

ПАЛТУЕВ

Руслан Маликович

**БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИНДИВИДУАЛИЗАЦИИ
ЛЕЧЕНИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия.

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Санкт-Петербург – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН,
заслуженный деятель науки РФ Семиглазов Владимир Федорович

Официальные оппоненты:

Демидов Сергей Михайлович – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный врач РФ, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой онкологии и лучевой диагностики (Екатеринбург)

Вторушин Сергей Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», заместитель директора по науке и трансляционной медицине, заведующий отделением общей и молекулярной патологии (Томск)

Боженко Владимир Константинович – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий отделом молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей (Москва)

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Ростов-на-Дону)

Защита диссертации состоится «___» _____ 2025 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета 21.1.033.01 при ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68) и на сайте: <https://www.niioncologii.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

доктор медицинских наук

Филатова Лариса Валентиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Рак молочной железы (РМЖ) – наиболее часто встречающееся онкологическое заболевание в женской популяции. Более 2 млн случаев в мире выявляется ежегодно. В Российской Федерации по данным на 2018 г. РМЖ у женского населения является ведущей онкологической патологией (20,9 %) и основной причиной смертности от злокачественных новообразований (16,2 %). В период с 2008 по 2018 гг. абсолютное число впервые выявленных случаев РМЖ увеличилось с 52 469 до 70 682, показатель заболеваемости на 100 тыс. населения – с 42,83 до 51,63. На 2018 г. в структуре онкологической заболеваемости РМЖ занимает 1-е место у женщин в возрасте 30–59 лет (27,2 %), 2-место – у женщин в возрасте 60 лет и старше (18,1 %) и 3-е место у лиц в возрасте 0-29 лет (7,0 %) (Каприн А. Д. и соавт., 2019).

За последние десятилетия смертность от РМЖ в мире несколько снизилась благодаря широкому внедрению маммографического скрининга, адъювантной и неoadъювантной системной терапии (EBCTCG, 2005). Активно развивающимся направлением современной онкологии является индивидуализация лечения РМЖ на основе анализа прогностических и/или предиктивных маркеров. Персонализированный подход позволяет повысить эффективность лечения и качество жизни пациента, а также снизить затраты на оказание медицинской помощи за счет выбора оптимальной схемы лечения (De Lima, 2020).

Клинико-морфологическая гетерогенность РМЖ была отмечена В. Ф. Семиглазовым и другими исследователями задолго до формирования современных представлений о вариантах течения РМЖ. В 1979–1983 гг. на основании изучения клинико-эпидемиологических признаков и анализа уровня продукции эстрогенов, прогестерона и других биохимических показателей были выделены овариальная, надпочечниковая и инволютивная формы РМЖ, отличающиеся по прогнозу и ответу на эндокринотерапию и химиотерапию (Семиглазов В. Ф., 1980). В 2000 г. К. М. Пожариский одним из первых в России продемонстрировал роль иммуногистохимических методов в общей характеристике биологических особенностей опухоли и определении прогноза заболевания (Пожариский К. М. и соавт., 2000). К настоящему времени рецепторы стероидных гормонов, HER2 продемонстрировали свою предиктивную и прогностическую значимость в многочисленных клинических исследованиях, радикально изменили подходы к лечению РМЖ.

На основании достижений последних генетических исследований получено представление о генетическом многообразии РМЖ (Anders C. K. et al., 2008; Angèle S. et al., 2000; Axelsson C. K. et al., 1992; Fougner C. et al., 2020; Katoh M., 2020). Для каждого подтипа характерны различные факторы риска, патологические признаки, ответ на лечение и отдаленные его результаты. После ретроспективного анализа предложено несколько прогностических и

предиктивных тестов, основанных на оценке экспрессии генов: Oncotype DX (Genomic Health, США), Mammaprint (Agendia BV, Нидерланды), PAM 50, MapQuant DX (Ipsogen, Франция) (Abdelrahman, A. E. et al., 2017; Adamo B. et al., 2017; Albain K. S. et al., 2010; Aleskandarany M. A. et al., 2012; Azim H. A. et al., 2012; Badve S. et al., 2007). Однако внедрение молекулярно-генетического профилирования опухоли в рутинную практику затруднено из-за высокой стоимости теста и отсутствия полученных в проспективных исследованиях доказательств прогностической и предиктивной ценности для выбора адъювантного лечения. Для практического здравоохранения представляют важность новые научные данные, практические рекомендации и разработки в данной области.

Все более актуальным становится изучение биологических маркеров РМЖ, являющихся альтернативой стандартным маркерам, которые широко применяются в рутинной клинической практике. Целый ряд показателей таких, как p53 (Lee S. K. et al., 2015), CK5/6 (Abdelrahman A. E. et al., 2017), SMA (Chang H. Y. et al., 2005), p63 (Di Franco S. et al., 2016), PNH3 (Hao Q. et al., 2018), Е-кадгерин (Popescu C. I. et al., 2013), EGFR (Masuda H. et al., 2012), FOXA1 (Bernardo G. M. et al., 2012), рецепторы андрогенов (РА) (Higgins M. J. et al., 2010), TILs (Diece M. V. et al., 2018) и другие в многочисленных исследованиях демонстрируют свою предиктивную и/или прогностическую значимость. Результаты данных исследований свидетельствуют о том, что новые биологические маркеры РМЖ требуют дальнейшего подробного изучения. Подобные исследования в будущем могут существенно повлиять на формирование новых подходов к лечению РМЖ.

Все вышеизложенное определило актуальность проведения настоящего исследования.

Степень разработанности темы

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

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

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

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

Цель исследования

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

Задачи исследования

1. Определить прогностическое значение возраста больной, размера первичной опухоли, состояния регионарных лимфатических узлов, степени гистологической злокачественности, маркера клеточной пролиферации Ki-67, уровня рецепторов стероидных гормонов (эстрогена и прогестерона), экспрессии HER2.
2. Определить прогностическое значение рутинных маркеров и создать на основе полученных результатов традиционную прогностическую шкалу.
3. Определить прогностическое значение малоизученных иммуногистохимических маркеров (p53, CK5/6, FOXA1, PNH3, E-кадгерина, EGFR, CD4, CD8, клеточной плотности) и создать на основе полученных результатов регрессионную прогностическую шкалу.
4. Используя разработанные прогностические шкалы, выделить группы высокого, среднего и низкого риска летального исхода и провести анализ эффективности адъювантной химиотерапии в группах разного риска.
5. Изучить молекулярно-биологические характеристики опухоли на основе современных методов исследований и создать мультигенную сигнатуру, включающую молекулярные подтипы и лечебно-ориентированные кластеры.
6. Провести исследование диагностической эффективности разработанной мультигенной сигнатуры при различных стадиях и подтипах РМЖ.

Научная новизна исследования

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

На обширном материале проанализированы возможности определения различных иммуногистохимических маркеров методом тканевых матриц в качестве прогностического и

предиктивного теста. Созданы традиционная (на основе рутинных маркеров) и регрессионная (на основе малоизученных маркеров) прогностические шкалы.

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

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

Теоретическая и практическая значимость работы

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

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

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

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

Проведенные исследования с использованием технологии nCounter, основанной на прямой цифровой детекции мишеней с помощью флуоресцентных штрих-кодов, продемонстрировали возможность оценки экспрессии мРНК широкой панели генов в рамках одного лабораторного исследования гистологического материала.

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

Методология и методы исследования

Проведен ретроспективный анализ анамнестических, клинических, патоморфологических и иммуногистохимических данных пациенток с РМЖ, полученных из объединенного канцер-

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

Положения, выносимые на защиту

1. Уровень экспрессии стероидных гормонов (ЭР и ПР), HER2, Ki-67, CK5, CK14, EGFR, P53 может быть использован в многофакторном анализе для оценки риска рецидива у больных T1-2N0M0 независимо от подтипа РМЖ.
2. Разработаны традиционная прогностическая шкала, включающая рутинные маркеры РМЖ («T2N0M0», «ПР<8», «G2G3», «ЭР<8», «HER2=3» и «Ki-67>5 %»), и регрессионная прогностическая шкала, включающая уровень экспрессии новых маркеров РМЖ («CK14, есть»; «FOXP3=0»; «T2N0M0»; «E-cadherin»; «P53»; «HER2=3»; «CD8>0»; «EGFR есть»; «степень G2, G3»; «CD4>0»), с выделением групп высокого, среднего и низкого риска летального исхода на основании суммы баллов. Регрессионная прогностическая шкала обладает более высокой специфичностью, эффективностью, прогностической и предсказывающей значимостью по сравнению с традиционной шкалой.
3. Разработана мультигенная сигнатура из 100 генов, обладающих высокой предиктивной и прогностической значимостью (пролиферативно-референсная часть – 58 генов, лечебно-ориентированная часть – 37 генов, референс – 5 генов), позволяющая обеспечить персонализированный подход к назначению системного лечения РМЖ.
4. Технология nCounter, основанная на прямой цифровой детекции мишеней с помощью флуоресцентных штрих-кодов, позволяет оценить экспрессию мРНК широкой панели генов в рамках одного лабораторного исследования гистологического материала.
5. Молекулярно-генетическое профилирование опухоли является точным методом определения подтипа опухоли (люминальный А, люминальный В, базальный) у пациенток с метастатическим РМЖ в сравнении с рутинным суррогатным иммуногистохимическим исследованием.

Степень достоверности и апробация результатов

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

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

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

Внедрение результатов

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

Материалы диссертационного исследования использованы при подготовке клинических рекомендаций Российского общества онкомаммологов (РООМ) и используются в научной деятельности СПбГБУЗ «Городской клинический онкологический диспансер» (соглашение о научном сотрудничестве от 26.02.2016), ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер» МЗ РТ УФА. (соглашение о научном сотрудничестве от 26.02.2016), ГБУЗ НО «Нижегородский областной клинический онкологический диспансер» (соглашение о научном сотрудничестве от 07.04.2016), КГБУЗ «Алтайский краевой онкологический диспансер» (соглашение о научном сотрудничестве от 25.02.2021), ОБУЗ «Ивановский областной онкологический диспансер» (соглашение о научном сотрудничестве от 25.03.2021), ГБУЗ СК «Пятигорский межрайонный онкологический диспансер» (соглашение о научном сотрудничестве от 24.05.2021), ГБУЗ СК «Ставропольский краевой клинический онкологический диспансер» (соглашение о научном сотрудничестве от 31.05.2021), ГАУЗ ТО МКМЦ «Медицинский город» Тюмень (соглашение о научном сотрудничестве от 4.10.2022).

Личное участие автора в получении результатов

Автору принадлежит идея проведения комплексных научных исследований с целью разработки прогностических шкал и мультигенной сигнатуры (100-генная панель) для внедрения в клиническую практику индивидуализированного подхода к лечению РМЖ. Автором

сформулированы цель и задачи исследования, разработан план исследования и отдельных его этапов, осуществлен углубленный анализ отечественной и зарубежной научной литературы, проведен набор клинического материала. В сотрудничестве с сотрудниками лаборатории ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, автором были разработаны и проведены гистологические, иммуногистохимические и молекулярно-биологические исследования образцов опухолевой ткани молочной железы. Автором были оперированы пациенты из группы T1-2N0M0, проведен анализ тепловых карт с рекомендаций системного лечения у 84 больных мРМЖ. При непосредственном участии автора выполнены обобщение и статистический анализ полученных результатов, написание и оформление рукописи диссертации и публикаций по выполненной работе.

Соответствие диссертации паспорту научной специализации

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

Публикации

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

Объем и структура диссертации

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

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность член-корр. РАН, д.м.н., профессору Алексею Михайловичу Беляеву, член-корр. РАН, д.м.н., профессору Владимиру Фёдоровичу Семиглазову, к.м.н. Асель Галимовне Куйдабергеновой, член-корр. РАН, д.м.н., профессору Евгению Наумовичу Имянитову и сотрудникам отделения опухолей молочной железы, отдела инновационных методов терапевтической онкологии и реабилитации ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России за помощь в выполнении научной работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

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

Дизайн исследования представлен на Рисунках 1 и 2.

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

Ретроспективный анализ данных канцер-регистра

Общая численность исследуемой популяции канцер-регистра составила 1216 пациенток. В рамках ретроспективного анализа выполнена оценка комплекса анамнестических, клинических, патоморфологических и иммуногистохимических данных пациенток, включая возраст на момент операции, стадию pTNM, размеры опухоли до лечения, вид неoadъювантной и адъювантной терапии, длительность наблюдения после операции, данные о рецидиве и выживаемости, степень гистологической злокачественности по Elston–Ellis, уровень экспрессии ЭР, ПР, HER2.

На следующем этапе был проведен анализ архивного материала из парафиновых блоков опухолей исследуемой популяции 1216 больных с T1–2N0M0 РМЖ. Оценивали степень злокачественности опухоли (Elston–Ellis), клеточную плотность, традиционные (ЭР, ПР, HER2, Ki-67) и малоизученные (CK 14, FOXA1, FOXP3, PDL1, P53, SMA, AR, E-cadherin, CD4, CD8, CK 5\6, EGFR) маркеры.

Основные характеристики исследуемой популяции пациенток с РМЖ T1-2N0M0 (ретроспективный анализ данных канцер-регистра) приведены в Таблице 1. Средний ($\pm$ SD) возраст пациенток на момент операции составлял 55,66 ($\pm$ 10,90) лет. Медиана длительности наблюдения пациенток после операции составила 12 лет. Летальный исход был зарегистрирован у 206 из 1216 пациенток (16,9%). Адъювантную терапию получили 1034 (85,0 %) женщин исследуемой популяции, остальные 182 пациентки (15,0 %) находились под наблюдением.

Ретроспективное когортное одноцентровое исследование с проспективным пересмотром блоков опухоли

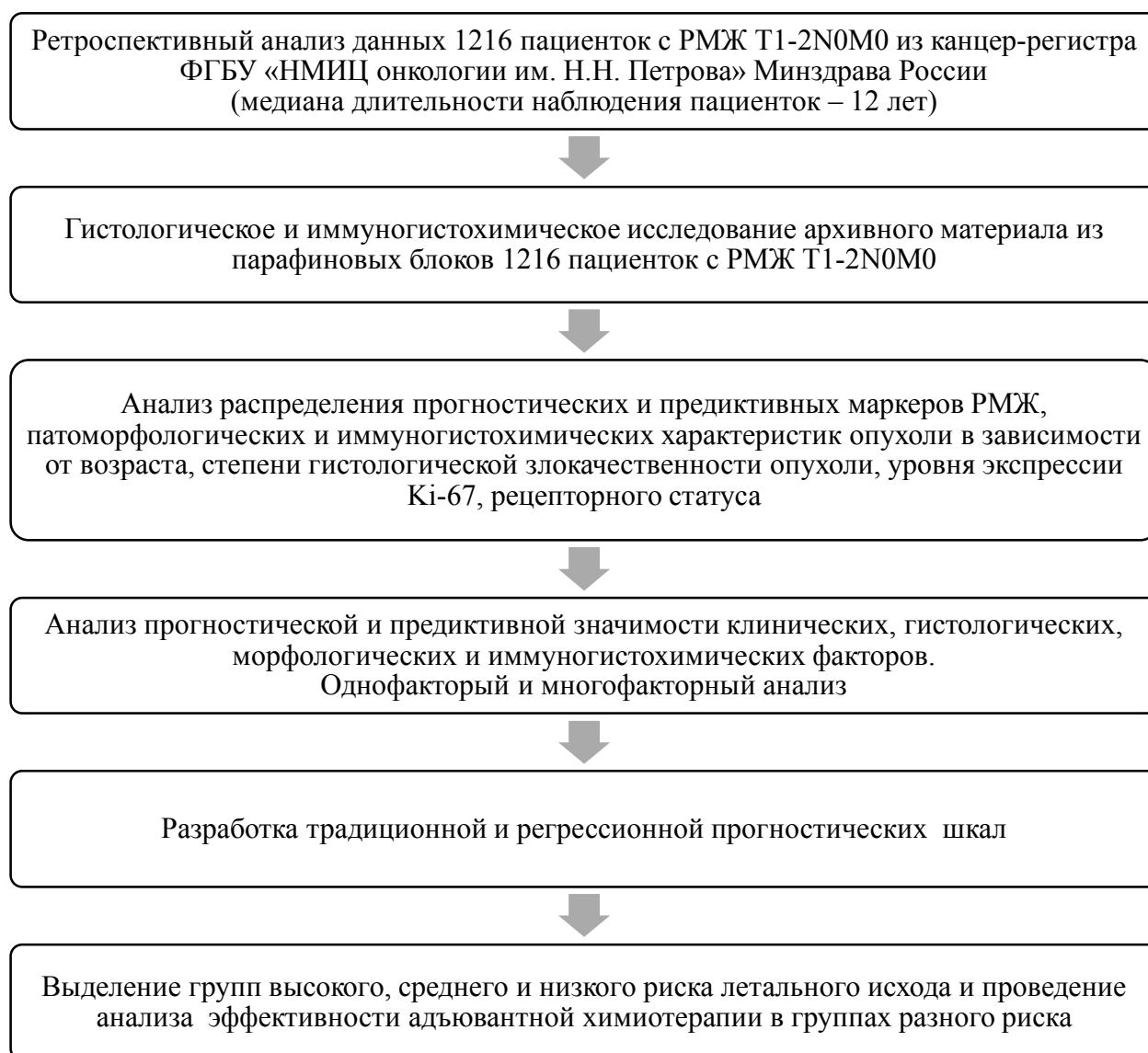


Рисунок 1 – Дизайн исследования в популяции пациенток с РМЖ T1-2N0M0

Таблица 1 – Возраст больных и клиничко-морфологические характеристики опухоли пациенток исследуемой популяции

Показатель	N (%)*	M ± SD	V, %	Me [LQ; UQ]	Min; Max
Возраст на момент операции, лет	1175 (96,63)	55,66 ± 10,90	20,00	55,00 [48,00; 63,00]	24,00; 84,00
Маркеры					
Клеточная плотность, клеток/мм ²	723 (59,46)	5 887,61 ± 3 192,83	54,00	5 329,80 [4 276,00; 6 826,86]	940,84; 48 521,89

Показатель	N (%)*	M ± SD	V, %	Me [LQ; UQ]	Min; Max
ЭР, баллы по шкале Allred	741 (60,94)	3,80 ± 3,94	104,00	0,00 [0,00; 8,00]	0,00; 8,00
РП, баллы по шкале Allred	741 (60,94)	3,21 ± 3,79	118,00	0,00 [0,00; 8,00]	0,00; 10,00
Ki-67, %	732 (60,20)	20,02 ± 20,96	105,00	11,92 [5,35; 26,10]	0,00; 96,76
Размер опухоли					
Размеры опухоли до лечения, см	1109 (91,20)	2,24 ± 0,87	39,00	2,00 [1,50; 2,80]	0,50; 6,00
Максимальный размер опухоли, см	1133 (93,17)	2,33 ± 1,00	43,00	2,20 [1,50;3,00]	0,30; 15,00
Длительность наблюдения после операции, лет	1191 (97,94)	12,27 ± 3,60	29,00	12,00 [10,00;16,00]	0,00; 18,00

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

Молекулярно-генетические исследования образцов ткани рака молочной железы

План молекулярно-генетических исследований включал разработку мультигенной сигнатуры, включающей пролиферативно-референсную и лечебно-ориентированную часть, и изучение мРНК экспрессии генов, участвующих в развитии РМЖ.

Состав изучаемой мультигенной сигнатуры приведен в Таблице 2. Выбор генов основывался на результатах изучения данных литературы и опыта разработки других мультигенных структур, а также клинической значимости маркеров прогностических шкал.

Изучение мРНК экспрессии генов мультигенной сигнатуры выполнено в 84 образцах опухолевой ткани пациенток с метастатическим РМЖ. Образцы опухолей были предоставлены ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, ГБУЗ НО «Нижегородский областной клинический онкологический диспансер», КГБУЗ «Алтайский краевой онкологический диспансер», ОБУЗ «Ивановский областной онкологический диспансер», ГБУЗ СК «Пятигорский межрайонный онкологический диспансер», ГБУЗ СК «Ставропольский краевой клинический онкологический диспансер». У всех пациенток было получено письменное согласие на исследование образцов опухолевой ткани. Назначение лекарственной терапии проводилось лечащим врачом по данным иммуногистохимического исследования на основании Клинических рекомендаций Министерства здравоохранения Российской Федерации «Рак молочной железы»

Проспективное когортное многоцентровое исследование



Рисунок 2 – Дизайн исследования в популяции пациенток с метастатическим РМЖ

Гистологические и иммуногистохимические исследования были проведены в лаборатории ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Образцами опухолевой ткани могли быть биоптаты и операционный материал. Для оценки степени злокачественности опухоли использовали классификацию Elston–Ellis: G1 – низкая (высокодифференцированная), G2 – умеренная (умеренно дифференцированная), G3 – высокая (низкодифференцированная). Для иммуногистохимических исследований архивный материал был окрашен антителами как к широко используемым в настоящее время маркерам (ЭР, ПР, HER2, Ki-67), так и к малоизученным маркерам (СК 14, FOXA1, FOXP3, PDL1, P53, актин гладкомышечный (SMA), андрогена рецепторы (AR), Е-кадхерин (E-cadherin), CD4, CD8, СК 5\6, EGFR). Анализ образцов ткани проводился с использованием метода тканевых матриц.

Таблица 2 – Исследуемая 100-генная сигнатура для РМЖ

Проллиферативно-референсная часть				Лечебно-ориентированная часть		Референс
Ген	Ссылка	Ген	Ссылка	Ген	Ссылка	
<i>ACTR3B</i>	PAM50	<i>MYC</i>	PAM50	<i>BCAR4</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000262117	<i>ACTB</i> <i>GAPDH</i> <i>GUS</i> <i>RPLPO</i> <i>TRFC</i>
<i>ALDH4A1</i>	Mammaprint	<i>NDC80</i>		<i>BCAS2</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000116752	
<i>AR</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000169083	<i>NUF2</i>	PAM50	<i>BIRC5</i>	Oncotype, PAM50, Endopredict	
<i>AURKA</i>	Oncotype	<i>ORC6L</i>	Mammaprint, PAM50	<i>BRC A1</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000012048	
<i>BAG1</i>	Oncotype, PAM50	<i>PITRM1</i>	Mammaprint	<i>BRC A2</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000139618	
<i>BCL2</i>	Oncotype, PAM50	<i>PRC1</i>	Mammaprint	<i>CCNB1</i>	Oncotype, PAM50	
<i>BLVR A</i>	PAM 50	<i>QSOX2</i>	Mammaprint	<i>CCND1</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000110092	
<i>CD68</i>	Oncotype	<i>RAB6B</i>	Mammaprint	<i>CCND2</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000118971	
<i>CDC20</i>	PAM 50	<i>RASSF7</i>	Mammaprint	<i>CCND3</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000112576	
<i>CDC6</i>	PAM 50	<i>RECQL5</i>	Mammaprint	<i>CD274</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000120217	
<i>CENPA</i>	Mammaprint	<i>RFC4</i>	Mammaprint	<i>CDH1</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000039068	
<i>CENPF</i>	PAM 50	<i>RTN4RL1</i>	Mammaprint	<i>CDH3</i>	PAM50	
<i>CEP55</i>	PAM 50	<i>RUNDC1</i>	Mammaprint	<i>CDK4</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000135446	
<i>C16orf61</i>	Mammaprint	<i>SCUBE2</i>	Mammaprint, Oncotype	<i>CDK6</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000105810	
<i>COL4A2</i>	Mammaprint	<i>SERF1A</i>	Mammaprint	<i>CHEK2</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000183765	
<i>CXXC5</i>	PAM 50	<i>SLC2A3</i>	Mammaprint	<i>uHCLDN3</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000165215	
<i>DCK</i>	Mammaprint	<i>STK32B</i>	Mammaprint	<i>CLDN7</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000181885	
<i>DHX58</i>	Mammaprint	<i>TGFB3</i>	Mammaprint	<i>EGFR</i>	PAM50	
<i>DIAPH3</i>	Mammaprint	<i>C20orf46</i>	Mammaprint	<i>ERBB2</i>	Oncotype, PAM50	
<i>EBF4</i>	Mammaprint	<i>TSPYL5</i>	Mammaprint	<i>ErbB3</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000065361	
<i>ECT2</i>	Mammaprint	<i>UCHL5</i>	Mammaprint	<i>ESR1</i>	Oncotype, PAM50	
<i>EGLN1</i>	Mammaprint			<i>FGF18</i>	Mammaprint	
<i>EXT1</i>	Mammaprint			<i>FOXA1</i>	PAM50	
<i>FLT1</i>	Mammaprint			<i>FOXC1</i>	PAM50	
<i>GPR160</i>	PAM50			<i>pHH3</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000275714	
<i>GRB7</i>	Oncotype, PAM50			<i>KRT14</i>	PAM50	
<i>GSTM1</i>	Oncotype			<i>KRT5</i>	PAM50	
<i>IL6ST</i>	Endopredict			<i>MELK</i>	Mammaprint, PAM50	
<i>LOC730018</i>	Mammaprint			<i>MYBL2</i>	Oncotype, PAM50	
<i>LPCAT1</i>	Mammaprint			<i>PGR</i>	Oncotype, PAM50	
<i>MCM6</i>	Mammaprint			<i>PIK3CA</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000121879	
<i>MGP</i>	Mammaprint			<i>PTEN</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000171862	
<i>MMP11</i>	Oncotype, PAM50			<i>TOP2a</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000131747	
<i>MMP9</i>	Mammaprint			<i>P53</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000141510	
<i>MS4A7</i>	Mammaprint			<i>TUBBIII</i>	https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000198211	
<i>C9orf30</i>	Mammaprint			<i>TYMS</i>	PAM50	
<i>MTDH</i>	Mammaprint			<i>UBE2T</i>	PAM50	

Анализ экспрессии генов проводили с использованием технологии nCounter, основанной на прямой цифровой детекции мишеней с помощью флуоресцентных штрих-кодов (nCounter Analysis System компании NanoString). Основные этапы технологии nCounter включают гибридизацию, пробоподготовку (отмывка не связавшихся проб, иммобилизация проб на картридже, выравнивание в электромагнитном поле), цифровой подсчет штрих-кодов. Для очистки РНК из залитых парафином образцов ткани использовали набор компании Norgen (Канада). Технология очистки основана на хроматографии со спин-колоной с использованием в качестве сепарационной матрицы патентованной смолы Norgen.

Исследования с целью подтверждения мутации генов проводили методами NGS (секвенирование нового поколения) и RT-PCR (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией).

Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью пакетов прикладных программ Statistica 10 и SAS JMP 11.

Характеристики исследуемой популяции представлены дескриптивно. Сравнения двух групп по количественным шкалам проводились с помощью непараметрического критерия Манна – Уитни. Сравнения трех и более групп по количественным показателям проводились на основе непараметрического критерия Краскела – Уоллеса. Статистическая значимость различий групп для бинарных и категориальных шкал осуществлялась при помощи критерия χ^2 Пирсона. Для анализа влияния сразу нескольких независимых факторов на зависимую применялся многофакторный дисперсионный анализ. Показатели общей выживаемости рассчитывали по методу Каплана – Майера. Различия между сравниваемыми группами выявляли с помощью непараметрических статистических критериев (логарифмического рангового критерия). Отношение рисков (hazard ratio) оценивали с помощью регрессионной модели Кокса. Для построения прогностической модели использовали метод логистической регрессии. Уровень значимости устанавливался как двусторонний 0,05 для всех статистических тестов.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ распределения прогностических и предиктивных маркеров рака молочной железы

Результаты анализа распределения прогностических и предиктивных маркеров РМЖ в исследуемой популяции обобщены в Таблице 3. В исследуемой популяции преобладали женщины в возрасте ≥ 50 лет (69,1 %). Оценка по системе TNM продемонстрировала преобладание стадии T1N0M0 (55,2 %). У 52,0 % пациенток размер опухоли составлял более 2 см, у 46,2 % – от 1 до 2 см, у 1,8 % – менее 1 см. При анализе гистологической злокачественности новообразований было установлено преобладание прогностически неблагоприятных степеней G2 (47,5 %) и G3 (36,9 %) опухолевого процесса. Положительный HER2-статус наблюдался у 8,7 % женщин (ИГХ категория 3+), отрицательный HER2-статус – у 91,3 %. В данном исследовании у 45,7 % женщин степень положительного окрашивания на ЭР достигла 7–8 баллов. Максимальная экспрессия ПР была установлена в 35,4 % случаев. Уровень Ki-67 был 5 % и более у 76,9 % женщин, при этом приблизительно у половины пациенток (47,7 %) Ki-67 превысил 13 %. Таким образом, внутри когорты с исходно сопоставимыми клиническими критериями опухоли (T1-2N0M0) регистрировался значительный разброс в распределении прогностических и предиктивных маркеров.

Данные о положительных маркерах CK 14, FOXA1, FOXP3, PDL1, P53, SMA, AR, E-cadherin, CD4, CD8, CK 5\6, EGFR у пациенток исследуемой популяции приведены в Таблице 4.

Таблица 3 – Распределение прогностических и предиктивных маркеров рака молочной железы в исследуемой популяции

Маркер	n/N (%)*
Возраст на момент операции:	
≥ 50 лет	812/1175 (69,1)
<50 лет	363/1175 (30,9)
Степень дифференцировки G:	
G2	479/1008 (47,5)
G3	372/1008 (36,9)
G1	157/1008 (15,6)
Экспрессия ЭР, баллы по шкале Allred:	
0	381/741 (51,4)
4–6	21/741 (2,8)
7–8	339/741 (45,7)
Экспрессия ПР, баллы по шкале Allred:	
0	424/741 (57,2)
3–6	55/741 (7,4)
7–8	262/741 (35,4)

Маркер	n/N (%)*
Клинико-морфологические критерии опухоли по pTNM:	
T1N0M0	671/1216 (55,2)
T2N0M0	545/1216 (44,8)
Уровень экспрессии HER2, баллы:	
0	544/771 (70,6)
1	89/771 (11,5)
2	71/771 (9,2)
3	67/771 (8,7)
Уровень экспрессии Ki-67:	
≥5 %	563/732 (76,9)
<5 %	169/732 (23,1)
Уровень экспрессии Ki-67 с пограничным значением 13 %:	
<13 %	385/732 (52,6)
≥13 %	347/732 (47,4)
Размер опухоли:	
<1 см	20/1133 (1,8)
1–2 см	524/1133 (46,2)
>2 см	589/1133 (52,0)

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

Таблица 4 – Распределение маркеров CK14, FOXA1, FOXP3, PDL1, P53, SMA, AR, E-cadherin, CD4, CD8, CK5\6, EGFR в исследуемой популяции

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

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

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

Средний ($\pm$ SD) возраст пациенток в пременопаузальной группе составил $43,21 \pm 4,95$ года, в постменопаузальной группе – $61,22 \pm 7,80$ года.

Сравнительный межгрупповой анализ не выявил статистически значимых различий по уровням экспрессии ЭР, ПР и Ki-67 у женщин двух сравниваемых возрастных групп ($p > 0,05$). Доли опухолей с соответствующими степенями дифференцировки были также сопоставимы (Таблица 5). При этом преобладающей была степень G2, которая была диагностирована у 46,26 % женщин пременопаузального возраста и у 48,39 % пациенток старше 50 лет. Несмотря на отсутствие статистически значимых различий, отмечена тенденция к преобладанию степени G1 в когорте более молодых женщин (18,03 % против 13,93 %).

Последующий анализ не выявил статистически значимых различий между сравниваемыми группами женщин по степени экспрессии генов-маркеров РМЖ (Таблица 5). Распределение по ПР-статусу значимо не различалось в сравниваемых возрастных группах женщин. Однако у женщин в возрасте до 50 лет доля ПР-позитивных опухолей со степенью окрашивания 7–8 баллов была несколько выше (40,09 % против 33,20 %), а в более старшей возрастной группе отмечалась тенденция к превалированию ПР-резистентных новообразований (58,14 % против 54,50 %). Статистически значимых различий между возрастными группами по параметрам HER2 статуса и уровню Ki-67 выявлено не было. Вместе с тем, у женщин молодого возраста отмечалась тенденция к более частым случаям уровня Ki-67 <5 % (24,06 % против 22,92 %), а у пациенток старше 50 лет – тенденция к превалированию уровня Ki-67 «13 % и более» (47,46 % против 45,75 %).

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

Структуризация маркеров РМЖ по уровню злокачественности в когортах женщин разного возраста и анализ распределения редких маркеров также не выявили значимых различий.

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

Таблица 5 – Рутинные опухолевые маркеры в возрастных группах <50 лет и ≥50 лет

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

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

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

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

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

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

анализ показал, что по мере увеличения степени злокачественности РМЖ прогрессивно увеличивалась доля пациенток с экспрессией гена Ki-67 >5 % (с 56,86 % до 88,37 %) ($p < 0,0001$).

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

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

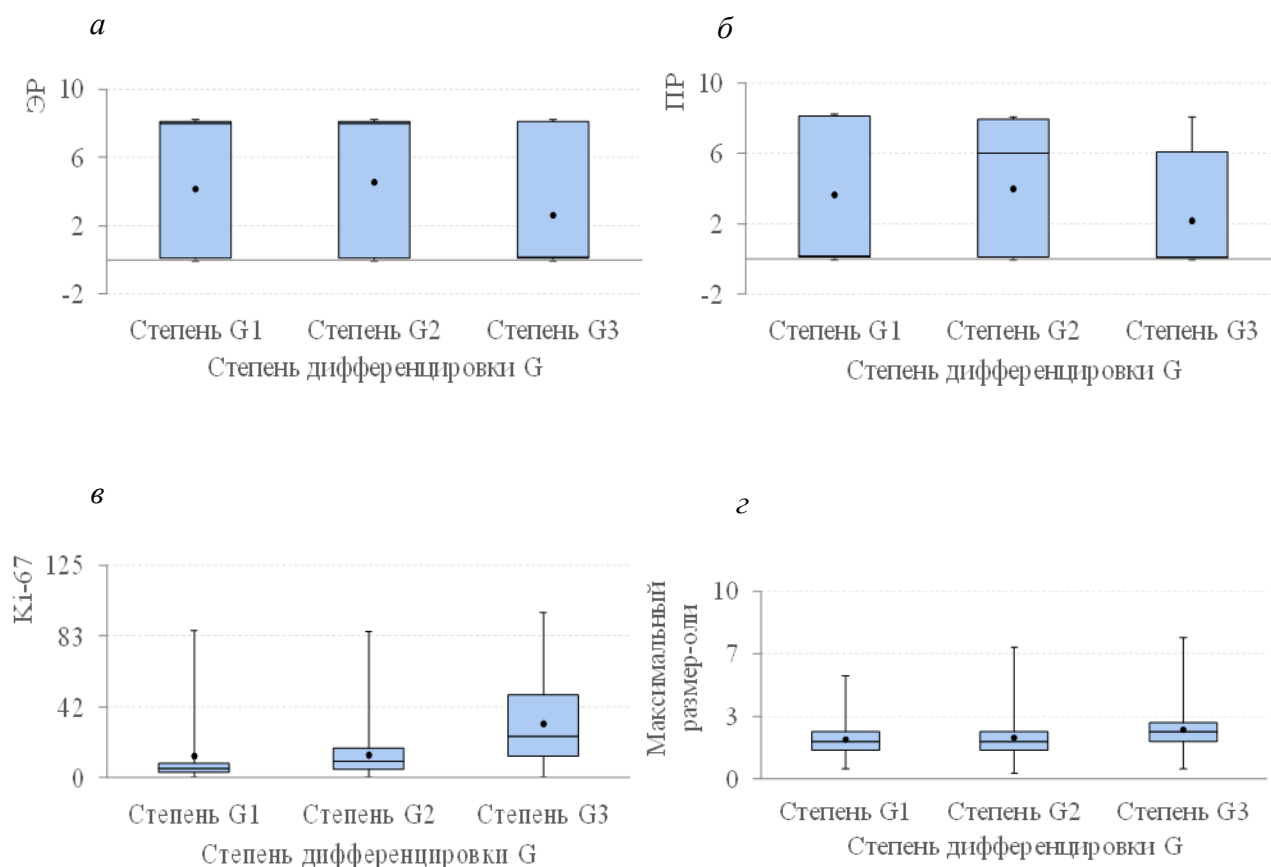


Рисунок 3 – Диаграммы размаха экспрессии ЭР (а), ПР (б), Ki-67-антигена (в) и максимального размера новообразования (г) в зависимости от степени дифференцировки опухоли G

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

Число женщин в подгруппах с низкой (<13 %) и высокой (≥ 13 %) экспрессией гена Ki-67 было сопоставимым – 52,6 и 47,4 % соответственно. Возраст пациенток на момент операции в обеих сравниваемых когортах был сопоставим – $56,29 \pm 11,17$ года (Ki-67 <13 %) и $55,22 \pm 10,37$ года (Ki-67 ≥ 13 %, $p = 0,2490$).

Установлено, что рецепторный статус опухоли, оцениваемый по показателям ЭР и ПР, и уровень экспрессии гена Ki-67 носили разнонаправленный характер (Рисунок 4). При низкой активности гена Ki-67 экспрессия ЭР и ПР была выше в среднем более чем в 1,5 раза, чем при значениях Ki-67 ≥ 13 %: среднее ($\pm$ SD) значение уровня экспрессии ЭР составляло $6,10 \pm 3,32$ против $3,79 \pm 3,97$, уровня экспрессии ПР – $5,19 \pm 3,59$ против $3,10 \pm 3,77$ ($p < 0,0001$).

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

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

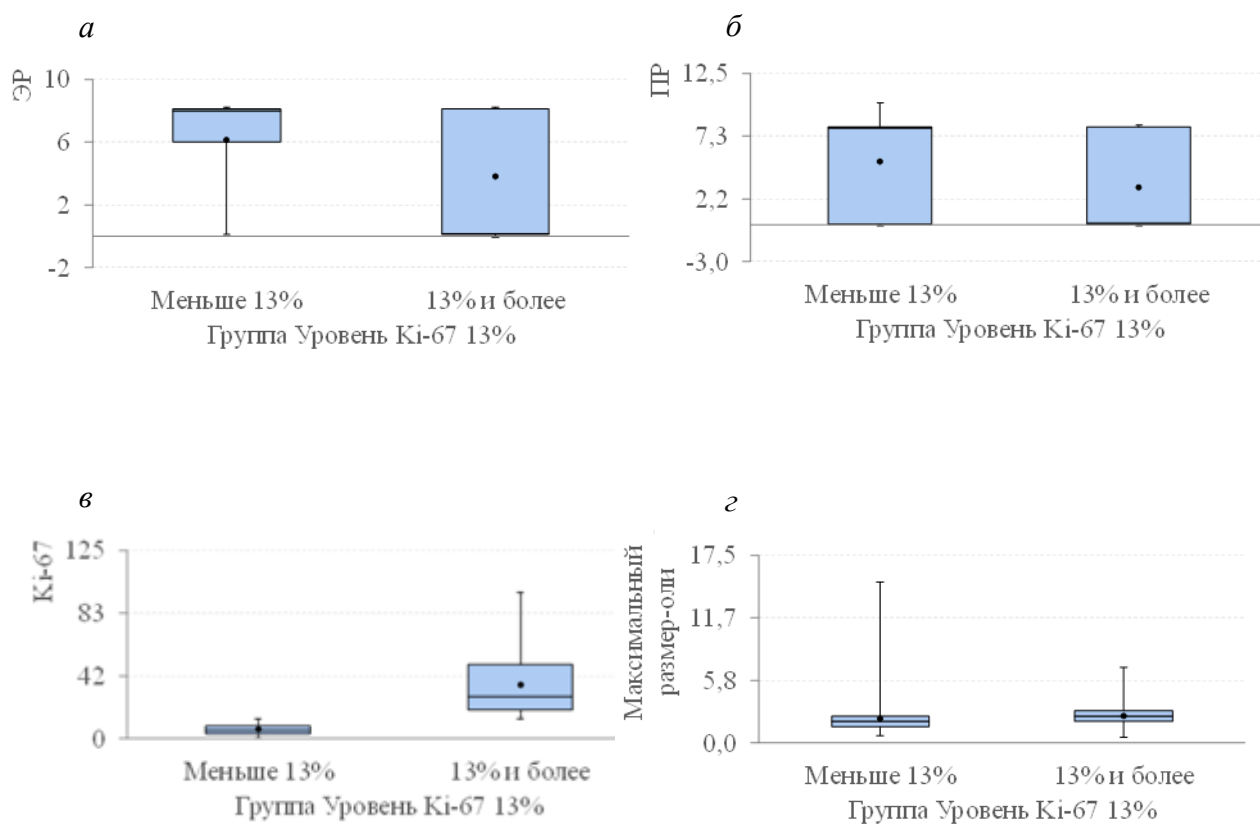


Рисунок 4 – Диаграммы размаха экспрессии ЭР (а), ПР (б), Ki-67-антигена (в) и максимального размера новообразования (г) в зависимости от уровня экспрессии гена Ki-67 (с пограничным значением 13 %)

Анализ распространенности опухолей различной степени злокачественности в когортах с низким и высоким уровнем экспрессии гена Ki-67 выявил наличие статистически значимой взаимосвязи ($p < 0,0001$). При уровне Ki-67 $< 13\%$ отмечалось преобладание степени дифференцировки клеток G2 (56,70 %). Активация гена Ki-67 сопровождалась увеличением частоты степени гистологической злокачественности ткани G3 (с 19,7 % до 59,4 %) (Рисунок 5).

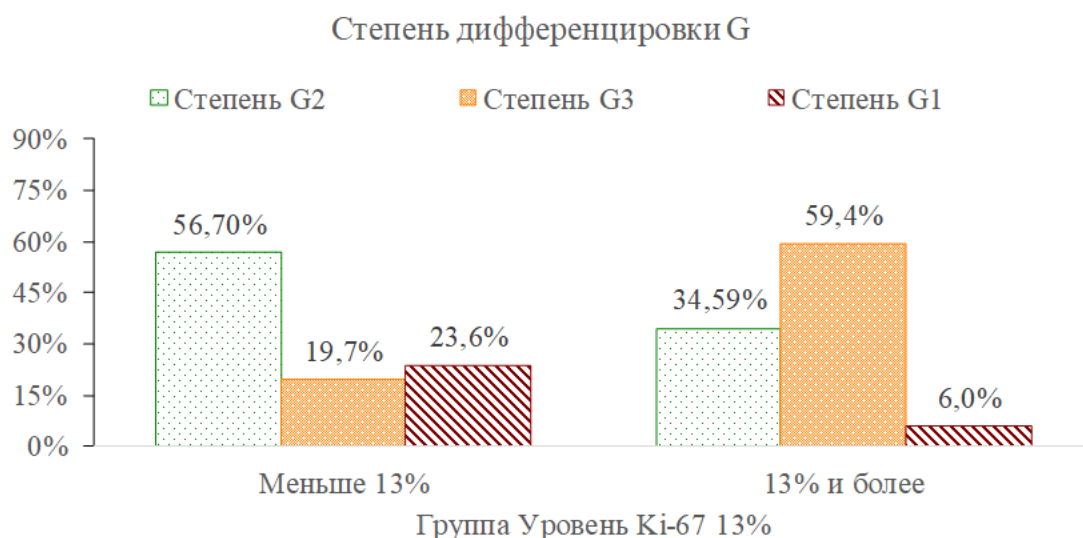


Рисунок 5 – Распространенность опухолей различной степени гистологической злокачественности (G₁–G₃) в когортах с низкой и высокой экспрессией гена Ki-67

Для когорты с низким уровнем Ki-67 по сравнению с когортой Ki-67 $\geq 13\%$ было характерно преобладание опухолей с максимальной экспрессией ЭР (7–8 баллов, $p < 0,0001$), ПР (7–8 баллов, $p < 0,0001$) и более высокая частота встречаемости HER2-негативных форм опухоли ($p = 0,0007$).

Анализ прогностической значимости клинико-морфологических характеристик опухоли по классификации pTNM показал преобладание стадии T1N0M0 в когорте со значением Ki-67 $< 13\%$ (62,34 % против 37,7 %). Увеличение экспрессии Ki-67 сопровождалось ростом злокачественности опухоли ($p < 0,0001$).

Анализ патоморфологических и иммуногистохимических характеристик опухоли в зависимости от рецепторного статуса

Анализ прогностической значимости рецепторного статуса эстрогенов продемонстрировал последовательный рост критериев по мере увеличения уровня экспрессии ЭР (Рисунок 6, $p < 0,0001$). Полученная закономерность, вероятно, отражает степень дифференцировки новообразования. В таком случае ожидаемо, что увеличение уровня ЭР и экспрессии гена Ki-67 описывает обратная зависимость: средний ($\pm$ SD) уровень экспрессии гена

Ki-67 в когортах ЭР 0, 4–6 и 7–8 баллов составил $31,39 \pm 27,25$, $13,50 \pm 17,14$ и $12,56 \pm 12,57$ соответственно ($p < 0,0001$). Наименьший размер опухоли имели женщины с максимальной экспрессией ЭР: средний ($\pm$ SD) размер опухоли в когортах ЭР 0, 4–6 и 7–8 баллов составил $2,50 \pm 1,20$, $2,64 \pm 0,89$ и $2,28 \pm 0,84$ соответственно.

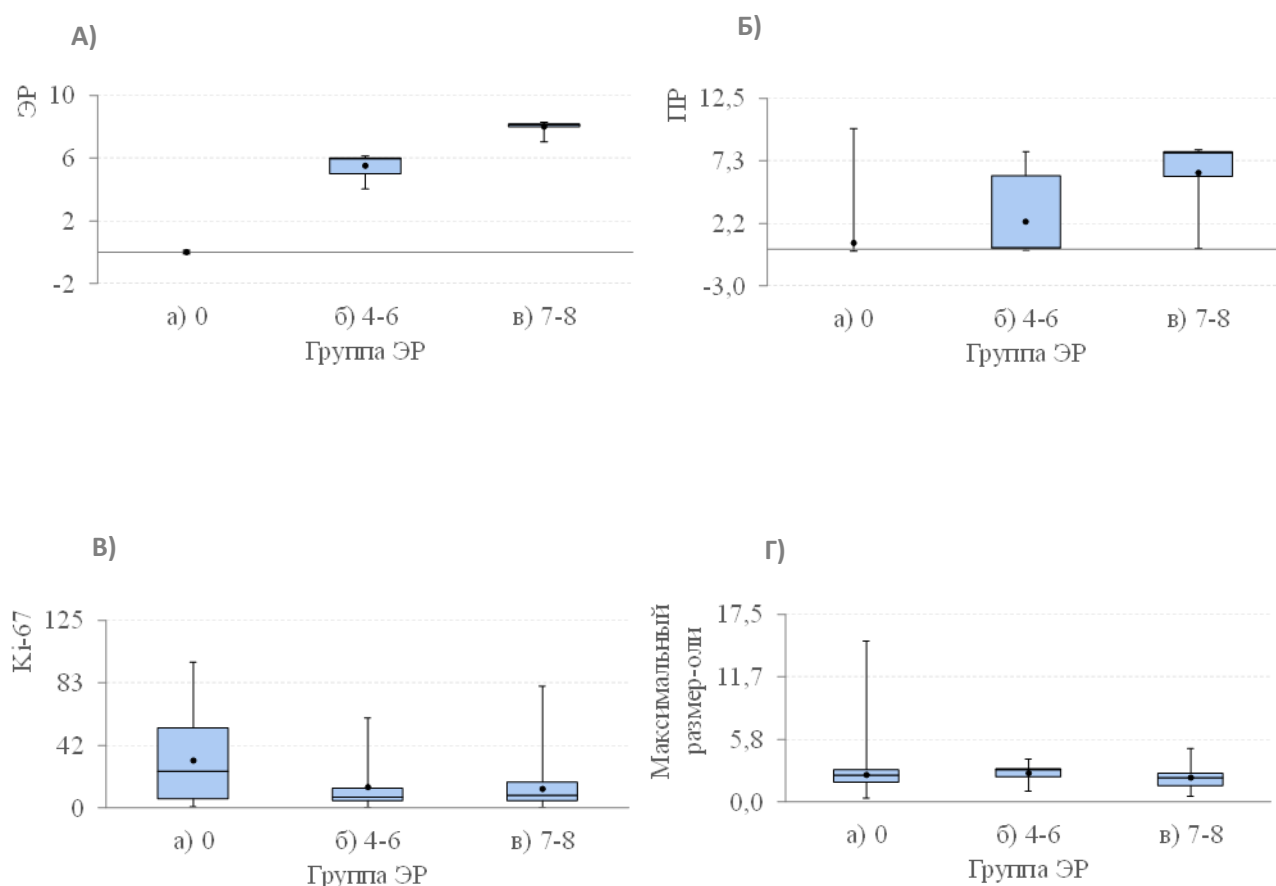


Рисунок 6 – Диаграммы размаха показателей ЭР (А), ПР (Б), Ki-67 (В) и максимального размера опухоли (Г) в зависимости от уровня экспрессии эстрогеновых рецепторов (ЭР)

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

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

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

При сравнительном анализе уровня экспрессии Ki-67 ($<5\%$ и $\geq 5\%$) в когортах с различной экспрессией ЭР статистически значимых межгрупповых различий выявлено не было ($p = 0,1346$). При пограничном значении Ki-67, равном 13 %, были установлены статистически значимые различия в уровне экспрессии данного маркера в группах с разным значением ЭР. В когорте женщин с ЭР-негативными формами РМЖ избыточная активность гена Ki-67 ($\geq 13\%$) двукратно превышала типы опухоли с низкой экспрессией описываемого маркера (64,9 % против 33,6 %). Напротив, при увеличении чувствительности опухоли к эстрогенам продукция маркера Ki-67 снижалась и преобладали типы РМЖ с экспрессией гена менее 13 %. Взаимосвязь между изучаемыми ЭР и Ki-67 подгруппами была статистически значимой ($p < 0,0001$).

Сравнительный анализ размеров опухоли и клинико-морфологических параметров злокачественности процесса по классификации pTNM не выявил статистически значимых межгрупповых различий в зависимости от уровня экспрессии ЭР.

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

Первый этап оценки включал однофакторный анализ факторов риска летального исхода для комплекса показателей. Результаты представлены в Таблицах 6-9.

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

Таблица 6 – Однофакторный анализ факторов риска в отношении переменной «Исход, смерть»

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

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

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

Таблица 7 – Однофакторный анализ ключевых рутинных факторов риска в отношении переменной «Исход, смерть 5 лет»

Фактор	Исход 5 лет: частота (риск, %)		Изменение риска (95 % ДИ)	Относитель- ный риск (95 % ДИ)	Уровень <i>p</i>
	Фактор: Нет	Фактор: Есть			
Ki-67 $\geq 32,2$	7 (1,2%)	17 (11,6%)	10,4 (5,1; 15,7)	9,55 (4,04; 22,59)	<0,0001
Группа Уровень Ki-67 13 % (13 % и более)	5 (1,3%)	19 (5,5%)	4,2 (1,5; 6,9)	4,18 (1,58; 11,06)	0,0017
Максимальный размер опухоли $\geq 3,7$	36 (3,5%)	8 (9,9%)	6,4 (-0,2; 13,0)	2,83 (1,36; 5,88)	0,0045

Фактор	Исход 5 лет: частота (риск, %)		Изменение риска (95 % ДИ)	Относитель- ный риск (95 % ДИ)	Уровень p
	Фактор: Нет	Фактор: Есть			
Риск по степени дифференцировки G и Ki-67 (Высокий риск)	1 (0,8%)	11 (4,9%)	4,1 (0,8; 7,3)	5,92 (0,77; 45,27)	0,0489
Степень дифференцировки G (Степень G ₃ , Степень G ₁)	11 (2,4%)	24 (4,6%)	2,3 (0,0; 4,5)	1,96 (0,97; 3,96)	0,0545
Уровень Ki-67 (5 % и более)	2 (1,2%)	22 (4,0%)	2,8 (0,4; 5,1)	3,27 (0,78; 13,76)	0,0838
HER2 (3)	23 (3,3%)	5 (7,5%)	4,1 (-2,3; 10,6)	2,24 (0,88; 5,71)	0,0867
Рецепторный статус по ЭР и ПР (Рецептор-негативный статус по ЭР и ПР)	6 (2,2%)	16 (4,7%)	2,5 (-0,3; 5,4)	2,18 (0,87; 5,50)	0,0888
Группа ЭР (а) 0, б) 4-6)	8 (2,4%)	18 (4,6%)	2,2 (-0,4; 4,9)	1,93 (0,85; 4,39)	0,1081

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

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

Таблица 8 – Однофакторный анализ 19 ключевых факторов влияния на целевой показатель «Исход смерть 5 лет»

Фактор	Исход смерть 5 лет: частота (риск, %)		Изменение риска (95 % ДИ)	Относитель- ный риск (95 % ДИ)	Уровень p
	Фактор: Нет	Фактор: Есть			
СК5 (Есть)	19 (3,1%)	7 (8,9%)	5,8 (-0,6; 12,2)	2,88 (1,25; 6,64)	0,0106
FOXA1 < 8,0	17 (2,9%)	7 (7,6%)	4,7 (-0,9; 10,3)	2,6 (1,11; 6,10)	0,0244
P53 (Есть)	10 (4,1%)	2 (16,7%)	12,6 (-8,7; 33,8)	4,05 (1,00; 16,48)	0,0450
Ki-67 $\geq$ 32,2	7 (1,2%)	17 (11,6%)	10,4 (5,1; 15,7)	9,55 (4,04; 22,59)	<0,0001
Степень дифференцировки G (Степень G ₃ , Степень G ₁)	11 (2,4%)	24 (4,6%)	2,3 (0,0; 4,5)	1,96 (0,97; 3,96)	0,0545
Клеточная плотность < 3 940,8	22 (3,8%)	1 (0,8%)	-3,0 (-5,2; -0,9)	0,2 (0,03; 1,49)	0,0788
HER2 (Позитив)	28 (3,5%)	5 (6,8%)	3,3 (-2,6; 9,2)	1,95 (0,78; 4,91)	0,1525

Фактор	Исход смерть 5 лет: частота (риск, %)		Изменение риска (95 % ДИ)	Относитель- ный риск (95 % ДИ)	Уровень <i>p</i>
	Фактор: Нет	Фактор: Есть			
PTNM (T2N0M0)	21 (3,2%)	25 (4,7%)	1,5 (-0,8; 3,7)	1,46 (0,83; 2,58)	0,1898
AR < 2,0	16 (2,8%)	15 (4,4%)	1,6 (-1,0; 4,2)	1,57 (0,79; 3,14)	0,1960
ПР < 8,0	6 (2,4%)	20 (4,2%)	1,8 (-0,9; 4,4)	1,73 (0,70; 4,25)	0,2248
ЭР < 8,0	16 (3,2%)	24 (4,5%)	1,2 (-1,1; 3,6)	1,39 (0,75; 2,58)	0,2973
CD4 ≥ 1,0	3 (2,1%)	29 (3,9%)	1,8 (-1,0; 4,6)	1,84 (0,57; 5,95)	0,2988
EGFR (Есть)	27 (3,4%)	5 (5,1%)	1,7 (-2,8; 6,2)	1,5 (0,59; 3,82)	0,3899
CD8 < 2,0	9 (4,8%)	23 (3,5%)	-1,3 (-4,7; 2,1)	0,73 (0,35; 1,56)	0,4197
SMA (Есть)	11 (4,4%)	0 (0,0%)	-4,4	0,00	0,4997
E-cadherin (Есть)	6 (3,6%)	25 (4,2%)	0,6 (-2,6; 3,8)	1,16 (0,49; 2,79)	0,7318
PDL (Есть)	12 (3,9%)	2 (4,5%)	0,7 (-5,8; 7,2)	1,17 (0,27; 5,07)	0,8299
FOXP3 < 3,0	5 (3,5%)	8 (3,8%)	0,3 (-3,7; 4,3)	1,08 (0,36; 3,23)	0,8913
CK14 (Есть)	14 (3,4%)	1 (3,3%)	-0,1 (-6,8; 6,6)	0,97 (0,13; 7,14)	0,9773

Таблица 9 – Однофакторный анализ 19 ключевых факторов влияния на целевой показатель «Исход смерть 10 лет»

Фактор	Исход, смерть: частота (риск, %)		Изменение риска (95 % ДИ)	Относитель- ный риск (95 % ДИ)	Уровень <i>p</i>
	Фактор: Нет	Фактор: Есть			
FOXP3 < 1,0	28 (14,2%)	44 (28,8%)	14,5 (5,9; 23,2)%	2,02 (1,32; 3,09)	0,0008
PTNM (T2N0M0)	93 (14,2%)	112 (20,9%)	6,8 (2,4; 11,1)%	1,48 (1,15; 1,90)	0,0021
CD8 < 1,0	79 (13,9%)	56 (21,2%)	7,4 (1,7; 13,0)%	1,53 (1,12; 2,09)	0,0073
ПР < 8,0	32 (13,0%)	99 (20,8%)	7,8 (2,3; 13,4)%	1,61 (1,11; 2,32)	0,0094
Степень дифференцировки G (Степень G3, G2)	14 (9,1%)	144 (17,3%)	8,2 (3,0; 13,4)%	1,9 (1,13; 3,20)	0,0110
Уровень Ki-67 (Меньше 2 %)	16 (30,2%)	96 (14,1%)	-16,1 (-28,7; -3,4)%	0,47 (0,30; 0,73)	0,0018

Фактор	Исход, смерть: частота (риск, %)		Изменение риска (95 % ДИ)	Относитель- ный риск (95 % ДИ)	Уровень <i>p</i>
	Фактор: Нет	Фактор: Есть			
E-cadherin (Есть)	18 (10,7%)	101 (16,8%)	6,1 (0,5; 11,6)%	1,57 (0,98; 2,51)	0,0536
AR < 3,0	57 (13,2%)	83 (17,5%)	4,3 (-0,4; 9,0)%	1,32 (0,97; 1,81)	0,0750
Клеточная плотность ≥ 5 869,7	59 (13,7%)	51 (18,1%)	4,4 (-1,1; 10,0)%	1,32 (0,94; 1,86)	0,1104
HER2 (Позитив)	121 (15,0%)	15 (20,3%)	5,3 (-4,2; 14,8)%	1,36 (0,84; 2,19)	0,2255
CD4 < 1,0	114 (15,5%)	27 (19,3%)	3,8 (-3,2; 10,8)%	1,25 (0,85; 1,82)	0,2625
FOXA1 < 8,0	74 (12,7%)	15 (16,3%)	3,6 (-4,5; 11,6)%	1,28 (0,77; 2,13)	0,3479
CK5 (Есть)	93 (15,0%)	15 (19,0%)	3,9 (-5,2; 13,0)%	1,26 (0,77; 2,06)	0,3623
P53 (Есть)	62 (25,5%)	2 (16,7%)	-8,8 (-30,6; 12,9)%	0,65 (0,18; 2,36)	0,4902
CK14 (Есть)	41 (10,0%)	4 (13,3%)	3,3 (-9,2; 15,8)%	1,33 (0,51; 3,46)	0,5674
ЭР < 8,0	83 (16,6%)	96 (17,8%)	1,2 (-3,4; 5,8)%	1,07 (0,82; 1,40)	0,6159
SMA (Есть)	66 (26,2%)	2 (20,0%)	-6,2 (-31,6; 19,2)%	0,76 (0,22; 2,68)	0,6614
EGFR (Есть)	119 (14,9%)	16 (16,3%)	1,4 (-6,3; 9,1)%	1,09 (0,68; 1,76)	0,7195
PDL (Есть)	67 (21,6%)	9 (20,5%)	-1,2 (-13,9; 11,6)%	0,95 (0,51; 1,76)	0,8610

Таблица 10 – Результаты пошаговой логистической регрессии для прогнозирования показателя «Исход, смерть»

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

Исходя из выделенных факторов были построены балльные шкалы с разным количеством факторов. При построении шкалы за каждый фактор, который присутствует у пациентки, начислялось по 1 баллу, при отсутствии данных – 0,5 балла. Названия шкал соответствовали количеству факторов, входящих в шкалу. Факторы всегда выбирались по порядку на основании влияния на прогнозируемую переменную «Исход, смерть». Сравнение этих шкал для использования в качестве модели, а также традиционной шкалы (на основе рутинных маркеров: T2NOMO, ПР<8, G2G, ЭР<8, HER2=3 и Ki-67>5 %) приведены в Таблице 11.

Таблица 11 –Результаты сравнения балльных шкал для прогноза показателя «Исход, смерть»

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

Примечание:

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

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

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

Традиционная шкала: T2NOMO, ПР<8, G2G, ЭР<8, HER2=3 и Ki-67>5 % (6 факторов)

На основании трех шкал (Шкала 8, Шкала 9, Шкала 10) были построены 100-балльные модели «Регрессия 8», «Регрессия 9», «Регрессия 10» соответственно. В Таблице 12 представлены результаты сравнения всех моделей для прогнозирования целевого показателя.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что предложенные балльные и регрессионные шкалы имеют лучшие показатели, чем традиционная шкала. Моделью, которая наилучшим образом предсказывает показатель «Исход, смерть», является «Регрессия 10».

Таблица 12 –Результаты сравнения балльных шкал и шкал на основе пошаговой регрессии для прогноза показателя «Исход, смерть»

Фактор	Точка отсечения	AuROC	Чувствительность	Специфичность	Эффективность	Хи-квадрат
Регрессия 10	51,0	0,67	59,22%	66,34%	62,78%	47,4491
Шкала 8	3,5	0,67	76,70%	49,11%	62,90%	46,0957
Шкала 9	4,5	0,67	67,48%	58,22%	62,85%	45,4534

Регрессия 8	45,5	0,67	72,82%	52,77%	62,79%	44,8545
Регрессия 9	46,0	0,67	72,33%	52,28%	62,30%	41,5017
Шкала 10	6,0	0,65	64,56%	57,33%	60,94%	32,9671
Традиционная 100-балльная шкала	41,0	0,60	82,04%	32,77%	57,41%	17,7850
Традиционная шкала	4,0	0,57	45,63%	61,98%	53,81%	4,1548

Традиционная прогностическая шкала

Традиционная шкала состоит из шести показателей, являющихся рутинными маркерами, используемыми в клинической практике: «T2N0M0», «ПР<8», «G2G3», «ЭР<8», «HER2=3» и «Ki-67>5 %». В соответствии с предварительно полученной 100-балльной прогностической шкалой для каждого из шести указанных факторов был определен коэффициент, показывающий силу влияния фактора на ключевой показатель. При значении уровня экспрессии прогестерона менее 8 фактор оценивали в 24 балла, для стадии заболевания T2N0M0 показатель оценивали в 18 баллов, при значении уровня экспрессии HER2 равному 3 фактор оценивали в 20 баллов, для степени дифференцировки опухоли G2 или G3 фактор оценивали в 13 баллов, при значении уровня экспрессии эстрогена равному 8 фактор оценивали в 12 баллов, при значении уровня экспрессии пролиферативной активности в опухоли Ki-67 более 5 % фактор оценивали в 13 баллов. В том случае, если значение какого-либо прогностического фактора не соответствует установленным значениям, такой фактор оценивался 0 баллов (Таблица 13).

Таблица 13 – Традиционная прогностическая балльная шкала

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

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

В дальнейшем для каждой группы риска проводили анализ распределения пациентов трех подгрупп: (1) ЭР+, ПР±, HER2–; (2) HER2 +; (3) ЭР–, ПР–, HER2–. Результаты представлены на Рисунке 7. Благоприятный прогноз ассоциировался с высокой экспрессией ЭР и ПР-позитивным статусом. Для группы низкого риска прогрессирования злокачественного процесса активация HER2 была не характерна. Напротив, неблагоприятный прогноз развития заболевания сопровождался повышенной экспрессией HER2 и снижением экспрессии рецепторов стероидных гормонов.

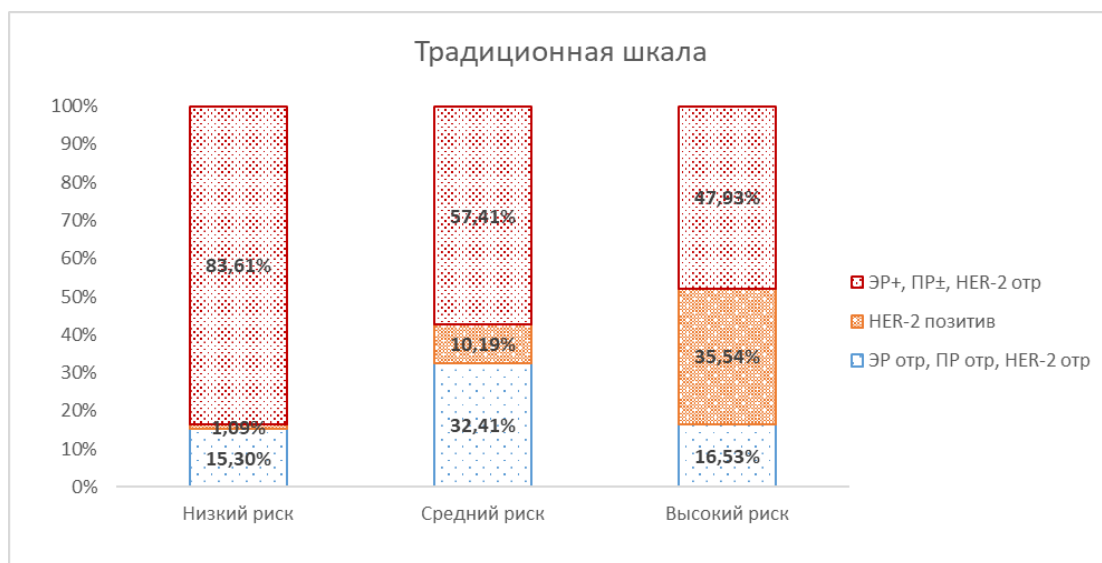


Рисунок 7 – Распределение пациенток с разным рецепторным статусом в подгруппах низкого, среднего и высокого риска летального исхода по традиционной шкале

Результаты оценки летальности за 5 лет и 10 лет в группах различного риска по традиционной шкале приведены на Рисунке 8. Летальность в течение 10 лет в группе высокого риска была в 2,5 раза выше таковой в группе низкого риска (25,7 % против 10,0 %).

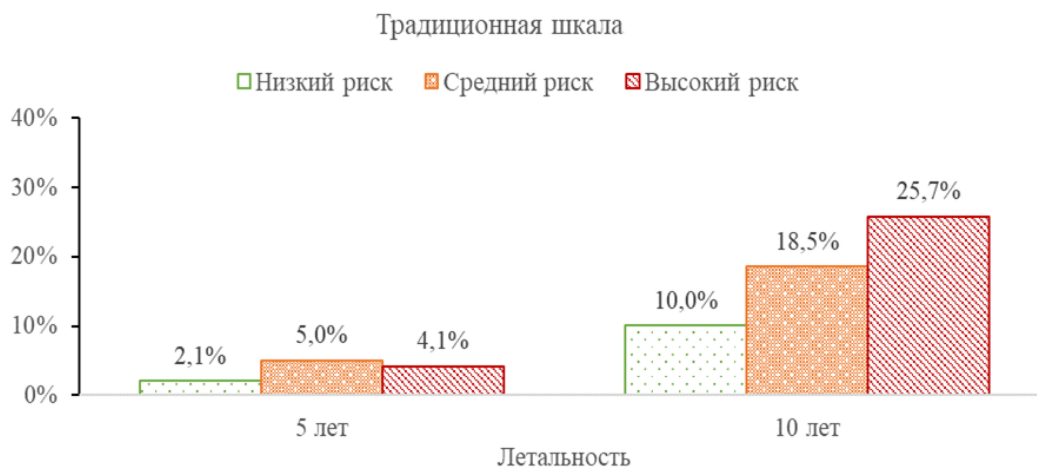


Рисунок 8 – Летальность в группах низкого, среднего и высокого риска по традиционной шкале

Результаты анализа выживаемости для пациенток групп высокого и низкого риска по традиционной шкале приведены на Рисунке 9 ($p = 0,0004$, лог-ранговый тест). Показатель 10-летней выживаемости составил 84,1 % и 91,7 % для групп высокого и низкого риска, соответственно. Отношение рисков (hazard ratio) в регрессионной модели Кокса группы высокого риска к группе низкого риска составило 2,17 (95 % ДИ (1,44; 3,25)).

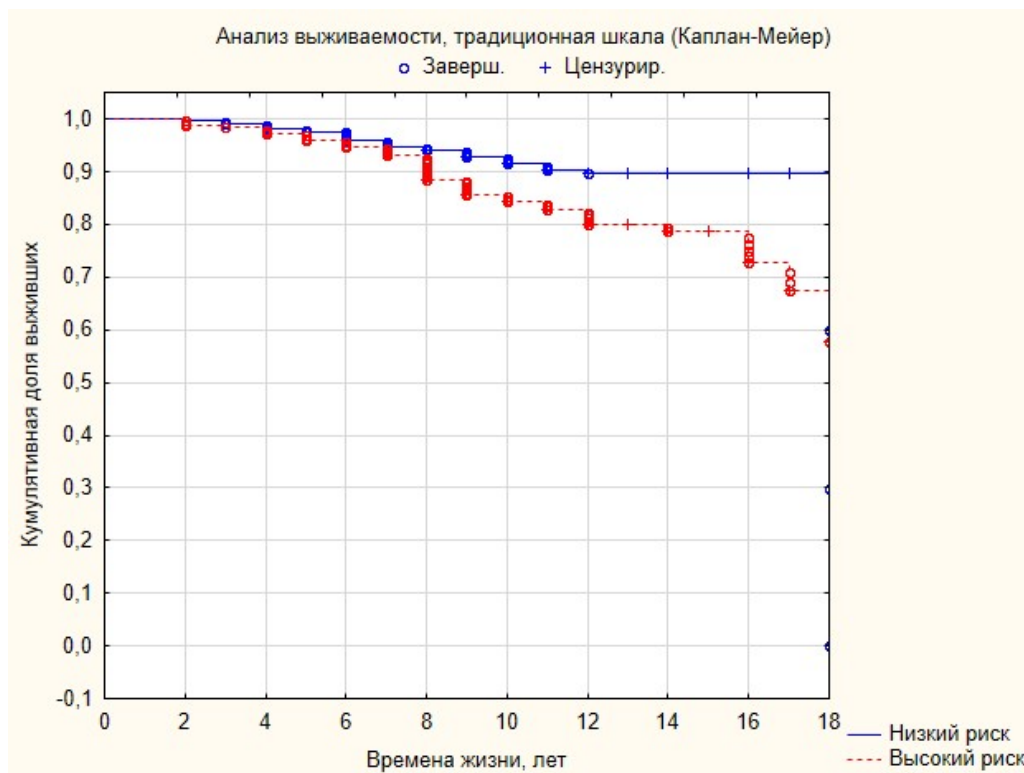


Рисунок 9 – Кривые Каплана – Майера, отражающие общую выживаемость для групп высокого и низкого риска по традиционной шкале

Результаты анализа общей выживаемости в исследуемой популяции в зависимости от проведения адъювантной химиотерапии приведены на Рисунке 10 ($p = 0,0009$, лог-ранговый тест). Показатель 10-летней выживаемости составил 91,1 % в группе с химиотерапией и 87,3 % в группе без химиотерапии. Отношение рисков (hazard ratio) в регрессионной модели Кокса группы без химиотерапии к группе с химиотерапией составило 1,63 (95 % ДИ (1,21; 2,19)).

Результаты оценки эффективности адъювантной химиотерапии в объединенной группе среднего и высокого риска по традиционной шкале продемонстрировал статистически значимые преимущества адъювантной химиотерапии в когортах пациентов с высоким и средним рисками неблагоприятного развития заболевания ($p < 0,0131$, лог-ранговый тест). Показатель 10-летней выживаемости составил 88,9 % в группе с химиотерапией и 86,2 % в группе без химиотерапии. Отношение рисков (hazard ratio) в регрессионной модели Кокса группы без химиотерапии к группе с химиотерапией составило 1,48 (95 % ДИ (1,07; 2,04)).

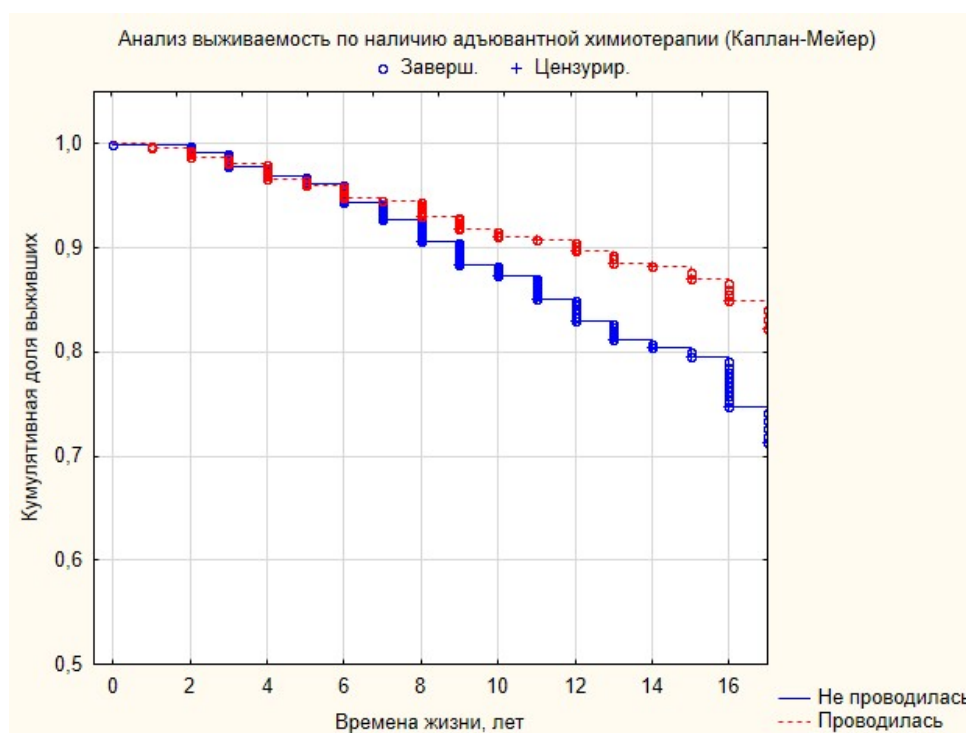


Рисунок 10 – Кривые Каплана – Майера, отражающие общую выживаемость в зависимости от адъювантной химиотерапии

Регрессионная прогностическая шкала

Установлено, что моделью, которая наилучшим образом предсказывает показатель «Исход, смерть», является регрессионная шкала, учитывающая 10 факторов, включая малоизученные иммуногистохимические маркеры РМЖ (Таблица 14). Каждый фактор из таблицы может принимать значение 0, если у пациента не выполняется условие, 1 – если условие выполняется и 0,5 если данных по показателю отсутствуют. Соответствующие значения умножаются на коэффициенты и складываются по всем факторам. Чем больше баллов набирается по шкале, тем выше риск наличия соответствующего фактора.

Таблица 14 – Прогностическая шкала альтернативных маркеров РМЖ

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

Фактор	Коэффициент	100 баллов	Округленные
CD4>0	0,179	3,189	3
Сумма	5,607	100	100

Согласно количеству набранных баллов, все пациенты были разделены на три группы риска летального исхода: до 40 баллов – низкий риск, от 40 до 60 баллов – средний риск, более 60 баллов – высокий риск. Высокий риск прогрессирования злокачественного процесса был верифицирован только у 11,3 % участниц исследования. Низкий и средний риск были выявлены для 27,0 % и 61,7 % участниц соответственно.

Анализ рецепторного статуса опухоли в когортах с разным прогностическим риском по количеству баллов показал, что низкий риск прогрессирования злокачественного процесса у 85,53 % женщин был ассоциирован с положительным стероидным статусом по ЭР/ПР и отрицательной экспрессией HER2 (Рисунок 11). Доля данного типа опухоли, в среднем, в 1,5 раза снижалась по мере увеличения риска прогрессирования РМЖ, достигая 55,89 % и 55,24 % соответственно в когортах со средним и высоким риском неблагоприятного развития заболевания.

РМЖ, для которого был характерен отрицательный стероидный статус по ЭР/ПР и экспрессия HER2, был верифицирован только у 13,16 % когорты с благоприятным развитием заболевания. По мере увеличения риска прогрессирования РМЖ доля женщин с данной характеристикой рецепторного статуса, в среднем, двукратно увеличивалась.

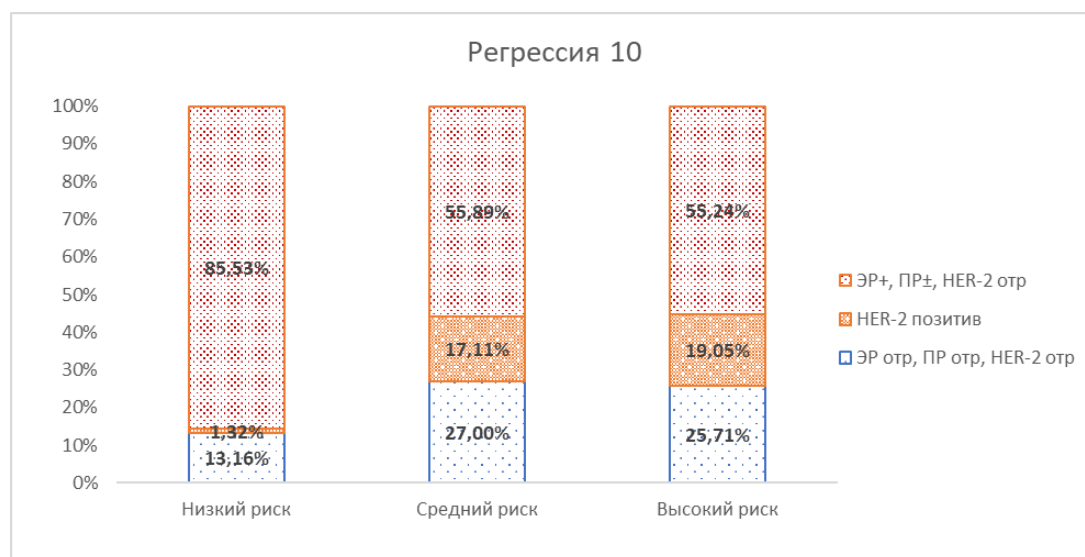


Рисунок 11– Распределение пациенток с разным рецепторным статусом в подгруппах низкого, среднего и высокого риска летального исхода по традиционной шкале

Результаты оценки летальности за 5 лет и 10 лет в группах различного риска по регрессионной шкале приведены на Рисунке 12. Летальность в течение 10 лет в группе высокого риска была в 2,5 раза выше таковой в группе низкого риска (25,7 % против 10,0 %). Пятилетняя летальность, достигнув максимальных значений в группе высокого риска, составила только 5,8 %. Относительно пятилетнего срока наблюдения на временном отрезке 10 лет отмечался рост летальности в три раза в группе низкого риска и более, чем в четыре раза в когорте со средним риском. В когорте с высоким риском неблагоприятного течения заболевания летальность на 10-летнем отрезке времени достигла 30,4 %, пятикратно превысив значения пятилетней летальности.

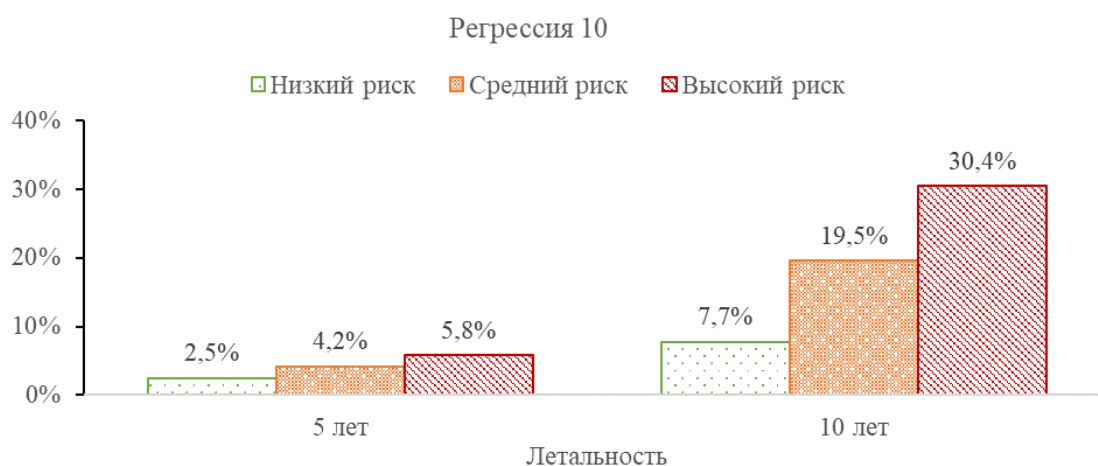


Рисунок 12 – Летальность в группах низкого, среднего и высокого риска по регрессионной шкале

Таким образом, если при применении традиционной шкалы отличия между группами низкого и среднего риска регистрировались при сроке наблюдения 10 лет, то анализ летальности с применением новой шкалы позволил идентифицировать различия между группами низкого и высокого риска на отрезке 5 лет.

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

Результаты оценки эффективности адъювантной химиотерапии в объединенной группе среднего и высокого риска летального исхода по регрессионной шкале представлены на Рисунке 14. Пациенты групп среднего и высокого рисков (от 40 баллов и выше), получающие адъювантную химиотерапию, имели статистически значимые отличия выживаемости ($p = 0,0057$). Показатель 10-летней выживаемости составил 88,6 % в группе с химиотерапией и 84,9 % в группе без

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

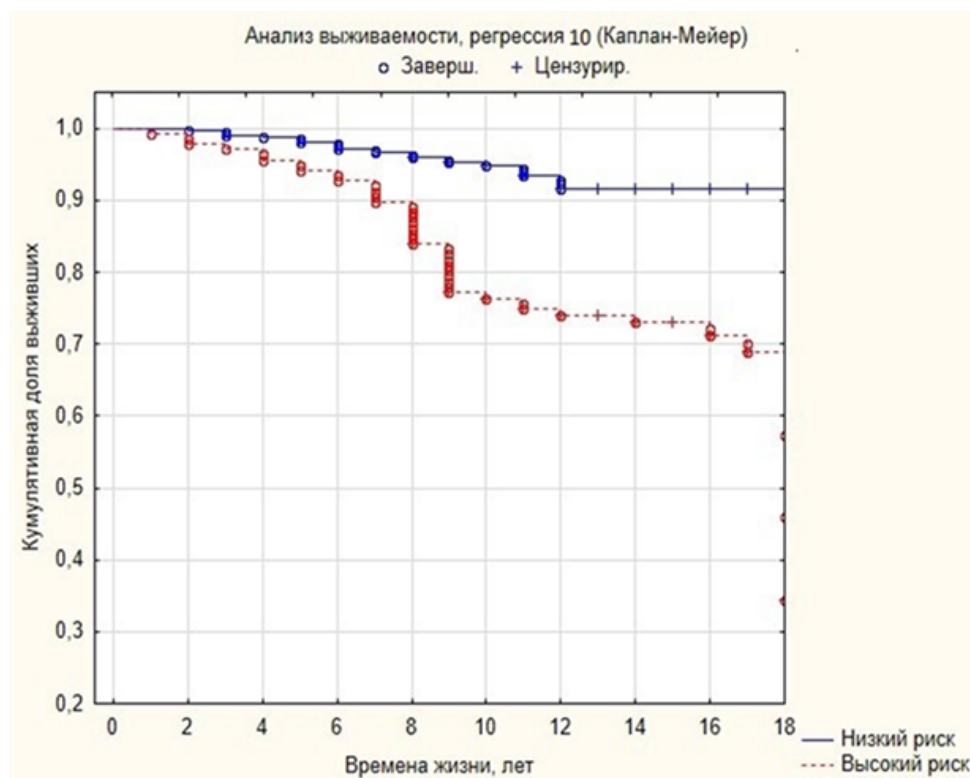


Рисунок 13 – Кривые Каплана – Майера, отражающие общую выживаемость для групп высокого и низкого риска по регрессионной шкале

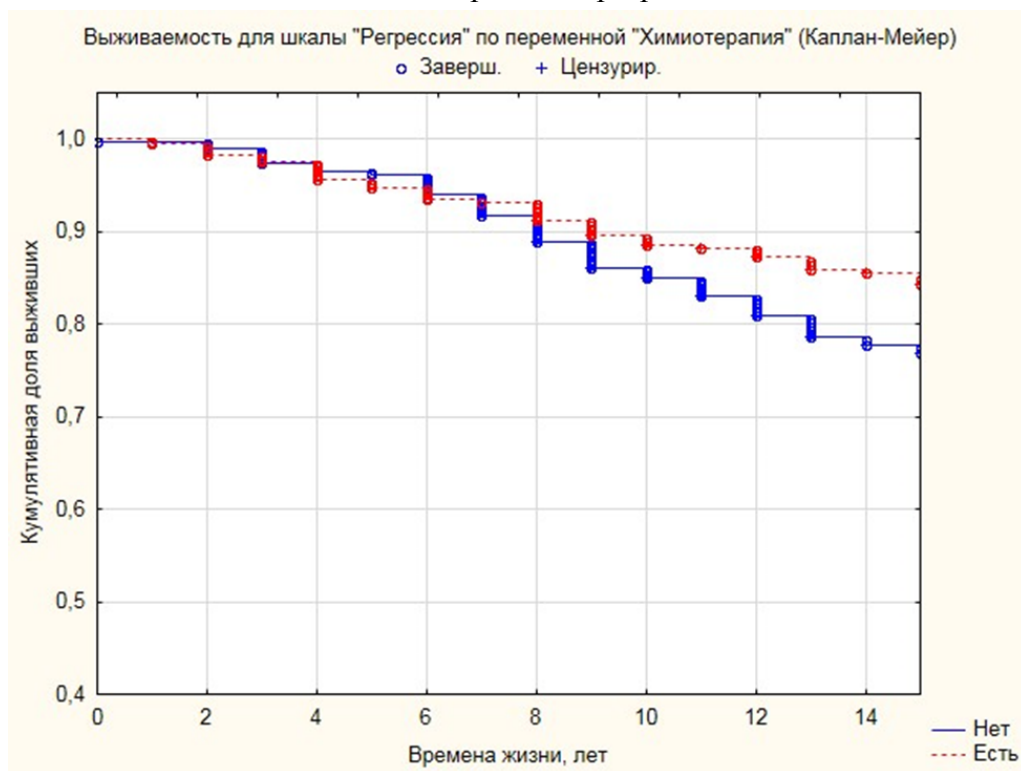


Рисунок 14 – Кривые Каплана – Майера, отражающие общую выживаемость в зависимости от адъювантной химиотерапии в объединенной группе среднего и высокого риска по регрессионной шкале

Результаты сравнения традиционной шкалы и новой шкалы для показателя «Исход, смерть» на 10-летнем этапе продемонстрировали достаточную чувствительность (58,05 %), специфичность (69,47 %) и эффективность (63,76 %) новой шкалы для прогнозирования неблагоприятного развития РМЖ (Таблица 15).

Таблица 15 – Результаты сравнения традиционной шкалы и регрессионной для показателя «Исход, смерть» на 10-летнем этапе

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

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

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

По результатам сравнений молекулярного подтипа опухоли, установленного на основании молекулярно-генетического анализа с использованием технологии nCounter, и суррогатного подтипа, определенного на основании данных ИГХ исследования в локальной лаборатории медицинского учреждения, в 84 образцах опухоли пациенток пре- и постменопаузального возраста с метастатическим РМЖ было выявлено 29 случаев (29/84, 34,5 %) расхождения оценки подтипа опухоли.

В 11 случаях расхождения относились к люминальным А и В подтипам РМЖ, что может оказать влияние на выбор оптимальной лекарственной терапии, однако при любой тактике назначенное лечение будет соответствовать утвержденным клиническим рекомендациям. В 18 случаях расхождения относились к подтипам опухоли РМЖ, для которых рекомендуются принципиально различные схемы лекарственной терапии.

Результаты оценки экспрессии отдельных генов

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

(перечень генов, рекомендуемых для исследования клиническими рекомендациями МЗ РФ)

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

В целом, уровень экспрессии *ESR1* по nCounter Analysis System коррелировал с результатами ИГХ исследования. В образцах с ЭР– статусом уровень экспрессии *ESR1* составлял от 52,42 до 26652,61 (медиана: 293,28; среднее ($\pm$ SD): 4869,70 (8823,17)), в образцах с ЭР+ статусом – от 304,30 до 86467,64 (медиана: 5560,13; среднее ($\pm$ SD): 11756,48 (15325,72)), различия между группами ЭР– и ЭР+ статуса были статистически значимыми ($p < 0,0001$) (Рисунок 15).

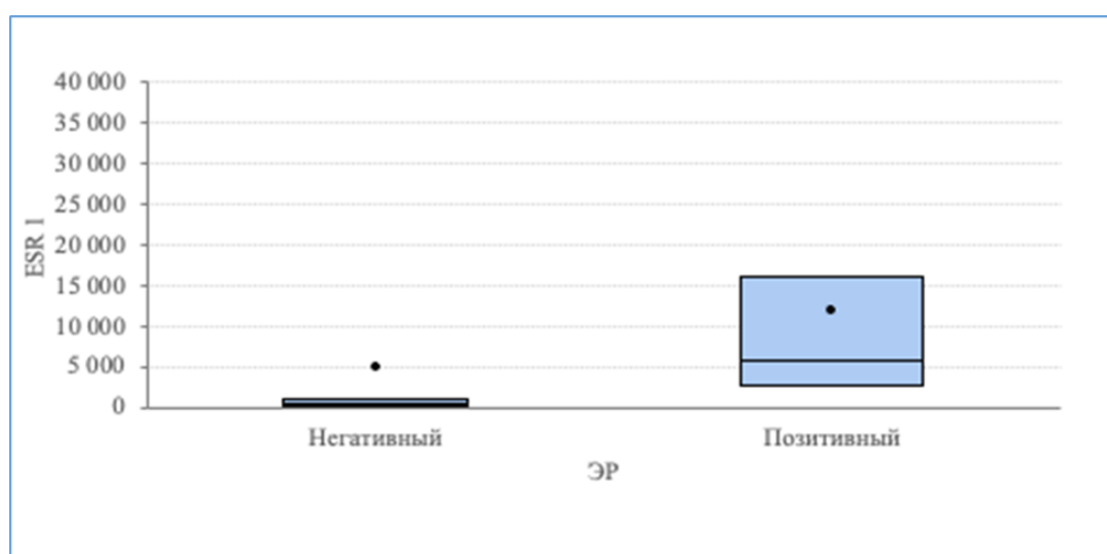


Рисунок 15 – Результаты оценки экспрессии *ESR1* в сравнении с оценкой ЭР статуса методом ИГХ

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

Уровень экспрессии *PIK3CA* варьировал от 323,59 до 3583,97. Уровни 323,59–1293,65, наблюдаемые для большинства исследуемых образцов, соответствовали оценке экспрессии «+1», 1293,65–2244,04 – «+2», выше 2244,04 – «+3». Согласно клиническим рекомендациям, пациенткам с гормонозависимым HER2– мРМЖ целесообразно определение мутации в гене *PIK3CA* для выбора оптимальной тактики лекарственной терапии. В связи с этим, был проведен генетический анализ (RT-PCR, секвенирование по Сенгеру) трех образцов опухолевой ткани с ЭР+, ПР+, HER2– статусом и экспрессией гена *PIK3CA* >2244,04, который подтвердил наличие мутации.

Уровень экспрессии *ERB2* варьировал от 252,32 до 128519,2. При сравнительном анализе с результатами ИГХ исследования HER2+ статус (ИГХ) расценивался как ложноположительный в случае значений экспрессии *ERB2* от 252,32 до 9196,25 (+1), а для HER2– статуса оценка считалась ложноотрицательной в случае значений экспрессии от 15022,46 (+2) и выше. Результаты дополнительного анализа показали, что уровень экспрессии *ERB2* по nCounter Analysis System коррелировал с результатами ИГХ оценки HER2 статуса. В образцах с HER2 статусом 0 баллов уровень экспрессии *ERB2* составлял от 583,93 до 22986,09 (медиана: 2841,31; среднее ($\pm$ SD): 4130,28 (3903,91)), статусом 1 балл – от 252,32 до 39315,20 (медиана: 3097,72; среднее ($\pm$ SD): 5258,62 (7431,21)), статусом 2 балла – от 2995,61 до 15022,46 (медиана: 8898,56; среднее ($\pm$ SD): 9053,16 (3664,86)), статусом 3 балла – от 819,72 до 128519,20 (медиана: 36025,32; среднее ($\pm$ SD): 43412,01 (35165,59)), различия между группами разного статуса были статистически значимыми ($p < 0,0001$) (Рисунок 16).

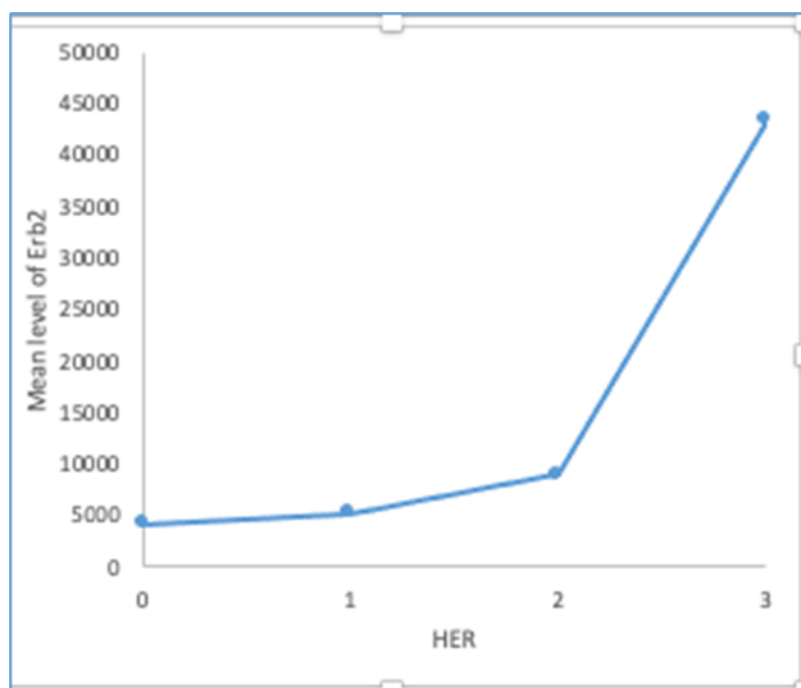


Рисунок 16 – Результаты оценки экспрессии *ERB2* в сравнении с оценкой HER2 статуса методом ИГХ

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

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

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

Оценка экспрессии BCAR4, BCAS2, CCND1, CCND2, CCND3, FOXA1

(перечень генов, связанных с гормоночувствительностью и гормонорезистентностью опухоли)

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

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

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

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

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

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

Оценка экспрессии EGFR, CDH3, FOXC1, KRT14, KRT5

(перечень генов, повышенная экспрессия которых является маркером базального РМЖ)

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

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

Уровень экспрессии *FOXC1* варьировал от 30,79 до 8867,77. Уровни 30,79–1121,59 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 1121,59–2129,13 – «+2», выше 2129,13 – «+3».

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

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

Оценка экспрессии CDK4, CDK6

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

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

Оценка экспрессии P53, PTEN, CHEK2

(перечень генов, связанных с развитием наследственной формы РМЖ)

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

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

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

Оценка экспрессии AR

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

Оценка экспрессии CLDN3, CLDN7

(перечень генов клаудиноподобного РМЖ)

Уровень экспрессии *CLDN3* варьировал от 40,81 до 21225,17. Уровни 40,81–5104,86 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 5104,86–7700,96 – «+2», выше 7700,96 – «+3».

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

Оценка экспрессии TOP2a, TUBBIII (перечень генов, отвечающих за чувствительность к химиотерапии антрациклинами и таксанами)

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

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

Клинические примеры

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

Так, при сравнении профилей образцов №2 и №19, имеющих по результатам ИГХ анализа HER2–, ЭР+ статус, в опухолевом образце №19 была выявлена более высокая экспрессия *ESR1* (31139,35 против 18978,76) и маркеров неблагоприятного прогноза: *PIK3CA* (15921,1 против 1054,68), *P53* (7620,37 против 1620,58), *CCND1* (51152,27 против 7404,94), *BCAS2* (3114,45 против 2179,47), *FOXA1* (35336,07 против 20930,43) (Рисунок 17).

Опухолевый образец №2

Опухолевый образец №19

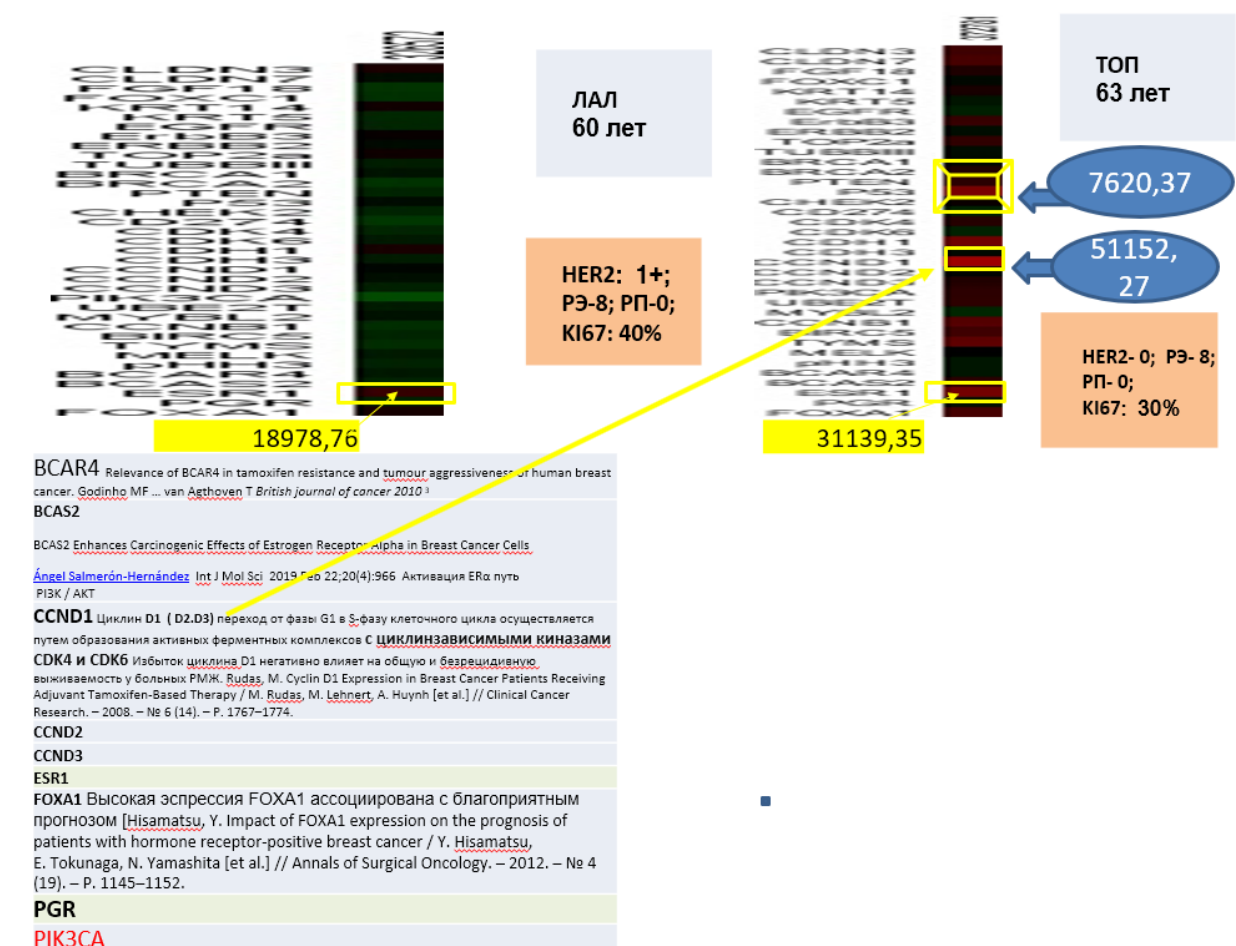


Рисунок 17 – Сравнительный анализ молекулярно-генетических профилей опухолевых образцов, имеющих сопоставимые результаты ИГХ анализа

Клинически значимые различия были также выявлены при сравнении профилей опухолевых образцов, имеющих HER2– и ЭР–статус по результатам молекулярной диагностики (образцы №6, №9, №17, №27, №34) (Рисунок 18).

В опухолевом образце №6 была выявлена гиперэкспрессия генов *KRT5* (19066,63) и *CDH3* (3240,66), являющихся маркером базального РМЖ, что позволяет рассматривать вопрос о применении карбоплатина. Кроме того, наблюдалась повышенная экспрессия гена *CLDN3* (20771,73), отвечающего за синтез клаудина-3, ассоциированного с более агрессивным течением РМЖ. [Danzinger S. и соавт. \(Danzinger S. et al., 2018\)](#) было показано, что высокий уровень клаудина-3 может рассматриваться в качестве предиктора мутации *BRCA1*.

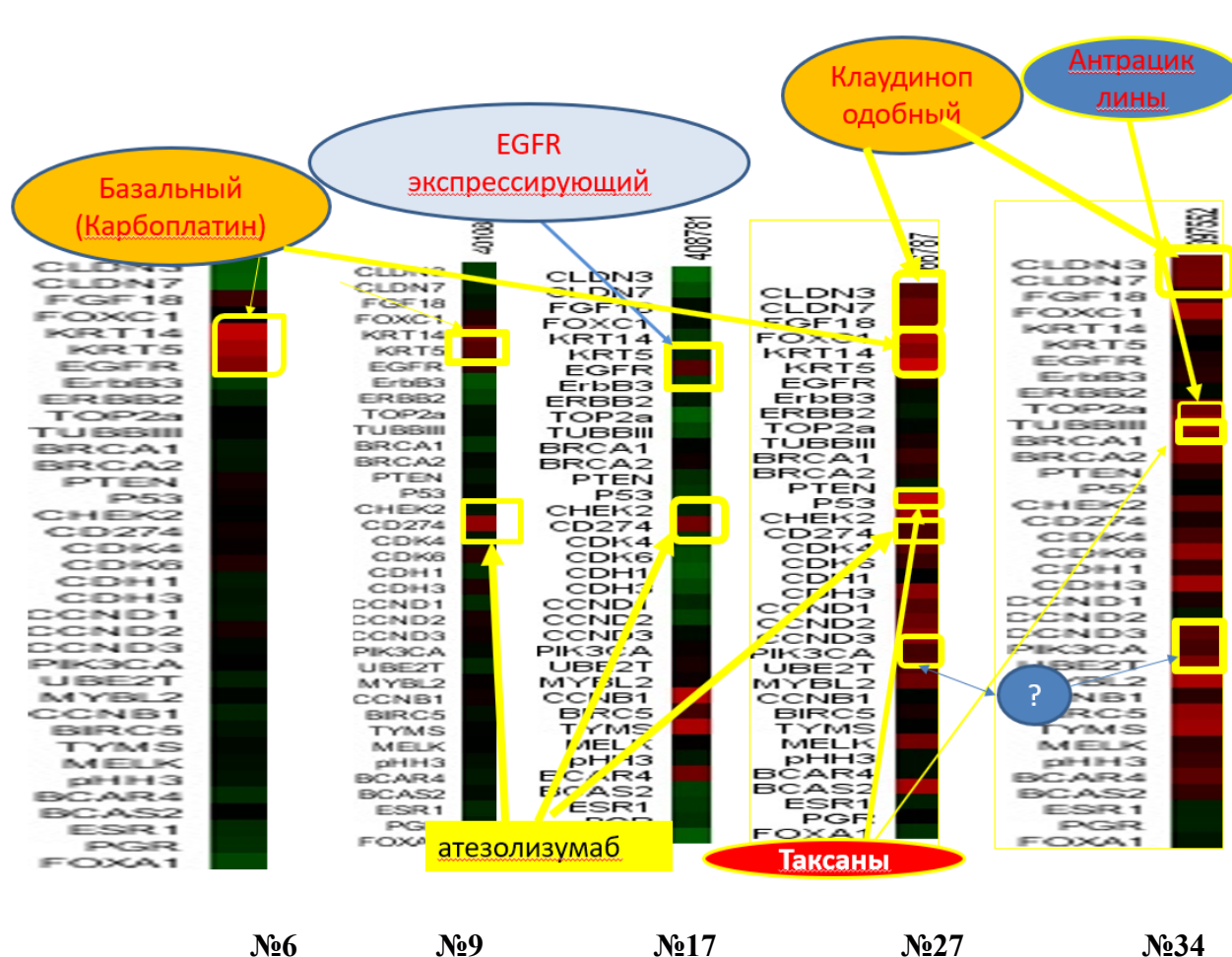


Рисунок 18 – Сравнительный анализ молекулярно-генетических профилей опухолевых образцов с HER2-, ЭР- статусом

В опухолевом образце №9 наблюдалась гиперэкспрессия генов *EGFR* (3281,37) и *CD274* (419,29). По данным мета-анализа от 2018 г. высокая экспрессия *EGFR* обнаруживается у 27 % пациентов с ранним РМЖ. У больных ТНРМЖ с гиперэкспрессией *EGFR* показатели безрецидивной и общей выживаемости были существенно ниже в сравнении с ТНРМЖ без гиперэкспрессии *EGFR* (Gonzalez-Conchas G. A. et al., 2018). В течение последних лет проводятся исследования по изучению анти-EGFR препаратов при РМЖ, в частности ингибиторов тирозинкиназы (Iancu G. et al., 2022), однако препараты, одобренные для применения в рутинной клинической практике, отсутствуют. Высокая экспрессия гена *CD274*, отвечающего за синтез PDL1, обуславливает необходимость назначения атезолизумаба (анти-PDL1 моноклонального антитела). Недавние результаты исследования KEYNOTE-355 продемонстрировали эффективность комбинации химиотерапии с анти-PDL1 моноклональным антителом пембролизумаб у больных с распространенным ТНРМЖ с PDL1 позитивным статусом (combined positive score) CPS>10, определенным с помощью теста DACO 22C3 (Cortés, J. Et al., 2021).

В опухолевом образце №17 наблюдалась гиперэкспрессия *EGFR* (2331,39), а также *KRT14* (35159,16) и *KRT5* (11546,55), ответственных за синтез цитокератинов. Повышенная экспрессия

данных генов является маркером базального РМЖ и обуславливает необходимость назначения карбоплатина.

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

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

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе представлены результаты разработки прогностических шкал и мультигенной панели на основе данных об индивидуальных иммуногистохимических и молекулярно-биологических характеристиках опухоли, оцененных с использованием современных методов исследований, для обеспечения персонализированного подхода к назначению системного лечения РМЖ.

Результаты изучения прогностической значимости рутинных и малоизученных маркеров позволили заключить, что уровни экспрессии стероидных гормонов, HER2, Ki-67, CK5, CK14, EGFR, PDL и FOXA1 демонстрируют высокую прогностическую значимость у пациенток с T1-2N0M0 РМЖ. На основе полученных данных были созданы традиционная прогностическая шкала из 6 показателей, являющихся рутинными маркерами («T2N0M0», «ПР<8», «G2G3», «ЭР<8», «HER2=3» и «Ki-67>5 %»), и регрессионная прогностическая шкала из 10 факторов с наибольшим влиянием в отношении риска летального исхода («CK14, есть»; «FOXP3=0»; «T2N0M0»; «E-cadherin»; «P53»; «HER2=3»; «CD8>0»; «EGFR есть»; «степень G2, G3»; «CD4>0»). Показано, что регрессионная шкала обладает более высокой специфичностью, эффективностью и прогностической значимостью.

На основе литературных данных и оценки клинической значимости маркеров прогностических шкал разработана 100-генная сигнатура, включающую молекулярные подтипы РМЖ (люминальный А, люминальный В, базальный) и лечебно-ориентированные кластеры.

Впервые проведен молекулярно-генетический анализ экспрессии 28 генов с высокой предиктивной значимостью (*ESR1*, *PGR*, *PIK3CA*, *BCAR4*, *BCAS2*, *CCND1*, *CCND2*, *CCND3*,

FOXA1, ERBB2, EGFR, CDH3, FOXC1, KRT14, KRT5, CD274, CDK4, CDK6, P53, PTEN, BRCA1, BRCA2, CHEK2, CLDN3, CLDN7, AR, TOP2a, TUBBIII) на основе технологии nCounter с использованием образцов опухоли пациенток пре- и постменопаузального возраста с метастатическим РМЖ. Для каждого из выбранных 28 генов описаны уровни экспрессии, соответствующие оценкам «+1», «+2» и «+3». Выявлены клинически значимые расхождения оценки подтипа опухоли в сравнении с результатами рутинного ИГХ исследования в локальной лаборатории.

Таким образом, результаты исследования позволили разработать многоаспектный подход к формированию прогноза РМЖ с более высокой точностью и достоверностью. Продemonстрировано, что молекулярно-генетическое профилирование опухоли может обеспечить персонализированный подход к назначению системного лечения РМЖ.

ВЫВОДЫ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

9. По результатам анализа 84 образцов опухоли пациенток пре- и постменопаузального возраста с метастатическим РМЖ, в рамках которого была проведена оценка экспрессии 28 генов с высокой предиктивной значимостью (*ESR1*, *PGR*, *PIK3CA*, *BCAR4*, *BCAS2*, *CCND1*, *CCND2*, *CCND3*, *FOXA1*, *ERBB2*, *EGFR*, *CDH3*, *FOXC1*, *KRT14*, *KRT5*, *CD274*, *CDK4*, *CDK6*, *P53*, *PTEN*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *CLDN3*, *CLDN7*, *AR*, *TOP2a*, *TUBBIII*), выявлено 29 случаев (29/84, 34,5 %) расхождения оценки подтипа опухоли в сравнении с результатами ИГХ исследования, из них в 18 случаях (18/84, 21%) расхождения относились к подтипам опухоли РМЖ, для которых рекомендуются принципиально различные схемы системного лечения.

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

уровней экспрессии, соответствующие ложноположительным и ложноотрицательным результатам ИГХ исследований статуса опухоли в отношении ЭР и HER2 рецепторов.

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

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

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

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

Таблица 16 – Традиционная прогностическая шкала

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

Таблица 17 – Регрессионная прогностическая шкала

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

Фактор	Баллы	Оценка результата
Степень G2, G3	5	
CD4>0	3	
Сумма	100	

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

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

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ДАННОЙ ТЕМЫ

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

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

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

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

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Семиглазов, В. Ф. Индивидуализация адъювантной терапии рака молочной железы / В. Ф. Семиглазов, В. В. Семиглазов, Р. М. Палтуев, Г. А. Дашян, А. Г. Манихас, К. Д. Пеньков, Т. Ю. Семиглазова, Т. Т. Табагуа, А. Г. Васильев, В. В. Коларькова, П. В. Криворотько, И. В. Никитина // Фарматека. – 2011. – №7 (220). – С. 8-13.
2. Семиглазов, В. Биологическое обоснование планирования лечения рака молочной железы / В. Семиглазов, Р. Палтуев, Т. Семиглазова, Г. Дашян // Врач. – 2012. – №11. – С. 2-4.
3. Семиглазов, В. Ф. Ранний рак молочной железы: Прогностическое значение биологических подтипов (Анализ кумулятивной базы данных ФГБУ «НИИ Онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздравсоцразвития) / В. Ф. Семиглазов, Р. М. Палтуев, В. В. Семиглазов, А. Г. Манихас, К. Д. Пеньков, К. Ю. Зернов, И. В. Никитина, А. А. Божок, Д. Е. Щедрин, Т. Ю. Семиглазова, А. М. Ермаченкова, И. А. Гречухина, Г. А. Дашян // Злокачественные опухоли. – 2012. – №2 (2). – С. 12-18. – doi.org/10.18027/2224-5057-2012-2-12-18.
4. Семиглазов, В. Ф. Адъювантная химиотерапия рака молочной железы: поиск новых путей планирования / В. Ф. Семиглазов, В. В. Семиглазов, Р. М. Палтуев, Г. А. Дашян, Р. В. Донских, А. В. Комяков, П. В. Криворотько, К. С. Николаев, И. В. Никитина, Т. Ю. Семиглазова // Вопросы онкологии. – 2014. – №60 (1). – С. 102-108.
5. Палтуев, Р. М. Автоматизированный анализ клеточной плотности при раке молочной железы как дополнительный способ повысить объективность и достоверность прогноза рака молочной железы / Р. М. Палтуев, А. Г. Кудабергенова, В. Ф. Семиглазов, А. В. Комяков // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2017. – №13 (3). – С. 12-16. – doi.org/10.17650/1994-4098-2017-13-3-12-16.
6. Палтуев, Р. М. Биологическое обоснование персонализации лечения рака молочной железы. Клиническое значение определения новых маркеров рака молочной железы / Р. М. Палтуев // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2019. – Т. 15, № 2. – С. 10-29. – doi.org/10.17650/1994-4098-2019-15-2-10-29.
7. Палтуев, Р. М. Биологическое обоснование персонализации лечения рака молочной железы. Анализ новых данных используемых в рутинной практике маркеров рака молочной железы / Р. М. Палтуев // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2019. – Т. 15, № 4. – С. 30-49. – doi.org/10.17650/1994-4098-2019-15-4-30-49
8. Берштейн, Л. М. Сравнительный анализ экспрессии ароматазы в ткани рака молочной железы: учет носительства мутаций brcal, варианта оценки ароматазы, клеточной плотности опухоли и особенностей использовавшихся антиароматазных антител / Л. М. Берштейн, А. П. Соколенко, А. Г. Кудайбергенова, Р. М. Палтуев, Н. А. Максимова,

Е. В. Васильева // Материалы VII Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2021». – СПб.: АННОМО «Вопросы онкологии», 2021. – С. 245.

9. **Абдулаева, Ш. Р.** Препредиктивная и прогностическая роль инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TILS) при раннем трижды негативном раке молочной железы / Ш. Р. Абдулаева, Т. Ю. Семиглазова, А. С. Артемьева, А. Г. Кудайбергенова, С. М. Шарашенидзе, А. И. Целуйко, Р. М. Палтуев, В. В. Семиглазов, П. В. Криворотко, В. Ф. Семиглазов // Фарматека. – 2022. – Т. 29, № 7. – С. 37-42. – doi.org/10.18565/pharmateca.2022.7.37-42.

10. **Целуйко, А. И.** Клиническая иммунология рака молочной железы / А. И. Целуйко, В. Ф. Семиглазов, А. Г. Кудайбергенова, А. С. Артемьева, Р. М. Палтуев, Р. В. Донских, Р. С. Песоцкий, П. В. Криворотко // Фарматека. – 2022. – Т. 29, № 7. – С. 29-36. – doi.org/10.18565/pharmateca.2022.7.29-36.

11. **Палтуев, Р. М.** Прогностические и препредиктивные возможности разработанной 100-балльной шкалы у больных раком молочной железы T1–2N0M0 11 / Р. М. Палтуев, А. Г. Кудайбергенова, В. Ф. Семиглазов, А. С. Артемьева, Т. Ю. Семиглазова, А. В. Комяхов, О. А. Волынщикова, В. В. Клименко, М. М. Урезкова // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2023. – Т. 19, № 1. – С. 56-68. – doi.org/10.17650/1994-4098-2023-19-1-56-68.

12. **Палтуев, Р. М.** Препредиктивная 100-генная шкала. Анализ диагностической эффективности при метастатическом раке молочной железы / Р. М. Палтуев, С. Н. Алексахина, А. С. Артемьева, Э. А. Байчоров, С. Ю. Бахарев, А. А. Божок, В. А. Васин, В. И. Владимиров, О. А. Волынщикова, А. Ю. Воронцов, Е. А. Гайсина, А. А. Гофман, Е. Н. Имянитов, В. В. Клименко, А. В. Комяхов, М. М. Константинова, М. В. Копп, А. Г. Кудайбергенова, И. А. Лалак, Д. Л. Матевосян, Н. М. Муджири, О. В. Полтарева, О. И. Севрюкова, В. Ф. Семиглазов, Т. Ю. Семиглазова, М. М. Урезкова, Л. А. Чурилова // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2023. – Т. 19, № 1. – С. 69-81. – doi.org/10.17650/1994-4098-2023-19-1-69-81.

13. **Палтуев, Р. М.** Прогностические возможности FOXA1 при раке молочной железы T1–2N0M0 / Р. М. Палтуев, А. Г. Кудайбергенова, В. Ф. Семиглазов, А. В. Комяхов, А. И. Целуйко // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2023. – Т. 19, № 2. – С. 82-88. – doi.org/10.17650/1994-4098-2023-19-2-82-88.

14. **Палтуев, Р. М.** Прогностические возможности CD4+ при раке молочной железы T1–2N0M0 / Р. М. Палтуев, А. Г. Кудайбергенова, В. Ф. Семиглазов, А. В. Комяхов, А. И. Целуйко // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2023. – Т. 19, № 2. – С. 89-93. – doi.org/10.17650/1994-4098-2023-19-2-89-93.

15. **Палтуев, Р. М.** Оценка экспрессии ERBB2 и HER2 при метастатическом раке молочной железы по результатам препредиктивной 100-генной шкалы с использованием

nCounter® / Р. М. Палтуев, О. А. Волынщикова, Ш. Р. Абдуллаева, С. Н. Алексахина, А. С. Артемьева, Э. А. Байчоров, С. Ю. Бахарев, Ю. А. Белая, А. А. Божок, В. А. Васин, В. И. Владимиров, А. Ю. Воронцов, Е. А. Гайсина, А. А. Гофман, В. Н. Дмитриев, Е. Н. Имянитов, В. В. Клименко, А. В. Комяхов, М. М. Константинова, М. В. Копп, А. Г. Кудайбергенова, И. А. Лалак, Д. Л. Матевосян, Н. М. Муджири, О. В. Полтарева, О. И. Севрюкова, В. Ф. Семиглазов, Т. Ю. Семиглазова, М. М. Урезкова, А. С. Чичканова, Л. А. Чурилова, М. В. Шомова // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2023. – Т. 19, № 3. – С. 30-36. – doi.org/10.17650/1994-4098-2023-19-3-30-36.

16. Semiglazov, V. F. P181 Factors influencing prognosis in node-negative early breast cancer (p)T1N0M0 / V. F. Semiglazov, R. M. Paltuev, I. V. Nikitina // The Breast. – 2011. – №20 (1). – S39. – doi.org/10.1016/S0960-9776(11)70123-0.

17. Semiglazov, V. F. 248. Breast recurrence after conservative surgery in patient with minimal (pT1a-bN0M0) breast cancer (significance of molecular subtype) / V. F. Semiglazov, R. M. Paltuev, A. A. Bozhok // Eur. J. Surg. Oncol. – 2012. – №38 (9). – P.813. – doi.org/10.1016/j.ejso.2012.06.242.

18. Semiglazov, V. Discordant immunohistochemical characteristics (ER, PR, HER2, Ki67, FOXA1) between primary breast cancer, residual tumor and axillar lymph node metastasis after neoadjuvant chemotherapy / V. Semiglazov, V. Bashlyk, A. Kудайbergenova, A. Artemyeva, V. Chirsky, T. Semiglazova, V. Klimenko, R. Paltuev, A. Tseluyko, V. Semiglazov // The Breast. – 2019. – Vol. 44, Suppl. 1. – S27-S28. – doi.org/10.1016/S0960-9776(19)30137-7.

Патенты на изобретения

1. Патент № 2664671 С1 Российская Федерация. МПК G01N 33/574. Способ прогноза рака молочной железы: № 2017127233: заявл. 28.07.2017: опубл. 21.08.2018, бюл. № 24 / Палтуев Р. М., Кудайбергенова А. Г., Семиглазов В. Ф., Комяхов А. В.

2. Патент № 2697709 С1 Российская Федерация. МПК G01N 33/574. Способ прогноза рака молочной железы: № 2018125394: заявл. 10.07.2018: опубл. 19.08.2019, бюл. № 23 / Палтуев Р. М., Кудайбергенова А. Г., Семиглазов В. Ф., Комяхов А. В., Трофименко К. С., Ким А. Я.

3. Патент № 2748716 С1 Российская Федерация. МПК G01N 33/574. Способ прогноза рака молочной железы: № 2020119220: заявл. 03.06.2020: опубл. 31.05.2021, бюл. № 16 / Палтуев Р. М., Кудайбергенова А. Г., Семиглазов В. Ф., Комяхов А. В., Целуйко А. И.

4. Патент № 2763839 С1 Российская Федерация. МПК G01N 33/574. Способ многофакторного прогноза рака молочной железы: № 2021112377: заявл. 27.04.2021: опубл. 11.01.2022, бюл. № 2 / Палтуев Р. М., Кудайбергенова А. Г., Семиглазов В. Ф., Артемьева

А. С., Семиглазова Т. Ю., Комяхов А. В., Волынщикова О. А., Клименко В. В., Урезкова М. М.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДИ	– доверительный интервал
ИГХ	– иммуногистохимический
мРМЖ	– метастатический рак молочной железы
ПР	– рецептор прогестерона
РМЖ	– рак молочной железы
РООМ	– Российское общество онкомаммологов
ТНРМЖ	– трижды негативный рак молочной железы
ЭР	– рецептор эстрогенов
HER2	– рецептор эпидермального фактора роста 2-го типа
NGS	– секвенирование нового поколения
RT-PCR	– полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
SD	– стандартное отклонение