

**ШАТОВА Юлиана Сергеевна**

**Клинико-эпидемиологические и гормонально-метаболические  
закономерности развития рака молочной железы у женщин в  
различные репродуктивные периоды жизни**

14.01.12-онкология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени  
доктора медицинских наук

Ростов-на-Дону – 2016

РАБОТА ВЫПОЛНЕНА В ФЕДЕРАЛЬНОМ ГОСУДАРСТВЕННОМ БЮДЖЕТНОМ УЧРЕЖДЕНИИ «РОСТОВСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ОНКОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**Научный консультант:**

доктор медицинских наук, профессор, **Кит Олег Иванович**

**Официальный оппонент:**

Куликов Евгений Петрович – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой онкологии с курсом лучевой диагностики ГБОУ ВПО "Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова" Министерства здравоохранения РФ.

Родионов Валерий Витальевич – д.м.н., профессор, заведующего отделением патологии молочной железы ФГБУ "Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова" Министерства здравоохранения РФ.

Семиглазова Татьяна Юрьевна – д.м.н. руководитель отдела инновационных методов терапевтической онкологии и реабилитации НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова, доцент кафедры онкологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский научно-исследовательский институт онкологии»

Защита диссертации состоится "\_\_\_\_\_" \_\_\_\_\_ 2016 г. в \_\_\_\_ часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д.208.083.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения Российской Федерации (344037, г. Ростов-на-Дону, 14 линия, 63).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте [www.rnioi.ru](http://www.rnioi.ru) ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан "\_\_\_\_\_" \_\_\_\_\_ 2016 г.

Ученый секретарь совета  
по защите докторских и кандидатских диссертаций,  
доктор медицинских наук, профессор **Позднякова В.В.**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы

Рак молочной железы (РМЖ) – представляет собой группу гетерогенных опухолей различных биологических подтипов (Семиглазов В.Ф., 2011; 2012). По сути, при одной локализации процесса в молочной железе имеются несколько заболеваний, которые различаются причинами возникновения злокачественного роста, генетическими нарушениями, клиническим течением, разным прогнозом болезни (Kris M.G. et al., 2011) и различными биологическими свойствами опухоли (Цырендоржиева Е.С., 2003; Енгай Д.А., 2007; Имянитов Е.Н., 2007; Van't Veer L.S., 2002; Iorio M.V., 2009). Современные исследования указывают на различия в патогенезе опухолевого процесса у больных с разным состоянием менструальной функции даже в пределах одной молекулярно-генетической группы опухолей (Завьялова М.В. и соавт., 2013). При этом переход к персонифицированному их лечению невозможен без фундаментальных исследований биологических характеристик опухоли.

Вопрос о гормональном обеспечении основных подтипов РМЖ, ассоциированных с возрастом, этнической принадлежностью и некоторыми особенностями менструальной и репродуктивной функции (Anderson W.F. et al., 2006; Kurian A.W. et al., 2010) привлекает к себе все большее и большее внимание (Берштейн Л.М., 2013). Исследования последних лет показали несостоятельность теории о том, что основной причиной развития онкопатологии репродуктивных органов является гиперэстрогения (Ашрафян Л.А., Киселев В.И., 2008). Очевидно, что причины возникновения и развития гормон-зависимого рака как болезни в организме намного сложнее. Даже в условиях гипоэстрогении опухолевая клетка выживает за счёт других гормон-независимых путей (Коновалова В.Н., Сметник В.П., 2011). В аутокринной и паракринной регуляции пролиферации клеток РМЖ кроме гормонов участвуют различные ростовые факторы: пептиды группы эпидермального фактора роста EGF, VEGF, TGF $\beta$ 1, взаимодействующие с общим рецептором, инсулиноподобные факторы роста (ИФР1 и ИФР2), соматостатин (Lippman M.E. et al., 1988). Рецепторы этих ростовых факторов были обнаружены в опухолях больных РМЖ, и их клиническое значение изучается в последние годы достаточно активно (Герштейн Е.С. и соавт., 2001; Шевченко А.В. и соавт., 2013;

Carmeliet P., Jain R., 2000; Brouwer-Visser J. and Huang G.S., 2015).

Автономное поведение опухоли, ее неконтролируемый рост и распространение, по-видимому, может быть реализовано при нарушениях, возникающих на различных уровнях: молекулярном (экспрессия генов пролиферации, апоптоза, адгезии и пр.), клеточном (способность реагировать на поступающие сигналы), тканевом (межклеточные взаимодействия, в т.ч., с клетками иммунной системы). С учетом этого для понимания особенностей ее биологического поведения представляется важной комплексная оценка пролиферативных свойств опухоли, иммуногистохимических (ИГХ) характеристик ее клеток и присутствия в ней, а также в прилежащей к ней перитуморальной области лимфоцитов различных субпопуляций. Можно надеяться, что и традиционные, и новые подходы, направленные на устранение нарушений эндокринной и метаболической природы, при их большей, чем ранее, адресации к уже устоявшемуся подразделению РМЖ на отдельные подтипы окажутся важным средством повышения эффективности превентивных и лечебных мер воздействия при этом серьезном и имеющем большую социальную значимость заболевании (Берштейн Л.М., Семиглазов В.Ф., 2011).

### **Степень разработанности темы**

В литературе имеется большое число данных проведенных исследований по изучению гетерогенности биологических подтипов РМЖ. Однако не все представленные результаты сопоставимы друг с другом, так как критерии распределения опухолей по подтипам менялись с течением времени по мере того, как расширялись знания по этому вопросу. На сегодняшний день считается необходимым проведение дальнейших эпидемиологических исследований в этом направлении с целью выявления роли того или иного фактора риска в развитии различных подтипов РМЖ (Синкина Т.В. и соавт., 2009; Davis A.A. and Kaklamani V.G., 2012). Перспективным представляется стратификация гетерогенной выборки пациентов РМЖ и поиск ассоциаций не во всей совокупности, а в пределах отдельных молекулярных подтипов (Garcia-Glosas M. et al., 2008). Несомненная важность данных о связи половых гормонов в системной циркуляции с отдельными подтипами карцином и их относительная немногочисленность свидетельствуют о желательности дальнейшего анализа

этого вопроса в сопоставлении, как с прикладными, так и с фундаментальными аспектами проблемы. До настоящего времени интенсивность биосинтеза эстрогенов в ткани различных подтипов РМЖ редко бывала предметом изучения, хотя подобное развернутое исследование могло бы представить несомненный и значимый интерес (Берштейн Л.М., Семиглазов В.Ф., 2011). За последнее десятилетие стало очевидно, что поиск вероятных факторов прогноза должен быть сосредоточен на клеточном и молекулярном уровнях. В частности, в стране и в мире интенсивно изучается роль циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) в распространении опухолевого процесса путем гематогенного метастазирования (Pachmann K. et al., 2008; Pierga J.Y. et al., 2008; Bidard F.C. et al., 2012; 2013). Однако, данные о влиянии биологического подтипа РМЖ, а тем более репродуктивного статуса на этот показатель скудны (Giordano A. et al., 2012; Munzone E. et al., 2012). Итак, изучение отечественной и зарубежной литературы показало, что поиск возможных закономерностей развития биологических подтипов РМЖ, формирующихся у женщин в различные репродуктивные периоды жизни, является перспективным научным направлением, отражающим современные тенденции к индивидуализации диагностических, лечебных и профилактических подходов.

### **Цель исследования**

Выявить особенности развития различных подтипов рака молочной железы, а также их биологических свойствах женщин в разные репродуктивные периоды жизни.

### **Задачи исследования**

1. Изучить закономерности развития биологических подтипов рака молочной железы в условиях разных внутренних и внешних факторов в различные репродуктивные периоды жизни.
2. Изучить морфологические и иммуногистохимические особенности различных биотипов опухолей в разные репродуктивные периоды.
3. Изучить гормонально-метаболические нарушения в крови и тканях опухоли молочной железы, перифокальной зоны и интактной ткани у женщин с различным состоянием менструальной функции и биологическим подтипом опухоли.

4. Изучить факторы роста и неоангиогенеза в опухолевой ткани и ее перифокальной зоне у женщин с различным состоянием менструальной функции и биологическим подтипом опухоли.

5. Изучить особенности иммунологического микроокружения опухолей разных биологических подтипов у женщин с различным состоянием менструальной функции.

6. Изучить пролиферативную активность опухолей различных биологических подтипов у женщин с различным состоянием менструальной функции.

7. Изучить особенности выявления циркулирующих опухолевых клеток у больных разными биологическими подтипами рака молочной железы.

### **Новизна исследования**

1. В диссертационной работе впервые на большом материале изучены закономерности развития биологических подтипов РМЖ с учетом факторов внешней и внутренней среды в различные репродуктивные периоды жизни.

2. Впервые изучены морфологические, иммуногистохимические, пролиферативные, гормонально-метаболические особенности опухолей различных биологических подтипов с учетом состояния менструальной функции женщины.

3. Впервые изучены особенности неоангиогенеза и локального иммунитета в опухоли и ее перифокальной зоне с учетом биотипа опухоли и состояния менструальной функции женщин.

### **Теоретическая и практическая значимость**

1. Заложена база для разработки мер первичной и вторичной профилактики с учетом биологических характеристик опухоли и состояния репродуктивной функции женщины.

2. Разработанный подход, учитывающий не только биологический подтип опухоли, определенный по стандартной ИГХ-панели, но и другие внешние и внутренние факторы, определяющие биологическое поведение опухоли в сочетании с состоянием менструальной функции женщины, позволяет перейти к персонифицированной тактике лечения этой категории больных и, соответственно, улучшить его результаты.

3. Выявленные ИГХ, гормонально-метаболические, иммунологические и пролиферативные особенности РМЖ различных биотипов, а также распределение факторов роста и неоангиогенеза у женщин с различным репродуктивным статусом являются предпосылкой для дальнейшей разработки вариантов таргетной терапии.

4. Разработанный способ лечения раннего РМЖ, основанный на определении ЦОК исходно и через сутки после операции, позволит улучшить ближайшие и отдаленные результаты лечения (патент РФ № 2554749 от 01.06.2015 г.).

5. Разработанные способы прогнозирования химиочувствительности (патент РФ № 2551232 от 20.04.2015 г.) и гормонозависимости опухоли (патент РФ № 2559152 от 10.07.2015 г.), применение которых возможно в любых технических условиях медицинского учреждения, позволяют своевременно начать специфическую терапию.

### **Методология и методы исследования**

Диссертация логически структурирована, представленные результаты основаны на изучении большого клинического материала. Клинико-эпидемиологическое исследование проведено с применением современных методов статистического анализа, что делает полученные данные убедительными и достоверными. Лабораторные исследования выполнены с использованием лабораторно-инструментальных, морфологических, иммуногистохимических, биохимических, иммунологических, гормональных, статистических методов, а также с применением проточной цитометрии, в том числе изучения ДНК-цитометрических показателей опухоли, технологии анализа в системе CellSearchSystem™ (JanssenDiagnostics, LLC) для детекции циркулирующих опухолевых клеток.

### **Научные положения, выносимые на защиту**

1. Факторы риска развития биологического подтипа РМЖ, а также морфо-функциональные особенности, локальная насыщенность гормонами и факторами роста опухоли и перифокальной зоны, обусловлены не только биологическим подтипом РМЖ, определенным по стандартной ИГХ-панели, но и состоянием менструальной функции женщины на момент ее развития.

2. Люминальный В РМЖ занимает промежуточное положение между люминальным А и нелюминальными опухолями по исследованным параметрам. Несмотря на рецепторный статус, характерный для благоприятного течения, заболевание носит достаточно агрессивный характер и кардинально отличается по своим клинико-биологическим характеристикам от люминального А РМЖ, приближаясь к тройному негативному раку (ТНР) и HER2neu+РМЖ.

3. РМЖ нельзя рассматривать только с позиции биологического подтипа, определенного на основании стандартной ИГХ-панели, или только с позиции сохранности менструальной функции. Необходимо учитывать и другие параметры, определяющие биологическое поведение опухоли: экспрессию рецепторов белков bcl-2, p53, Торо2α, Е-кадгерина, экспрессию рецепторов андрогенов, локальный гормональный и иммунологический фон опухоли, уровень факторов роста, а также ее пролиферативные свойства. Именно такой подход позволит перейти к персонифицированной тактике лечения этой категории больных и, соответственно, улучшить его результаты.

### **Степень достоверности и апробация результатов работы**

Автором лично изучены в сравнительном аспекте закономерности развития биологических подтипов РМЖ в условиях разных внутренних и внешних факторов в различные репродуктивные периоды; морфологические, ИГХ и иммунологические особенности различных биотипов опухолей в разные репродуктивные периоды; гормонально-метаболические нарушения в крови и тканях опухоли молочной железы, перифокальной зоны и здоровой ткани, а также факторы роста и неоангиогенеза в опухолевой ткани и ее перифокальной зоны у женщин с различным состоянием менструальной функции и биологическим подтипом опухоли; изучена пролиферативная активность опухолей различных биологических подтипов у женщин с различным состоянием менструальной функции, а также особенности выявления циркулирующих опухолевых клеток у больных различными биологическими подтипами РМЖ. Полученные результаты исследований подвергались статистической обработке и научному анализу, что позволило автору сделать объективные выводы и практические рекомендации.



Апробация результатов работы проводилась на заседании ученого совета ФГБУ «РНИОИ» МЗ РФ 22.10.2015 г. Основные положения диссертации доложены в виде устных докладов на конгрессах: I Ежегодный конгресс Российского общества онкомаммологов (2014), Мультидисциплинарный Форум ROOM по диагностике и лечению РМЖ в Северо-Кавказском и Южном Федеральном округе (2015), II Ежегодный конгресс Российского общества онкомаммологов (ROOM). Инновации в диагностике и лечении РМЖ (с сессией зарубежных докладов) (2015) и в виде постерных докладов: Евразийский Форум по раку молочной железы (2011), ASCO 2014; 2015, ESMO 2015.

По теме диссертации опубликованы 27 печатные работы, из них 12 в журналах, рекомендованных ВАК, получено 3 патента Российской Федерации.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 326 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материала и методов, 5 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, указателя литературы, включающего 151 отечественных и 324 зарубежных источника, иллюстрирована 91 таблицей и 60 рисунками.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

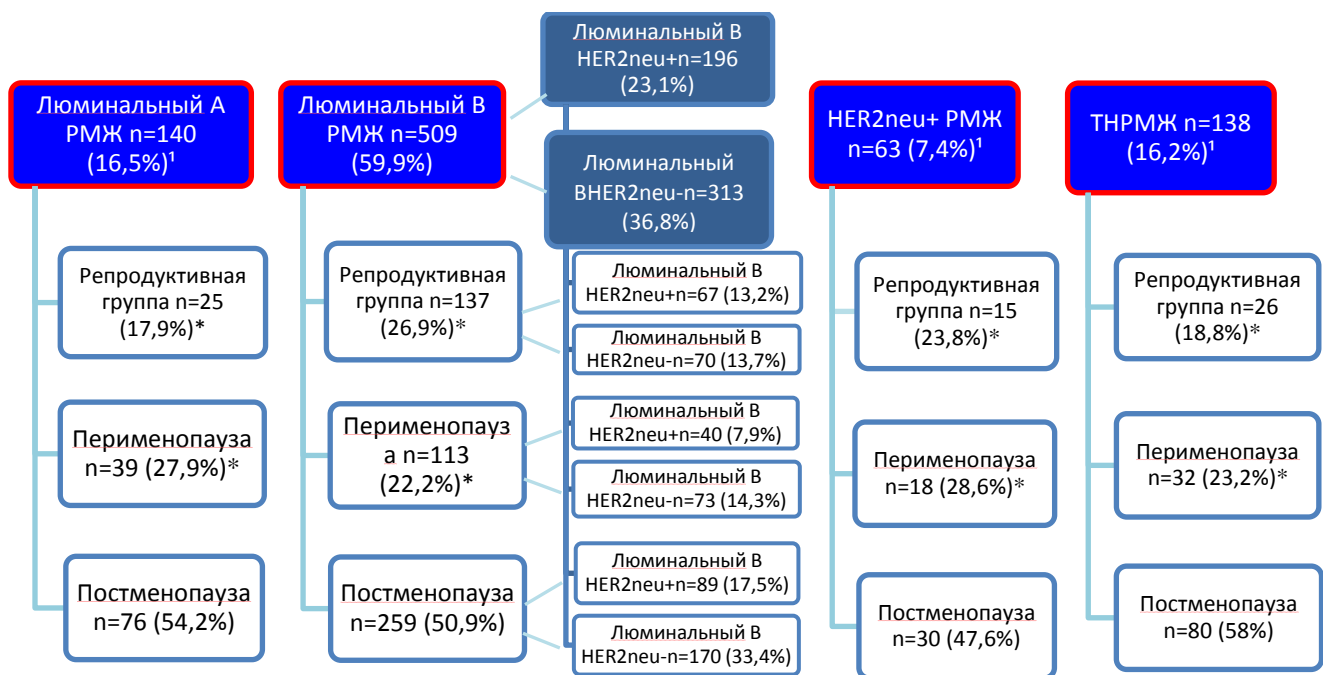
Научные положения диссертации соответствуют пункту 2 «Исследования по изучению этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии и др.)» паспорта специальности 14.01.12-«онкология».

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Характеристика клинического материала и методов исследования**

Клинико-эпидемиологическое исследование проведено на 850 больных РМЖ, получавших лечение в ФГБУ «РНИОИ» Минздрава РФ с 2010 по 2013 годы (рисунок 1).

Все пациентки до начала обследования дали свое письменное согласие на использование их персональных данных и биологического материала для научно-исследовательских целей.



\* – различия достоверны по отношению к больным в постменопаузе ( $p < 0,05$ )

<sup>1</sup> – различия достоверны по отношению к люминальному В подтипу ( $p < 0,05$ )

**Рисунок 1.** Характеристика клинического материала

Все больные предварительно проходили комплексное общеклиническое обследование, включающее в себя общий анализ крови, общий анализ мочи, биохимический анализ крови, коагулограмму, электрокардиограмму, спиральную компьютерную томографию органов грудной клетки, брюшной полости, малого таза, головного мозга, остеосцинтиграфию, консультации смежных специалистов (гинеколога, терапевта, невропатолога). Репродуктивный статус женщины определялся нами согласно менструальному статусу (Сметник В.П., Тумилович Л.Г. 1995). Распределение больных по биологическим подтипам осуществлялось на основании рекомендаций Панели экспертов St.Gallen (2013).

В клинко-эпидемиологическое исследование были включены пациентки с различными стадиями заболевания (таблица 1).

Средний возраст больных люминальным А РМЖ был  $56,1 \pm 2,5$  лет, люминальным В HER2neu+ –  $53,5 \pm 2,1$  лет, люминальным В HER2neu- –  $54,6 \pm 2,2$ , HER2neu+ РМЖ и ТНР –  $52,1 \pm 1,9$  год.

В исследование вошли пациентки с различными гистологическими формами РМЖ (таблица 2). Гистотип опухоли определялся согласно

классификации 2012 года (WHO 2012). Достоверных отличий по гистоструктуре опухолей различных биологических подтипов РМЖ выявлено не было ( $p \geq 0,1$ ).

**Таблица 1 – Распределение больных по степени распространенности опухолевого процесса для клинико-эпидемиологического исследования, абс. ч. (%)**

Стадия	Люминальный А (n=140)	Люминальный BHER2neu+ (n=196)	Люминальный BHER2neu- (n=313)	HER2neu+ (n=63)	ТНРМЖ (n=138)
I	14 (10,0)	21 (10,7)	33 (10,5)	6 (9,5)	15 (10,9)
IIa	41 (29,3)	58 (29,6)	93 (29,7)	21 (33,5)	45 (32,6)
IIb	27 (19,3)	40 (20,4)	64 (20,4)	12 (19)	28 (20,3)
IIIa	16 (11,4)	29 (14,8)	48 (15,4)	9 (14,3)	15 (10,9)
IIIb	20 (14,3)	24 (12,2)	38 (12,2)	5 (7,9)	23 (16,7)
IIIc	14 (10,0)	20 (10,2)	22 (7,0)	5 (7,9)	7 (5,0)
IV	8 (5,7)	4 (2,1)	15 (4,8)	5 (7,9)	5 (3,6)

**Таблица 2 – Распределение больных по гистотипу опухолей при различных биологических подтипах РМЖ, абс. ч. (%)**

Гистотип опухоли	Биологические подтипы РМЖ				Всего
	Люминальный А	Люминальный В	HER2neu+	ТНР	
Инфильтрирующий неспецифический	92 (65,7)	334 (65,6)	47 (74,6)	98 (71)	571 (67,2)
Инфильтрирующий дольковый	24 (17,1)	128 (25,2)	10 (15,9)	32 (23,2)	194 (22,8)
Смешанный (протоковый и дольковый)	5 (3,6)	17 (3,3)	2 (3,2)	0	24 (2,8)
Слизистый	3 (2,1)	0	3 (4,7)	3 (2,2)	9 (1,1)
Папиллярный	5 (3,6)	7 (1,4)	0	0	12 (1,4)
Тубулярный	5 (3,6)	4 (0,8)	0	0	9 (1,1)
Прочие	6 (4,3)	19 (3,7)	1 (1,6)	5 (3,6)	31 (3,6)
Всего	140 (100)	509 (100)	63 (100,0)	138 (100,0)	850 (100,0)

Учитывая, что неоднородность люминального В РМЖ определяется не только HER2neu статусом, но и другими немаловажными параметрами, такими как, например, индекс пролиферативной активности опухоли, а критерии его

оценки постоянно пересматриваются, в данной работе мы решили рассматривать данный подтип в целом, не разделяя его на HER2neu+ и HER2neu- варианты (за исключением клинико-эпидемиологического исследования). На наш взгляд, люминальный В подтип нуждается в пристальном изучении и заслуживает отдельного исследования.

Исходя из того, что наиболее распространенными гистотипами являлись дольковый рак и инфильтрирующая неспецифическая карцинома, именно их распределение мы рассматривали по всем группам

Информация о факторах риска РМЖ была получена путем обследования больных, их анкетирования, в ходе личных бесед, а также при изучении историй болезни. Стандартной морфологической и ИГХ оценке подвергался операционный или биопсийный материал всех 850 больных, а экспрессия маркеров p53, bcl-2, Торо2 $\alpha$ , Е-кадгерина 285 пациенток с различными биологическими подтипами и репродуктивным статусом. Предоперационной терапии до забора материала пациенткам не проводилось. Используемые в работе первичные антитела и их разведения представлены в таблице 3.

**Таблица 3–Панель использованных для ИГХ антител**

Специфичность	Клон	Фирма	Разведение	Буфер для «демаскировки антигенов»
Рецепторы прогестерона	PgR636, RTU, мышинные	DAKO		
Рецепторы эстрогенов	1D5, RTU, мышинные	DAKO		
c-erbB-2	поликлональные	DAKO	1:500	
Ki67	MIB-1, RTU, мышинные	DAKO		
Нормальный и мутантный тип p53	DO-7	DAKO	1:200	10 мМTris, 1 мМ EDTA (pH 9,0)
Bcl-2	Sp66	DAKO	1:100	10 мМTris, 1 мМ EDTA (pH 6,0)
Е-кадгерин	NCH-38	DAKO	1:100	10 мМTris, 1 мМ EDTA (pH 6,0)
Androgen receptor	AR 441	DAKO	1:100	10 мМTris, 1 мМ EDTA (pH 9,0)
Торо2 $\alpha$	SWT 3D1	DCS	1:25	10 мМTris, 1 мМ EDTA (pH 6,0)

Материалом для ДНК-цитометрии послужили опухоли и перифокальная зона 351 больной различными биологическим подтипами РМЖ и

репродуктивным статусом. Исследовался операционный материал больных, которым первым этапом комплексного лечения проводилось оперативное вмешательство. Для анализа ДНК в ткани опухоли использовали CycleTEST<sup>TM</sup>PLUS DNA ReagentKit. Полученные данные обрабатывали с помощью компьютерной программы ModFit LT. Долю клеток с различным содержанием ДНК на гистограмме вычисляли как процент от общего числа исследованных клеток. Чтобы оценить степень анеуплоидии, определяли индекс ДНК (ИДНК). Индекс пролиферации (ИП) вычисляли как суммарное число клеток опухоли, находящихся в S- и (G2 + M)-фазах клеточного цикла.

Для определения роли локальных гормонов и факторов роста были отобраны образцы опухоли, перифокальной зоны, периферической крови и мочи 220 больных различными биологическими подтипами РМЖ и репродуктивным статусом. Предоперационной терапии данные больные не получали. В качестве интактной использовали ткань молочной железы (n=16), полученную во время операций по поводу редукции молочных желез. Уровень эстрадиола, эстрона, тестостерона, прогестерона, пролактина, 2ОНЕ/16ОНЕ метаболитов эстрогенов, секс-стероид-связывающего глобулина, факторов роста: VEGF, EGF, TGFβ1, ИФР1, ИФР2, плазмина, плазминогена, u-PA, t-PA, PAI-1 определяли в 10% цитозольных фракциях тканей молочной железы, приготовленных на 0,1 М калий-фосфатном буфере pH 7,4, содержащем 0,1% Твин-20 и 1% БСА, стандартными ИФА методами (наборы ХЕМА, «Биохиммак», «АлкорБио» Россия; DBC Канада).

Материалом для иммунологических исследований послужили опухоли и перифокальная зона 285 пациенток различными биологическими подтипами РМЖ и репродуктивным статусом. Предоперационной терапии данные больные также не получали. Гомогенизацию тканей осуществляли с использованием BD Medimachine. Анализ экспрессии (не менее 20 000 клеток) был проведен на проточном цитометре FACSCantoII (Becton Dickinson, USA). Для тестирования и подтверждения оптимальной работы проточного цитометра использовали универсальные биологические частицы DNAQCParticles (BD). Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови, ткани опухоли и перитуморальной зоны (ПЗ) оценивали с использованием моноклональных

антител CD3, CD4, CD8, CD19, CD16+56, CD45. Доля лимфоцитов, положительных по тому или иному маркеру, вычислялась в процентах от общего числа CD45-положительных лимфоцитов. В случае ткани исследовалось не менее 1000 тыс. событий, крови – не менее 30 тыс. событий.

Для определения ЦОК мы применяли технологию анализа в системе CellSearchSystem™ (JanssenDiagnostics, LLC). В исследование были включены 36 пациенток, получавших первым этапом хирургическое лечение по поводу верифицированного РМЖ.

Обработка полученных данных выполнялась с использованием пакета программ «Statistica 7.0» и MedCalc (версия 9.3.5.0) (Боровиков В.П., 2001; Вуколов Э.А., 2008). Применялся дисперсионный анализ, критерий  $\chi^2$ . Обсуждаются результаты с достоверностью различий при  $p < 0,05$  и с тенденцией различий при  $p < 0,1$ . Для оценки вклада признаков в развитие того или иного биологического подтипа РМЖ нами применялся многофакторный регрессионный анализ с определением  $\beta$ -стандартизированного коэффициента регрессии.

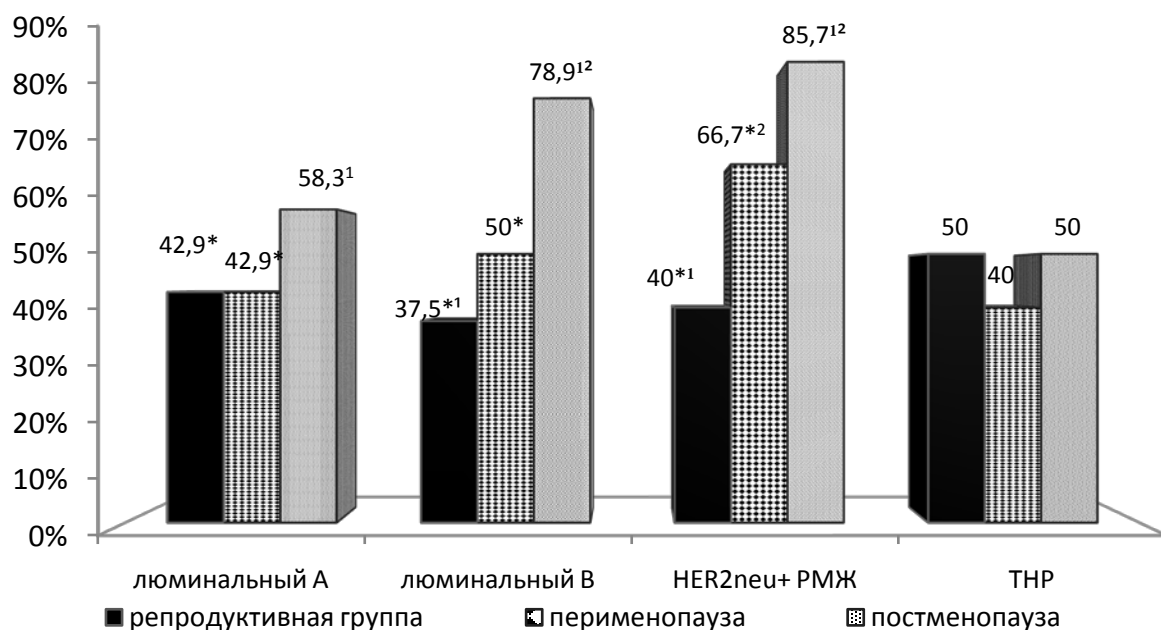
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Люминальный А РМЖ** определен у 140 (16,5%) пациенток. По результатам сравнительного, а в последующем и дисперсионного анализа выявлено, что факторами риска развития люминального А РМЖ являлись гормонально-метаболические нарушения. Поэтому можно предположить, что их своевременная и адекватная коррекция снизит риск развития данного подтипа РМЖ, а также может являться мерой вторичной профилактики у пациенток, уже завершивших лечение. Именно у этих больных в большей степени отмечены гипергликемия ( $F=3,68103$ ,  $p=0,012648$ ), гиперхолестеринемия ( $F=2,10306$ ,  $p=0,030929$ ). Это, в свою очередь, отражает и влияние такой сопутствующей патологии как сахарный диабет II типа ( $F=2,83759$ ,  $p=0,039285$ ) и артериальной гипертензии ( $F=3,18476$ ,  $p=0,021598$ ). Как следствие, постоянный прием лекарственных препаратов также нес значительную факторную нагрузку в развитии данного биотипа ( $F=6,12078$ ,  $p=0,000490$ ). Имеющиеся метаболические нарушения не могли не сказаться на репродуктивном анамнезе больных люминальным А РМЖ. Большое количество беременностей ( $F=3,039890$ ,  $p=0,029483$ ) в сочетании с большим количеством медицинских аборт

( $F=4,045787$ ,  $p=0,007757$ ), относительно высокая частота первичного бесплодия ( $F=2,378073$ ,  $p=0,040178$ ) и самоаборта, как результата первой беременности ( $F=1,804980$ ,  $p=0,046555$ ) являлись фактором риска развития этого биотипа. Следует отметить, что все вышесказанное справедливо только в отношении больных в пери- и постменопаузе. На наш взгляд, это говорит о том, что для реализации вклада этих факторов необходимо определенное время, а механизм развития люминального А РМЖ у больных репродуктивной группы несколько иной. Данные дисперсионного анализа показывают, что в репродуктивной группе и в перименопаузе фактором риска развития люминального А РМЖ является использование ВМС для контрацепции ( $F=4,204491$ ,  $p=0,023709$ ).

Данные морфологического исследования показали, что при люминальном А РМЖ в репродуктивной группе частота инфильтрирующей карциномы и долькового рака была одинакова (18,5 и 16,7%, соответственно), в перименопаузе преобладала инфильтрирующая карцинома (33,7 против 8,3%), а в постменопаузе – дольковый рак (75,0% против 47,8%), что является типичным для всех биотипов РМЖ, за исключением HER2neu+ РМЖ.

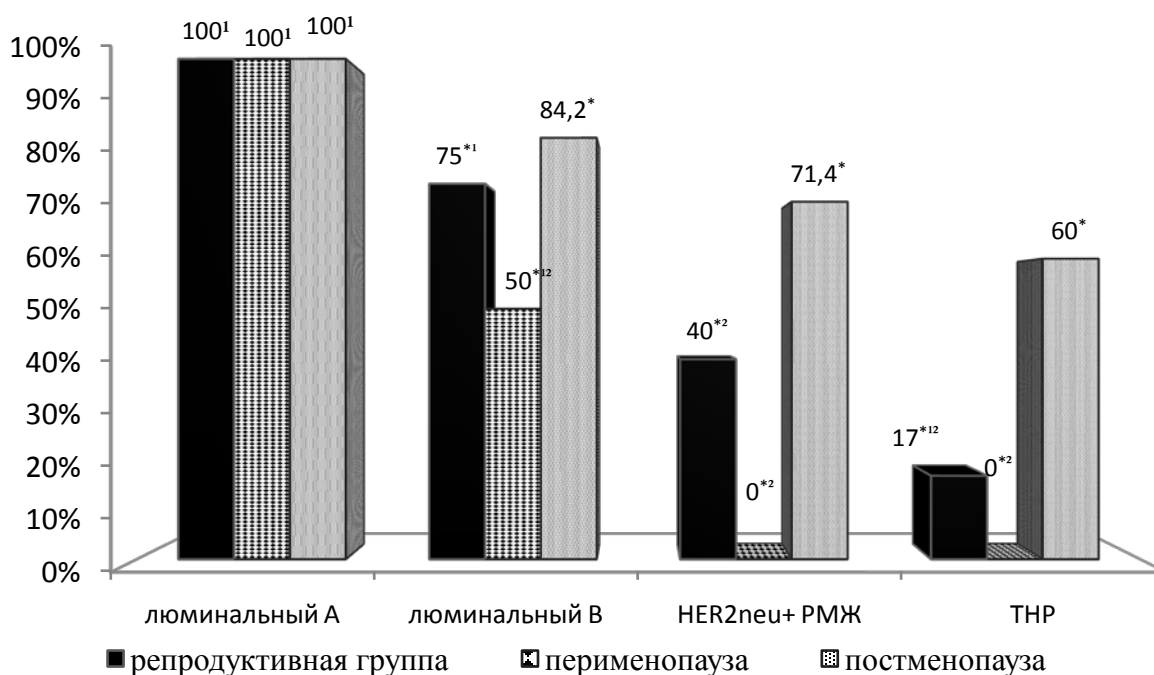
Гиперэкспрессия p53 при люминальном А РМЖ встречалась реже, чем при других подтипах: в 2 раза, чем при ТНР, в 2,5 раза реже чем при люминальном В, в 2,7 раза реже, чем при Her2neu+ РМЖ (рисунок 2).



**Рисунок 2.** Частота гиперэкспрессии p53 при различных биотипах РМЖ и репродуктивном статусе

Примечание – различия достоверны по отношению: \* – к больным в постменопаузе ( $p < 0,05$ ); <sup>1</sup> – к больным в перименопаузе ( $p < 0,05$ ); <sup>2</sup> – к люминальному А и ТНР ( $p < 0,05$ )

Проведенное ИГХ исследование обнаружило гиперэкспрессию bcl-2, превышающую уровень cut-off в цитоплазме опухолевых клеток больных люминальным АРМЖ в 100% случаев при среднем содержании bcl-2+ опухолевых клеток  $83,5 \pm 8,4\%$  (от 60,0 до 95,0%), причем только в люминальных А опухолях она была максимальна вне зависимости от репродуктивного статуса (рисунок 3).



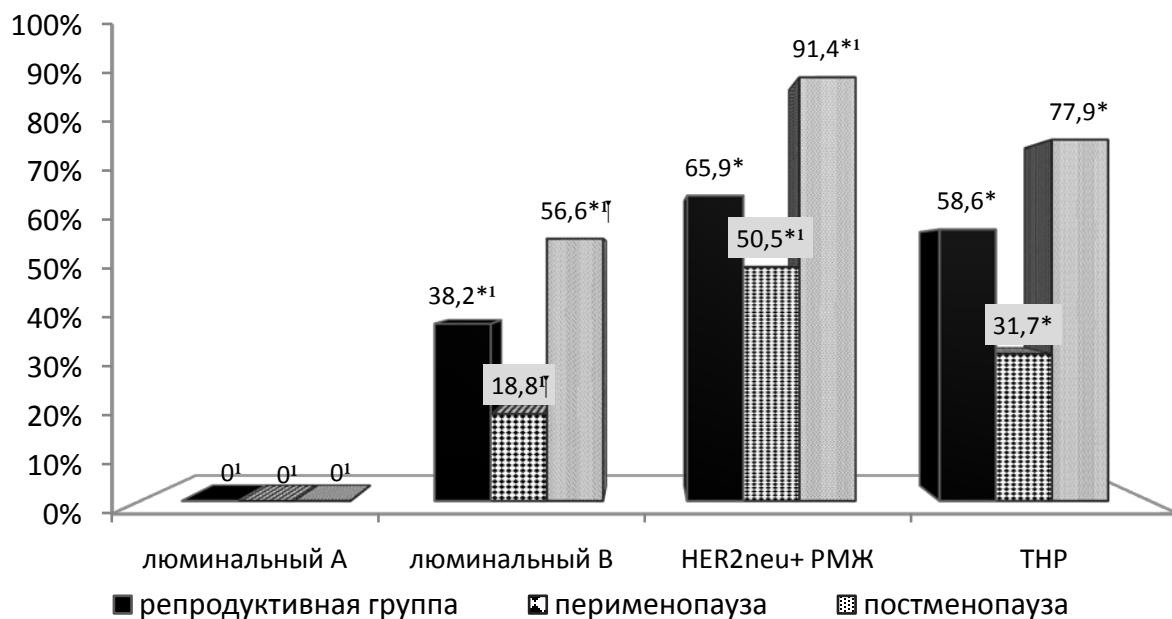
**Рисунок 3.** Частота гиперэкспрессии bcl-2 при различных биотипах РМЖ и репродуктивном статусе

Примечание – различия достоверны в отношении: \* – люминального А подтипа ( $p < 0,05$ ); <sup>1</sup> – HER2neu+ РМЖ ( $p < 0,05$ ); <sup>2</sup> – постменопаузы ( $p < 0,05$ )

Минимальная частота гиперэкспрессии p53 в сочетании с высоким уровнем гиперэкспрессии bcl-2 предполагает благоприятный характер его течения. Тот факт, что в люминальных А опухолях отмечался высокий уровень гиперэкспрессии bcl-2 и низкий Торо2а (рисунок 4) вне зависимости от репродуктивного статуса объясняет наибольшую эффективность, а соответственно и целесообразность применения именно гормонотерапии, а не полихимиотерапии в их лечении.

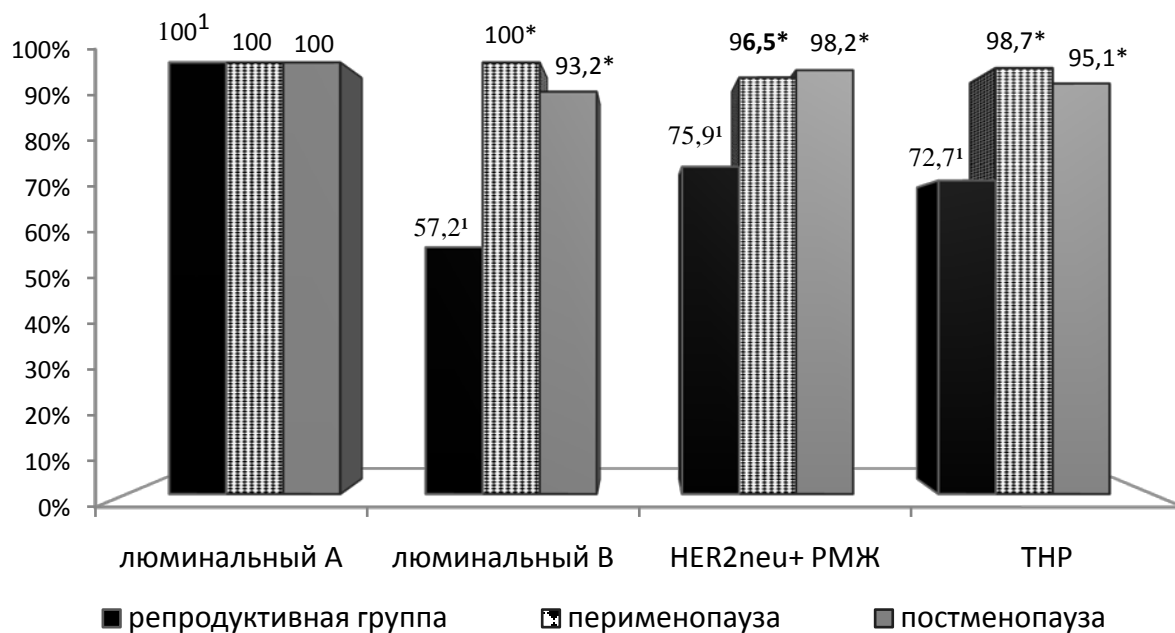


Люминальный А РМЖ характеризовался 100% полным интенсивным окрашиванием мембраны опухолевых клеток к Е-кадгерину вне зависимости от репродуктивного статуса (рисунок 5).



**Рисунок 4.** Уровень экспрессии Торо2а при различных биотипах РМЖ и репродуктивном статусе

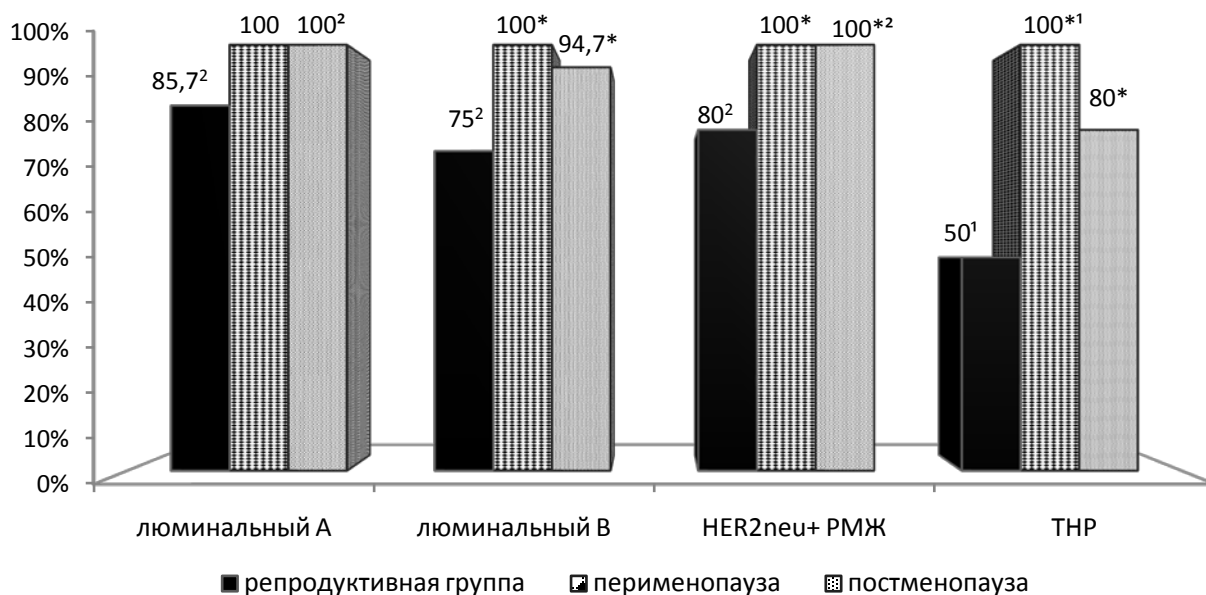
Примечание – различия достоверны в отношении: \* – люминального А подтипа ( $p < 0,05$ ); <sup>1</sup> – ТНР ( $p < 0,05$ )



**Рисунок 5.** Уровень экспрессии Е-кадгерина у больных различными биологическими подтипами РМЖ и репродуктивным статусом

Примечание – различия достоверны в отношении:\* – больных репродуктивной группы( $p<0,05$ ); <sup>1</sup> – люминального В подтипа ( $p<0,05$ )

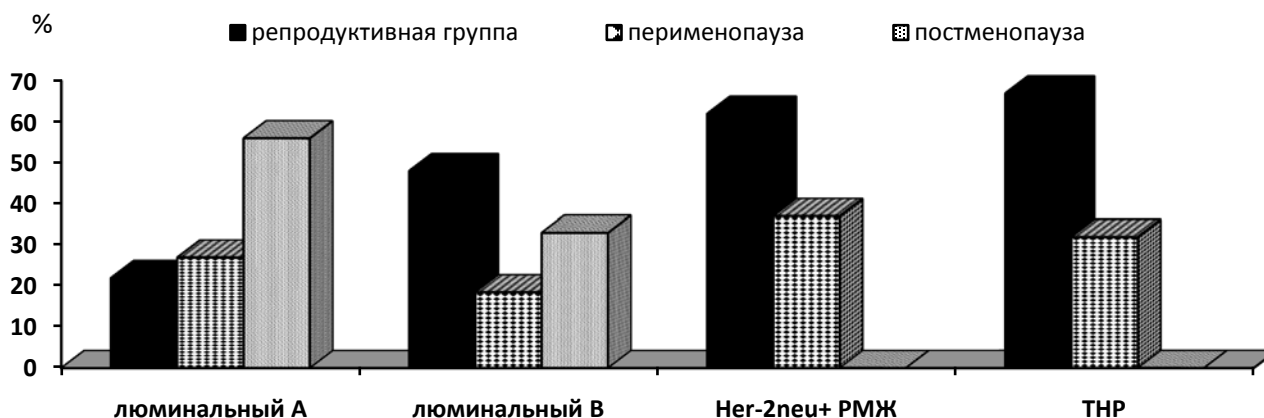
Кроме того, в 100% случаев отмечено положительное окрашивание ядер опухолевых клеток к рецепторам андрогенов, в среднем составив  $7\pm 1,7\%$  (разброс от 3 до 10% ядер) (рисунок 6). Таким образом, характер экспрессии рецепторов половых гормонов при люминальном А РМЖ носит однонаправленный характер.



**Рисунок 6.** Экспрессия рецепторов андрогенов в опухолях различных биологических подтипов РМЖ у больных с разным репродуктивным статусом

Примечание – различия достоверны в отношении:\* – репродуктивной группы( $p<0,05$ ); <sup>1</sup> – постменопаузы( $p<0,05$ ); <sup>2</sup> – ТНР ( $p<0,05$ )

Логичным являются и низкие показатели пролиферативной активности этого биотипа РМЖ. Хотя содержание анеуплоидных опухолей у этих больных в постменопаузе относительно высокое, что, скорее всего, можно объяснить относительно высокой частотой гиперэкспрессии p53 в этой группе (рисунок 7).



**Рисунок 7.** Частота встречаемости анеуплоидных опухолей у больных с различным репродуктивным статусом и подтипом РМЖ (%)

В настоящем исследовании люминальный А РМЖ у пациенток репродуктивной группы характеризовался сниженным содержанием эстрадиола (E2) как в опухоли (в 2,2 раза), так и в перифокальной зоне (в 1,9 раз) на фоне повышенных в 2,2 раза концентраций эстрона (E1) в опухоли. При этом сниженный в 1,3 раза уровень тестостерона (Т) и в опухоли, и в перифокальной зоне, а также прогестерона, в 2,4 раза и в 2,7 раза, соответственно, могут свидетельствовать не только о конверсии E2 в E1, но и о локальном синтезе эстрогенов опухолевой тканью. В данной группе больных метаболизм эстрогенов изменен в сторону увеличения образования 16 $\alpha$ -гидроксиэстрона (16ОНЕ) на фоне сниженного 2-гидроксиэстрона (2ОНЕ) (2ОНЕ/16ОНЕ 0,72 $\pm$ 0,02 в опухоли и 0,51 $\pm$ 0,015 в перифокальной зоне). Разбалансировка эстроген-андрогенового статуса в молочной железе в сторону превалирования андрогенов вызывала также нарушение связывания рецептора секс-стероидсвязывающего глобулина (ССГ). Коэффициент соотношения E1+E2/Т у больных репродуктивной группы был в 1,3–2 раза ниже, чем в интактной ткани. В группе перименопаузы в случае люминального А РМЖ усиление локального синтеза эстрогенов происходило только в опухолевой ткани, а перифокальная зона не затрагивалась. При этом метаболизм эстрогенов оказался измененным, но не усиленным, так как наряду с повышением уровня 16ОНЕ было отмечено снижение 2ОНЕ (2ОНЕ/16ОНЕ 0,45 $\pm$ 0,02 в опухоли и 1,1 $\pm$ 0,09 в перифокальной зоне). Соотношение суммы эстрогенов к тестостерону было

ниже показателей интактной ткани в 2 раза и демонстрировало превалирование андрогенов. Подобное соотношение эстрогенов и андрогенов было обнаружено в тканях ТНР у больных в постменопаузе. У больных люминальным А РМЖ в постменопаузе локально в тканях была установлена гиперэстрогения как за счет повышения уровня E2 в 1,9 раз в опухоли и в 1,7 раз в перифокальной зоне, так и за счет увеличения E1 в 1,6 раз в опухоли и в 1,8 раз в перифокальной зоне. Вероятно, образование эстрогенов происходило непосредственно в тканях молочной железы, так как одновременно было выявлено снижение концентрации предшественников эстрогенов: в 1,5 раза тестостерона в опухоли и в перифокальной зоне и в 3 и в 2,7 раза прогестерона, соответственно. При расчете  $E2+E1/Tв$  опухолевой ткани и перифокальной зоне отмечена гиперэстрогения – повышение в 2–2,5 раза по сравнению с показателями в интактной молочной железе. Таким образом, люминальный А РМЖ у больных репродуктивной группы и в перименопаузе обладал «измененным» гормональным фоном, отличающимся от тканей у больных в постменопаузе относительной гиперандрогенизацией, и был аналогичен ТНР в постменопаузе. И, по всей вероятности, данный подтип, развивающийся на фоне сохранной или относительно сохранной функции яичников, нельзя однозначно отнести к «благоприятному».

С другой стороны, такое поведение опухоли в перименопаузе возможно взаимосвязано с уровнем факторов роста в опухоли и перифокальной зоне, который сильно отличается от опухолей больных репродуктивной группы и в постменопаузе. Так, для больных люминальным А РМЖ в перименопаузе были достоверно более высокие показатели насыщенности опухоли VEGF – в 1,5 раз по сравнению с больными в постменопаузе и в 10 раз по сравнению с больными репродуктивной группы; EGF в 1,6–2,2 раза по сравнению с больными обеих групп. У этих больных в ткани, окружающей люминальный А подтип опухоли, был отмечен максимальный подъем концентрации  $TGF\beta 1$  – в 18–23,7 раз выше, чем в тканях больных в постменопаузе и репродуктивной группы.

Исследование компонентов фибринолитической системы проведено нами только в одной группе больных, имеющих «стаж менопаузы» не менее 5

лет, так как эту группу можно считать наиболее однородной. В образцах ткани люминального РМЖ было обнаружено высокое содержание плазмина, пониженное от нормы количество тканевого активатора плазминогена (tРА-акт) и второе по величине после ТНР содержание урокиназного активатора плазминогена (uРА-акт) при наивысшем балансе ингибитора активатора плазминогена/ активности ингибитора активатора плазминогена (РАI-I-АГ/РАI-I-акт). С другой стороны, эффективность взаимодействия РАI-I-акт с uРА-акт, определяемая в соотношении РАI-I-акт/uРА-акт, при люминальном А подтипе была выше, чем в остальных образцах, а РАI-I-акт/tРА-акт, наоборот, ниже, уступая только ТНР, где эта величина не отличалась от нормы (таблица 4).

**Таблица 4– Баланс тканевых компонентов системы фибринолиза при различных биологических подтипах РМЖ**

Коэффици- циент	Интактная молочная железа	Подтип РМЖ			
		ТНР	HER2neu+	Люминальный А	Люминальный В
П/ПГ	4,7±0,4	296±15,6 <sup>1</sup>	391±21,6 <sup>1,2</sup>	479±23,5 <sup>1,2,3</sup>	41,5±2,8 <sup>1,2,3,4</sup>
uРА-АГ/ uРА-акт	8,6±0,7	20,4±1,5 <sup>1</sup>	4,7±0,4 <sup>1,2</sup>	11,8±0,7 <sup>1,2,3</sup>	2,3±0,2 <sup>1,2,3,4</sup>
tРА-АГ/ tРА-акт	2,2±0,1	1,2±0,1 <sup>1</sup>	7,5±0,7 <sup>1,2</sup>	15,5±1,3 <sup>1,2,3</sup>	24,9±1,8 <sup>1,2,3,4</sup>
РАI-I-АГ/ РАI-I-акт	1,9±0,06	7,2±0,7 <sup>1</sup>	7,2±0,6 <sup>1</sup>	10,9±0,9 <sup>1,2,3</sup>	1,6±0,15 <sup>1,2,3,4</sup>
РАI-I-акт/ uРА-акт	14,0±1,1	14,94±1,1	1,25±0,1 <sup>1,2</sup>	4,18±0,3 <sup>1,2,3</sup>	0,64±0,04 <sup>1,2,3,4</sup>
РАI-I-акт/ tРА-акт	0,42±0,04	0,47±0,04	3,85±0,3 <sup>1,2</sup>	1,0±0,1 <sup>1,2,3</sup>	5,23±0,3 <sup>1,2,3,4</sup>

Примечание – <sup>1</sup> – достоверно относительно интактной ткани (p<0,05); <sup>2</sup> – достоверно по отношению к ТНР (p<0,05); <sup>3</sup> – достоверно по отношению к HER2neu+ РМЖ (p<0,05); <sup>4</sup> – достоверно по отношению к люминальному А подтипу (p<0,05)

Именно при люминальном А РМЖ обнаружен наибольший уровень НК-клеток в опухолевой ткани (10,6±1,73%), статистически значимо превышающий показатели люминального В и ТНР (в обоих случаях p<0,05) и наименьший уровень CD3+ (85,5±2,55%), что статистически значимо ниже по отношению к ТНР (p<0,05). При сравнении лимфоцитарного состава образцов опухоли и перифокальной зоны люминального А РМЖ показано, что различия между ними были статистически недостоверны, хотя отмечена тенденция к снижению в

ткани перифокальной зоны по сравнению с тканью опухоли количества CD3+CD4+ лимфоцитов и повышению уровня NK-клеток. Мы полагаем, что полученные нами данные вносят вклад в характеристику люминального АРМЖ как наиболее благоприятного, в том числе и по особенностям его лимфоцитарного микроокружения. Что касается влияния репродуктивного статуса на иммунологические характеристики опухоли и ее перифокальной зоны, то различия в пределах одного подтипа в основном сходны. По всем биологическим подтипам РМЖ отмечено статистически достоверно более высокое содержание в ткани опухоли CD3+CD4+ лимфоцитов у больных, находящихся в перименопаузе, в сравнении с репродуктивной группой. Статистически значимые различия между репродуктивной группой и группой постменопаузы в сторону увеличения в последней отмечены только при люминальном А РМЖ. Уровни CD3+CD8+ лимфоцитов в ткани опухоли больных репродуктивной группы статистически достоверно превышали показатели, выявленные у больных в пери- и постменопаузе, вне зависимости от биологического подтипа. Сохранная репродуктивная функция определяет, по-видимому, более высокое содержание в опухоли CD3+CD8+ при более низком уровне CD3+CD4+ клеток по сравнению с пери- и постменопаузой. По относительному содержанию CD16+CD56+лимфоцитов в ткани опухоли различных биологических подтипов в зависимости от репродуктивного статуса достоверных различий не получено. Видимо, содержание NK-лимфоцитов, которое при любой репродуктивной функции оказалось более высоким, у больных люминальным А РМЖ по сравнению с люминальным В и ТНР, определяется только биотипом опухоли.

**Her2neu+ РМЖ** встречался у 63 больных (7,4%). Установлено, что наибольшее влияние на его развитие оказывают социальные факторы, определяющие внешние воздействия на пациенток. Так, рабочие специальности встречались чаще среди этих больных ( $F=1,199921$ ,  $p=0,031023$ ), но, как и в других случаях, исключением являются больные репродуктивной группы. Изучение биохимических показателей и клинико-anamnestических данных больных HER2neu+ РМЖ говорит об отсутствии выраженных эндокринно-метаболических нарушений, которые имели место при люминальном А РМЖ,

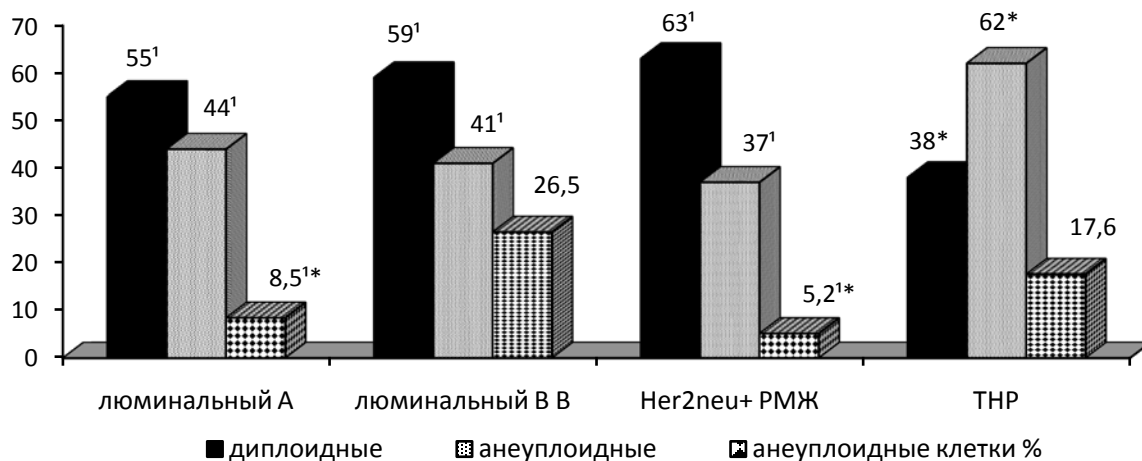
тогда как средние уровни общего билирубина, АСТ и АЛТ были максимальны при HER2neu+ РМЖ, но только у больных репродуктивной группы (15,5 мкмоль/л, 24,9 U/L и 25,9 U/L, соответственно), демонстрируя статистически достоверные различия по сравнению с люминальными РМЖ ( $p < 0,05$ ). У больных, находящихся в пери- и постменопаузе, HER2neu+ РМЖ никак не отличался по биохимическим показателям от других подтипов, за исключением достаточно высокого уровня щелочной фосфатазы у больных в перименопаузе (78,6 U/L). Таким образом, биохимическое зеркало HER2neu+ РМЖ свидетельствует об имеющихся нарушениях функции печени, что возможно связано с преимущественной сферой занятости этих больных.

У женщин в перименопаузе инфильтрирующая карцинома преобладала при всех биотипах, но при HER2neu+ РМЖ встречалась наиболее часто (42,6 против 10,0% долькового рака). У больных в постменопаузе ситуация была противоположной (44,6% инфильтрирующей карциномы против 50,0% долькового рака). Хотя при других биотипах в постменопаузе преобладал дольковый рак. У больных репродуктивной группы при HER2neu+ РМЖ, наоборот, дольковый рак встречался чаще, чем инфильтрирующая карцинома (40,0 против 12,8%). Таким образом, тенденция к увеличению частоты долькового рака с возрастом, отмеченная как нами, так и другими исследователями (Li C.I. et al., 2003; Newcomer L.M. et al., 2003), справедлива не при всех биотипах.

ИГХ маркеры в целом свидетельствуют об агрессивности течения HER2neu+ РМЖ (ассоциация с гиперэкспрессией p53 (рисунок 2) на фоне низкого уровня экспрессии bcl2 в целом) (рисунок 3). В отношении p53 это справедливо у женщин в пери- и постменопаузе, что подтверждает предположение о тесной взаимосвязи гиперэкспрессии p53 с HER2neu+ статусом и накопление «мутантного» p53 с возрастом. При Her2neu+ РМЖ также в большинстве случаев были экспрессированы рецепторы андрогенов (93,3%), демонстрируя позитивное окрашивание при среднем содержании положительно окрашенных ядер опухолевых клеток –  $31,7 \pm 10,9\%$  с разбросом от 10,0 до 45,0% (отличия показателей достоверны по отношению к люминальному А подтипу;  $p \leq 0,05$ ), а общая тенденция к увеличению экспрессии рецепторов андрогенов с возрастом

сохраняется (рисунок 6). Такой относительно высокий уровень экспрессии рецепторов андрогенов в опухолях HER2neu+ РМЖ объясняется не наличием рецепторов прогестерона и рецепторов эстрогенов, что не присуще данному биотипу, а, по-видимому, особенностями гормонального гомеостаза этих опухолей. Содержание положительно окрашенных клеток к Торо2а при Her2neu+ РМЖ было максимальным ( $77,5 \pm 7,5\%$ ); при этом минимальные значения отмечаются в опухолях женщин в перименопаузе ( $28,3 \pm 4,9\%$ ) (рисунок 4). Также в 100% случаев выявлено умеренное окрашивание мембраны опухолевых клеток антителами к Е-кадгерину с наличием слабого диффузного окрашивания цитоплазмы –  $80,1 \pm 2,8\%$  (рисунок 5).

Показатели, характеризующие плоидность и пролиферативную активность опухоли, против ожидания, при HER2neu+ РМЖ достаточно «благоприятны» и близки к люминальному Аподтипу (рисунок 8).



**Рисунок 8.** Частота встречаемости диплоидных и анеуплоидных опухолей и количество анеуплоидных опухолевых клеток при РМЖ разных биологических подтипов (%).

Примечание – различия достоверны в отношении: \* – люминального В РМЖ ( $p < 0,05$ );  
– ТНР ( $p < 0,05$ )

Логично предположить, что гормональный фон опухоли и перифокальной зоны больных при отсутствии экспрессии к половым гормонам будет отличаться от люминальных раков. И действительно, полученные нами данные свидетельствуют о том, что в постменопаузе только при HER2neu+ РМЖ в опухолевой ткани уровень E2 и E1 был повышен в 1,6 раза и в 3 раза соответственно по сравнению с показателями в интактной молочной железе на фоне снижения его в перифокальной зоне в 3,2 раза и в 2 раза соответственно.



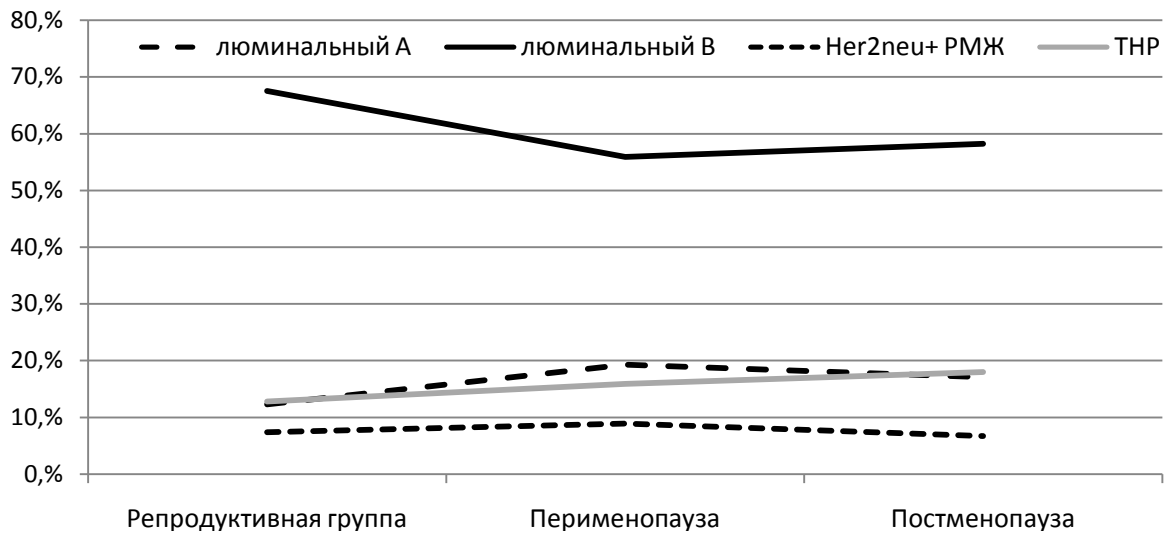
Таким образом, у больных в постменопаузе при HER2neu+ РМЖ отмечается обеднение гормонами перифокальной зоны с концентрацией их в опухоли. В данном случае, учитывая отсутствие в опухолевой ткани рецепторов эстрогенов и рецепторов прогестерона, этот факт является удивительным, тем более, что есть вероятность того, что данное увеличение насыщенности опухоли эстрогенами происходило не за счет непосредственного, локального синтеза гормонов опухолью, а за счет «перекачки» их из перифокальной зоны. При этом не приходится говорить о повышенном метаболизме эстрогенов перифокальной зоной, так как уровень 2ОНЕ снижался в 2,5 раза, а 16ОНЕ – не изменялся. Уровень тестостерона у больных в постменопаузе в отличие от люминальных подтипов в опухоли был в норме, а снижен только в перифокальной зоне в 1,7 раз. В результате коэффициент соотношения суммы эстрогенов к тестостерону в опухолевой ткани HER2neu+ РМЖ был в 1,5 раза повышен, а в перифокальной зоне в 2 раза снижен по сравнению с показателями в интактной молочной железе. Перифокальная зона HER2neu+ РМЖ была существенно обеднена прогестероном (в 3,7 раза) на фоне снижения и в опухоли, но не столь значительного (в 2,9 раза). Только в случае HER2neu+ РМЖ в постменопаузе уровень ССТГ в опухоли превышал нормальные величины в 1,3 раза. Пролактин также концентрировался только в опухоли, превышая в 2,5 раза показатели интактной молочной железы, на фоне неизмененного содержания в перифокальной зоне. У больных HER2neu+ РМЖ в перименопаузе и в репродуктивной группе нарушения мало отличались от других биотипов и захватывали не только опухолевую ткань, но и перифокальную зону, нося однонаправленный характер.

Уровень EGF больных в постменопаузе был в разной степени повышен в тканях молочной железы за исключением HER2neu+ РМЖ, при котором содержание этого фактора роста не отличалось от ткани интактной молочной железы. Эта особенность может быть объяснена гиперэкспрессией EGFR, характерной для данного подтипа. С другой стороны, это справедливо только в отношении больных в постменопаузе. Содержание TGF- $\beta$ 1 было повышено в опухолевой ткани при всех подтипах РМЖ, и только при HER2neu+ РМЖ – в перифокальной зоне уровень TGF- $\beta$ 1 не отличался от показателей в интактной

ткани молочной железы, тогда как при люминальных опухолях его содержание в перифокальной зоне было снижено. Концентрация IGF1 как в опухоли, так и в перифокальной была снижена в 2,5 раза и в 1,4 раза соответственно. При этом и минимальный уровень IGF2 был отмечен в перифокальной зоне при HER2neu+ РМЖ (снижение в 4,2 раза). В перименопаузе у этих больных насыщенность EGF в опухоли была существенно выше по сравнению с другими биотипами (в 11 раз по сравнению с интактной железой, в 1,8 раз с люминальным А РМЖ и в 5,3 раза с люминальным В РМЖ). При этом перифокальная зона HER2neu+ РМЖ практически не отличалась по содержанию фактора роста от опухоли. Аналогичная ситуация была и с уровнем TGF- $\beta$ 1 (в 6,5 раз превышение в опухоли по сравнению с интактной молочной железой, в 1,6 раз с люминальным А РМЖ, в 2,2 раза с люминальным В РМЖ и в 2,3 раза с ТНР). Но в отличие от больных в постменопаузе, перифокальная зона также была перенасыщена этим фактором. Концентрация IGF2 была снижена только в опухоли в 1,7 раз. У больных репродуктивной группы для HER2neu+ РМЖ было характерно также значительное повышение уровня EGF и в опухоли в 5,9 раз, и в перифокальной зоне в 7,6 раз, TGF- $\beta$ 1 в 4,8 раз в опухоли и в 3,4 раза в перифокальной зоне. Концентрация IGF2 также, как и в постменопаузе, была снижена и в опухоли в 4,7 раз, и в перифокальной зоне в 1,8 раз. Содержание IGF1 в тканях HER2neu+ РМЖ не отличалось от интактной. Можно отметить, что возрастание насыщенности VEGF, TGF $\beta$ 1 и/или EGF только опухолевого узла, исключая перифокальную зону, при люминальных и HER2neu+ подтипах РМЖ отражает некоторую ограниченность злокачественного процесса.

При Her2neu+ РМЖ в перифокальной зоне выявлен наиболее высокий уровень NK-клеток по сравнению с другими вариантами заболевания ( $23,1 \pm 4,75\%$ ); кроме того, он был в 3 раза выше, чем в опухолевой ткани этих больных. В качестве особенности подтипа HER2-neu+РМЖ можно отметить отсутствие снижения содержания NK-клеток у больных с сохранной репродуктивной функцией и находящихся в перименопаузе по сравнению с больными люминальным А РМЖ.

Частота встречаемости **ТНР** составила 16,2% (138 больных), равномерно увеличиваясь с возрастом (рисунок 9).



**Рисунок 9.** Динамика частоты встречаемости биологических подтипов РМЖ у женщин разного репродуктивного статуса

При этом у больных, находящихся в постменопаузе, он развивался немного раньше, чем люминальные раки (средний возраст  $58,6 \pm 1,1$  лет против  $64,4 \pm 1,3$  лет при люминальном BHER2neu+ и  $64,1 \pm 0,9$  лет при люминальном В HER2neu-) ( $p < 0,05$ ).

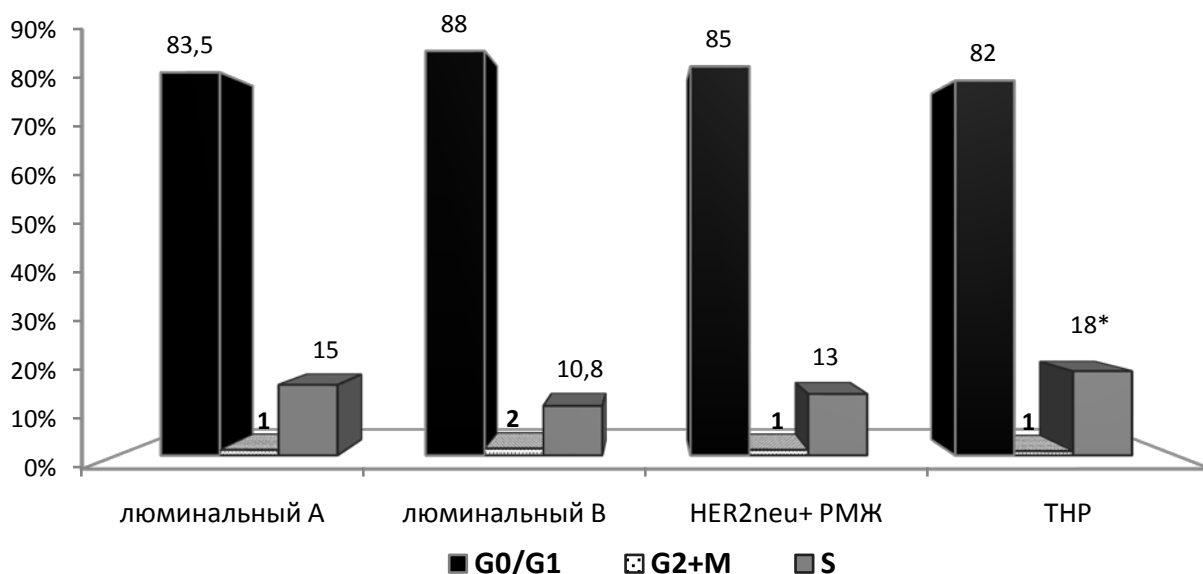
Статистически значимыми факторами риска развития ТНР также, как и HER2neu+РМЖ, являлись внешние воздействия. У этих больных в анамнезе первая беременность достоверно чаще заканчивалась медицинским абортом в сравнении с другими группами ( $F=4,948040$ ,  $p=0,006861$ ). Да и общее количество медабортов ( $F=4,045787$ ,  $p=0,007757$ ) и частота вторичного бесплодия были высокими ( $F=2,44147$ ,  $p=0,0423531$ ). Но эти факторы срабатывали опять только в пери- и постменопаузе. В связи с этим одним из возможных путей профилактики развития именно ТНР является снижение количества медицинских абортов, особенно при первой беременности. Что касается социальных факторов, играющих столь важную роль в развитии HER2neu+ РМЖ и гормонально-метаболических нарушений при люминальном А РМЖ, то на развитие ТНР, они не оказывали столь значимого влияния.

Распределение по гистологической принадлежности ТНР при различном репродуктивном статусе соответствовало таковому при люминальном А РМЖ.

Гиперэкспрессия p53 при ТНР оказалась несколько ниже по сравнению HER2neu+ РМЖ или люминальным В РМЖ (рисунок 2). Скорее всего, это связано с тем, что экспрессия p53 ассоциирована с экспрессией HER2neu, отсутствие которого характерно как для ТНР, так и для люминального А РМЖ, чем можно

объяснить сходную экспрессию p53. Интересным является относительно высокий уровень экспрессии bcl2 у больных в постменопаузе при нелюминальных подтипах, что может быть предпосылкой для применения гормонотерапии у этой категории больных даже при отсутствии экспрессии рецепторов половых гормонов (рисунок 3). Хотя в целом уровень экспрессии bcl2 при ТНР был ниже, чем при HER2neu+ РМЖ, также, как и содержание положительно окрашенных клеток к Торо2а (рисунок 4). По нашим данным, ТНР – единственный биотип, при котором уровень экспрессии рецепторов андрогенов в опухоли при постменопаузе достоверно ниже, чем таковой при перименопаузе (рисунок 6). При ТНР наблюдалось окрашивание 84,6±3,6% опухолевых клеток антителами к Е-кадгерину (рисунок 5). Достоверная разница в значении этого показателя получена при сравнении люминального А и нелюминальных подтипов ( $p<0,05$ ) в сторону снижения у последних. Подавление экспрессии Е-кадгерина при ТНРМ отмечено и другими авторами (Kashiwagi S. et al., 2010). Видимо, это связано со снижением уровня экспрессии половых гормонов, так как аналогичная картина наблюдается и при HER2neu+ РМЖ. Механизмы подобной взаимосвязи остаются пока неясными и нуждаются в дальнейших исследованиях.

Если по характеру экспрессии рецепторов ТНР демонстрировал некоторую схожесть с люминальным А РМЖ, что обусловлено, на наш взгляд, общим фактом отсутствия гиперэкспрессии или амплификации HER2neu, то показатели пролиферативной активности опухоли свидетельствовали об агрессивности данного биотипа. При ТНР выявлены максимальная доля анеуплоидных опухолей (рисунок 8), и высокие темпы пролиферации, определяемые по доле клеток в S-фазе клеточного цикла (рисунок 10).



**Рисунок 10.** Распределение клеток по фазам клеточного цикла при различных биологических подтипах РМЖ

Примечание —\* — отличия статистически достоверны по отношению к люминальному В РМЖ ( $p < 0,05$ )

При этом показатели гормонального статуса в опухолях этих групп идентичны. Несмотря на общие черты нелюминальных подтипов, TNF отличался своеобразной картиной локального гормонального статуса опухоли и перифокальной зоны, отличной от HER2neu+ РМЖ. В случае TNF в постменопаузе баланс эстрогенов и андрогенов в тканях молочной железы, несмотря на повышенные концентрации E1, был нарушен в сторону преобладания андрогенов, E2+E1/T был 2 раза ниже показателей в интактной ткани. В данном случае в постменопаузе уровень E2 оказался сниженным в 2 раза, как в опухоли, так и в перифокальной зоне, а концентрация E1, напротив, в 1,6 раза повышена. Можно предположить, что превалирование E1 происходило не столько за счет синтеза из тестостерона, локальная концентрация которого в тканях не изменялась, сколько за счет обратного превращения из E2. Причем высокие концентрации E1 практически не расходовались в опухоли и перифокальной зоне при TNF, так как метаболизм эстрогенов не увеличивался, а только качественно изменялся — за счет снижения 2ОНЕ (в 1,5 раза) и повышения 16ОНЕ (в 1,4 раза в опухоли и 1,3 раза в перифокальной зоне) (минимального среди всех рассматриваемых биотипов РМЖ). При этом отсутствие разницы эстрогенного метаболизма в опухоли

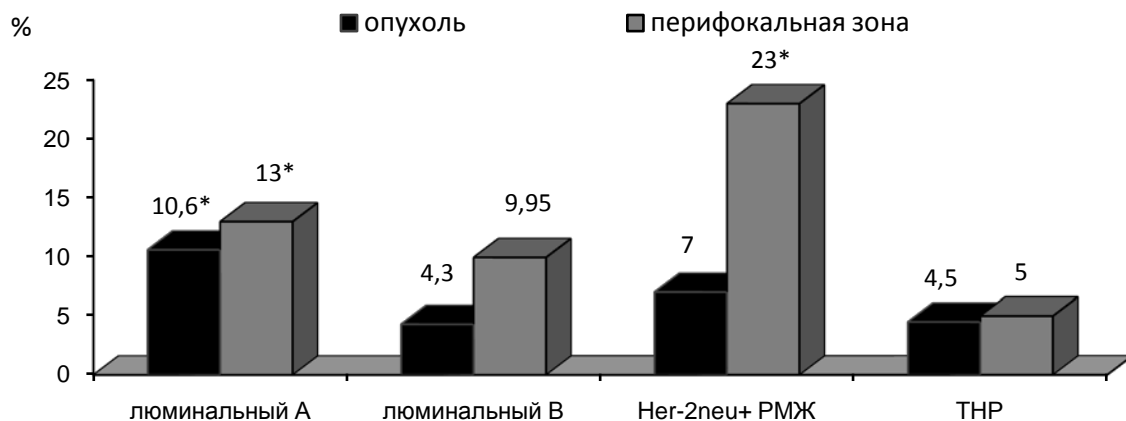
иперифокальной зоне у больных ТНР репродуктивной группы и в перименопаузе может свидетельствовать об исчезновении метаболических границ и более агрессивном течении заболевания.

Вероятно, существенный вклад в процесс развития данного заболевания вносят и особенности распределения факторов роста, с их высокой концентрацией в перифокальной зоне и, соответственно, значительным расширением опухолевого поля. Как уже было отмечено, уровень VEGF в нелюминальных опухолях в постменопаузе был намного выше, чем в люминальных. При ТНР он был максимален – в 11,3 раз превышающий показатели в интактной молочной железе, в 5,8 раз опухоли люминального А РМЖ, в 1,9 раз люминальный В РМЖ. Что касается перифокальной зоны опухоли, то только в случае ТНР уровень VEGF вообще был повышен (в 3,4 раза). Концентрация EGF в опухоли была повышена незначительно (в 3,3 раза), тогда как в перифокальной зоне в 9 раз. Содержание TGF- $\beta$ 1 в опухоли было также максимальным – в 4,2 раза, а в перифокальной зоне (только при ТНР) в 6,7 раз выше показателей в интактной ткани. И только концентрация IGF1 и IGF2 в перифокальной зоне была снижена, хотя в опухоли уровень IGF1 был повышен в 1,4 раза. В отличие от постменопаузы, в опухолях больных в *перименопаузе* не прослеживается такого накопления факторов роста в перифокальной зоне, в которой уровень EGF, например, был в 1,8 раз ниже по сравнению с опухолью, но в 6,2 раза выше по сравнению с интактной тканью. При этом изменения TGF- $\beta$ 1, IGF1 и IGF2 были аналогичны найденным у больных в постменопаузе. У больных *репродуктивной группы* концентрация этих факторов роста в перифокальной зоне была еще меньше, за исключением IGF2, уровень которого в перифокальной зоне превышал интактную ткань в 5,2 раз.

Ограничение активности uPA и tPA происходило интенсивнее в опухолях нелюминальных типов РМЖ. С другой стороны, эффективность взаимодействия PAI-I-акт с uPA-акт, определяемая в соотношении PAI-I-акт/uPA-акт не отличалась от нормы. Эффективность взаимодействия PAI-I-акт с активными формами uPA и tPA в балансе PAI-I-акт/uPA-акт и PAI-I-акт/tPA-акт была в норме при ТНР, но при нарушенном балансе всей тканевой системы фибринолиза нормальных соотношений явно недостаточно для блокирования

быстро растущей активности сериновых протеиназ. По нашим результатам, РАІ-I-АГ вырабатывался в резко повышенных количествах именно в указанных образцах ткани РМЖ. В ткани ТНР баланс РАІ-I-акт/uРА-акт и tРА, не отличался от нормальных значений (таблица 4).

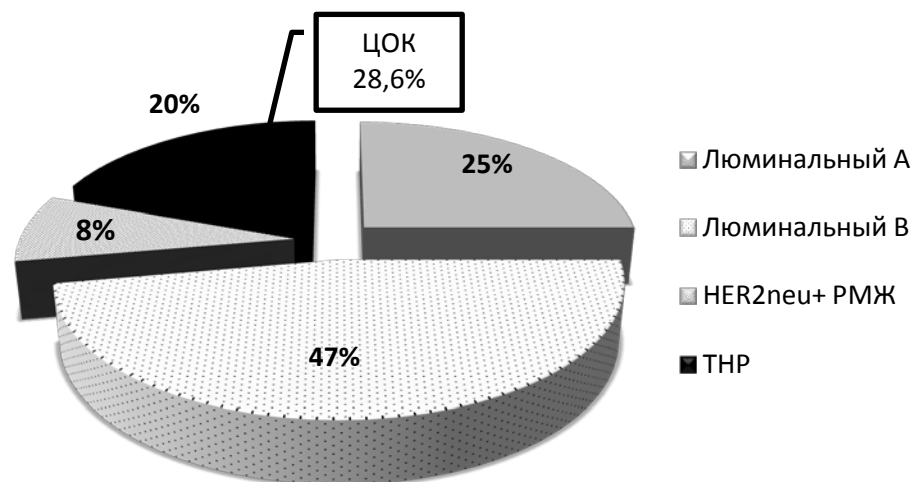
Показанное нами низкое содержание НК-клеток как в ткани опухоли, так и в перифокальной зоне (рисунок 11), дополняет картину, обуславливающую неблагоприятное течение данного биотипа РМЖ.



**Рисунок 11.** Сравнительная характеристика содержания лимфоцитарных субпопуляций в опухоли и перифокальной зоне больных РМЖ различных биологических подтипов (%)

Примечание —\* — отличия статистически достоверны по отношению ТНР ( $p < 0,05$ )

Именно при ТНР в процентном отношении наиболее часто определялись ЦОК (28,6%), в то время как они не были выявлены ни у одной больной с HER2neu+ РМЖ (рисунок 12). Возможно, этот факт в какой-то степени определяет неблагоприятный прогноз заболевания при этом биологическом подтипе.



**Рисунок 12.** Частота выявления ЦОК у больных различными биологическими подтипами РМЖ (%)

На основании полученных данных был разработан способ лечения раннего РМЖ, основанный на исходном определении ЦОК (патент РФ 2554749 от 01.06.2015 г.).

**Люминальный В РМЖ** встречался наиболее часто, а именно, у 509 больных. Данное обстоятельство более характерно для репродуктивной группы (таблица 5).

**Таблица 5– Частота встречаемости биологических подтипов у больных с различным менструальным статусом, абс. ч. (%)**

Биотип опухоли	Группа больных по состоянию репродуктивной функции		
	репродуктивная	перименопауза	постменопауза
Люминальный А	25 (12,3)*	39 (19,3)* <sup>1</sup>	76 (17,1)* <sup>1</sup>
Люминальный В	137 (67,5)	113 (55,9) <sup>1</sup>	259 (58,2) <sup>1</sup>
HER2neu+ РМЖ	15 (7,4)*	18 (8,9)*	30 (6,7)*
ТНР	26 (12,8)*	32 (15,9)* <sup>1</sup>	80 (18,0)* <sup>1</sup>
Всего	203 (100,0)	202 (100,0)	445 (100,0)

Примечание – \* – различия достоверны в отношении люминального В РМЖ ( $p < 0,05$ ); <sup>1</sup> – различия достоверны по отношению к репродуктивной группе ( $p < 0,05$ )

Люминальный В без гиперэкспрессии или амплификации гена HER2-neu встречался почти в 2 раза чаще, чем с таковой (таблица 6).

**Таблица 6– Частота вариантов люминального В подтипа (с амплификацией или гиперэкспрессией гена HER2-neu и без) в зависимости от репродуктивного статуса больных, абс. ч. (%)**

Группа больных	Люминальный В HER2-neu+	Люминальный В HER2-neu-	Всего
Постменопауза	89 (34,3) <sup>1</sup>	170 (65,7)* <sup>1</sup>	259 (100,0)
Перименопауза	40 (35,4) <sup>1</sup>	73 (64,6)* <sup>1</sup>	113 (100,0)
Репродуктивная	67 (48,9)	70 (51,1)	137 (100,0)
Всего	196 (38,5) <sup>1</sup>	313 (61,5)* <sup>1</sup>	509 (100,0)

Примечание – \* – различия достоверны относительно люминального В HER2neu+ ( $p < 0,05$ ); <sup>1</sup> – различия достоверны относительно репродуктивной группы ( $p < 0,05$ )

Но, если в репродуктивной группе высокая частота встречаемости данного подтипа поддерживалась достоверно более высоким процентом гиперэкспрессии или амплификации гена Her2-neu в сочетании с положительным рецепторным



статусом, то в перименопаузетакая закономерность отсутствовала. В постменопаузе его частота вновь возрастала, но уже за счет более высокой пролиферативной активности опухолей (таблица 7).

**Таблица 7– Средний показатель Ki 67 у больных с различными биологическими подтипами РМЖ и репродуктивным статусом (n=285), %**

Биологические подтипы	Репродуктивный статус больных		
	постменопауза	перименопауза	репродуктивная группа
Люминальный А	9,2	7,7	10,7
Люминальный В-	44,2	38,6*	39,2*
Люминальный В+	32,4	29,5	30,9%
HER2neu+	27,2** <sup>1</sup>	21,2 <sup>1</sup>	33,7**
ТНР	46,9 <sup>1</sup>	45,1 <sup>1</sup>	65
Среднее	31,9 <sup>1</sup>	28,4 <sup>1</sup>	35,9

Примечание – различия достоверны ( $p < 0,05$ ) в отношении: \* – постменопаузы; \*\* – перименопаузы; <sup>1</sup> – репродуктивной группы

По нашему мнению, этот подтип занимает промежуточное положение между достаточно благоприятным люминальным А и нелюминальными опухолями. Это и определило очередность его рассмотрения в последнюю очередь, позволяя провести сравнительный анализ. При клинко-эпидемиологическом анализе именно для люминального В РМЖ вне зависимости от HER2neu статуса не удалось выявить сколько-нибудь значимых факторов риска, определяющих его «лицо» вне зависимости от репродуктивного статуса.

У молодых женщин с сохранной менструальной функцией только у больных люминальным В РМЖ инфильтрирующая карцинома встречается чаще, чем дольковая (в 2 раза), тогда как при люминальном А и ТНР их частота встречаемости одинакова, а при HER2neu+РМЖ дольковый рак даже превалирует.

Несмотря на то, что данный подтип относится к люминальным, по ряду ИГХ параметров он существенно отличался от люминального А РМЖ, демонстрируя значительно большую агрессивность. Гиперэкспрессия p53 при люминальном В РМЖ наблюдалась практически с такой же частотой, как и при

Her2neu+ РМЖ, сохраняя тенденцию к увеличению в постменопаузе (рисунок 2). А уровень экспрессии bcl-2 наоборот был статистически достоверно ниже и в отличие от люминального А РМЖ зависел от состояния репродуктивной функции (рисунок 3). На наш взгляд, это объясняется прежде всего неоднородностью люминального В подтипа. Высокий уровень экспрессии p53 при нем может обеспечиваться за счет гормон-позитивных опухолей, ассоциированных с гиперэкспрессией или мутацией Her2neu. Минимальная экспрессия отмечена в опухолях больных в перименопаузе вне зависимости от биологического подтипа, а максимальная - в постменопаузе. С практической точки зрения, это позволяет предположить большую эффективность гормонотерапии при люминальном В подтипе у больных в постменопаузе. По всей вероятности, существует пока не установленная связь экспрессии bcl-2 с гормональной составляющей, которая могла бы объяснить тот факт, что именно этот маркер является предиктором эффективности химио/гормонотерапии РМЖ (Hellemans P., vanDam P.A., Weyler J et al., 1995; Gasparini G., Barbareschi M., Doglioni C. et al., 1995; Crawford A., Nahta R., 2011). Содержание положительно окрашенных клеток к Торо2α при люминальном В РМЖ было статистически значимо выше в сравнении с люминальным А (рисунок 4), а к Е-кадгерину сопоставимо в пери и постменопаузе (рисунок 5). В опухолях репродуктивной группы отмечена меньшая частота положительного окрашивания ядер опухолевых клеток к рецепторам андрогенов (рисунок 6). Можно предположить, что по мере угасания репродуктивной и менструальной функции, происходит снижение экспрессии рецепторов эстрогенов и рецепторов прогестерона, а экспрессия рецепторов андрогенов возрастает. Это, в свою очередь, может быть связано с особенностями стероидогенеза у больных РМЖ в постменопаузе.

У больных люминальным В РМЖ также, как и при люминальном А, в постменопаузе выявлены абсолютная и относительная гиперэстрогения в тканях молочной железы. Но в опухоли люминального В подтипа уровень E1 более чем в 2 раза превышал таковой в опухоли люминального А РМЖ. Соответственно отмечено и снижение E2/E1 в 2,5 раза. В остальных случаях опухолевая ткань и окружающая ее зона, хотя и отличались повышенным уровнем E1, но при

рассмотрении соотношения суммы эстрогенов к тестостерону демонстрировали превалирование андрогенов.

Этот подтип напоминает нелюминальные опухоли (ТНР и HER2neu+РМЖ) и по уровню факторов роста в опухоли и перифокальной зоне. Так, у больных в постменопаузе насыщенность люминальной В опухоли VEGF превышает интактную молочную железу в 5,8 раз, а люминальную А опухоль в 3 раза, тем самым приближаясь к ТНР и HER2neu+ РМЖ. Содержания TGF- $\beta$ 1 у больных в постменопаузе также было максимальным в люминальных В опухолях, превышая показатели интактной молочной железы в 4,9 раз и являясь сопоставимым с показателями в ТНР. Однако в отличие от последнего содержание TGF- $\beta$ 1 в перифокальной зоне было снижено (в 1,3 раза). Концентрация IGF1 в опухоли была снижена при люминальном В подтипе в 3,3 раза, что опять сближает его HER2neu+РМЖ (снижение в 2,5 раза). И вновь отличается перифокальная зона (перенасыщение IGF1 в 2,4 раза в отличие от HER2neu+РМЖ). С другой стороны, учитывая, что часть опухолей люминального В подтипа экспрессирует EGFR, логично было бы предположить, что насыщенность опухоли EGF должна приближаться к HER2neu+ РМЖ, а именно, не отличаться от интактной молочной железы. Но по результатам исследования мы получили, наоборот, максимальную концентрацию EGF в люминальной В опухоли, в 13,4 превышающую концентрацию EGF в интактной молочной железе, в 3,5 раза в люминальной А опухоли и в 12,1 раз HER2neu+РМЖ. Что касается перифокальной зоны, то уровень EGF также был повышен, но не столь существенно (в 2,5 раза по сравнению с интактной молочной железой). Несколько другая картина складывается при перименопаузе, где опять распределение факторов роста люминальных подтипов отличается между собой. Насыщенность опухоли VEGF в люминальных А опухолях выше в 1,4 раза, а насыщенность EGF в 2,9 раза, чем в люминальных В. При этом, если для люминального А подтипа было характерно относительно равномерное распределение EGF как в опухоли, так и в перифокальной зоне, превышающее показатели в интактной молочной железе в среднем в 6 раз, то при люминальном В подтипе данный фактор роста в основном концентрировался в перифокальной зоне, содержание в которой EGF было выше, чем в опухоли в 5 раз. В результате

при люминальном ВРМЖ насыщенность опухоли EGF превышала показатели в интактной железе в 2,2 раза, а насыщенность перифокальной зоны – в 11,3 раза. При этом перифокальная зона люминального В подтипа была также перенасыщена и VEGF (в 4 раза). В отличие от больных репродуктивной группы, и в постменопаузе, и в перименопаузе люминальные В опухоли не отличались от других по уровню TGF- $\beta$ 1 и IGF1. По насыщенности тканей факторами роста люминальные В опухоли больных репродуктивной группы были в основном сходны с опухолями в постменопаузе. Отличительной особенностью люминального В подтипа в репродуктивной группе явилось повышение данного фактора роста только в опухолевой ткани – в 2,7 раз по сравнению с интактной молочной железой.

Также он резко отличался от других по состоянию фибринолитической системы (табл. 4). В ткани наблюдался наибольший выброс плазминогена, uPA-акт, минимальное содержание tPA-акт и плазмина. Цифровые показатели активации компонентов тканевой фибринолитической системы при люминальном В подтипе сравнимы с HER2neu+ РМЖ. При люминальном В РМЖ также, как и при HER2neu+ РМЖ, наблюдалась самая высокая степень разбалансировки uPA-АГ/uPA-акт: коэффициенты были понижены в 1,8 и 3,7 раза, соответственно, сравнительно с тканью интактной молочной железы. В этих же тканях наблюдались самые низкие коэффициенты баланса PAI-I-акт/uPA-акт: в 11,2 и в 21,9 раза ниже нормы соответственно.

Что касается пролиферативных свойств, то люминальный В подтип при минимальном среди всех количестве опухолевых клеток в S-фазе (рисунок 10) демонстрирует высокую частоту анеуплоидии (рисунок 8).

На основании выделенных факторов риска нами разработан способ прогнозирования эффективности химиотерапии РМЖ за счет использования косвенных признаков. На данную методику получен патент РФ № 2551232 от 20.04.2015 г. Методика внедрена в ФГБУ «РНИОИ» МЗ РФ (акт о внедрении результатов диссертационного исследования от 25.12.2014). Математическое выражение:  $\text{ЭфХТ} = (1,99 - 0,004 * X_1 - 0,0076 * X_2 + 0,001 * X_3 - 0,0009 * X_4 - 0,0126 * X_5 + 0,0138 * X_6 - 0,0574 * X_7) * 100\%$ , где ЭфХТ – эффективность химиотерапии,  $X_1$  – возраст пациентки в годах,  $X_2$  – рост пациентки в см,  $X_3$  –

вес пациентки в кг, X4 – продолжительность менструального цикла при сохранной менструации, 0 – при ее отсутствии; X5 – количество беременностей в абсолютных числах, X6 – количество медицинских аборт в абсолютных числах, X7 – преимущественное белковое питание (1–да, 0–нет). Коэффициент детерминации составил  $R^2=0,87$ . Если рассчитанное значение эффективности терапии 50% и выше, то больному химиотерапия показана до определения биологического подтипа РМЖ, если менее 50%, то нет.

Аналогичная модель (с другими коэффициентами) разработана нами и для ускоренного прогнозирования гормонозависимости опухоли, соответственно, эффективности гормонотерапии (патент РФ 2559152 от 10.07.2015 г.). Математическое выражение:  $ГЗ=(-1,0006+0,0040 \times X1+0,0076 \times X2-0,0010 \times X3+0,0010 \times X4+0,0125 \times X5-0,0137 \times X6-0,0066 \times X7+0,0571 \times X8) \times 100\%$ , где ГЗ – гормонозависимость опухоли, X1 – возраст пациентки в годах, X2 – рост пациентки в см, X3 – вес пациентки в кг, X4 – продолжительность менструального цикла при сохранной менструации, дни: если у женщины перименопауза или постменопауза – 0, X5 – количество беременностей в анамнезе в абсолютных числах, X6 – количество медицинских абортов в анамнезе в абсолютных числах, X7 – прием оральных контрацептивов в анамнезе: 1 балл – да, 0 баллов – нет, X8 – преимущественное белковое питание: 1 балл – да, 0 – нет. Коэффициент детерминации составил  $R^2=0,72$ .

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, впервые на большом материале изучены закономерности развития биологических подтипов РМЖ с учетом факторов внешней и внутренней среды у женщин в различные репродуктивные периоды жизни. Показано, что люминальный А РМЖ является в большей степени «гормонально-метаболическим» раком, а HER2neu+ РМЖ и ТНР развиваются, по всей вероятности, под воздействием определенных внешних условий. Это справедливо только у женщин в пери- и постменопаузе. Факторов, влияющих на развитие того или иного биотипа в репродуктивной группе, не выявлено. Понимание данной ситуации позволит разработать меры первичной и вторичной профилактики с учетом биологических характеристик опухоли и индивидуальных параметров женщины. На основании выявленных закономерностей разработаны способы

прогнозирования химиочувствительности и гормонозависимости опухоли, применение которых возможно в любых технических условиях медицинского учреждения и позволяет своевременно начать специфическую терапию. Изучены морфологические, ИГХ, пролиферативные, гормонально-метаболические особенности опухолей различных биологических подтипов, иммунологические характеристики их микроокружения с учетом состояния менструальной функции женщины. Выявленные закономерности показывают, что на сегодняшний день РМЖ нельзя рассматривать только с позиции биологического подтипа, определенного по стандартной ИГХ-панели. Необходимо учитывать и другие внешние и внутренние факторы, определяющие биологическое поведение опухоли в сочетании с состоянием менструальной функции женщины. Именно такой подход позволит разработать меры профилактики с учетом биологических характеристик опухоли и индивидуальных параметров женщины, а также перейти к действительно персонифицированной тактике лечения этой категории больных и, соответственно улучшить его результаты.

## **ВЫВОДЫ**

1. Изученные закономерности развития биологических подтипов рака молочной железы с учетом факторов внешней и внутренней среды у женщин в различные репродуктивные периоды жизни показали, что в перименопаузе люминальный А рак молочной железы является в большей степени «гормонально-метаболическим» раком, а HER2neu+ подтип и тройной негативный рак зависят в основном от социальных факторов. Факторов риска, влияющих на развитие всех биотипов в репродуктивной группе, не выявлено. Для люминального В рака молочной железы не удалось выявить значимых факторов риска вне зависимости от репродуктивного статуса.

2. Экспрессия рецепторов белков bcl-2 и p53, а также экспрессия Е-кадгерина и Торо2α при раке молочной железы зависит от биотипа опухоли, и от репродуктивного статуса больных. Гиперэкспрессия p53 ассоциирована с HER2neu+ статусом. Экспрессия рецепторов андрогенов максимальна при люминальных подтипах: 100% при люминальном А раке молочной железы и 90,09% при люминальном В и увеличивается с возрастом при всех подтипах, кроме тройного негативного рака.

3. У больных в репродуктивной группе и в перименопаузе вне зависимости от биотипа локальный гормональный фонопухолимо молочной железы характеризуется превалированием андрогенов над эстрогенами (в 1,3–2 раза) ( $p < 0,05$ ). У пациенток в постменопаузе эстрогеново-андрогеновое равновесие зависит от биологического подтипа рака молочной железы: в случае люминальных типов и HER2neu+ подтипа в тканях превалировали эстрогены (в 1,5–2,5 раза), а в случае тройного негативного рака – андрогены (в 2 раза) ( $p < 0,05$ ). При этом во всех тканях молочной железы локальный прогестероновый дефицит присутствовал вне зависимости от биологического подтипа рака молочной железы и репродуктивного статуса пациентки (снижение в 2,7–4,8 раз по сравнению с интактной тканью) ( $p < 0,05$ ).

4. Только у больных люминальным А раком молочной железы в постменопаузе ведущим фактором в формировании локального эндокринного фона является эстрадиол. В остальных случаях у женщин в постменопаузе и всех биологических типов у больных в репродуктивной группе и в перименопаузе для эстрогенового фона характерно преобладание эстрона (в 1,3–5,3 раза) и 16гидроксиметаболитов (в 1,3–2,3 раз) ( $p < 0,05$ ).

5. Только в репродуктивном периоде локальная гиперандрогения вне зависимости от биологического подтипа опухоли сочеталась с низким уровнем экспрессии рецепторов андрогенов. По мере угасания репродуктивной функции уровень экспрессии рецепторов андрогенов возрастал и уже в перименопаузе относительная гиперандрогения в опухоли сочеталась с их высоким уровнем экспрессии.

6. В ткани всех исследованных подтипов рака молочной железы наблюдается выраженный дисбаланс компонентов фибринолитической системы, максимально при люминальном В подтипе. Нарушения взаимодействия урокиназного активатора плазминогена и его ингибитора, уровни плазмина ( $103,5 \pm 5,4$ ) и плазминогена ( $2,496 \pm 0,2$ ) при люминальном В подтипе отличались от люминального А ( $832,7 \pm 49,1$  и  $1,738 \pm 0,2$ ), HER2neu+ ( $579,5 \pm 36,2$  и  $1,481 \pm 0,06$ ) и тройного негативного рака ( $419,7 \pm 26,2$  и  $1,420 \pm 0,07$ ) ( $p < 0,05$ ).

7. Были установлены статистически значимые различия пролиферативных характеристик опухолевой ткани при исследованных биологических подтипах рака молочной железы: частота анеуплоидии (44,0%) и количество клеток в S-фазе клеточного цикла (15,0%) были минимальны при люминальном А подтипе и максимальны при тройном негативном раке (62,0 и 18,0% соответственно)( $p<0,05$ ), что сопоставимо с Ki67.

8. Локальный иммунный статус определяется биологическим подтипом опухоли и репродуктивным статусом больных. Тройной негативный рак отличается максимальной концентрацией CD3+ ( $92,2\pm1,4\%$ ), а опухоли люминального А подтипа – максимальной концентрацией NK-клеток ( $10,6\pm1,73\%$ ) в сравнении с опухолями других подтипов( $p<0,05$ ). У больных с сохранной репродуктивной функцией в опухоли содержится больше CD3+CD8+ и меньше CD3+CD4+ клеток по сравнению с пери- и постменопаузальными периодами. При различном репродуктивном статусе больных в пределах одного подтипа факторы локального клеточного иммунитета как опухоли, так и ее перифокальной зоны, имеют сходные характеристики.

9. Циркулирующие опухолевые клетки определяются в крови больных без клиничко-рентгенологических признаков генерализации РМЖ в  $22,2\pm3,2\%$ , максимально при ТНРМЖ –  $28,6\pm2,5\%$ .

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. При планировании персонифицированного лечения рака молочной железы целесообразно учитывать не только показатели «стандартной ИГХ-панели», но и другие характеристики: экспрессию рецепторов белков bcl-2, p53, Торо2α, экспрессию рецепторов андрогенов, локальный гормональный и иммунологический фон опухоли, уровень факторов роста, а также ее пролиферативные свойства в сочетании с репродуктивным статусом больной.

2. При разработке мер вторичной профилактики рака молочной железы необходимо учитывать биотип опухоли и репродуктивный статус, на фоне которого он развивался.

3. При разработке таргетной терапии у больных раком молочной железы в постменопаузе при нелюминальных подтипах, особенно при ТНР



необходимо учитывать особенности экспрессии рецепторов андрогенов и bcl2 в опухолях.

4. Для своевременного начала специфической терапии рака молочной железы рекомендуется применять разработанные способы прогнозирования химиочувствительности (патент РФ № 2551232 от 20.04.2015 г.) и гормонозависимости опухоли (патент РФ № 2559152 от 10.07.2015 г.), что возможно в любых технических условиях медицинского учреждения.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Сидоренко, Ю.С. Сочетанная патология молочной железы и гениталий: вариант организационного решения / Ю.С. Сидоренко, В.Н. Касьяненко, Н.Е. Левченко, Ю.С. Шатова // Тюменский мед. журнал. – 2010. – №2. – С. 22–23.

2. Касьяненко, В.Н. Тактика лечения больных с сочетанной патологией молочной железы и гениталий / В.Н. Касьяненко, Ю.С. Шатова, А.Э. Лисутин // Известия ВУЗов Сев.-Кав. региона. Спецвыпуск. – 2011. – С. 43–45.

3. Франциянц, Е.М. Содержание прогестерона и пролактина в ткани опухолей органов репродуктивной системы у менопаузальных женщин больных раком молочной железы / Е.М. Франциянц, Е.Ф. Комарова, Ю.С. Шатова, М.И. Верескунова, Н.Д. Черярина, В.В. Позднякова, Ю.В. Пржедецкий // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – №6. – С. 279.

4. Кит, О.И. Содержание половых гормонов, пролактина и метаболитов эстрогенов в перифокальной зоне при злокачественной и доброкачественной пролиферации в молочной железе / О.И. Кит, Е.М. Франциянц, В.А. Бандовкина, М.И. Верескунова, В.Н. Касьяненко, В.Ф. Комарова, Ю.С. Шатова // Научные ведомости Белгородского гос. университета. – 2012. – Т. 20, №22-2. – С. 113–116.

5. Франциянц, Е.М. Состояние тиреоидного и глюкокортикоидного статуса больных раком молочной железы / Е.М. Франциянц, Е.Ф. Комарова,

**Ю.С. Шатова, М.И. Верескунова, Н.Д. Черярина, Ю.В. Пржедецкий // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – №1. – С. 15.**

**6. Шатова, Ю.С. Комплексный подход к хирургическому лечению больных раком молочной железы при наличии у них сопутствующей патологии гениталий /Ю.С.Шатова,Н.В. Черникова,В.В. Позднякова,Л.П. Кучкина,Р.Г. Луганская,Н.С. Сафорьян, О.М. Семилеткин// Современные проблемы науки и образования. – 2013. – №1. –С. 56.**

**7. Кит, О.И. Содержание метаболитов эстрогена в периферических жидкостях и тканях у женщин больных раком молочной железы разного возраста и репродуктивного статуса /О.И.Кит,Е.М. Франциянц,В.А. Бандовкина,Ю.С. Шатова,Е.Ф. Комарова, М.И. Верескунова, Л.П.Кучкина // Фундаментальные исследования.– 2013.–№7.–С. 319–323.**

**8. Кит, О.И. Уровень половых гормонов и пролактина в ткани злокачественных опухолей молочной железы у больных разного возраста /О.И.Кит,Е.М. Франциянц,В.А. Бандовкина,Ю.С. Шатова,Е.Ф. Комарова, М.И. Верескунова, Л.П.Кучкина // Фундаментальные исследования.– 2013.– №7.–С. 560–564.**

**9. Кит, О.И. Первый опыт детекции циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови /О.И. Кит,И.А. Новикова,А.В. Бахтин,Е.А.Никипелова,Ю.С. Шатова,В.М.Габараева, О.В.Нистратова// Междунар. журнал экспериментального образования.– 2013.–№11.–С. 37–39.**

**10. Кит, О.И. Опыт определения циркулирующих опухолевых клеток на аппарате Verydex II CellSearch ТМ при раке молочной железы без отдаленных метастазов /О.И.Кит,Ю.С. Шатова,И.А. Новикова,А.В. Бахтин,Е.А. Никипелова, В.М. Габараева// Фундаментальные исследования.–2014.–№3 (4).–С. 747–749.**

**11. Кит, О.И. Частота встречаемости различных молекулярно-биологических подтипов рака молочной железы в зависимости от репродуктивного статуса /О.И.Кит,Ю.С. Шатова,С.С.Тодоров, Т.Н. Гудцова// Рос.онкологич. журнал.– 2014.– №5 (19).– С. 24–27.**

**12. Кит, О.И. Гетерогенность люминального рака молочной железы**

у женщин с различным репродуктивным статусом/О.И.Кит,Ю.С. Шатова,С.С. Тодоров,А.Э.Лисутин, Т.Н. Гудцкова Э.Э. Кечеджиева// Рос.онкологич. журнал.– 2014.– №6 (19).– С. 14–17.

**13. Кит, О.И. Экспрессия p53 и BCL2 при различных подтипах рака молочной железы / О.И.Кит, Ю.С.Шатова, И.А.Новикова, Л.Ю.Владимирова, Е.П.Ульянова, Е.А.Комова, Э.Э.Кечеджиева // Фундаментальные исследования.– 2014.–№10.–С. 85–88.**

14. Бандовкина, В.А. Метаболиты эстрогенов в ткани опухоли и биологических жидкостях больных раком молочной железы /В.А. Бандовкина, Е.М. Франциянц, Е.Ф. Комарова, Ю.С. Шатова, М.И. Верескунова, Л.П. Кучкина,В.С. Карнаухова //Междунар. журнал прикладных и фундаментальных исследований.– 2014.– №10 (1).–С. 126–127.

15. Новикова, И.А. Пролиферативные и иммунологические характеристики молекулярно-биологических подтипов рака молочной железы /И.А.Новикова, Ю.С. Шатова, Е.Ю. Златник, Ю.В. Пржедецкий, Е.П. Ульянова, Е.Н. Черникова //Междунар. журнал прикладных и фундаментальных исследований.– 2014.– №11.–С. 116–119.

16. Кит, О.И. Опыт определения циркулирующих опухолевых клеток на аппарате VerydexIICellSearchTM у больных раком молочной железы без отдаленных метастазов / О.И.Кит, Ю.С.Шатова, И.А.Новикова, А.В.Бахтин, Е.А.Никипелова, В.М.Габараева // Опухоли женской репродуктивной системы. Спецвыпуск. – 2014. –С. 99.

17. Кит, О.И. Гетерогенность люминального рака молочной железы у женщин с различным репродуктивным статусом / О.И.Кит, Ю.С.Шатова, С.С.Тодоров, Т.Н.Гудцкова // Опухоли женской репродуктивной системы. Спецвыпуск. – 2014. – С. 99.

18. Frantsiyants, E.M. Content of sex steroids and prolactin in tumor tissue in breast cancer /E.M. Frantsiyants, V.A. Bandovkina, E.F. Komarova, Yu.S. Shatova, M.I. Vereskunova, L.P. Kuchkina, V.S. Karnaukhova //Journal of clinical oncology.– 2014; ASCO e 22238.

**19. Шатова, Ю.С. Экспрессия топоизомеразы-2α и E-кадгерина при**

**различных подтипах рака молочной железы и репродуктивном статусе больных /Ю.С. Шатова, Л.Н. Ващенко, И.А. Новикова, Е.Ю. Златник, Л.Ю. Владимирова, Е.П. Ульянова, Е.А. Комова, Е.Н. Черникова, С.А. Машурова // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – №3,**

20. Zlatnik, E.Y. Local immunity of patients with various molecular subtypes of breast cancer /E.Y. Zlatnik, Y.S. Shatova, I.A. Novikova, A.V.Bakhtin //Journal of clinical oncology. 33:5s, 2015; suppl; abstr e12080.

21. Shatova, Y.S. Triple-negative breast cancer: Neoangiogenesis and hormonogenesis in tumor and surrounding tissues /Y.S. Shatova, E.M. Frantsiyants, V. Bandovkina, Y.A.Pogorelova, L.P. Kuchkina, L.G. Sergostyants, M.I. Vereskunova //Journal of clinical oncology.33:5s, 2015; suppl; abstr e12089.

22. Gabaraeva, V. Circulating tumor cells (CTCs) in breast cancer without distant metastases /V. Gabaraeva, O.I. Kit, I.A. Novikova, E.A. Nikipelova, Y.S. Shatova, A.V. Bakhtin, E.N. Chernikova, E.A. Komova //Journal of clinical oncology.33:5s, 2015; suppl; abstr e22016.

23. Shatova, Y. Characteristics of the local immunity of breast cancer patients with different reproductive function statuses /Y. Shatova, E. Zlatnik, I. Novikova, A. Bakhtin// European journal of cancer. –2015Sep. –Vol.51, suppl. S3; S298–299.

24. Chernikova, E. Some molecular biological characteristics of breast cancer. E. Chernikova, I. Novikova, Y. Shatova, E. Ulianova, E. Komova, V. Nikitina, O. Kravtsova, L. Vladimirova //European journal of cancer. – 2015Sep. –Vol.51, suppl. S3; S300.

## **ПАТЕНТЫ**

**1. Способ прогнозирования эффективности химиотерапии при лечении рака молочной железы [текст]: патент № 2551232 РФ: МПК А61М. / Кит О.И., Шатова Ю.С., Владимирова Л.Ю., Лисутин А.Э., Кечеджиева Э.Э.; заявитель и патентообладатель Ростовский научно-исследовательский онкологический институт. (RU). - № 2014127431; заявл. 04.07.2014; опубл. 20.05.2015, Бюл. №14. – 10 с.**

**2. Способ лечения раннего рака молочной железы [текст]: патент №2554749 РФ: МПК G01N, А61К, А61Р. / Кит О.И., Шатова Ю.С., Новикова**

**И.А., Бахтин А.В., Никипелова Е.А., Габараева В.М.; заявитель и патентообладатель Ростовский научно-исследовательский онкологический институт (RU). - № 2014122117; заявл. 30.05.2014; опубл. 27.06.2015, Бюл. № 18 – 5 с.**

**3. Способ прогнозирования гормонозависимости рака молочной железы [текст]: патент № 2559152 РФ, МПК А61В, А61В. / Кит О.И., Шатова Ю.С., Владимирова Л.Ю., Лисутин А.Э.; заявитель и патентообладатель Ростовский научно-исследовательский онкологический институт. (RU). - № 2014136007; заявл. 03.09.2014; опубл. 10.08.2015, Бюл. №22. – 8 с.**

### **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

РМЖ – рак молочной железы;

ФГБУ «РНИОИ» Минздрава РФ – федеральное государственное бюджетное учреждение «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России;

ТНРМЖ – тройной негативный рак молочной железы;

ИГХ – иммуногистохимия;

ВМС – внутриматочная спираль;

Торо2 $\alpha$  – топоизомераза 2 альфа;

ЦОК – циркулирующие опухолевые клетки;

РА – рецепторы андрогенов;

РП – рецепторы прогестерона;

РЭ – рецепторы эстрогенов;

АКТГ – адренокортикотропный гормон;

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов;

ИФР – инсулиноподобный фактор роста;

EGF – эпидермальный фактор роста;

TGF- $\beta$  – трансформирующий фактор роста;

ССГ – секс-стероидсвязывающий глобулин;

E2 – эстрадиол;

E1 – эстрон;

2-ОНЕ1 – 2-гидроксиэстрон;

16 $\alpha$ -ОНЕ1– 16 $\alpha$ -гидроксиэстрон;

Т–тестостерон;

tРА-акт – тканевой активатор плазминогена;

uРА-акт – урокиназный активатор плазминогена;

РАI-I-АГ – ингибитор активатора плазминогена;

РАI-I-акт – активность ингибитора активатора плазминогена.