи и ткани молочной железы.

Таким образом, целью нашего исследования являлось уточнение тактики хирургического лечения больных I-II стадиями рака молочной

железы на основании клинических, морфологических и генетических характеристик первичной опухоли. В рамках поставленных задач нами были оценены клиничко-морфологические характеристики первичной опухоли и их взаимосвязь с уровнем экспрессии 21 гена у больных РМЖ после выполнения органосохраняющих резекций. Также произведена оценка уровня экспрессии 21 гена при различных биологических подтипах РМЖ. Был выявлен ряд критериев, имеющих прямую корреляцию с возникновением локорегионарных рецидивов РМЖ у пациенток после выполнения органосохраняющего лечения. Обобщив полученные данные мы смогли разработать математическую модель прогноза развития ЛРР РМЖ. Применение разработанной модели позволило модифицировать существующий алгоритм лечения больных РМЖ I и II стадии, за счет определения новых критериев прогноза ЛРР.

В исследование было включено 98 больных раком молочной железы перенесших органосохраняющие резекции. Оценивались данные историй болезни, а также гистологический материал первичной опухоли в виде парафиновых блоков. Группу прогрессирования составили 33 пациентки, у которых в отдаленном послеоперационном периоде развился ЛРР. В группу сравнения вошли данные 65 пациенток с длительностью ремиссии более 5 лет. В исследование не включались пациентки перенесшие неоадьювантную химиотерапию. Набор материала производился на базе ФБГУ “Российского Научного Центра Рентгенрадиологии Минздрава России” и Онкологического клинического диспансера № 1 г. Москвы. Временной промежуток составил период с 2000 по 2011 годы.

В нашем исследовании мы оценили 3 группы пациенток, до 40 лет, от 40 до 50 и старше 50 лет. В первую группу вошло 14 пациенток, у 4 из них отмечалось прогрессирование заболевания. При сравнении данных групп нами не выявлено статистически значимых различий в размерах опухолей, поражении регионарных лимфоузлов, соотношении биологических видов и частоте выявления локорегионарных рецидивов в данных группах.

Учитывая небольшое количество пациентов моложе 40 лет, полученные данные не несут репрезентативный характер. Тем не менее они указывают на различие во времени возникновения ЛРР. Так, для молодых пациенток медиана наблюдения до появления рецидива составила 22,8 месяца, а в группах пациентов от 40 до 50 лет и старше 50 – 45,2 и 46,6 месяцев, соответственно. Однако, учитывая тот факт, что в группу прогрессирования в нашем исследовании вошло всего 4 пациентки моложе 40 лет, полученные данные не являются статистически значимыми.

При оценке возможности выполнения органосохраняющей резекции в первую очередь оцениваются размеры опухолевого узла. В нашем исследовании было показано, что размер опухоли более 2 см уже статистически достоверно повышает риск локорегионарного рецидивирования ( $p < 0,0001$ ). При этом в опухолях размером менее 2 см появление локорегионарного рецидива было отмечено в 42,4% случаев, при T2 – 57,6%. Увеличение размера опухоли также коррелирует с высоким уровнем экспрессии генов Ki-67, STK15, CCNB1, MYBL2, CTSL2. Первые 4 гена из вышеуказанных являются генами пролиферации, что значительно подтверждает вывод о том, что размер опухолевого узла действительно является важным параметром при оценке риска развития ЛРР. Пятый ген “ответственен” за межклеточные взаимодействия опухолевых клеток. Также нами выявлена взаимосвязь размеров опухоли с биологическими подтипами РМЖ. При размерах опухолевого узла менее 2 см опухоли с люминальным В подтипом без экспрессии Her2/neu составили 42,6% случаев, люминальный А подтип был представлен в 33% случаев, “трижды негативный” РМЖ составил 13% случаев, люминальный В с экспрессией Her2/neu составил 10% случаев, наименьшее процентное соотношение принадлежало Her2-экспрессирующей подтипу РМЖ, что составило 1,4% случаев. Для опухолей более 2 см, соответствующих критерию T2, отмечалось иное соотношение биологических подтипов - по-прежнему наибольший удельный вес удерживал люминальный В тип без экспрессии Her2/neu (62%), далее

следовал “трижды негативный” РМЖ (21%), люминальный В с экспрессией Her2/neu составлял 10% случаев, люминальный А и Her2-экспрессирующий подтипы составляют по 3,5 %. Оценивая полученные соотношения было отмечено, что при изменении размеров опухоли критерия T1 к T2 резко уменьшается количество пациентов с люминальным А подтипом (с 33% до 3,5%), увеличивает удельный вес люминального В без экспрессии Her2/neu и “трижды негативного” подтипов РМЖ. При этом вероятность длительной ремиссии при люминальном А подтипе статистически достоверно ( $p=0,02$ ) выше в сравнении с другими подтипами.

В проведенной работе было показано, что наличие метастазов в регионарных лимфоузлах также является достоверно значимым критерием, значительно повышающим риск локорегионарного рецидивирования ( $p<0,001$ ). В тоже время нами не было выявлено статистически значимых связей между соотношением подтипов РМЖ и поражением регионарных лимфоузлов. Однако, при оценке генетического профиля при метастатическом поражении регионарных лимфоузлов отмечается статистически значимое снижение экспрессии генов CCNB1, BCL2, BAG1, ESR1. BCL2 и BAG1 являются генами, отвечающими за процессы апоптоза в клетках опухоли. Можно предположить, что снижение уровня экспрессии данных генов изменяет долю активно делящихся клеток к клеткам, переходящими в фазу апоптоза, в сторону процессов пролиферации.

Также был проведен сравнительный анализ 21-генного профиля по выявлению отличий между биологическими подтипами РМЖ. При этом, при сравнении люминального А и люминального В подтипа без экспрессии Her2/neu во втором случае было выявлено статистически достоверное повышение уровня экспрессии генов пролиферации (KI67, STK15, CCNB1, MYBL2) и ингибиторов апоптоза (BIRC5, TERT). При сравнении люминального А подтипа с “трижды негативным” фенотипом РМЖ, отличия наблюдались по 18 генам из 21. Это указывает на тот факт, что опухоли люминального А подтипа обладают индивидуальным генетическим

фенотипом, что во многом определяет их биологические свойства и отличия от опухолей других подтипов.

Однако, несмотря на высокие прогностические возможности существующих классификаций, их способность предсказывать развитие ЛЛР не превышает 83% случаев. Данный результат получен в ходе настоящего исследования, и хотя он является достаточно высоким, тем не менее не позволяет выявить четкие критерии для изменения тактики лечения пациентов с ранними стадиями РМЖ.

Определение опухолевого фенотипа при помощи широкой панели генов, позволило оценить новые критерии в прогнозировании течения заболевания. Во всех существующих генетических панелях оцениваются биологически-детерминированные свойства опухолей, такие как дифференцировка, апоптоз, деление, межклеточные взаимодействия. Широкий спектр генов позволяет оценить, как гены-активаторы, так и гены-супрессоры биологических функций. В свою очередь это позволяет взглянуть на процессы жизнедеятельности опухолевых клеток, тем самым объяснить случаи прогрессирования и дополнить предшествующие классификации для более точного прогнозирования течения заболевания. При сравнении групп прогрессирования и ремиссии нами были выявлены генетические маркеры неблагоприятного прогноза, имеющие прямую корреляционную связь с вероятностью развития ЛЛР. К ним относятся высокий уровень экспрессии Ki-67 ( $p=0,003$ ), STK15 ( $p=0,02$ ), CTSL2 ( $p=0,01$ ), CD68 ( $p=0,01$ ), а также снижение экспрессии генов BAG1 ( $p=0,001$ ), MYC ( $p=0,03$ ) и PGR( $p=0,02$ ).

В настоящее время для определения хирургической тактики лечения РМЖ большинство зарубежных лечебных центров используют клинические рекомендации ESMO, NCCN, а также материалы ежегодно проводимых в Сент Галлене конференций. Основу существующей системы клинических рекомендаций составляют морфологические критерии, такие как размер опухоли, поражение регионарных лимфатических узлов, фактор

мультицентричности, соотношение опухоли и молочной железы, молодой возраст пациенток, беременность. В сравнении с клиническими данными, результаты иммуногистохимического исследования носят вторичный уточняющий характер. Изолированно они не могут быть использованы для определения показаний/противопоказаний к выбору того или иного метода хирургического лечения. При этом у пациентов I-II стадии РМЖ наравне с радикальными мастэктомиями допускается выполнение экономных резекций, что в ряде случаев создает неопределенность при выборе тактики хирургического лечения. Иммуногистохимические критерии отчасти компенсируют возникающую неопределенность, тем не менее по-прежнему остаются случаи, когда при всех равных условиях определение хирургической тактики основывается на интуиции хирурга, и как следствие, носит субъективный характер.

Несомненно, что выявленные в ходе данной работы закономерности экспрессии генетических маркеров могут быть использованы для уточнения прогноза развития ЛРР. Однако изолированное использование данных маркеров, несмотря на прямую корреляцию с риском развития ЛРР может привести к неправильным выводам. В связи с этим представляется целесообразным использование комплекса биологических маркеров, что позволило бы снизить фактор субъективности. С этой целью нами было отобрано 8 биологических критериев в которые вошли - размеры опухоли согласно критерию T, соотношение РЭ и ПГ, уровень экспрессии генов - *Cerb-b2*, *MYBL2*, *BAG1*, *MMP11* и *STCL2*. Использование значений данных критериев в математической модели, разработанной на основе дискриминантного анализа, позволило с высокой точностью (более 95%) сделать правильный прогноз относительно риска возникновения ЛРР у пациентов перенесших органосохраняющие резекции.

Клиническая ценность разработанной модели заключается в том, что она позволяет уточнить прогноз заболевания относительно ЛРР для “спорных” случаев, в которых хирург сомневается относительно тактики

хирургического лечения. С этой целью нами был переосмыслен алгоритм лечения пациенток с I-II 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, внутриорганная сеть лимфатических протоков 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.

## 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.

б. Определение риска развития ЛРР позволяет сформировать индивидуальный подход при выборе тактики хирургического лечения пациентов РМЖ I-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 ЛИТЕРАТУРЫ

- 1) Боженко В.К., Рожкова Н.И, Кудинова Е.А и др. Профиль экспрессии генов как фактор прогноза при раке молочной железы. // Вестник РНЦРР МЗ РФ 2011. № 11. URL:[http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v11/papers/bozh1\\_v11.htm](http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v11/papers/bozh1_v11.htm).
- 2) Боженко В.К., Рожкова Н.И, Кудинова Е.А и др. Анализ уровня экспрессии генов при гиперпролиферативных заболеваниях молочной железы. // Вестник РНЦРР МЗ РФ 2011. № 11. URL:[http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v11/papers/bozh1\\_v11.htm](http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v11/papers/bozh1_v11.htm)
- 3) Боженко В.К., Харченко Н.В., Запиров Г.М и др. Анализ экспрессии генов пролиферации и апоптоза в зависимости от статуса рецепторов стероидных гормонов при раке молочной железы. // Вестник РНЦРР МЗ РФ 2011. № 11. URL: [http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v12/papers/bozhenko1\\_v12.htm](http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v12/papers/bozhenko1_v12.htm)
- 4) Вторушин С.В., Перельмутер В.М, Завьялова М.В. и др. Синхронное и метахронное развитие локальных рецидивов и отдаленных метастазов у больных раком молочной железы. // Сибирский онкологический журнал. 2011. №2 . с. 27-31.
- 5) Гурбанов С.С., Мацко Д.Е., Канаев С.В. и др. Факторы риска возникновения местно-регионарных рецидивов рака молочной железы после органосохраняющих операций. Вопросы онкологии. 2009. Т. 55 № 1. С. 33-37.
- 6) Деньгина Н.В. Важнейшие события в онкологии в 2013 году. Лучевая терапия: в фокусе – рак молочной железы.// Практическая онкология. 2014. Т. 15, №1. С. 17-23.
- 7) Дружков О.Б., Дружков Б.К. Принципы хирургического органосохраняющего лечения больных раком молочной железы. // Практическая медицина 2009. № 4. с.17-18.
- 8) Дружков О.Б., Дружков Б.К., Гатауллин И.Г. и др. Оптимизация резекционных методов хирургического компонента в комплексном лечении рака молочной железы. // Медицинский Альманах 2010. № 3. с.59-62.
- 9) Имянитов Е.Н. Молекулярная диагностика в онкологии. // Вопросы

онкологии. 2012. Т. 58, №2. С. 153-163.

10) Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2014 г. (Заболевания и смертность). // МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ “НМИЦ” Минздрава России. 2016. 250 с.

11) Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Состояние онкологической помощи населению в 2015 г. // МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ “НМИЦ” Минздрава России. 2016. 236 с.

12) Канаев С.В. Роль лучевой терапии в лечении рака молочной железы. // Практическая онкология 2002. Т. 3. №1 . С. 45-51.

13) Колядина И.В. Гетерогенность раннего рака молочной железы: биологическое, популяционное и прогностическое значение. // Дис. докт. мед. наук 14.01.12. Москва. 2015. с. 333.

14) Колядина И.В., Поддубная И.В., Франк Г.А. и др. Прогностическое значение рецепторного статуса опухоли при раннем раке молочной железы. // Современные технологии в медицине. 2012. №4. С 48-53.

15) Колядина И.В., Поддубная И.В., Франк Г.А. и др. Гетерогенность рака молочной железы I стадии: биологическое и прогностическое значение. // Злокачественные опухоли. 2015. №1. С.31-40.

16) Колесников Р.В. Особенности местно-регионарного рецидивирования первично-операбельного рака молочной железы. // Автореф. дис. канд. мед. наук 14.01.12. Москва. 2013. с. 21.

17) Колесников Р.В., Станоевич У.С., Гребенкин Е.Н. и др. Связь между местно-регионарными рецидивами и отдаленными метастазами рака молочной железы. Вестник РНЦРР МЗ РФ. 2013. № 13. URL: [http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v13/papers/kolesn\\_v13.htm](http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v13/papers/kolesn_v13.htm)

18) Косых Э.А. Некоторые клинические характеристики локальных рецидивов рака молочной железы. // Дальневосточный медицинский журнал. 2013. № 2. с.36-37.

19) Кривохотько П.В., Семигразов В.В., Канаев С.В. и др. Риск местного рецидива после органосохраняющих операций на молочной

железе.//Вопросы онкологии. 2011. Т. 57 № 4. С. 627-635.

20) Кулигина Е. Ш. Эпидемиологические и молекулярные аспекты рака молочной железы. // Практическая онкология 2010. т. 11. № 4. с.203-216.

21) Лалак И.А. Пути улучшения результатов органосохраняющего лечения у больных раком молочной железы. // Дис. канд. мед. наук 14.01.12. Санкт-Петербург. 2015. с. 130.

22) Летягин В.П. Эволюция хирургического лечения рака молочной железы. // Опухоли женской репродуктивной системы. 2012. № 1. С. 32-36.

23) Летягин В.П., Колядина И.В., Высоцкая И.В. Возможности хирургического лечения местнорецидивирующего и осложненного рака молочной железы. // Опухоли женской репродуктивной системы. 2015. № 3. С. 30-34.

24) Литвяков Н. В., Цыганов М. М., Чердынцева Н. В. И др. Микроматричный анализ числа ДНК копий опухоли молочной железы: связь с эффектом неoadъювантной химиотерапии. // Сибирский онкологический журнал. 2014. № 3. С. 19-27.

25) Лобанова Л.Н. Дистанционная лучевая терапия рака молочной железы и ее влияние на состояние сердечно-сосудистой системы. // Вестник ОГУ. 2005. №12. С. 123-127.

26) Молодикова Н.Р., Нечушкин М.И., Уйманов В.А. и др. Прогностические факторы местного рецидива после органосохраняющего лечения ранних стадий рака молочной железы. Состояние проблемы.// Опухоли женской репродуктивной системы 2009. № 1-2. С. 16-20.

27) Поддубная И.В., Комов Д.В., Колядина И.В. Роль рецепторного статуса первичной опухоли в развитии локальных рецидивов у больных первично-операбельным раком молочной железы. // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина. 2008. т. 19. №3. С. 43-50.

28) Поддубная И.В., Комов Д.В., Колядина И.В. Локальные рецидивы рака молочной железы. // М.: Медиа Медика. 2010. 112 С.

29) Савицкий С.Э. Молекулярно-генетические и клинические аспекты

наследственного рака молочной железы. // Вестник ВГМУ. 2009. т. 8. № 1. с. 1-15.

30) Седаков И.Е., Зинкевич И.И., Шатова О.П. Экспрессия рецепторов эстрогенов и особенности клинических проявлений рака молочной железы. // Онкология. 2010. Т. 12 №2. 160-163.

31) Семиглазов В.Ф., Палтуев Р.М., Семиглазов В.В. и др. Ранний рак молочной железы: прогностическое значение биологических подтипов (Анализ кумулятивной базы данных ФГБУ «НИИ Онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздравсоцразвития). // Злокачественные опухоли. 2012. Т2. № 2. С. 12-18.

32) Семиглазов В.Ф. Рак молочной железы: мультидисциплинарный подход к лечению. // Практическая онкология. 2015. т. 2. С. 49-54.

33) Симонов К. А., Старцева Ж. А., Слонимская Е. М. Роль послеоперационной лучевой терапии в лечении больных раком молочной железы. // Бюллетень СО РАМН. 2012. Т. 32. № 6. С. 34-40

34) Тящян А.А., Троценко И.Д., Кудинова Е.А. и др. Морфологические и молекулярно-генетические методы диагностики метастазов в в сигнальном лимфоузле при раке молочной железы. // Вестник РНЦРР МЗ РФ. 2015. № 15. URL: [http://vestnik-mcrr.ru/vestnik/v15/papers/tyashan\\_aa\\_v15.htm](http://vestnik-mcrr.ru/vestnik/v15/papers/tyashan_aa_v15.htm)

35) Трофимова О.П., Михина З.П., Иванов С.М. и др. Эффективность методов лучевой терапии после органосохраняющих операций у больных ранним раком молочной железы. // Современные технологии в медицине. 2014. Т. 6. №2. С. 45-52.

36) Уйманов В.А., Нечушкин М.И., Гладилина И.А. и др. Прогностические факторы местного рецидивирования после органосохраняющего лечения больных раком молочной железы. // Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. 2010 . Т. 21. №3. С. 65-70.

37) Харченко В.П., Хмелевский Е.В., Чхиквадзе В.Д. и др. Особенности развития и факторы риска постмастэктомических местно-регионарных рецидивов рака молочной железы. // Вопросы онкологии. 2009. т. 55, № 4б.

С. 436-442.

38) Чеснокова Н.П., Барсуков В.Ю., Злобнова О.А. Рак молочной железы: проблемы патогенеза. // Фундаментальные исследования. 2012. № 4. с.146-151.

39) Штанько А. И., Караяни Е. В., Тимофеев Н. Ф и др. Органосохраняющая хирургия рака молочной железы. // Злокачественные опухоли. 2014. №3. С.103-109.

40) Aaltonen K., Amini R.-M., Heikkila P. et al. High cyclin B1 expression is associated with poor survival in breast cancer. // British Journal of Cancer. 2009. № 100. P. 1055–1060.

41) Abdulkarim B. S. , Cuartero J., Hanson J. et al. Increased Risk of Locoregional recurrence for women with T1-2N0 triple-negative breast cancer treated with modified radical mastectomy without adjuvant radiation therapy compared with breast-conserving therapy. // Journal of Clinical Oncology. 2011. V. 29.№ 21. P. 2852-2858

42) Albain K. S., Barlow W. E., Shak S. et al. Prognostic and predictive value of the 21-gene recurrence score assay in postmenopausal women with node-positive, oestrogen-receptor-positive breast cancer on chemotherapy: a retrospective analysis of a randomised trial.// The Lancet Oncology. 2010. V11. №1. P.55-65.

43) Arpino G., Generali D., Sapino A. et al. Gene expression profiling in breast cancer: a clinical perspective. // Breast. 2013. V. 22. P. 109-20.

44) Arvold N.D., Taghian A.G., Niemierko A. et al. Age, Breast Cancer Subtype Approximation, and Local Recurrence After Breast-Conserving Therapy. // Journal of clinical oncology. 2011. V. 29 N. 29. P. 3885-3891.

45) Atalay C. Breast conserving therapy. Gland Surgery. 2012. № 1(2). P. 84-86.

46) Azim H. A., Partridge A. H. Biology of breast cancer in young women. // Breast Cancer Research. 2014. P. 1-9. URL: <http://breast-cancer-research.com/content/16/4/427>.

47) Azim H. A., Michiels S., Bedard P.L. et al. Elucidating prognosis and

- biology of breast cancer arising in young women using gene expression profiling. // *Clinical Cancer Research*. 2012. V18. № 5. P. 1341-51.
- 48) Bartelink H., Horiot J.-C., Poortmans P. M. et al. Impact of a Higher Radiation Dose on Local Control and Survival in Breast-Conserving Therapy of Early Breast Cancer: 10-Year results of the randomized boost versus no boost EORTC 22881-10882 Trial. // *Journal of clinical oncology*. 2007. V. 25. N. 22, P. 3259-3265
- 49) Baxter E., Gondara L., Lohrisch C. et al. Using proliferative markers and Oncotype DX in therapeutic decision-making for breast cancer: the B.C. experience. // *Current Oncology*. 2015. V. 22. P. 192-198.
- 50) Beatson G.D. On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases. // *The Lancet*. 1896. P 104 -107.
- 51) Bishop H., Chan C., Monypenny I. et al. Surgical guidelines for the management of breast cancer Association of Breast Surgery at BASO 2009. // *European journal of surgical oncology*. 2009. № 35 P. 1-22.
- 52) Blamey R.W., Bates T., Chetty U. et al. Radiotherapy or tamoxifen after conserving surgery for breast cancers of excellent prognosis: British Association of Surgical Oncology (BASO) II trial. // *European Journal of Cancer*. 2013. V. 49. P. 2294-2302.
- 53) Blows F.M., Driver K.E., Schmidt M.K. et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. // *PLOS Medicine*. 2010. № 7(5).
- 54) Boidot R., Vegran F., Jacob D. et al. The Expression of BIRC5 is correlated with loss of specific chromosomal regions in breast carcinomas. // *Genes, Chromosomes and cancer*. 2008. № 47 P. 299–308.
- 55) Buchholz T.A., Somerfield M.R., Griggs J.J. et al. Margins for breast-conserving Surgery with whole-breast irradiation in stage I and II invasive breast cancer: American society of clinical oncology endorsement of the society of

surgical oncology/American society for radiation oncology consensus guideline. // Journal of clinical oncology. 2014. V. 32 N. 14. P. 1502-1507.

56) Buseman C.M., Wright W.E., Shay J.W. Is telomerase a viable target in cancer? // Mutation Research. 2012. № 730 P. 90–97.

57) Cao J.Q., Olson R.A., Tyldesley S.K. Comparison of recurrence and survival rates after breast-conserving therapy and mastectomy in young women with breast cancer. // Current Oncology. 2013. V.20, N. 6, P. 593-601.

58) Chae S.W., Sohn J.H., Kim D.-H. et al. Overexpressions of Cyclin B1, cdc2, p16 and p53 in Human Breast Cancer: The Clinicopathologic Correlations and Prognostic Implications. // Yonsei medical journal. 2011. № 52(3) P. 445-453.

59) Cifuentes-Rojas C., Shippen D. E. Telomerase Regulation. // Mutation Research. 2012. № 730(1-2) P. 20–27.

60) Coates A. S., E. P. Winer E. P., Goldhirsch A. et al. Tailoring therapies—improving the management of early breast cancer: St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2015. // Annals of Oncology. 2015. V. 26. P. 1533–1546.

61) Copson E., Eccles B., Maishman T., Gerty S., Stanton L., Cutress R. I., Altman D. G., Durcan L., Simmonds P., Lawrence G., Jones L., Bliss J., Eccles D. Prospective observational study of breast cancer treatment outcomes for UK women aged 18-40 years at diagnosis: the POSH study. // Journal of the national cancer institute. 2013. V. 105(13). P. 978-88.

62) Darby S., McGale P., Correa C. et al. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10 801 women in 17 randomised trials.// Lancet. 2011. V. 378. P. 1707–1716.

63) Dawson S.-J., Makretsov N., Blows F.M. et al. BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy. // British Journal of Cancer. 2010.№ 103. P. 668–675.

64) Dent R., Valentini A., Hanna W. et al. Factors associated with breast cancer mortality after local recurrence. // Current Oncology. 2014. V. 21. №3. P. 418-425.

- 65) Dowsett M., Cuzick J., Wale C. et al. Prediction of risk of distant recurrence using the 21-gene recurrence score in node-negative and node-positive postmenopausal patients with breast cancer treated with anastrozole or tamoxifen: a TransATAC study. // *Journal of Clinical Oncology*. 2010. V. 28. №11. P. 1829-1834.
- 66) Ferlay J., Soerjomataram I., Ervik M. et al. GLOBOCAN 2012, Cancer Incidence and Mortality Worldwide. International Agency for Research on Cancer. // *IARC Cancer Base*. 2013. №11.
- 67) Fisher B., Jeong J.H., Bryant J. et al. Treatment of lymph-node-negative, oestrogen-receptor-positive breast cancer: long-term findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project randomized clinical trials. // *Lancet*. 2004. № 4-10 P. 858-68.
- 68) Freedman G.M., Anderson P.R, Li T. et al. Locoregional recurrence of triple-negative breast cancer after breast-conserving surgery and radiation. // *Cancer*. 2009. № 115(5). P. 946-51. 2009.
- 69) Forrest A.P., Stewart H.J., Everington D. et al. Randomised controlled trial of conservation therapy for breast cancer: 6-year analysis of the Scottish trial // *Lancet*. 1996. V. 348. P. 708–713.
- 70) Gnerlich J. L., Deshpande A. D., Jeffe D. B. et al. Elevated breast cancer mortality in young women (<40 years) compared with older women is attributed to poorer survival in early stage disease. // *Journal of the American College of Surgeons*. 2009. V. 208 (3). P. 341-347.
- 71) Goldhirsch A., Ingle J.N., Gelber R.D. et al. Thresholds for therapies: highlights of the St. Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer // *Annals of Oncology*. 2009. V. 20. P. 1319–1329.
- 72) Györfy B., Hatzis C., Sanft N. et al. Multigene prognostic tests in breast cancer: past, present, future. // *Breast Cancer Research*. 2015. URL: <http://breast-cancer-research.com/content/17/1/11>.
- 73) Hernandez-Aya L.F., Gonzalez-Angulo A.M. Targeting the Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Pathway in Breast Cancer. // *The*

Oncologist. 2011. № 16 P. 404–414.

74) Ho A., Morrow M. The evolution of the locoregional therapy of breast cancer. // The Oncologist. 2011.V.16. P. 1367–1379.

75) Hoadley K.A., Weigman V.J., Fan C. et al. EGFR associated expression profiles vary with breast tumor subtype. // BioMed Central Genomics. 2007. № 8. P. 258.

76) Holmes D.R., Schooler W., Smith R. Oncoplastic approaches to breast conservation. // International Journal of Breast Cancer. 2011. P.1-16  
[URL:http://doi:10.4061/2011/303879](http://doi:10.4061/2011/303879)

77) Holysz H., Lipinska N., Paszel-Jaworska A. et al. Telomerase as a useful target in cancer fighting—the breast cancer case. // Tumor biology. 2013. № 34 P. 1371–1380.

78) Honma N., Horii R., Iwase T. et al. Clinical importance of estrogen receptor-beta evaluation in breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen therapy. // Journal of clinical oncology. 2008.№ 26(22) P. 3727–3734.

79) Hoover S., Bloom E., Patel S. Review of breast conservation therapy: then and now. International scholarly research network oncology. 2011, P. 1-13  
[URL:http://doi:10.5402/2011/617593](http://doi:10.5402/2011/617593)

80) Hopp T.A., Weiss H.L., Parra I.S et al. Low levels of estrogen receptor beta protein predict resistance to tamoxifen therapy in breast cancer. // Clinical cancer research. 2004. V. 10. № 22. P.7490–7499.

81) Horst K.C., Smitt M.C., Goffinet D.R. et al. Predictors of local recurrence after breast-conservation therapy. // Clinical Breast Cancer. 2005. № 5(6) P. 425-438.

82) Houssami N., Macaskill P., Marinovich M.L. et al. The association of surgical margins and local recurrence in women with early-stage invasive breast cancer treated with breast-conserving therapy: ameta-analysis. // Annals of surgical oncology. 2014. № 21 P. 717–730.

83) Hughes S. K., Schnaper L. A., Bellon J. R. et al. Lumpectomy plus tamoxifen with or without irradiation in women age 70 years or older with early

breast cancer: long term follow up of CALGB 9343.//Journal of Clinical Oncology. 2013. V. 31. № 19. P. 2382-2387.

84) Inwald E.C., Klinkhammer-Schalke M., Hofstadter F. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. // Breast cancer research and treatment. 2013. № 2 P. 539-552.

85) Jia W.-J., Jia H.-X., Feng H.-Y. et al. HER2-enriched Tumors Have the Highest Risk of Local Recurrence in Chinese Patients Treated with Breast Conservation Therapy. // Asian Pacific Journal of cancer Prevention. 2014. V.15. P.315-320.

86) Jeevan R., Cromwell D. A., Trivella M. Reoperation rates after breast conserving surgery for breast cancer among women in England: retrospective study of hospital episode statistics. // British medical journal. 2012. P. 345.

87) Kaviani A., Sodagari N., Sheikhabaei S. From radical mastectomy to breast-Conserving therapy and oncoplastic breast surgery: a narrative review comparing oncological result, cosmetic outcome, quality of life, and health economy. // International Scholarly Research Notices Oncology. 2013. [URL:http://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/742462/](http://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/742462/).

88) Kholoussi N.M., El-Nabi E.H., Esmail N.N. et al. Evaluation of Bax and Bak Gene Mutations and Expression in Breast Cancer. // BioMed Research International. 2014. [URL:http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/2493722014](http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/2493722014).

89) Kreike B., Hart A.A., Velde V.D. et al. Continuing risk of ipsilateral breast relapse after breast-conserving therapy at long-term follow-up. // International journal of radiation oncology Biology \* Physics. 2008. № 71(4) P. 1014-21.

90) Leung Y.-K., Lee M.-T., Lam H.-M. et al. Estrogen receptor-beta and breast cancer: Translating biology into clinical practice. // Steroids. 2012. V. 77. № 7. P.727–737.

91) Li S., Yu K.D., Fan L. et al. Predicting breast cancer recurrence following breast-conserving therapy: a single-institution analysis consisting of 764 Chinese breast cancer cases. // Annals surgical oncology. 2011. №18(9) P.2492-2499.

- 92) Lin R., Tripuraneni P. Radiation Therapy in Early-Stage Invasive Breast Cancer. // Indian journal of surgical oncology. 2011. V.2. P. 101–111.
- 93) Liubota R.V., Zotov A.S., Vereshchako R.I. et al. Risk factors of the invasive breast cancer locoregional recurrence.// BioMed Research International. 2015. P. 1-6. URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/789646>.
- 94) Lu L., Zhang C., Zhu G. et al. Telomerase expression and telomere length in breast cancer and their associations with adjuvant treatment and disease outcome. // Breast Cancer Research. 2011. URL:<http://breast-cancer-research.com/content/13/3/R56>.
- 95) Luoh S.-W, Ramsey B., Newell A. H. et al. HER-2 gene amplification in human breast cancer without concurrent HER-2 over-expression. // Springerplus. 2013. URL:<http://www.springerplus.com/content/2/1/386>.
- 96) Milella M., Falcone I., Conciatori F. et al. PTEN: multiple functions in human malignant tumors. Frontiers in Oncology // Molecular and Cellular Oncology. 2015. V. 5. № 24 (6). P. 1-14.
- 97) Millar E.K., Graham P.H., O’Toole S.A. et al. Prediction of local recurrence, distant metastases, and death after breast-conserving therapy in early- stage invasive breast cancer using a five-biomarker panel // Journal of clinical oncology.2009. V. 27. P. 4701–4708.
- 98) Murphy L., Cherlet T., Lewis A. et al. New insights into estrogen receptor function in human breast cancer. // Annals of Medicine. 2003. № 35(8) P. 614-631.
- 99) Murphy C., Penny B.A., Anderson R. et al. Impact of the radiation boost on outcomes after breastconserving surgery and radiation.// International Journal of Radiation Oncology. Biology. Physics. 2011 V. 81(1). P. 69–76.
- 100) Nadler Y., Gonzalez A.M., Camp R. L. et al. Growth factor receptor-bound protein-7 (Grb7) as a prognostic marker and therapeutic target in breast cancer. // Annals of Oncology. 2010. № 21. P. 466–473.
- 101) Nixon A., Neuberg D., Hayes D. et al. Relationship of patients age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer // Journal of clinical oncology. 1994. V.12. P. 888–894.

- 102) Nottage M.K., Kopciuk K.A., Tzontcheva A. et al. Analysis of incidence and prognostic factors for ipsilateral breast tumor recurrence and its impact on disease-specific survival of women with node-negative breast cancer: a prospective cohort study. // *Breast Cancer Research*. 2006. V. 8(4). P .1-10.
- 103) Okumura Y., Nishimura R., Nakatsukasa K. et al. Change in estrogen receptor, HER2, and Ki-67 status between primary breast cancer and ipsilateral breast cancer tumor recurrence. // *European journal of surgical oncology*. 2015. V. 41. P. 548–552.
- 104) Onitilo A.A., Engel J.M., Stankowski R.W. et al. Survival comparisons for breast conserving surgery and mastectomy revisited: community experience and the role of radiation therapy. // *Clinical medicine and research* 2015. V. 13.№. 2. P. 65-73.
- 105) Otani K., Nishiyama K., Ito Y. et al. Steroid treatment increases the recurrence of radiationinduced organizing pneumonia after breast-conserving therapy. // *Cancer Medicine*. 2014. V. 3.№4. P. 947–953.
- 106) Ozyigit G., Gultekin M. Current role of modern radiotherapy techniques in the management of breast cancer. // *World journal of clinical oncology*. 2014. V. 5(3). P. 425-439.
- 107) Paik S., Tang G., Shak S. et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. // *Journal of clinical oncology*. 2006. V 24. №.23. P. 3726-3734.
- 108) Pleijhuis R. G., Graafland M., Vries J. et al. Obtaining adequate surgical margins in breast-conserving therapy for patients with early-stage breast cancer: Current Modalities and Future Directions. // *Annals of surgical oncology*. 2009. № 16. P. 2717–2730.
- 109) Povoski S. P., Jimenez R.E., Wang W. P. et al. Research article standardized and reproducible methodology for the comprehensive and systematic assessment of surgical resection margins during breast-conserving surgery for invasive breast cancer. // *BioMed Central Cancer*. 2009. V. 9(254). URL:<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/9/254>.

- 110) Pradip D., Bouzyk M., Dey N. et al. Dissecting GRB7-mediated signals for proliferation and migration in HER2 overexpressing breast tumor cells: GTP-ase rules. // American journal of cancer research. 2013. № 3(2). P. 173-195.
- 111) Purrington K.S., Slager S., Eccles D. et al. Genome-wide association study identifies 25 known breast cancer susceptibility loci as risk factors for triple-negative breast cancer. // Carcinogenesis. 2014. № 35(5) P. 1012-1019.
- 112) Rakovitch E., Nofech-Mozes S., Hanna W. et al. A population-based validation study of the DCIS score predicting recurrence risk in individuals treated by breast-conserving surgery alone. // Breast Cancer Research and Treatment. 2015. V. 152. № 2. P.389-398.
- 113) Rouanet P., Roger P., Rousseau E. et al. HER2 overexpression a major risk factor for recurrence in pT1a-bN0M0 breast cancer: results from a French regional cohort. // Cancer Medicine. 2014. № 3(1). P. 134–142.
- 114) Saghir N. S., Seoud M., Khalil M. K., Charafeddine M., Salem Z. K., Geara F. B., Shamseddine A. I. Effects of young age at presentation on survival in breast cancer. // BioMed Central Cancer. 2006. URL:<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/6/194>
- 115) Sangen M.J., Poortmans P.M., Scheepers S.W. et al. Prognosis following local recurrence after breast conserving treatment in young women with early breast cancer. // European journal of surgical oncology. 2013. № 39(8) P. 892-898.
- 116) Sedlmayer F., Sautter-Bihl M.-L., Budach W. et al. DEGRO practical guidelines: radiotherapy of breast cancer I Radiotherapy following breast conserving therapy for invasive breast cancer. // Strahlentherapie und Onkologie. 2013. V. 189. P. 825–833.
- 117) Shen J., Gammon M.D., Terry M.B. et al. Genetic polymorphism in telomere length and breast cancer survival. // Breast cancer research and treatment. 2012. V. 134 (1). P.393-400.
- 118) Senkus E., Kyriakides S., Penault-Llorca F. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. // Annals of oncology. 2013. V. 26. P. 8-30.

- 119) Siggelkow W., Boehm D., Gebhard S. et al. Expression of aurora kinase A is associated with metastasis-free survival in node-negative breast cancer patients. // *BioMed Central Cancer*. 2012. V. 12:562. URL:<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/12/562>.
- 120) Siglin J., Champ C. E., Vakhnenko Y. et al. Radiation Therapy for Locally Recurrent Breast Cancer.// Hindawi. Publishing Corporation International Journal of Breast Cancer. 2012. P. 1-7. URL:[http://doi: 10.1155/2012/571946](http://doi:10.1155/2012/571946).
- 121) Solin L. J., Gray R., L. J. Goldstein L. J. et al. Prognostic value of biologic subtype and the 21-gene recurrence score relative to local recurrence after breast conservation treatment with radiation for early stage breast carcinoma: results from the Eastern Cooperative Oncology Group E2197 study. // *Breast Cancer Research and Treatment*. 2012. № 134(2) P. 683–692.
- 122) Smith B.D., Bentzen S.M., Correa C.R. et al. Fractionation for whole breast irradiation: an American Society for Radiation Oncology (ASTRO) evidence-based guideline.//*International Journal of Radiation Oncology. Biology. Physics*. 2011 V. 81(1). P.59-68.
- 123) Van Dongen J. A., Voogd A. C., Fentiman I.S. et al. Long-term results of a randomized trial comparing breast-conserving therapy with mastectomy: European Organization for Research and Treatment of Cancer 10801 trial. // *Journal of the National Cancer Institute*. 2000. V. 92. №. 14. P. 1143-1150.
- 124) Veronesi U., Orecchia R., Luini A. et al. Full-dose intra-operative radiotherapy with electrons (ELIOT) during breast-conserving surgery: experience with 1246 cases cancer. // 2008. V. 2. № 65. P.1-11.
- 125) Viani G. A., Stefano E. J., Afonso S. L. et al. Breast-conserving surgery with or without radiotherapy in women with ductal carcinoma in situ: a meta-analysis of randomized trials. // *Radiation Oncology* 2007, V. 2:28. URL:<http://doi:10.1186/1748-717X-2-28>.
- 126) Wapnir I.L., Anderson S.J., Mamounas E.P. et al. Prognosis after ipsilateral breast tumor recurrence and locoregional recurrences in five National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project node-positive adjuvant breast cancer trials. //

Journal of clinical oncology. 2006. V. 24. № 13. P. 2028-2037.

127) Wojtyla A., M. Gladych, B. Rubis et al. Human telomerase activity regulation. // Molecular Biology Reports. 2011. № 38 P. 3339–3349.

128) Yamamoto S., Yamamoto-Ibusuki M., Yamamoto Y. et al. A comprehensive analysis of Aurora A; transcript levels are the most reliable in association with proliferation and prognosis in breast cancer. // BioMed Central Cancer. 2013. V.13. URL:<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/13/217>.

129) Yu J. I., Choi D. H., Huh S. J. et al. Proportion and Clinical Outcomes of Postoperative Radiotherapy Omission after Breast-Conserving Surgery in Women with Breast Cancer.//Journal of Breast Cancer. 2015. V. 18(1). P. 50-56.URL:<http://dx.doi.org/10.4048/jbc.2015.18.1.50>.

130) Yu K-D., Li S., SHAO Z.-M. Different annual recurrence pattern between lumpectomy and mastectomy: implication for breast cancer surveillance after breast-conserving surgery. //The oncologist. 2011. V.16 P.1101–1110.

131) Zhang N., Li X., Tao K. et al. BCL-2 (-938C> A) polymorphism is associated with breast cancer susceptibility Zhang et al. // BioMed Central Medical Genetics. 2011. V. 12. URL:<http://www.biomedcentral.com/1471-2350/12/48>.