

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ТОМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ  
ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»  
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ОНКОЛОГИИ

На правах рукописи

БАБЫШКИНА НАТАЛИЯ НИКОЛАЕВНА

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ И ПРЕДСКАЗАТЕЛЬНАЯ ЗНАЧИМОСТЬ  
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ,  
АССОЦИИРОВАННЫХ С R13K/AKT/mTOR- СИГНАЛЬНЫМ ПУТЕМ  
ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

14.01.12 – онкология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени доктора медицинских наук

Научные консультанты:

доктор биологических наук

член-корр. РАН Чердынцева Н.В.

доктор медицинских наук

профессор Слонимская Е.М.

Томск 2019

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	10
ГЛАВА 1.....	22
1.1 Биологические маркеры рака молочной железы: от рецепторов стероидных гормонов до мультигенных тестов.....	22
1.2 Молекулярно-генетические механизмы чувствительности и резистентности к терапии тамоксифеном эстроген-зависимого рака молочной железы.....	26
1.2.1 Структурная организация и функционирование эстрогенового рецептора.....	26
1.2.2 Генетические aberrации <i>ESR1</i> .....	29
1.2.3 Молекулярно-генетические изменения внутриклеточных регуляторов ER $\alpha$ .....	34
1.2.4 Взаимодействие между сигнальными каскадами рецепторов факторов роста и ER $\alpha$ .....	38
1.3 Факторы прогноза, ассоциированные с особенностями клинического течения и ответом на неоадьювантную химиотерапию эстроген-независимого рака молочной железы.....	43
1.3.1 Гетерогенность тройного негативного рака молочной железы.....	43
1.3.2 Предсказательная значимость существующих молекулярно-генетических маркеров эффективности неоадьювантной химиотерапии.....	46
1.4 Роль PI3K/Akt/mTOR-сигнального в механизмах резистентности эстроген-зависимого и эстроген-независимого рака молочной железы.....	50
1.4.1 Основные компоненты PI3K/Akt/mTOR сигнального пути.....	50
1.4.2 Особенности функционирования PI3K/Akt/mTOR-сигнального каскада при эстроген-зависимом раке молочной железы.....	57
1.4.3 Активация PI3K/Akt/mTOR-сигнального каскада при эстроген-независимом раке молочной железы.....	62
1.5 Заключение по обзору литературы.....	64
МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	66

2.1 Характеристика групп исследования.....	66
2.2 Методы исследования .....	73
2.2.1 Материал исследования.....	73
2.2.2 Выделение ДНК из образцов периферической крови.....	73
2.2.3 Выделение ДНК из образцов опухолевой ткани.....	74
2.2.4 Выделение РНК из образцов опухолевой и прилежащей нормальной ткани .....	75
2.2.5 Полимеразная цепная реакция и анализ полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ).....	76
2.2.6 Полимеразная цепная реакция с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени (РТ-ПЦР).....	78
2.2.7 Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)....	79
2.2.8 Иммуногистохимическое исследование .....	81
2.2.9 Фенотипирование методом проточной цитофлуориметрии.....	84
2.3 Методы статистической обработки результатов.....	86
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....	88
3.1 Полиморфизм генов, вовлеченных в процессы пролиферации и апоптоза опухолевых клеток при разных молекулярных подтипах рака молочной железы .....	88
3.1.1 Ассоциация полиморфных вариантов гена эстрогенового рецептора <i>ESR1</i> с клинико-морфологическими параметрами у больных люминальным РМЖ.....	88
3.1.2 Ассоциация полиморфных вариантов генов рецепторов ростовых факторов EGFR, TGF- $\beta$ 1, VEGFR2, IGF1R с клинико-морфологическими параметрами у больных люминальным А, В и тройным негативным РМЖ ...	94
3.1.3 Ассоциация полиморфных вариантов генов апоптоза и репарации ДНК, генов факторов роста и рецепторов факторов роста, а также генов ферментов фолатного цикла с клинико-морфологическими параметрами у больных люминальным А, В и тройным негативным РМЖ .....	101

3.2 Особенности белковой и генной экспрессии рецепторов ростовых факторов EGFR, TGF- $\beta$ R1, VEGFR2, IGF1R в образцах опухолевой и прилежащей нормальной ткани в зависимости от молекулярного подтипа РМЖ .....	114
3.3 Особенности внутриклеточной экспрессии белков Akt (pS473) и PTEN в опухолевой ткани в зависимости от молекулярного подтипа РМЖ .....	126
3.4 Особенности содержания субпопуляций клеток CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-low</sup> , CD44 <sup>-</sup> /CD24 <sup>+</sup> , CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>+</sup> , CD44 <sup>-</sup> /CD24 <sup>-</sup> в опухолевой ткани больных с разными молекулярными подтипами РМЖ.....	133
3.5 Анализ связи исследуемых молекулярно-генетических маркеров с эффективностью гормональной терапии тамоксифеном у больных эстроген-зависимым РМЖ .....	142
3.5.1 Ассоциация полиморфных вариантов исследуемых генов с эффективностью гормональной терапии тамоксифеном.....	142
3.5.2 Анализ связи белковой и генной экспрессии рецепторов факторов роста с эффективностью гормональной терапии тамоксифеном .....	147
3.5.3 Ассоциация экспрессии белков Akt(pS473) и PTEN с эффективностью терапии тамоксифеном .....	152
3.5.4 Содержание субпопуляций опухолевых клеток CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-low</sup> , CD44 <sup>-</sup> /CD24 <sup>+</sup> , CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>+</sup> , CD44 <sup>-</sup> /CD24 <sup>-</sup> в зависимости от эффективности терапии тамоксифеном .....	155
3.5.5 Связь характера распределения ER $\alpha$ в опухоли с ответом на тамоксифен у больных эстроген-зависимым РМЖ.....	158
3.5.6 Ассоциация исследуемых молекулярно-генетических маркеров с показателями безметастатической выживаемости у больных эстроген-зависимым РМЖ.....	161
3.5.7 Математические модели прогноза клинического течения и эффективности терапии тамоксифеном у больных эстроген-зависимым РМЖ .....	171
3.6 Анализ связи молекулярно-генетических маркеров с эффективностью неoadьювантной химиотерапии у больных тройным негативным РМЖ .....	176

3.6.1 Экспрессия рецепторов факторов роста в процессе НАХТ у больных тройным негативным РМЖ.....	176
3.6.2 Связь полиморфных вариантов генов рецепторов факторов роста с эффективностью НАХТ.....	181
3.6.3 Показатели безметастатической выживаемости у больных тройным негативным РМЖ в зависимости от исследуемых маркеров.....	186
3.6.4 Математическая модель, позволяющая предсказывать ожидаемую эффективность НАХТ у больных тройным негативным РМЖ.....	189
3.7 Методологические подходы к прогнозированию исхода заболевания и предсказанию эффективности терапии РМЖ разных молекулярных подтипов.....	193
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	199
ВЫВОДЫ.....	212
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	216
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	217

## СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

кДНК – комплементарная ДНК

Люм А – люминальный А РМЖ

Люм В – люминальный В РМЖ

НАХТ – неоадьювантная химиотерапия

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ПЦР-ПДРФ – полимеразная цепная реакция и анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов

РМЖ – рак молочной железы

РТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

ТАМ-Р – тамоксифен-резистентная группа

ТАМ-Ч – тамоксифен-чувствительная группа

ТН – тройной негативный РМЖ

4E-ВР1 – eIF-4E binding protein 1

Akt – protein kinase B

AR – androgen receptor

Bcl2 – B-cell lymphoma 2 protein

BL1– basal-like 1 subtype

BL2 – basal-like 2 subtype

BRCA1 – breast cancer type 1 susceptibility protein

BRCA2 – breast cancer type 2 susceptibility protein

BRD2-4 – bromodomain containing domain proteins

CBP – CREB-binding protein

CTLA-4 – cytotoxic T-lymphocyte associated protein

CAX – cyclophosphamide, adriamycin, capecitabine

Deptor – domain containing mTOR interacting protein

DHFR – dihydrofolate reductase

DNA-ПК – DNA-dependent protein kinase

DNMT3b – DNA methyltransferase

EGF– epidermal growth factor

EGFR – epidermal growth factor receptor  
EMT – epithelial–mesenchymal transition  
EpCAM – epithelial cell adhesion molecule  
ER – estrogen receptor  
ERE – estrogen response element  
ER $\alpha$  – estrogen receptor alpha  
*ESR1* – estrogen receptor gene  
FAC – 5-fluorouracil, adriamycin, cyclophosphamide  
FDA – Food and Drug Administration  
FoxO – forkhead box O  
GAPDH – glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase  
GSK3 $\alpha$  – kinase-3 $\alpha$  glycogen synthase  
G $\beta$ L – G protein beta subunit-like  
HAS2 – hyaluronan synthase 2  
HAT – histone acetyltransferase  
HDAC1/3 – histone deacetylases  
HER2 – human epidermal growth factor receptor 2/ErbB2  
HMTs – histone methyltransferases  
H-score – histoscore  
IGF1R – insulin like growth factor 1 receptor  
IGFBP –insulin-like growth factor-binding protein  
IGF-I – insulin-like growth factor 1  
IM – immunomodulatory subtype  
LAR – luminal androgen receptor subtype  
LKB1 – liver kinase B1  
M –mesenchymal subtype  
MAPK – mitogen-activated protein kinase  
MDM2 – murine double minute 2  
mLST8 – mammalian lethal with Sec13 protein 8  
mSin1 – mammalian stress-activated protein kinase (SAPK)-interacting protein 1

MSL – mesenchymal-stem like subtype  
MTHFR – methylenetetrahydrofolate reductase  
mTOR – mammalian target of rapamycin  
mTORC2 – mammalian target of rapamycin complex 2  
MTR – methionine synthase  
MTRR – methionine synthase reductase  
NCoR1 – nuclear receptor co-repressor  
NLS – nuclear localization signal  
PARP1 – poly [ADP-ribose] polymerase 1  
pCR – pathologic complete response  
PD-1 – programmed cell death protein 1  
PDK1 – phosphoinositide-dependent kinase 1  
PH – plectrin-homologous domain  
PI – propidium iodide  
PI3K – phosphatidylinositide 3-kinases  
PR – progesterone receptor  
Protor – protein observed with rictor  
Raptor – regulatory-associated protein of TOR  
RAS40 – proline-rich PKB/AKT substrate 40kDa  
RD – repressor domain  
RECIST – Response Evaluation Criteria in Solid Tumors  
RFC1 – reduce folate carrier 1  
Rictor – rapamycin-insensitive companion of TOR  
RID – receptor-interacting domain  
S6K1 – p70 ribosomal protein S6 kinase – S6K  
SMRT – silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors  
SNP – single nucleotide polymorphism  
SOPs – Standard Operation Procedures  
SRC-1/NCOA1 – steroid receptor coactivator  
TCGA – The Cancer Genome Atlas

TEAM – Tamoxifen Exemestane Adjuvant Multinational

Tel2 – telomere maintenance 2

TGF- $\alpha$  – transforming growth factor alpha

TGF- $\beta$ 1 – transforming growth factor beta 1

TGF- $\beta$ R2 – transforming growth factor, beta receptor II

TP53 – tumor protein p53

TS – thymidylate synthetase

VEGFR2 – vascular endothelial growth factor receptor 2

XRCC1 – X-ray repair cross-complementing protein 1

## ВВЕДЕНИЕ

## Актуальность проблемы

В настоящее время рак молочной железы (РМЖ) представляет собой группу гетерогенных заболеваний [42, 49, 53, 78, 163]. Наиболее важным достижением последних десятилетий стало утверждение классификации биологических подтипов РМЖ, основанной на экспрессии опухолевыми клетками специфических молекулярных маркеров [76, 165]. Выделение четырех внутренних биологических подтипов РМЖ - люминального А, люминального В, HER2-позитивного и тройного негативного, позволило обосновать принципиально разные подходы к планированию терапии РМЖ. Данные молекулярные подтипы представляют собой разные варианты развития РМЖ, с разной этиологией, патогенезом, а значит, и разными механизмами прогрессирования и исходом заболевания [92, 96, 296, 378].

Люминальный А подтип характеризуется отсутствием экспрессии рецепторов к эпидермальному фактору роста 2-го типа (HER2), низким индексом пролиферативной активности Ki67 (<20%), а высокая экспрессия рецепторов стероидных гормонов предопределяет чувствительность этой подгруппы опухолей, прежде всего, к эндокринной терапии [162, 237, 268].

Люминальный В подтип включает опухоли с положительной экспрессией рецепторов стероидных гормонов как с отсутствием экспрессии HER2 при высоком (>20%) индексе Ki67, так и HER2-позитивные с любым индексом пролиферативной активности. Опухоли этой подгруппы имеют худший прогноз и большую вероятность развития рецидивов, чем опухоли люминального А подтипа [78, 222]. Низкий уровень экспрессии гормональных рецепторов, высокий индекс пролиферативной активности, G3 степень злокачественности, выраженная лимфоваскулярная инвазия, наличие метастатически пораженных лимфатических узлов N<sub>2-3</sub>, а также средние/высокие значения шкал риска Oncotype DX<sup>®</sup>, MammaPrint<sup>®</sup>, PAM-50 ROR<sup>®</sup> или EndoPredict<sup>®</sup> определяют относительные показания к назначению адъювантной цитотоксической химиотерапии для

пациентов с люминальным типом заболевания [163]. Несмотря на то, что эндокринотерапия является основным методом лечения больных люминальными типами РМЖ, как в монорежиме, так и в комбинации с химиотерапией, эффективность ее может быть ограничена развитием приобретенной резистентности [2, 233, 242, 261].

HER2-позитивный подтип включает эстроген-независимые агрессивные опухоли, с высоким пролиферативным индексом, для которых характерна низкая степень дифференцировки, большой размер опухоли, вовлечение в процесс лимфатических узлов. Поскольку данные опухоли характеризуются гиперэкспрессией HER2, для пациентов с этим подтипом эффективно назначение в адьювантном режиме трастузумаба, моноклонального антитела, таргетно взаимодействующего с внеклеточным доменом рецептора 2 эпидермального фактора роста [374, 375]. Кроме того, добавление трастузумаба к неoadьювантной химиотерапии у больных HER2-позитивным РМЖ существенно увеличивает число полных морфологических регрессий и приводит к длительной безрецидивной выживаемости по сравнению с пациентками, которым назначалась только предоперационная химиотерапия [248, 387]. Однако показано, что определенный процент больных не отвечает на таргетную терапию трастузумабом [113].

Тройные негативные опухоли характеризуется низкой степенью дифференцировки, высокой агрессивностью, большей вероятностью развития местнораспространенных и метастатических форм заболевания. Отсутствие мишеней воздействия для проведения гормонотерапии и таргетной терапии в опухолях, негативных по всем трем рецепторам, определяет их чувствительность к стандартным химиотерапевтическим схемам [253, 388]. Активно применяются различные схемы с включением антрациклинов, таксанов, препаратов платины [114, 186, 269, 290], однако их клинический эффект неоднозначен [315, 402]. Таким образом, развитие химио- и эндокринорезистентности остается в настоящее время существенной проблемой при лечении больных РМЖ.

Механизмы терапевтической резистентности опухолей могут быть обусловлены коммуникацией специфически активированных для каждого молекулярного варианта РМЖ сигнальных каскадов с кумулятивными системами внутриклеточной передачи сигналов. К одной из таких универсальных систем относится PI3K/Akt/mTOR-сигнальный путь, ответственный за интеграцию пролиферативных стимулов и одновременную активацию процессов трансляции в опухолевых клетках [93, 101, 398]. Реализация этого сигналинга в опухолевых клетках может осуществляться посредством различных мембранных тирозинкиназ (рецепторов инсулиноподобного фактора роста 1-го типа (IGF1R); рецепторов сосудистого эндотелиального фактора роста 2-го типа (VEGFR2); рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR); рецепторов трансформирующего фактора роста  $\beta$  I/II типа (TGF- $\beta$ R1/2)), а также эстрогеновых рецепторов ER $\alpha$ , что обеспечивает регуляцию роста как эстроген-зависимых так и эстроген-независимых опухолей, и эффективность противоопухолевого ответа [157, 286, 354, 392, 395, 405].

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что каждый из молекулярных подтипов РМЖ может иметь разный, присущий только этому типу опухоли механизм дисрегуляции PI3K/Akt/mTOR-ассоциированной активности, что определяет интерес к изучению основных компонентов данного сигналинга как факторов прогноза заболевания, так и чувствительности/резистентности к терапии [29, 203, 244]. Выявлено, что содержание IGF1R-позитивных клеток значимо коррелирует с высокими показателями безметастатической выживаемости у больных эстроген-зависимым РМЖ, однако для эстроген-независимых опухолей данный маркер является предиктором неблагоприятного исхода заболевания [368]. Показано, что повышение экспрессии IGF1R и снижение уровня экспрессии PTEN в опухоли связано со снижением общей выживаемости у больных трижды негативным раком [193, 218]. Коэкспрессия EGFR и p-mTOR у больных данным подтипом РМЖ ассоциирована с неблагоприятным исходом заболевания [297]. В недавних исследованиях продемонстрировано, что потеря экспрессии рецептора трансформирующего

фактора роста  $\beta$  II типа (TGF- $\beta$ R2) является одним из механизмов неэффективности эндокринной терапии тамоксифеном у больных РМЖ [219]. Среди всех молекулярных подтипов РМЖ наиболее высокий уровень экспрессии VEGFR2 характерен для HER2-позитивного варианта, что может определять ответ таких опухолей на антиангиогенную терапию [106].

Помимо рецепторных тирозинкиназ важной регуляторной активностью в отношении PI3K/Akt/mTOR сигнального пути обладают трансмембранные гликопротеины CD44 [61, 64, 213]. Являясь рецепторами гиалуроновой кислоты, главного компонента внеклеточного матрикса, CD44 вовлечены в процессы клеточной миграции, адгезии и метастазирования посредством модуляции активности тирозинкиназных рецепторов EGFR/HER2, IGF1R, TGF- $\beta$ R, VEGFR2 [58, 221]. Экспериментальные исследования свидетельствуют о том, что уровень экспрессии CD44 может являться ключевым звеном в формировании тамоксифен-резистентного фенотипа эстроген-позитивных клеточных линий РМЖ [263]. В настоящее время общепризнанным считается использование маркера CD44 в комбинации с другим поверхностным гликопротеином CD24, для идентификации клеток со свойствами стволовых [82, 201]. В отношении эстроген-негативных опухолей, именно, тройного негативного рака, наличие субпопуляции CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>low</sup> связывают с более агрессивным течением заболевания [8, 63, 291, 352, 376]. Значение субпопуляции стволовых опухолевых клеток в механизмах прогрессии эстроген-зависимых опухолей остается менее изученным [54, 70].

Несмотря на большое количество проводимых фундаментальных и клинических исследований, результаты изучения прогностической или предсказательной значимости ключевых сигнальных белков, ассоциированных с PI3K/Akt/mTOR-путем в опухолях разных молекулярных подтипов молочной железы носят фрагментарный характер. Нет комплексного системного подхода, который учитывал бы особенности молекулярных вариантов рака молочной железы с учетом состояния генетической детерминированности организма, уровня белковой и геновой экспрессии, как мембранных рецепторов опухолевых клеток, так и центральных регуляторов PI3K/Akt/mTOR-сигнального пути.

Интеграция разных уровней исследования PI3K/Akt/mTOR-ассоциированных факторов (генетический, клеточный, внутриклеточный) позволит более адекватно подойти к поиску информативных молекулярно-генетических маркеров предсказания ожидаемой эффективности терапии и прогнозирования возможного исхода заболевания у больных РМЖ.

#### Цель исследования:

Разработать методологический подход к предсказанию ожидаемой эффективности терапии и прогнозированию возможного исхода заболевания у больных с разными молекулярными подтипами РМЖ на основе комплексного анализа компонентов, ассоциированных с PI3K/Akt/mTOR сигнальным путем.

#### Задачи исследования:

1. Исследовать полиморфизм генов, вовлеченных в процессы пролиферации и апоптоза опухолевых клеток при разных молекулярных подтипах рака молочной железы.
2. Изучить особенности белковой и генной экспрессии рецепторов ростовых факторов EGFR, TGF- $\beta$ R1, VEGFR2, IGF1R в образцах опухолевой и прилежащей нормальной ткани у больных люминальным А, В и тройным негативным подтипами рака молочной железы.
3. Изучить уровень экспрессии внутриклеточных белков Akt (pS473) и PTEN в опухолевой ткани в зависимости от молекулярного подтипа рака молочной железы.
4. Изучить уровень экспрессии клеток с фенотипом CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>low</sup>, CD44<sup>-</sup>/CD24<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup>, CD44<sup>-</sup>/CD24<sup>-</sup> в опухолевой ткани у больных с разными молекулярными подтипами РМЖ.

5. Провести анализ связи уровня белковой и генной экспрессии рецепторов ростовых факторов, стволовых опухолевых клеток, внутриклеточных белков и полиморфных вариантов изучаемых генов с эффективностью системного лечения при разных подтипах РМЖ.
6. Оценить ассоциации полиморфных вариантов изучаемых генов и их экспрессионных характеристик с показателями безметастатической выживаемости у больных раком молочной железы исследуемых подтипов.
7. Оценить возможность активации в опухоли PI3K/Akt/mTOR-каскада для определения механизмов формирования резистентности и чувствительности к терапии у больных эстроген-зависимым и эстроген-независимым раком молочной железы.
8. Создать математическую модель на основе выбранной панели значимых молекулярно-генетических маркеров для прогноза эффективности терапии тамоксифеном у больных эстроген-зависимым РМЖ.
9. Выделить наиболее информативные предсказательные критерии у больных эстроген-независимым РМЖ и создать математическую модель, позволяющую прогнозировать ожидаемую эффективность неоадьювантной химиотерапии.

### Научная новизна

Впервые разработан методологический подход к определению ожидаемой эффективности терапии и возможного исхода заболевания у больных с разными молекулярными подтипами РМЖ на основе комплексного анализа компонентов, ассоциированных с PI3K/Akt/mTOR- сигнальным путем.

Получены новые данные о том, что каждый молекулярный вариант РМЖ характеризуется определенными показателями генетического фона, экспрессионного и белкового профиля маркеров, ассоциированных с

PI3K/Akt/mTOR-путем, что может обуславливать не только их различное клиническое поведение, но и ответ на терапевтическое воздействие.

Установлено, что мутантные варианты генов *FGFR2* rs1219648, *TGF-βRI* rs334354 и *KDR* rs2071559 ассоциированы с эстроген-зависимым РМЖ, мутантные генотипы *EGFR* rs1468727 – с эстроген-независимым РМЖ.

Выявлен высокий уровень экспрессии генов *EGFR* и *TGF-βRI* в опухолях люминального А типа. Для эстроген-зависимых опухолей характерен высокий уровень белковой экспрессии *TGF-βRI* и активированной формы Akt1 – Akt(pS473), а также высокий процент клеток с фенотипами, позитивными по экспрессии Akt1 и негативными по экспрессии рецепторов факторов роста (*VEGFR2*<sup>-</sup>/*Akt*(pS473)<sup>+</sup>/*IGF1R*<sup>-</sup>/*Akt*(pS473)<sup>+</sup>). Эстроген-независимый РМЖ сопряжен с высоким уровнем экспрессии белков *EGFR* и *VEGFR2*, значительным процентом PTEN-позитивных клеток и высоким количеством клеток, позитивных по экспрессии *VEGFR2* и негативных – по Akt1 (*VEGFR2*<sup>+</sup>/*Akt*(pS473)<sup>-</sup>).

Впервые описаны фенотипы опухолевых клеток разных молекулярных вариантов РМЖ на основе коэкспрессии маркеров стволовых опухолевых клеток и тирозинкиназ/PTEN. Показано, что популяция клеток, экспрессирующих гликопротеин CD24 в комплексе с рецептором трансформирующего фактора роста β I типа (*CD24*<sup>+</sup>/*TGF-βRI*<sup>+</sup>), а также клеточная популяция трижды позитивная по экспрессии гликопротеинов *CD44*/*CD24* и фосфатазы PTEN (*CD44*<sup>+</sup>/*CD24*<sup>+</sup>/*PTEN*<sup>+</sup>) наиболее выразительно представлена в люминальных опухолях. Субпопуляции клеток с позитивной экспрессией гликопротеинов в сочетании с негативной экспрессией рецепторов факторов роста (*CD44*<sup>+</sup>/*IGF1R*<sup>-</sup> и *CD24*<sup>+</sup>/*TGF-βRI*<sup>-</sup>) характерны для тройного негативного РМЖ.

Впервые определены молекулярные маркеры чувствительности и резистентности к адъювантной терапии тамоксифеном у больных эстроген-зависимым РМЖ и выявлены их особенности для пациенток люминального А и В подтипов. Установлено, что чувствительность опухоли к тамоксифену связана с

носителем мутантного аллеля А гена *KDR* rs2305948, высоким уровнем генной и белковой экспрессии TGF- $\beta$ RI, высоким процентом клеток с отсутствием коэкспрессии гликопротеина CD44 и рецептора инсулиноподобного фактора роста 1-го типа (CD44<sup>-</sup>/IGF1R<sup>-</sup>) и гомогенным характером распределения ER $\alpha$  в опухоли. Резистентность к тамоксифену у больных эстроген-зависимым РМЖ ассоциирована с высоким уровнем экспрессии фосфорилированного белка Akt(pS473) и популяции клеток, экспрессирующих гликопротеин CD44 в комбинации с рецептором инсулиноподобного фактора роста 1-го типа (CD44<sup>+</sup>/IGF1R<sup>+</sup>), а также с гетерогенным характером распределения ER $\alpha$ . Значимыми маркерами неэффективности терапии тамоксифеном у больных люминальным А РМЖ являются наличие мутантного аллеля G гена *IGFR1* rs2016347, высокий уровень экспрессии белка EGFR и высокий уровень экспрессии клеток с фенотипом стволовости CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-low</sup>. Резистентность к тамоксифену в опухолях люминального В подтипа связана с точечными мутациями гена *ESR1* rs2228480.

Впервые показано, что предсказательной значимостью в отношении эффективности НАХТ у больных тройным негативным РМЖ обладают мутантные варианты генов *EGFR* rs1468727 и *KDR*-604T>C rs2071559. Показано значимое снижение уровня экспрессии белков EGFR/VEGFR2 в процессе НАХТ, которое ассоциировано с выраженным клиническим и патоморфологическим ответом опухоли.

Впервые установлено, что выявленные молекулярные маркеры чувствительности и резистентности к адъювантной терапии тамоксифеном у больных эстроген-зависимым РМЖ и маркеры предсказания эффективности НАХТ у пациенток эстроген-независимым РМЖ ассоциированы с исходом заболевания.

## Теоретическая и практическая значимость

Получены новые фундаментальные данные о функциональных особенностях интегрального для опухоли сигнального пути PI3K/Akt/mTOR для разных молекулярных подтипов РМЖ, обусловленных генетическим полиморфизмом, специфическими закономерностями генной и белковой экспрессии рецепторов патогенетически значимых факторов роста, регуляторных и сигнальных молекул в опухоли.

Сформированы представления о чувствительных и резистентных фенотипах эстроген-зависимых и эстроген-независимых опухолей и потенциальных механизмах их реализации, что определяет многоступенчатый молекулярный портрет опухоли.

На основе комплексного анализа индивидуальных генетических особенностей, уровня генной и белковой экспрессии основных компонентов интегрального для опухолевых клеток PI3K/Akt/mTOR сигнального пути выявлены информативные прогностические и предсказательные маркеры у больных РМЖ разных молекулярных вариантов.

Разработаны математические модели прогнозирования риска прогрессирования РМЖ на фоне адъювантной терапии тамоксифеном у больных РМЖ на основе оценки полиморфных вариантов гена *ESR1* в локусе rs2228480 и характера распределения ER $\alpha$  в опухоли для эстроген-зависимых опухолей; состояния регионарных лимфоузлов, характера распределения ER $\alpha$  и уровня экспрессии EGFR в опухоли для люминального А варианта РМЖ.

Для предсказания ожидаемой эффективности неoadъювантной химиотерапии у больных тройным негативным РМЖ разработана математическая модель на основании комплексной оценки возраста пациенток и статуса белковой экспрессии VEGFR2 до предоперационной терапии.

Использование предложенной методологии позволит оптимально и персонифицировано подойти к обоснованию выбора системной терапии для опухолей молочной железы с разным молекулярным портретом.

## Основные положения, выносимые на защиту

1. На основе анализа патогенетически значимых компонентов PI3K/Akt/mTOR сигнального каскада на уровне генетической регуляции (полиморфизм генов), транскрипционной активности генов (экспрессия генов) и фенотипа опухоли (белковая экспрессия) определены специфические комплексы информативных прогностических и предсказательных маркеров у больных разных молекулярных подтипов РМЖ.
2. Точечные замены гена *KDR* rs2305948, высокий уровень транскрипционной и функциональной активности гена *TGF-βRI*, высокий процент опухолевых клеток с двойным негативным фенотипом CD44<sup>-</sup>/IGF1R<sup>-</sup>, а также гомогенный характер распределения ERα в опухоли ассоциированы с эффективностью адъювантной терапии тамоксифеном у больных эстроген-зависимым РМЖ. Механизмы реализации тамоксифен-чувствительного фенотипа опухоли связаны с отсутствием активации PI3K/Akt/mTOR сигнального пути, ассоциированного с ингибированием VEGFR2-зависимых каскадов, усилением TGF-β1/Smad-опосредованных антипролиферативных сигналов при функционально полноценном эстрогеновом рецепторе.
3. Мутации гена *ESR1* в локусе rs2228480, гетерогенный характер распределения ERα в опухолевой ткани, высокий уровень экспрессии фосфорилированной формы белка Akt1 и клеток с двойным позитивным фенотипом CD44<sup>+</sup>/IGF1R<sup>+</sup> связаны с резистентностью к тамоксифену у больных эстроген-зависимым РМЖ. Механизмы реализации тамоксифен-резистентного фенотипа опухоли ассоциированы с наличием транскрипционно неактивного *ESR1* и стимуляцией PI3K/Akt/mTOR каскада посредством тирозинкиназ IGF1R и EGFR.
4. Генетические вариации *EGFR* rs1468727 и *KDR*-604T>C rs2071559 сопряжены со стабилизацией и прогрессированием опухолевого процесса у больных тройным негативным РМЖ. Активация PI3K/Akt/mTOR в опухолях с тройным негативным фенотипом определяется стимуляцией EGFR/PI3K/Akt

трансдукции как одного из потенциальных механизмов неэффективности предоперационного химиотерапевтического лечения.

5. Снижение уровня белковой экспрессии EGFR/VEGFR2 в процессе НАХТ связано с выраженным клиническим и патоморфологическим ответом опухоли. Механизмы химиочувствительности эстроген-независимых опухолей обусловлены ингибированием активности VEGF/PI3K/Akt сигнального пути.

### Апробация диссертации

Основные положения и результаты научных исследований были доложены на VII международной конференции по раку молочной железы, Испания, Барселона (2010); 22-м международном симпозиуме EORTC-NCI-AACR «Молекулярные мишени и лечение рака», Германия, Берлин (2010); 12-й международной конференции по раку молочной железы, Швейцария, Санкт-Галлен (2011); международных симпозиумах AACR-NCI-EORTC «Молекулярные мишени и лечение рака», США, Сан-Франциско (2011), Бостон (2015); ежегодном международном симпозиуме AACR «Использование достижений таргетного лечения», США, Сан-Диего (2014); EMBO международной конференции «Клеточные и молекулярные механизмы взаимоотношения опухоли и микроокружения», Россия, Томск (2015); II Всероссийской Конференции по молекулярной онкологии, Россия, Москва (2016); Международной конференции «Физика рака: трансдисциплинарные проблемы и клинические применения», Россия, Томск (2017), 22-м международном симпозиуме имени Чарльза Хайдельбергера, Россия, Томск, (2018).

### Публикации

По теме диссертации опубликовано 55 печатных работ, в том числе 20 статей, из них 7 статей в зарубежных журналах, имеется 1 патент на изобретение и 2 свидетельства на базы данных.

### Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 263 страницах машинописного текста, состоит из введения, трех глав, включающих обзор литературы, материалы и методы исследования, главы с изложением собственных результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы. Библиографический указатель включает 405 источников, из них 6 отечественных, 399 зарубежных. Работа иллюстрирована 51 таблицей и 40 рисунками.

## ГЛАВА 1

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Биологические маркеры рака молочной железы: от рецепторов стероидных гормонов до мультигенных тестов

Понятие биологических маркеров было впервые предложено Национальным Институтом Здоровья в США в 1998 году и характеризует их как клеточные и молекулярные индикаторы физиологических и патологических процессов или фармакологических ответов на терапевтическое вмешательство [46]. В отношении злокачественных новообразований, в том числе и РМЖ, биологические маркеры могут определяться непосредственно в опухолевой ткани или в субклеточных фракциях (цитоплазма, мембрана, ядро и т.п.); характеризуют биологические особенности опухоли: способность к пролиферации и дифференцировке, метастазированию и инвазии, а также гормональную и/или лекарственную чувствительность. В клинической практике использование любого биологического маркера сопряжено с оценкой возможного исхода заболевания, чувствительности опухоли к определенным видам терапии и индивидуализацией схем лечения больных, а также разработкой новых препаратов, направленно блокирующих регулируемые белками-маркерами внутриклеточные процессы [175].

Одними из первых клеточных маркеров, вошедших в практику лечения больных РМЖ, были рецепторы стероидных гормонов. Рецепторы стероидных гормонов – это белки, специфически и избирательно связывающие стероиды, и опосредующие их биологические эффекты. Открытие и исследование стероидных рецепторов Jensen в 1958 году привело к осмыслению РМЖ как гормонзависимой опухоли. Наличие рецепторов эстрогенов, как ключевых молекул канцерогенеза, позволило рассматривать их в качестве диагностического инструмента и терапевтических мишеней. Начало клинического применения рецепторов эстрогенов как биомаркеров было положено McGuire в 1975 году, который предложил их определение в опухолевой ткани в качестве метода оценки

гормональной зависимости опухоли и предсказания эффективности эндокринной терапии [250].

Дальнейшее изучение механизмов регуляции пролиферации и дифференцировки опухолевых клеток, привело к появлению большого количества биологически значимых показателей, которые рассматривались в качестве потенциальных молекулярных маркеров. К их числу можно отнести различные факторы роста и их рецепторы, протеазы, участвующие в процессах метастазирования, интегрины, отвечающие за межклеточные контакты, ангиогенные факторы, супрессорные гены и т.п. Поиск наиболее значимых, дополняющих друг друга показателей, который позволил бы при минимально возможной стоимости обследования обеспечить максимальную эффективность лечения каждого больного оставался приоритетной задачей.

Систематизация опухолей молочной железы на основе характера экспрессии генов базального и люминального эпителия, позволила приблизиться к её решению, что привело к созданию геномной классификации РМЖ, основанной на его внутренних подтипах. Впервые «внутренняя панель» из 465 генов, которые координированно варьировали между образцами тканей, детерминируя пять различных экспрессионных паттернов, была представлена в публикации Letter to Nature в 2000 году группой исследователей из Института Северной Каролины, США. Perou и соавторы показали, что опухоли молочной железы имеют значительную вариабельность в экспрессии генов; вариабельность многомерна, и различные наборы генов показывают независимый характер вариации; все опухоли молочной железы можно классифицировать на подтипы, отличающиеся различиями в экспрессии определенного кластера генов [238]. Признание геномной классификации РМЖ экспертами 12-й Международной конференция по раку молочной железы в St.Gallen (2011) ознаменовало новую эру персонафицированного подхода к планированию терапии РМЖ, основанного на его молекулярных подтипах. Ввиду сложности и дороговизны воспроизведения результатов микрочиповых экспрессионных исследований для типирования биологических типов РМЖ в рутинной клинической практике, была предложена

панель суррогатных иммуногистохимических маркеров. Согласно консенсусу в St.Gallen (2011) на основе иммуногистохимического исследования экспрессии рецепторов к эстрогену (ER), и прогестерону (PR), а также рецептора эпидермального фактора роста 2-го типа и Ki67 в клетках опухоли, РМЖ можно классифицировать на 4 молекулярно-гетерогенных подтипа (люминальный А, люминальный В, HER2-позитивный и базальноподобный), которые отличаются между собой по ответу на терапию и исходу заболевания [169]. Таким образом, помимо рецепторов стероидных гормонов, белки HER2 и Ki67 стали общепринятыми клеточными маркерами, которые используются как для диагностики заболевания, так и определения тактики лечения больных РМЖ.

Люминальный рак молочной железы является наиболее часто встречающимся молекулярным подтипом, который характеризуется наличием позитивной экспрессии рецепторов к стероидным гормонам и высокими показателями чувствительности к эндокринной терапии [3, 5]. Он представляет собой гетерогенную группу опухолей: люминальный А подтип является положительным по экспрессии к ERa/PR, без гиперэкспрессии белка HER2, с низким индексом пролиферативной активности Ki67(<20%); люминальный В тип может быть представлен подтипами положительными по экспрессии к ERa/PR, без гиперэкспрессии HER2, с высоким индексом Ki67, а также опухолями, позитивными как по экспрессии рецепторов к стероидным гормонам, так и HER2. Современные подходы к эндокринной терапии люминального РМЖ включают применение селективных модуляторов эстрогеновых рецепторов (тамоксифен), селективных ингибиторов ERa (фулвестрант) и ингибиторов ароматазы (экземестан, летрозол, анастрозол). Показано, что использование тамоксифена в адъювантном режиме позволяет значительно увеличить показатели безрецидивной выживаемости больных РМЖ [181]. Однако высокий риск рецидива или прогрессирования заболевания на фоне данной эндокринотерапии существенно снижает её эффективность [7].

HER2-позитивный рак молочной железы образует группу прогностически неблагоприятных эстроген-независимых агрессивных опухолей, с выраженной

амплификацией онкогена *HER2*. Гиперэкспрессия *HER2* определяет показания к назначению анти-*HER2* терапии (трастузумаб, лапатиниб, пертузумаб, Т-DM1), что в сочетании с химиопрепаратами позволяет увеличить показатели безрецидивной выживаемости больных [177].

Базальноподобные опухоли характеризуются низкой степенью дифференцировки, высокой агрессивностью, большей вероятностью развития местнораспространенных и метастатических форм. Отсутствие мишеней воздействия для проведения эндокринной и таргетной терапии в опухолях, негативных по всем трем рецепторам, определяет их чувствительность к стандартным химиотерапевтическим схемам, однако результаты их применения противоречивы [75, 340].

Последующие исследования, проведенные с помощью геномных, транскриптомных и протеомных методов в 2008-2014 гг., подтвердили значительную молекулярную гетерогенность РМЖ. Совместный проект Национального Института Рака и Института Исследований Генома США – The Cancer Genome Atlas (TCGA) – позволил систематизировать данные о генетических мутациях и определить основные характеристики генома опухолевой клетки при разных злокачественных новообразованиях, в том числе при РМЖ. Наиболее важным выводом, полученным в ходе данного широкомасштабного исследования, является подтверждение существования четырех основных групп, соотносящихся с молекулярными подтипами РМЖ. Кроме того, показано, что соматические мутации только трёх генов *TP53*, *PIK3CA* и *GATA3* наблюдаются в более чем 10 % случаев всех типов РМЖ. При люминальном А подтипе РМЖ чаще выявляются мутации генов *GATA3*, *PIK3CA* и *MAP3K1*. Найдены специфические мутации генов *PTEN*, *TBX3* и *FOXA1*, характерные для дольковой карциномы молочной железы [52].

Мультигенные тесты, созданные на основе сопоставления показателей экспрессии генов, вовлеченных в процессы пролиферации/инвазии с исходами РМЖ на ретроспективных выборках, позволили более точно, чем стандартные клиничко-морфологические факторы, выделить среди больных эстроген-

позитивного РМЖ подгруппы с неблагоприятным и благоприятным прогнозом заболевания. Экспертами St.Gallen (2015) одобрен тест Oncotype DX®, MammaPrint®, шкала PAM-50 ROR®, EndoPredict® и Breast Cancer Index® в качестве полезных маркеров для оценки вероятности рецидива или отдаленного метастазирования в течение первых 5 лет у больных РМЖ. Для оценки прогноза эстроген-позитивного РМЖ свыше 5 лет одобрена тест-система PAM-50 ROR®, и только коммерческий набор Oncotype DX® был одобрен в отношении предсказания пользы от химиотерапии [327]. Следует отметить, что данные тест-системы не универсальны, основаны на определении уровня экспрессии определенного набора генов, каждая из них применима только к ограниченной группе больных, и может быть использована лишь в качестве прогностического теста.

Таким образом, значительные достижения в области изучения биологических маркеров привели к созданию молекулярной таксономии РМЖ и внедрению в клиническую практику мультигенных тестов, позволяющих прогнозировать исход заболевания у больных раком молочной железы. Однако поиск маркеров эффективности лечения РМЖ остается одним из приоритетных направлений дальнейших молекулярно-генетических исследований.

## 1.2 Молекулярно-генетические механизмы чувствительности и резистентности к терапии тамоксифеном эстроген-зависимого рака молочной железы

### 1.2.1 Структурная организация и функционирование эстрогенового рецептора

Эстрогеновые рецепторы принадлежат к суперсемейству лиганд-зависимых нуклеарных факторов транскрипции, опосредующих биологические эффекты эстрогенов. Эстрогеновый сигнальный путь реализуется посредством двух типов эстрогеновых рецепторов  $\alpha$  и  $\beta$ , которые по-разному экспрессируются в различных тканях. В тканях молочной железы, строме яичника и эндометрии

преимущественно выражена экспрессия ER $\alpha$ , тогда как экспрессия ER $\beta$  характерна для слизистых оболочек кишечника, тканей легкого, почек, предстательной железы, а также костной ткани и клеток головного мозга. Структурно оба типа рецепторов имеют ряд доменов: аминотерминальный домен (N-терминальный домен, A/B), ДНК-связывающий домен (C), лиганд-связывающий домен (E), карбокситерминальный домен (F) и связывающий аминокислоты - и карбокситерминальные регионы - D домен (Рисунок 1).



Рисунок 1 – Структура эстрогеновых рецепторов  $\alpha$  и  $\beta$  [206]

ER $\alpha$  и ER $\beta$  имеют значительную степень гомологии в области ДНК-связывающего и лиганд-связывающего доменов. A/B домен включает область транскрипционной активации AF1, которая ответственна за конститутивную и лиганд-независимую транскрипцию ER, тогда как F домен – область транскрипционной активации AF2, необходимую для лиганд-зависимой активации ER [380].

Классический геномный ER каскад инициализируется взаимодействием эстрогенов (эстрадиол, эстрон и эстриол) с лиганд-связывающим доменом рецептора, что вызывает диссоциацию ассоциированных с рецептором белков hsp90 и димеризацию рецептора. В клеточном ядре гетеродимерный комплекс связывается с ERE (estrogen response element) промоторов целевых генов, что приводит к последующей активации транскрипции, опосредованной двумя активационными функциями, AF1 и AF2, соответственно. AF1 и AF2 необходимы для связывания коактивирующих белков и стимуляции активности РНК-полимеразы II, что способствует пролиферации клеток, процессу ангиогенеза и инвазии опухоли [144, 389].

Использование селективных модуляторов эстрогеновых рецепторов – антиэстрогенов – направлено на ингибирование ER $\alpha$  сигнального пути, а значит на подавление стимулированного эстрогенами роста опухоли. Тамоксифен был предложен для лечения больных раком молочной железы еще в 1971 году и до настоящего времени остается базисным антиэстрогеном для проведения адъювантной гормональной терапии. Тамоксифен ((Z)-2-[4-(1,2-Дифенил-1-бутенил) фенокси]-N, N-диметилэтанамин) был открыт благодаря исследованиям по созданию противозачаточных препаратов в начале 60-х, группой британских ученых. Полученное ими вещество обладало выраженной антиэстрогенной активностью, которая позже была подтверждена в клинических испытаниях [90]. Механизм действия тамоксифена обусловлен его свойствами селективно конкурировать с эстрогенами за связывание с эстрогеновыми рецепторами. Связывание тамоксифена с ER $\alpha$  приводит к конформационным изменениям рецептора. В активированном комплексе тамоксифен-ER $\alpha$  блокируется функция AF2, тогда как функция AF1 не изменяется. Связывание гетеродимера тамоксифен-ER $\alpha$  в клеточном ядре с ERE промоторной области эстроген-чувствительных генов приводит к ослаблению процессов их транскрипции, и, следовательно, нарушению синтеза специфических белков, обеспечивающих биологические эффекты стероидов. Таким образом, тамоксифен способен лишь частично блокировать эстрогеновый сигнальный путь за счет ингибирования функциональной активности AF2 [44].

На сегодняшний день ER $\alpha$  сигнальный путь является основной мишенью эндокринной терапии, поэтому в качестве возможных механизмов формирования резистентности к тамоксифену рассматриваются факторы, сопряженные с его активацией: генетические абберации *ESR1*; молекулярно-генетические изменения внутриклеточных регуляторов ER $\alpha$ ; а также двунаправленное взаимодействие между сигнальными путями ER $\alpha$  и рецепторов факторов роста [365]. Поиск маркеров, ассоциированных с резистентностью к тамоксифену, связан с изучением всех представленных выше механизмов.

### 1.2.2 Генетические aberrации *ESR1*

Ген эстрогенового рецептора  $\alpha$  - *ESR1*- локализован на длинном плече 6 хромосомы (локус q24–27), имеет молекулярный вес около 66кДа и состоит из 595 аминокислотных остатков [172]. *ESR1* содержит восемь экзонов, разделенных семью интронными последовательностями. Первый экзон кодирует A/B домен, вовлеченный в лиганд-независимую транскрипцию ER $\alpha$ ; второй и третий экзоны - ДНК-связывающий домен (C). Четвертый экзон кодирует часть C домена, весь D домен и часть лиганд-связывающего домена (E). Экзоны с пятого по восьмой кодируют E домен, определяющий лиганд-зависимую димеризацию рецептора и обеспечивающий транскрипцию генов посредством коактиваторов. F домен кодируется частью восьмого экзона [38].

В настоящее время выделяют ряд генетических aberrаций гена эстрогенового рецептора, которые могут определять ответ на эндокринную терапию: амплификация *ESR1*, мутации гена эстрогенового рецептора и генетические полиморфизмы *ESR1*.

Процесс увеличения числа копий фрагментов ДНК может рассматриваться в качестве универсального механизма опухоли, определяющего её преимущества перед нормальными клетками, что проявляется в ускорении роста или повышении устойчивости к различным видам противоопухолевой терапии. Показано, что амплификация *ESR1* коррелирует с высоким уровнем экспрессии эстрогенового рецептора, чувствительностью к тамоксифену и благоприятным исходом заболевания у больных ранним РМЖ [136, 140]. Однако исследования, проведенные с использованием секвенирования, показали, что амплификация *ESR1* достигает лишь 2% как в первичных, так и метастатических опухолях молочной железы, и может не иметь существенного вклада в развитие эндокринной резистентности [120]. Тем не менее, Li et al, продемонстрировали лиганд-независимый рост опухоли, обусловленный амплификацией *ESR1* на модели ксенотрансплантата с использованием опухолевых клеток пациентов с ER-позитивным метастатическим эндокринно-рефрактерным РМЖ [121].

Мутации *ESR1* могут приводить к функционально ER-негативному фенотипу без потери экспрессии гена, что может определять неэффективность гормональной терапии. Впервые мутации *ESR1* были описаны на моделях клеточных культур в 1996 году, когда было обнаружено, что замены аминокислот в позиции 537 (Y537S) и позиции 380 (E380Q) лиганд-связывающего домена рецептора ведут к конститутивной активации рецептора и определяют резистентность к антиэстрогенам [89]. Впоследствии три мутации G140C, A1591G, а также Y537S были идентифицированы в опухолевых образцах метастатического рака молочной железы [32]. Наибольшее количество исследований посвящено изучению мутации K303R в четвертом экзоне гена, как при злокачественных новообразованиях молочной железы, так и гиперплазиях [12, 173, 278]. Замена лизина на аргинин в 908 позиции D домена приводит к экспрессии мутантного рецептора, обладающего гиперчувствительностью к эстрадиолу [12]. Показано, что гиперэкспрессия K303R-мутантного рецептора в ER-позитивных клеточных линиях рака молочной железы способствует снижению их чувствительности к тамоксифену и ингибиторам ароматазы при активации перекрестных сигнальных путей рецепторов фактора роста [173, 278]. Выявлена ассоциация данной мутации с агрессивным клиническим течением и неблагоприятным исходом у больных РМЖ, не получавших адъювантную терапию тамоксифеном [39]. Однако, несмотря на центральную роль, которая отводилась мутациям *ESR1* в развитии гормонорезистентности, данные TCGA проекта подтвердили их незначительную клиническую значимость. В ходе исследования, включавшего более 900 образцов РМЖ, различные мутации гена эстрогенового рецептора были выявлены в 0,5% среди всех первичных опухолей молочной железы [52].

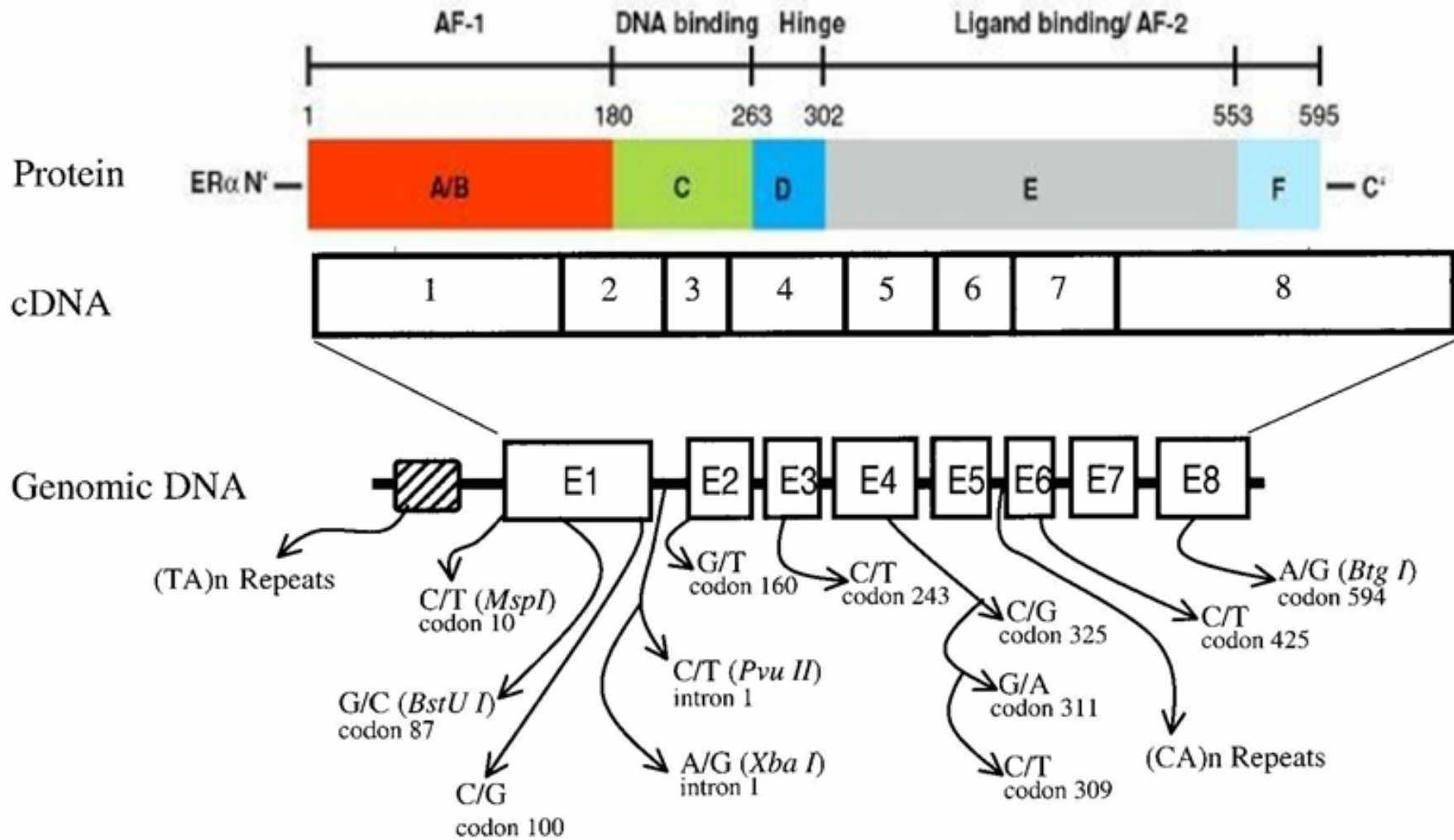
С внедрением секвенирования нового поколения возник интерес к исследованию мутаций *ESR1* при метастатическом раке молочной железы. Ряд независимых параллельных исследований показал, что 20% пациенток с метастатическим РМЖ имеют мутации в лиганд-связывающем домене ER $\alpha$ , которые возникают, в основном, на фоне эндокринной терапии. Большинство данных мутаций являются «hotspot» мутациями, затрагивают сайты

фосфорилирования Y537 и D538 и приводят к лиганд-независимой активации ER $\alpha$ , которая способствует росту опухоли, развитию его метастатического потенциала и резистентности к антиэстрогенам [21, 28, 132]. Кроме того, корреляция между частотой встречаемости «hotspot» мутаций и количеством курсов эндокринной терапии у пациентов, несущих данные мутации, свидетельствуют о том, что под влиянием терапии происходит клональная экспансия редких мутантных клонов, приводящая к развитию резистентности [133, 365]. Полагают, что конститутивная активность ER $\alpha$ , обусловленная мутациями Y537S и D538G, связана с внутренней способностью мутантных рецепторов конформационно изменяться в отсутствие эстрогенов, что приводит к усиленному рекрутированию коактиваторов SRC-3 и увеличению транскрипционной активности ER $\alpha$  [139].

Помимо мутаций, скрининг локусов гена *ESR1* позволил выявить существование множества полиморфных сайтов (Рисунок 2).

Наиболее широко изученными однонуклеотидными полиморфизмами (точечные мутации или SNP) гена *ESR1* являются PvuII (T397C) (rs2234693) и XbaI (A351G) (rs9340799), локализованные в первом интроне и находящиеся в сильном неравновесном сцеплении. Функциональная значимость данных полиморфизмов определяется их возможным влиянием на механизмы экспрессии гена путем изменения связывания транскрипционных факторов и влиянием на альтернативный сплайсинг гена ER $\alpha$  [137]. Выявлены корреляции *ESR1*/PvuII T вариантного аллеля с высокой транскрипционной активностью гена эстрогенового рецептора [87] и уровнем циркулирующих эстрогенов [355]. Показано, что мутантные генотипы *ESR1*/PvuII TT и *ESR1*/XbaI AA могут являться предикторами ответа на тамоксифен у больных РМЖ [135, 300].

## Functional Domains

Рисунок 2 – Структура функциональных доменов и описанных полиморфизмов гена *ESR1* [147]

Полиморфизмы в кодирующих участках гена *ESR1* – экзонах, могут изменять аминокислотную последовательность белка (в случае несинонимичных SNP) или не менять её (в случае синонимичных SNP). *ESR1+30T>C* (rs2077647) представляет собой синонимичный SNP, который расположен в 10 кодоне первого экзона гена, что соответствует аминотерминальному домену и, соответственно, области транскрипционной активации AF1 [138]. Поскольку функционально область AF1 может быть активирована посредством негеномных эффектов ER $\alpha$ , полиморфизм в данном локусе гена может быть вовлечен в механизмы гормональной резистентности посредством активации различных сигнальных каскадов MAPK/p38, JAK/STAT, PI3K/Akt. Однако литературные данные свидетельствуют только о рисковом значимости данного полиморфного локуса при РМЖ. Протективная роль минорного аллеля *ESR1+30T>C* SNP, частота встречаемости которого значимо меньше у больных раком молочной железы, чем в группе контроля, показана для различных популяционных групп [134, 142, 146].

Функциональная роль синонимичной замены в 594 кодоне F домена, являющейся *ESR12014G>A* (rs2228480) полиморфизмом, до конца не изучена. Однако, известно, что F домен играет важную роль в процессе димеризации и транскрипционной активности ER $\alpha$  [356]. Учитывая, что димеризация необходима для правильного функционирования рецептора, можно предположить, что мутации в этой области приводят к образованию нерастворимого или транскрипционно-неактивного рецептора, что изменяет способность ER $\alpha$  взаимодействовать с тамоксифеном и потенциально способствует резистентности. Однако в современных источниках ассоциаций данного SNP с эффективностью гормональной терапии у больных РМЖ не описано. Предыдущие исследования связывают носительство минорного аллеля *ESR1* rs2228480 с риском развития рака молочной железы у пациенток с ранним менархе [131, 141, 267]. Выявлена ассоциация rs2228480 SNP с возрастом больных на момент постановки диагноза [137].

Не менее функционально важным является rs1801132 в четвертом экзоне гена *ERα*, локализованный в лиганд-связывающем домене, вовлеченный в механизмы димеризации рецептора, процессы связывания с шаперонами и рекрутирование корегуляторов. Показано, что данная синонимичная замена приводит к изменению сайтов связывания для транскрипционных факторов *GATA-1* и *GATA-2* [158]. Исследования этого полиморфного локуса крайне противоречивы. Выявлена как взаимосвязь носительства *G* аллеля с риском развития РМЖ [35, 141], так и отсутствие значимых ассоциаций *ESR1* rs1801132 с риском возникновения заболевания и выживаемостью больных раком молочной железы [131, 143].

Таким образом, генетические aberrации *ESR1* могут вносить определенный вклад в механизмы резистентности к эндокринной терапии, являются приоритетным и актуальным направлением в современных исследованиях, многие аспекты которого остаются открытыми.

### 1.2.3 Молекулярно-генетические изменения внутриклеточных регуляторов *ERα*

В процессах регуляции экспрессии генов важную роль играют внутриклеточные белки-коактиваторы и белки-корепрессоры, которые увеличивают (коактиваторы) или подавляют (корепрессоры) экспрессию генов путем связывания с факторами транскрипции.

Процесс транскрипции ДНК, являющейся первым этапом экспрессии генов, катализируется РНК-полимеразой II и зависит от множества регуляторных белков, взаимодействующих с участками ДНК, образующими промотор. Коактиваторы представляют собой белки, которые не способны связываться с ДНК напрямую, им присущи адаптерные свойства, обеспечивающие передачу регуляторного сигнала от специфических белков активаторов транскрипции к РНК-полимеразе II. Коактиваторы, связываясь с транскрипционными факторами,

способны усиливать их взаимодействие с инициаторными последовательностями промоторов [227, 249, 357, 396]. Кроме того, механизм действия коактиваторов связан с дерепрессией промоторных участков генов, которые могут быть блокированы гистонами. Обладая гистонацетилтрансферазной активностью, коактиваторы ослабляют скрученность хроматина, в результате чего регуляторные последовательности становятся доступными для транскрипционных факторов и РНК-полимеразы II [51]. Коактиваторы конкурируют с корепрессорами за места связывания на молекулах транскрипционных факторов. Связываясь с транскрипционным белковым комплексом, корепрессоры способны присоединять гистондеацетилазы, что приводит к гипоацетилированию и изменению конформации хроматина. Более плотное расположение нитей ДНК уменьшает её доступность для факторов транскрипции, что приводит к транскрипционной репрессии [171, 210].

Первым среди коактиваторных молекул ядерных рецепторов был открыт коактиватор стероидных рецепторов 1 (steroid receptor coactivator, SRC-1/NCOA1), который обнаружен при изучении белков, взаимодействующих с лиганд-связывающим доменом рецептора прогестерона [326]. Впоследствии были идентифицированы два дополнительных члена семейства SRC, коактиваторы стероидных рецепторов -2 (SRC-2/NCOA2/GRIP2/TIF2) [370] и -3 (SRC-3/NCOA3/AIB1/RAC3/ACTR /PCIP) [25]. В настоящее время известно более чем 400 корегуляторов транскрипции, которые характеризуются повторяющимися аминокислотными последовательностями LXXLL (где L – лейцин, а X – любая другая аминокислота) и обладают энзиматической активностью. К ним относят такие белки как p300 и циклический АМФ связывающий белок (CREB-binding protein, CBP), принадлежащие к семейству гистон-ацетилтрансфераз (histone acetyltransferase, HAT); гистон-деацетилазы (histone deacetylases, HDAC1/3); гистон-метилтрансферазы (histone methyltransferases, HMTs), такие как CARM1 and PRMT1; бромодоменсодержащие белки (bromodomain containing domain proteins, BRD2-4) [391]. SRCs являются наиболее охарактеризованными среди всех коактиваторных белков и содержат три функциональных домена: N-

терминальный, содержащий сигнал ядерной локализации (nuclear localization signal, NLS); домен, ответственной за связывание с ядерным рецептором, содержащий два мотива LXXLL; и два С-терминальных активационных домена AD1 и AD2, обеспечивающих слабую гистон-ацетилтрансферазную активность. AD1 домен взаимодействует с белками, модифицирующими хроматин, такими как CBP; в то время как AD2 домен необходим для связывания с гистон-метилтрансферазами [45, 319, 394].

В классическом сигнальном пути эстрогенового рецептора связывание эстрогенов с лиганд-связывающим доменом ER $\alpha$  индуцирует конформационные изменения рецептора, приводящие к изменению ориентации области AF2, образуя поверхность распознавания для взаимодействия с короткими мотивами LXXLL коактиваторов. Именно LXXLL мотивы за счёт формирования гидрофобной поверхности из остатков лейцина на амфипатической  $\alpha$ -спирали обеспечивают связывание коактиватора с гидрофобной щелью рецептора, формируемой при обязательном участии 12-й  $\alpha$ -спирали [176]. Взаимодействуя с активированными факторами транскрипции, SRCs образуют многокомпонентный комплекс с другими коактиваторными белками, такими как CBP, p300 и CARM1, посредством AD1 и AD2 доменов. Внутренняя ацетилтрансферазная активность как SRCs, так и CBP, p300, CARM1 белков, способствует накоплению ацетилированных нуклеосом и активации транскрипции [204, 337].

Типичными представителями корепрессоров ER $\alpha$  являются белки NCoR1 (nuclear receptor co-repressor) и SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors), которые первоначально были клонированы в качестве гормон-независимых рецепторов тиреоидных гормонов при дрожжевом двугибридном скрининге [212]. В отличие от коактиваторов, NCoR1 и SMRT взаимодействуют с ER $\alpha$  в отсутствие гормонов, содержат взаимодействующий с рецептором домен (RID) и репрессирующие домены (RD). RID домен включает мотив CORNR, подобный LXXLL мотиву коактиваторов, ответственный за связывание с ядерными рецепторами. Важно отметить, что NCoR1 и SMRT не обладают внутренней энзиматической активностью, они способны рекрутировать

гистондеацетилазы посредством репрессивных доменов RD1, RD2 и RD3, что способствует деацетилированию гистонов, репрессии хроматина и, соответственно, подавлению транскрипционной активности [9, 254]. Интересно, что уровень и активность ко-регуляторов может приводить как к усилению лиганд-независимой активации ER $\alpha$ , так и модуляции агонист/антагонист активности антиэстрогенов. В клетках рака молочной железы тамоксифен действует преимущественно как антагонист ER $\alpha$ , блокируя его активность и приводя к уменьшению роста и выживаемости опухолевых клеток. Пространственно-структурные исследования показали, что связывание тамоксифена с лиганд-связывающим доменом ER $\alpha$  вызывает определенную переориентацию 12  $\alpha$ -спирали, что приводит к «закрытию» поверхности распознавания области AF2, необходимой для связывания с SRCs [363]. Однако при наличии высокого уровня коактиваторов, в частности SRC-1, тамоксифен может действовать как агонист, способствуя активации транскрипции ER $\alpha$  и, соответственно, опухолевому росту [184]. Показано, что гиперэкспрессия коактиватора SRC-3 ассоциирована с резистентностью к тамоксифену в клинических и экспериментальных исследованиях [230, 255, 320]. Высокий уровень SRC-3 связан с неблагоприятным исходом у больных РМЖ, получавших тамоксифен, особенно при наличии ко-экспрессии в опухоли HER2 или других членов HER2 -семейства [31, 320]. Соответственно, низкий уровень экспрессии корепрессоров NCOR1 и SMRT коррелирует с приобретением резистентности к тамоксифену в экспериментальных моделях клеточных линий и у больных РМЖ [108, 205]. Установлено, что процессы посттрансляционной модификации белков могут в значительной степени модулировать функциональную активность ко-регуляторов. Так, фосфорилирование SCR-3 приводит к усиленному привлечению других ко-регуляторов, что способствует увеличению транскрипционной активности ER $\alpha$  даже в присутствии тамоксифена [325]. Аналогичным образом фосфорилирование NCOR1 приводит к его исключению из клеточного ядра, тем самым, снижая его ингибирующие эффекты на ER $\alpha$  [108].

Таким образом, ко-регуляторы эстрогеновых рецепторов играют важную роль в процессах инициации и прогрессии опухолевого роста. Обладая свойствами адаптерных молекул, способных контролировать транскрипционные генетические процессы, опосредованные гормональной стимуляцией ядерных рецепторов, они представляют на сегодняшний день перспективные мишени для создания таргетных препаратов, направленных на модуляцию ER $\alpha$  сигнальной трансдукции.

#### 1.2.4 Взаимодействие между сигнальными каскадами рецепторов факторов роста и ER $\alpha$

Биологические эффекты стероидов могут реализовываться независимо от транскрипционных генетических процессов. Посредством негеномных механизмов эстрогеновые рецепторы способны прямо или косвенно взаимодействовать с рецепторными тирозинкиназами, такими как EGFR, HER2 и IGF1R, активируя нижележащие внутриклеточные сигнальные пути. В настоящее время доказано, что перекрестные связи между сигнальными путями эстрогеновых рецепторов и рецепторов факторов роста могут играть важную роль в возможном снижении устойчивости опухолей молочной железы к эндокринной терапии [194, 404].

##### *HER2 сигнальный путь*

HER2 (Human epidermal growth factor receptor 2/ErbB2) является мембранным белком семейства тирозинкиназных рецепторов эпидермального фактора роста EGFR/ErbB. Все рецепторы факторов роста, обладая тирозинкиназной активностью, осуществляют перенос внеклеточного сигнала во внутрь клетки, и состоят из нескольких доменов - внеклеточного лиганд-связывающего с семью участками гликозилирования, трансмембранного и внутриклеточного цитозольного домена, содержащего тирозинкиназный участок и участки

связывания белков. Процесс димеризации рецепторов, который инициируется связыванием их с лигандом, приводит к аутофосфорилированию тирозиновых остатков цитоплазматического домена рецепторов, и запуску процесса сигнальной трансдукции. HER2, не имея собственного лиганда, способен образовывать гомодимеры (ErbB2/ErbB2) и гетеродимеры (ErbB1/ErbB2) со всеми остальными белками семейства ErbB. Показано, что гетеродимеры, содержащие HER2, характеризуются высокой устойчивостью и медленным эндоцитозом, что приводит к более эффективной передаче внутриклеточного сигнала [208, 399]. Активация HER2 сигнального пути изменяет ER $\alpha$ - опосредуемую транскрипцию путем нарушения взаимодействия между эстрогеновым рецептором и его регуляторами (коактиваторами и корепрессорами). Гиперэкспрессия HER2 приводит к запуску нескольких сигнальных каскадов, включая PI3K/Akt/mTOR и MAPK-сигнальные пути [232, 261, 390].

Амплификация гена *ErbB2* наблюдается в 30% случаев рака молочной железы и ассоциирована с агрессивным клиническим течением заболевания и неблагоприятным прогнозом. Клинические и экспериментальные исследования свидетельствуют о том, что гиперэкспрессия HER2 определяет резистентность к антиэстрогенной терапии в ER-позитивных опухолях [95, 298]. Показано, что активация HER2 сигнального пути, даже без гиперэкспрессии HER2, приводит к развитию резистентности к тамоксифену в ER-позитивных клетках [166]. Экспериментальные исследования свидетельствуют, что в тамоксифен-чувствительных клеточных линиях экспрессия гена *HER2* репрессируется комплексом PAX2-ER-тамоксифен. Однако в тамоксифен-резистентных клеточных культурах SRC-3 способен конкурировать с PAX2 за связывание с эстрогенами, что приводит к усилению транскрипции HER2 [311]. Кроме того, активация HER2 снижает уровень эстрогенов рецепторов и усиливает фосфорилирование ER, даже в отсутствие эстрогенов [118, 311]. Взаимозависимость HER2 и ER подтверждается экспериментальными данными, согласно которым добавление ингибиторов ароматазы или блокирование эстрогеновых рецепторов фулвестрантом в культуре HER2-положительных

клеток тормозит их рост [13]. Фактически накопленные экспериментальные данные подвели к обоснованию комбинированного ингибирования HER2 и ER сигнальных путей для ER/HER2-позитивного РМЖ в клинической практике. Использование комбинации анастрозол плюс трастузумаб против только анастрозола в клиническом исследовании III фазы TAnDEM позволило добиться длительной выживаемости без прогрессирования (4,8 мес против 2,4 мес;  $p=0.0016$ ) и высокой клинической эффективности (42,7% против 20,3%) у постменопаузальных ER/HER2-позитивных больных [373]. Показана эффективность применения двух моноклональных антител к HER2 (пертузумаба и трастузумаба) в сочетании с ингибиторами ароматазы у HER2-позитивных больных метастатическим/местно-распространённым РМЖ [159]. Таким образом, одновременное блокирование двух сигнальных молекул HER2 и ER, позволяет добиться на сегодняшний день максимальной терапевтической эффективности у пациенток ER-позитивным РМЖ.

#### *EGFR сигнальный путь*

Среди четырех членов семейства ErbB, HER1 более известен как рецептор эпидермального фактора роста (EGFR). Связывание одного из его специфичных лигандов (EGF и TGF- $\alpha$ ) приводит к рецептор-гомо и/или гетеродимеризации и активации нижестоящих сигнальных каскадов, включая PI3K/Akt/mTOR и MAPK. При раке молочной железы гиперэкспрессия EGFR и, соответственно, активация PI3K/Akt/mTOR и MAPK сигнальных путей, определяют резистентность к эндокринной терапии и неблагоприятный прогноз [298, 343]. Показано, что активация ErbB3, EGFR и Erk молекул имеет решающее значение для роста клеточных линий РМЖ, резистентных к фулвестранту [273]. В доклинических исследованиях на тамоксифен-резистентных клеточных линиях MCF-7 получены данные, свидетельствующие о том, что гефитиниб, селективный ингибитор тирозинкиназных рецепторов, эффективно ингибирует гетеродимеризацию EGFR-HER2, фосфорилирование и PI3K/Akt/mTOR сигнальную трансдукцию [341].

В настоящее время одним из направлений исследований по преодолению развития эндокринной резистентности у больных РМЖ является изучение селективных ингибиторов EGFR как в монорежиме, так и в сочетании с эндокринной терапией, однако результаты клинических испытаний неоднозначны. Согласно данным клинических исследований добавление EGFR/HER2-таргетной терапии к ингибиторам ароматазы у ER/HER2-позитивных пациенток с рецидивом заболевания на фоне терапии тамоксифеном значительно увеличивает время до прогрессирования [209]. Однако Osborne et al., не доказали преимущества добавления gefitiniba в схему лечения ER-позитивных больных метастатическим РМЖ, получавших тамоксифен [164].

Стратегия комбинированного воздействия на две молекулярные мишени - ER и EGFR - активно применяется и в неoadьювантном режиме. В двойном слепом рандомизированном клиническом исследовании II фазы использование комбинации gefitinib plus anastrozole против gefitinib plus placebo за 4-6 недель до оперативного лечения способствовало значительному снижению уровня Ki67 у ER/EGFR-позитивных больных РМЖ [292]. В другом рандомизированном исследовании, включающем 206 ER-позитивных постменопаузальных больных РМЖ, использование подобной схемы лечения не приводило к улучшению клинического объективного ответа [14]. Авторы полагают, что для определения прогноза рецидива и эффективности предоперационной эндокринной терапии с включением ингибиторов EGFR у больных РМЖ необходим поиск дополнительных предсказательных маркеров.

### *IGF1R сигнальный путь*

Сигнальная система инсулиноподобного фактора роста занимает ключевые позиции в процессах, опосредующих гормонозависимую индукцию пролиферации и дифференцировки эпителия молочных желез. Основными компонентами данной системы являются непосредственно белки семейства инсулиноподобного фактора роста IGF-I и IGF-II; мембранные рецепторы IGF1R и IGF2R, опосредующие их биологические эффекты, а также комплекс белков, связывающих инсулиноподобный фактор роста IGFБPs. Центральная роль в

системе отводится IGF1R, тогда как IGF2R определяет внеклеточную концентрацию IGF-II [334]. Связывание лиганда с внеклеточной  $\alpha$ -субъединицей IGF1R конформационно изменяет  $\beta$ -субъединицу рецептора за счет трансавтофосфорилирования её тирозинкиназного участка. Далее рецептор автофосфорилирует дополнительные остатки тирозина в примембранном и C-концевом домена, которые представляют собой место специфического взаимодействия с белками субстрата инсулинового рецептора IRSs (insulin receptor substrate) и адаптерными белками. Последующее фосфорилирование этих белков по нескольким тирозиновым остаткам придает им способность соединяться с SH2-домен содержащими белками (p85 регуляторная субъединица PI3, адапторный белок Grb2, протеин-тирозинфосфатаза SH-PTP2 и т.п.), опосредующими многочисленные нисходящие сигналы от активированного рецептора [19, 362].

IGF1R экспрессируется в 90-95% случаях при раке молочной железы и довольно часто ко-экспрессируется с ER $\alpha$  [157]. Показано перекрестное влияние между двумя белками: с одной стороны уровень экспрессии ER $\alpha$  контролируется IGF, с другой стороны – эстрогеновые рецепторы посредством геномного и негеномного действия, способны активировать IGF1R-зависимую трансдукцию [23, 155]. В ранних экспериментальных работах продемонстрирована IGF-опосредованная активация Akt с последующим фосфорилированием ER $\alpha$ , приводящим к лиганд-независимой активации эстрогенового рецептора в качестве механизма, позволяющего IGF-I-леченым культурам клеток рака молочной железы избегать тамоксифен-индуцированного апоптоза [274]. Дальнейшие исследования свидетельствуют о вовлечении сигнальной системы инсулиноподобного фактора роста в процессы фосфорилирования (Ser167) и активирования ER $\alpha$  посредством mTOR/S6K1 -зависимого механизма [358]. В исследованиях *in vitro* показано, что добавление специфических ингибиторов рецептора инсулиноподобного фактора роста AG1024 значительно снижает рост тамоксифен-резистентных клеточных линий рака молочной железы MCF-7 [196]. Кроме того, на моделях *in vivo* получены данные о том, что использование

моноклональных антител к IGF1R значительно усиливает противоопухолевую активность ER-позитивных ксенотрансплантатов рака молочной железы [83]. В настоящее время проводятся клинические испытания ингибиторов системы инсулиноподобного фактора роста. В частности, рандомизированные плацебо-контролируемые исследования II фазы по изучению гуманизованного моноклонального антитела AMG 479 (направленного против IGF1R) с экземестаном и/или фулвестрантом не выявило значимых преимуществ их применения у ER-позитивных пациенток в постменопаузе с прогрессированием заболевания при предшествующей эндокринной терапии [17, 78]. Дальнейшее обобщение данных проводимых клинических испытаний будет иметь большое значение для определения роли ингибиторов IGF1R в комплексной терапии рака молочной железы.

### 1.3 Факторы прогноза, ассоциированные с особенностями клинического течения и ответом на неoadьювантную химиотерапию эстроген-независимого рака молочной железы

#### 1.3.1 Гетерогенность тройного негативного рака молочной железы

Термин «тройной негативный рак» молочной железы (ТНРМЖ) впервые был упомянут в зарубежных публикациях в 2005 году [236]. Тройной негативный рак молочной железы идентифицирован в 2000 году как клиническая значимая подгруппа РМЖ, не имеющая экспрессии рецепторов эстрогена/прогестерона и гиперэкспрессии или амплификации HER2, для которой характерен неблагоприятный прогноз, крайне агрессивное поведение и низкие показатели выживаемости. Динамика заболевания, риск развития рецидивов и характер метастазирования при тройном негативном РМЖ значительно отличается от других молекулярных подтипов [182, 328]. Тройной негативный рак встречается в 10-20% всех случаев РМЖ, его часто называют базальноподобным, однако это не совсем корректно, поскольку базальноподобные опухоли составляют 47-88% всех

опухолей с тройным негативным фенотипом [102, 183]. Согласно эпидемиологическим данным, ТНPMЖ чаще регистрируется среди афроамериканок и латиноамериканок, особенно в молодом возрасте и пременопаузальном периоде [180, 377]. Ряд исследований свидетельствует о связи в анамнезе женщин трех и более беременностей с высоким риском развития этого молекулярного подтипа [313, 371]. Кроме того, высокий индекс массы тела, метаболический синдром, диабет второго типа могут рассматриваться в качестве факторов риска в отношении развития опухолей с тройным негативным фенотипом [47, 97, 231]. ТНPMЖ часто ассоциирован с мутацией гена *BRCA1*, значительно реже - с *BRCA2*, характеризуется высокой пролиферативной активностью и чувствительностью к цитотоксическим препаратам [105, 256, 329]. Современные стратегии лечения данного молекулярного подтипа связаны с использованием различных химиотерапевтических схем, в том числе в неoadьювантном режиме, эффективность которых определяется полным патоморфологическим ответом (pCR), суррогатной конечной точкой оценки результатов лечения [98, 266, 379].

Накопленные к настоящему моменту знания свидетельствуют о гетерогенности тройного негативного рака молочной железы, имеющего различные морфологические и молекулярные особенности, а также ответ на системную химиотерапию. На основании профиля генной экспрессии опухолей с тройным негативным фенотипом исследователями из Vanderbilt-Ingram Cancer Center выделено как минимум шесть подтипов, обладающих разным клиническим течением и чувствительностью к терапии: два варианта базально-подобного рака (BL1 и BL2), иммуномодулирующий (IM), мезенхимальный (M), мезенхимальный стволово-подобный (MSL) и подтип с экспрессией рецепторов андрогенов (LAR) [183].

BL1 подтип характеризуется экспрессией базальных цитокератинов, высокой скоростью процессов клеточного деления и потерей контроля клеточного цикла. Такие опухоли избыточно экспрессируют мРНК Ki67 и отвечают на антимитотические агенты, такие как таксаны (паклитаксел/доцетаксел) и

алкилирующие препараты (цисплатин), демонстрируя самое высокое количество pCR (52%) среди всех подтипов тройного негативного рака. Опухоли второго варианта базально-подобного рака экспрессируют EGF, EGFR, MET, Wnt/ $\beta$ -catenin, IGF1R, а также миоэпителиальные маркеры, для них характерна активация процессов гликолиза и гликонеоангиогенеза, однако пациенты с таким подтипом редко достигают полных регрессий [105, 385]. Иммуномодулирующий вариант представлен иммунокомпетентными, антигенпрезентирующими клетками и цитокинами, имеет сходство с медуллярным типом РМЖ и благоприятным клиническим прогнозом. Процент полных морфологических регрессий у пациентов с IM подтипом достигает средних значений [344]. Два подтипа мезенхимальных опухолей экспрессируют маркеры эпителиально-мезенхимального перехода, а также белки сигнальных каскадов рецепторов факторов роста. Показано, что клеточные линии РМЖ этих подтипов чувствительны к ингибиторам SRC и PI3K (дазатиниб). Они демонстрируют низкую экспрессию генов, ассоциированных с пролиферацией, и имеют средние показатели частоты достижения полных регрессий (23-31%) [183]. Для мезенхимального стволово-подобного подтипа характерна дисрегуляция TGF- $\beta$ RIII, что приводит к активации процессов миграции и инвазии MSL-клеточных линий *in vitro* и росту опухоли *in vivo* [372]. Опухоли LAR группы являются гормон-регулируемыми, включая синтез стероидов и андроген рецептор сигнальную трансдукцию, характеризуются мутациями *PIK3CA* и наименее чувствительны к химиотерапии (pCR 10%). Экспериментальные исследования показали, что комбинированное применение таргетных антиандрогенных препаратов (бикалутамид) с ингибиторами PI3K, позволяет достичь терапевтического эффекта [284].

В настоящее время проводятся многочисленные экспрессионные исследования, на основании которых предполагается определить эффективные молекулярные маркеры чувствительности/резистентности к лечению разных подтипов тройного негативного РМЖ и, следовательно, получить возможность дополнительного (помимо химиотерапии) таргетного воздействия.

### 1.3.2 Предсказательная значимость существующих молекулярно-генетических маркеров эффективности неоадьювантной химиотерапии

На сегодняшний момент в качестве общепринятых предиктивных маркеров тройного негативного рака молочной железы в клинической практике нашли применение лишь два показателя - лимфоцитарная инфильтрация опухоли и мутации генов *BRCA1* или *BRCA2*. Наличие лимфоцитарной инфильтрации связано с нарастанием частоты pCR в ответ на неоадьювантную химиотерапию [216, 302]. Показано, что у пациентов с дефицитом репарации ДНК, связанным с мутацией генов *BRCA1* или *BRCA2* наблюдается высокая частота pCR на химиотерапию препаратами платины [265]. Клинические исследования продемонстрировали высокую активность карбоплатина по сравнению с доцетакселом у больных с метастатическим РМЖ и мутацией гена *BRCA1* [364].

Однако для тройного негативного рака, как молекулярного подтипа с чрезвычайно гетерогенным поведением существует острая потребность в поиске новых терапевтических мишеней, воздействие на которые, могло бы увеличить эффективность лечения этой когорты больных. Ниже приведены некоторые из белков, которые были идентифицированы в различных группах ТНРМЖ и рассматриваются в настоящее время в качестве потенциальных таргетных биологических маркеров проводимой терапии.

#### *EGFR*

Гиперэкспрессия EGFR, ассоциированная с неблагоприятным прогнозом у большинства больных тройным негативным РМЖ, послужила основанием для проведения многочисленных исследований малых молекул и моноклональных антител против рецептора эпидермального фактора роста. Несмотря на то, что клинические испытания TBCRC001 по изучению цетуксимаба как в монотерапии, так и в сочетании с препаратами платины были многообещающими, представленные результаты оказались весьма скромны. Анти-EGFR направленная терапия даже в сочетании с карбоплатином имела небольшую эффективность: только у четырех пациентов (двое из которых получали цетуксимаб в

монотерапии и двое больных цетуксимаб в комбинации с карбоплатином) наблюдались длительные ответы более 12 месяцев [348]. Более обнадеживающие данные получены при изучении малой молекулы ингибитора тирозинкиназ гефитиниба. Экспериментальные работы на клеточных линиях тройного негативного рака молочной железы показали высокую эффективность гефитиниба в сочетании с карбоплатином и доцетакселом [127].

### *VEGF-A*

Сосудистый эндотелиальный фактор роста является ключевым белком ангиогенеза, амплификация и высокая экспрессия которого часто наблюдается при опухолях с тройным негативным фенотипом [333]. Результаты клинических испытаний свидетельствуют, что использование бевациумаба (моноклонального антитела против VEGF) в комбинации с неoadьювантной химиотерапией приводит к увеличению частоты полных морфологических регрессий у больных ТНРМЖ [85]. Кроме того, в исследовании GBG 44 продемонстрировано значительное увеличение количества pCR у больных тройным негативным раком молочной железы, получавших антрациклин-таксан-содержащую химиотерапию с бевациумабом в неoadьювантном режиме [247]. Комбинированная химиотерапия с анти-VEGF-терапией может стать потенциальным вариантом лечения первой линии больных тройным негативным РМЖ.

### *PARP*

Система репарации ДНК опухолевых клеток, как правило, дефектна за счет мутаций генов *BRCA1* или *BRCA2* и нарушения механизма гомологичной рекомбинации. Поли(АДФ-рибоза) - полимеразы 1 (PARP1) представляет собой фермент суперсемейства восемнадцати поли(АДФ-рибоза) - полимераз, которые играют важную роль в процессах восстановления однонитевых разрывов ДНК и ремоделировании хроматина. На участках повреждения ДНК PARP1 активирует внутриклеточные сигнальные пути, которые модулируют репарацию ДНК с помощью поли(АДФ)-рибозилирования нескольких ядерных белков, участвующих в метаболизме ДНК [30]. Экспериментальные исследования

продемонстрировали, что дисфункция генов *BRCA1* или *BRCA2* сенсбилизирует опухолевые клетки к ингибированию ферментативной активности PARP1, что приводит к хромосомной нестабильности, остановке клеточного цикла и последующему апоптозу. По-видимому, это связано с тем, что инактивация PARP1 приводит к сохранению ДНК-повреждений, обычно восстанавливаемых гомологичной рекомбинацией. Эти результаты предполагают, что прицельная инактивация специфических сигнальных путей восстановления ДНК может позволить разработать новые и менее токсичные подходы к лечению РМЖ [109, 347].

К настоящему времени проведено более 100 клинических испытаний ингибиторов PARP, таких как олапариб, велипариб, рукапариб, нирапариб и талазопариб, причем в большей степени на выборках пациенток с мутациями *BRCA1/2* [34]. Из всех ингибиторов PARP, олапариб является первым ингибитором, который был одобрен FDA у больных с рецидивами рака яичников, имеющих мутацию BRCA, чувствительных к препаратам платины [258]. В нескольких клинических испытаниях продемонстрирована эффективность олапариба у больных *BRCA1/2* – ассоциированным РМЖ [257, 259, 260]. В рамках II фазы мультицентрового исследования I-Spy показано, что добавление комбинации карбоплатин+велипариб к неоадьювантной химиотерапии (паклитаксел/доксорубицин/ циклофосфан) приводит к удвоению частоты pCR у больных ТНРМЖ [386]. Однако результаты рандомизированных исследований II фазы рукапариба в монорежиме и в комбинации с цисплатином не выявили существенных различий между показателями безрецидивной выживаемости в обеих группах больных ТНРМЖ [73]. Несмотря на то, что ингибиторы PARP имеют ряд потенциальных терапевтических преимуществ при использовании в монорежиме, остается открытым вопрос об их применении в комбинации с химиопрепаратами, в частности препаратами платины.

#### *Ингибиторы контрольных точек иммунного ответа*

Контрольные точки иммунного ответа (immune checkpoints) играют важную роль в регуляции активации и модуляции иммунного ответа, препятствуя запуску

аутоиммунных процессов и способствуя ауто толерантности. Опухолевые клетки способны использовать сигнальные пути контрольных точек иммунного ответа для супрессии Т-лимфоцитов, приобретая невосприимчивость к действию иммунной системы.

К таким контрольным точкам иммунного ответа относится PD-1 (Programmed cell death protein 1), мембранный рецептор, экспрессирующийся на поверхности активированных лимфоцитов. Взаимодействие PD-1 с его лигандами PD-L1 и PD-L2 приводит к инактивации Т-лимфоцитов и запуску апоптоза. Блокада PD-1 и, соответственно, его сигнального пути способствует усилению Т-клеточной противоопухолевой активности [264]. Результаты мультицентровых клинических испытаний Ia фазы показали многообещающую эффективность атезолизумаба (MPDL3280A), моноклонального антитела против PD-L1, в отношении метастатического тройного негативного РМЖ [190]. Предварительные данные сочетанного применения атезолизумаба и наб - паклитаксела у больных данным молекулярным подтипом РМЖ подтвердили хорошую переносимость и эффективность комбинации двух препаратов [322]. Кроме того, клинические испытания I фазы другого моноклонального антитела против PD-L1 - пемролизумаба (МК-3475), также продемонстрировали его эффективность и низкую токсичность у пациенток с рецидивирующим/метастатическим РМЖ тройным негативным фенотипом [168].

К другой наиболее исследуемой иммунотерапевтической мишени, блокада которой позволит восстановить реактивность собственной иммунной системы, относится белок цитотоксических лимфоцитов CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte associated protein). Показана активность моноклонального антитела тремелимумаба, направленного на инактивацию CTLA-4 сигнального каскада, в отношении рецептор-позитивного рака молочной железы [71]. Таким образом, изучение иммуномодулирующих препаратов, оценка их иммуногенности, позволило заложить основу для развития иммунотерапии при тройном негативном раке молочной железы.

### *Андрогеновый рецептор*

Андроген-рецептор позитивный тройной негативный РМЖ представляет подтип опухоли с неблагоприятным клиническим исходом. Блокада андрогеновых рецепторов рассматривается в качестве потенциальной эндокринной терапии этого молекулярного подтипа [36]. Клинические испытания II фазы андроген-блокирующего агента бикалутамида у пациентов с AR-положительным статусом РМЖ показали его потенциальную клиническую эффективность [272]. Подобная эффективность была продемонстрирована при применении другого ингибитора андрогеновых рецепторов – энзалутамида – у больных тройным негативным РМЖ с экспрессией рецепторов андрогена  $\geq 10\%$  [316]. Показано, что воздействие на андроген-опосредованный сигнальный путь сопряжено с меньшей токсичностью, чем использование стандартных химиотерапевтических схем, однако комбинация двух данных подходов может приносить неменьшую выгоду пациентам с LAR опухолями [346], как, впрочем, и сочетанное применение ингибиторов андрогеновых рецепторов с анти-PDL1-антителами [294]. В настоящее время продолжаются рандомизированные клинические исследования, которые позволят оценить эффективность применения антиандрогенных препаратов у больных тройным негативным РМЖ.

## 1.4 Роль PI3K/Akt/mTOR-сигнального в механизмах резистентности эстроген-зависимого и эстроген-независимого рака молочной железы

### 1.4.1 Основные компоненты PI3K/Akt/mTOR сигнального пути

Несмотря на разнообразие митогенных сигнальных путей, которые могут быть активированы при РМЖ, PI3K/Akt/mTOR сигнальный путь представляет универсальный механизм ответственный в опухолевых клетках за интеграцию пролиферативных стимулов и одновременную активацию трансляции [11, 170]. Основными компонентами данного сигнального каскада являются белки PI3K

(фосфоинозитид 3-киназа), Akt (протеинкиназа B) и mTOR (серин-треониновая протеинкиназа).

Ключевым элементом PI3K/Akt/mTOR сигналинга является PI3K, гетеродимерная молекула, принадлежащая к классу липид-киназ. В настоящее время выделяют три класса (I, II и III) PI3 киназ, которые различаются по структуре, механизмам регуляции и субстратной специфичности [226]. Фосфоинозитид-3-киназы класса I изучены наиболее полно. Главной особенностью киназ этого класса является гетеродимерная структура, включающая одну регуляторную и одну каталитическую субъединицы. Класс I можно подразделить на подклассы IA и IB в зависимости от типа данных субъединиц. Киназы подкласса IA состоят из регуляторной субъединицы, которая может быть представлена пятью изоформами (p85 $\alpha$ , p55 $\alpha$ , p50 $\alpha$ , p85 $\beta$  или p55 $\gamma$ ) и каталитической субъединицы, имеющей три изоформы (p110  $\alpha$ , p110  $\beta$  или p110  $\delta$ ). Регуляторные белки p85 $\alpha$ , p55 $\alpha$ , p50 $\alpha$  являются продуктами альтернативного сплайсинга мРНК одного гена PIK3R1, а субъединицы p85 $\beta$  или p55 $\gamma$  продуктами двух других генов PIK3R2 и PIK3R3. Из всех регуляторных субъединиц наиболее распространен p85 $\alpha$ , который содержит SH2 и SH3 домены, отвечающие за взаимодействие с фосфорилированным тирозином тирозинкиназного рецептора. Каждая каталитическая субъединица является продуктом своего собственного гена, то есть гены PIK3CA, PIK3CB и PIK3CD отвечают за синтез субъединиц p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  и p110 $\delta$ , соответственно. Изоформы p110 $\alpha$  и p110 $\beta$  присутствуют в большинстве клеток организма, а изоформа p110 $\delta$  встречается, главным образом, в лейкоцитах и играет важную роль в адаптивном иммунитете. Киназы подкласса IA могут активироваться как рецепторами, ассоциированными с G-белками, так и рецепторными тирозинкиназами [124, 361].

Фосфоинозитид-3-киназы класса IB представляют собой гетеродимерные комплексы, состоящие из регуляторного белка p101 или p84 и связанной с ним каталитической субъединицы p110 $\gamma$ . PI3 киназы этого класса активируются рецепторами, ассоциированными с G-белками [94]. Фосфоинозитид-3-киназы класса II значительно отличаются от PI3 киназ класса I по структуре и функциям,

поскольку не имеют регуляторных субъединиц. Их каталитические субъединицы представлены тремя изоформами C2 $\alpha$ , C2 $\beta$  и C2 $\gamma$ . Экспрессия первых двух изоформ выражена в большинстве клеток организма, тогда как экспрессия C2 $\gamma$  характерна только для клеток печени. Особенностью киназ данного класса является отсутствие С-концевого домена, ответственного за связывание кальция [156]. Физиологическая роль PI3 киназ класса II до конца не выяснена, однако недавние исследования свидетельствуют об их участии в ангиогенезе и регуляции процессов клеточного роста [122]. Фосфоинозитид-3-киназа класса III является гетеродимером, состоящим из каталитической субъединицы VPS34 и регуляторной субъединицы p150. Этот класс PI3 киназ участвует во внутриклеточном транспорте белков и везикул [41].

Реализация PI3K/Akt/mTOR сигнального каскада инициируется взаимодействием фосфорилированных тирозиновых остатков рецепторов факторов роста или рецепторов, ассоциированных с G-белками с SH2 доменом регуляторного белка p85 PI3 киназы. Это приводит к аллостерической активации каталитической субъединицы p110 PI3K и генерации фосфатидилинозитола-3,4,5-трифосфата (PI3,4,5-P3) из фосфатидилинозитол-4,4-бисфосфата (PI-4,5-P2). Образующиеся трифосфаты рекрутируют к плазматической мембране множество сигнальных белков, содержащих плекстрин-гомологичный домен (PH), таких как серин/треонин киназа (3'- фосфоинозитид-зависимая киназа 1, PDK1) и Akt1 [280]. В цитоплазматической мембране Akt1 фосфорилируется PDK1 в положении Thr-308 и mTORC2 комплексом (mammalian target of rapamycin complex 2) или DNA-ПК (DNA-dependent protein kinase) в положении Ser-473 [276]. Активация Akt1 способствует её перемещению в цитоплазму и клеточное ядро для последующего фосфорилирования белков-мишеней, обеспечивающих многочисленные клеточные процессы (Рисунок 3).

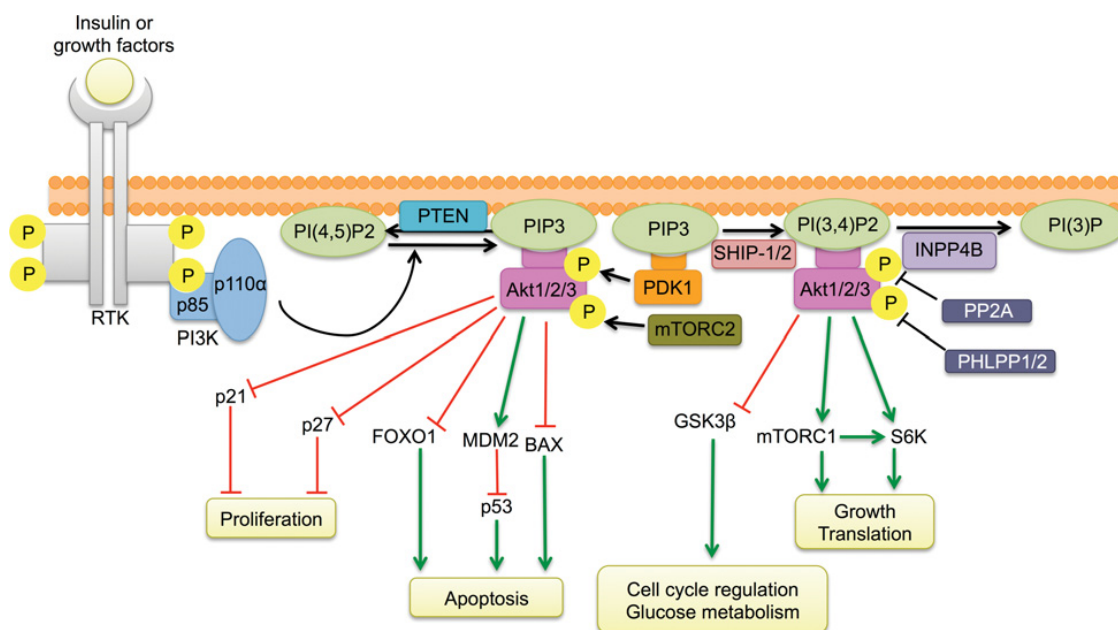


Рисунок 3 – Схематическое представление PI3K/Akt/mTOR сигнального каскада [74]

Например, процессы клеточного деления и регуляции их жизнедеятельности могут быть опосредованы Akt1-фосфорилированием таких внутриклеточных белков, как киназа-3 $\alpha$  гликогенсинтаза (GSK3 $\alpha$ ), GSK3 $\beta$ , транскрипционный фактор FoxO (forkhead box O), белки MDM2 (murine double minute 2) и Bcl2 (B-cell lymphoma 2) [124, 330].

Семейство протеинкиназ В представлено тремя изоформами Akt1, Akt2, Akt3, которые кодируются соответствующими генами *Akt1*, *Akt2*, *Akt3*. Все три белка функционально и структурно тесно связаны, имеют длину около 479-481 пар оснований, на 77-82% гомологичны друг другу при попарных сравнениях и состоят из четырех доменов - N-концевого плекстрин-гомологичного, линкерного участка, киназного домена и C-концевого регуляторного региона [225]. Каждый из белков может быть активирован посредством общих сигнальных каскадов факторов роста и гормональных рецепторов через PI3 киназу, причем каждая из изоформ контролирует несколько нижележащих внутриклеточных сигнальных путей, включающих фосфорилирование FoxO, протеинкиназы mTORC1, GSK3 $\alpha$  и GSK3 $\beta$  [48].

Экспериментальные исследования, проведенные на клеточных линиях рака молочной железы, продемонстрировали стимуляцию клеточной пролиферации и

рост опухоли при гиперэкспрессии конститутивно активной Akt1, однако при этом наблюдалось снижение процессов клеточной подвижности и инвазии [229, 401]. Напротив, потеря экспрессии Akt1 в клетках РМЖ приводила к усилению процессов клеточной миграции, обусловленной экспрессией Akt2 [107]. Анализ данных проекта TCGA показал, что изоформа Akt3 преимущественно амплифицируется и экспрессируется в опухолях с тройным негативным фенотипом. Подобно Akt1, «выключение» Akt3 может усиливать миграцию MCF10DCIS, MDA-MB468 и BT-549 клеточных линий рака молочной железы [345]. Таким образом, каждая из изоформ Akt характеризуется как различными, так и перекрывающимися функциональными возможностями, которые могут варьироваться в зависимости от молекулярного подтипа опухоли.

Основной мишенью PI3K/Akt сигнального пути является белок mTOR (mammalian target of rapamycin), идентифицированный еще в начале 1990-х годов при изучении механизма действия противогрибкового препарата рапамицина, который в настоящее время используется в качестве иммунодепрессанта и противоопухолевого агента. mTOR представляет собой протеинкиназу серин-треониновой специфичности с молекулярной массой 289 кДа, активность которой в нетрансформированных клетках контролируется положительными и отрицательными вышележащими компонентами сигналинговой сети [174]. В качестве положительных регуляторов выступают аминокислоты, факторы роста и их рецепторы IGF-I, IGF1R, VEGF, VEGFR2, члены семейства эпидермального фактора роста и ассоциированные с ними лиганды, которые передают сигнал mTOR посредством протеинкиназ PI3K/Akt. Отрицательным регулятором активности mTOR является фосфатаза PTEN (phosphatase and tensin homolog), которая ингибирует пролиферативные стимулы через PI3K/Akt путь и комплекс белков гамартина/туберина TSC1/TSC2. Фосфорилирование TSC2 с помощью Akt снижает его ингибирующее действие на mTOR и повышает активность последнего. Другой ингибитор mTOR, белок LKB1 (liver kinase B1), осуществляет энергозависимую регуляцию TSC [359].

mTOR представлен в клетке в виде каталитической субъединицы двух внутриклеточных мультимолекулярных комплексов mTORC1 и mTORC2. mTORC1 является каноническим рапамицин-чувствительным комплексом, в состав которого помимо mTOR входят белки Raptor (regulatory-associated protein of TOR), mLST8 (mammalian lethal with Sec13 protein 8), PRAS40 (proline-rich PKB/AKT substrate 40kDa), Deptor (domain containing mTOR interacting protein), Tti1 (KIAA0406) и Tel2 (telomere maintenance 2). Белок Raptor отвечает за сборку mTORC1 и определяет внутриклеточную локализацию комплекса. Белки PRAS40 и Deptor ингибируют активность mTORC1: активация комплекса сопровождается их фосфорилированием mTOR и последующей диссоциацией [99]. Роль белка mLST8 не выяснена, тогда как белки Tti1/Tel2 необходимы для стабилизации mTORC1 [381]. Основная функция mTORC1 — регуляция процессов синтеза белка, транскрипции, клеточного деления, апоптоза и метаболизма. Активация PI3K/Akt сигнального пути различными триггерами сопровождается двумя значимыми эффектами — инактивацией димеризации белков TSC1/TSC2 и фосфорилированием Akt [217]. Эти внутриклеточные процессы ведут к активации mTORC1 и последующему фосфорилированию двух эффекторных белков трансляционного репрессора 4E-BP1 (eIF-4E binding protein 1) и рибосомального белка S6K1 (p70 ribosomal protein S6 kinase — S6K). В результате фосфорилирования киназа S6 активирует процессы трансляции белка посредством фосфорилирования белков SKAR, PDCD4, eEF-2L, eIF4B и рибосомального белка S6 [223]. Фосфорилирование белка 4E-BP1 приводит к его инактивации, освобождению фактора eIF-4E и образованию функционально активного комплекса инициации трансляции, что в конечном итоге ведет к стимуляции синтеза белка [331]. В отличие от mTORC1, mTORC2 менее чувствителен к рапамицину, его активность стимулируется только факторами роста. Функциональная значимость mTORC2 заключается в регуляции организации актинового цитоскелета клетки и регуляции активности Akt [217]. В состав комплекса mTORC2 помимо белков mTOR, mLST8, Deptor, Tti1 и Tel2 входят белки GβL (G protein beta subunit-like), Rictor (rapamycin-insensitive

companion of TOR), mSin1 (mammalian stress-activated protein kinase (SAPK)-interacting protein 1) и Protor (protein observed with rictor). Белок Rictor конкурирует с белком Raptor за связывание с киназой mTOR, белок mSin1 стабилизирует комплекс, а наличие mLST8 необходимо для поддержания киназной активности mTORC2. Фосфорилирование белка Rictor по сайту фосфорилирования Thr1135 эффекторной киназой S6K1 комплекса mTORC1 ингибирует mTORC2 [239]. Таким образом, первый комплекс киназы mTOR может регулировать активность второго комплекса. Видимо, биологический смысл существования двух мультимолекулярных комплексов mTORC1 и mTORC2 состоит в координации функционально противоположных ответов на сигналы факторов роста.

Фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат-3-фосфатаза PTEN выступает в качестве негативного регуляторного звена PI3K/Akt/mTOR сигнального пути. Обладая двойной субстратной специфичностью, PTEN может дефосфорилировать белки, однако его первичными мишенями остаются высокоспециализированные мембранные липиды. PTEN состоит из 403 аминокислотных остатков и содержит каталитический сигнальный мотив HCXXGXXR (где X представляет собой любую аминокислоту), который также присутствует в активных сайтах других белковых тирозинфосфатаз [161]. Структурная организация белка включает короткий N-концевой домен связывания фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата, фосфатазный домен, домен C2, C-концевой домен и участок, связывающий PDZ-домен. Фосфатазный домен содержит активный сайт связывания, который и осуществляет ферментативную функцию, дефосфорилируя избыточный фосфоинозитол-3фосфат в дифосфат ( $PIP_3 \rightarrow PIP_2$ ), ингибируя фосфорилирование Akt и останавливая передачу сигнала [288, 324]. N-концевой домен PTEN имеет гомологичное сходство по аминокислотной последовательности с актинсвязывающимся белком тензином, откуда фосфатаза и получила свое название. C2 домен отвечает за связывание фосфолипидов и расположение молекулы на мембране, C-концевой домен – за регуляцию стабильности белка [204]. Практически для каждого домена PTEN характерны мутации, что свидетельствует о значимости

генетических aberrаций для антионкогенной функции белка. Известно, что снижение экспрессии или потеря клетками PTEN приводит к формированию опухолей, однако, на сегодняшний день неясно, достаточно ли биохимической инактивации только белка PTEN для запуска PI3K [123].

#### 1.4.2 Особенности функционирования PI3K/Akt/mTOR-сигнального каскада при эстроген-зависимом раке молочной железы

PI3K/Akt/mTOR является ключевой сигнальной системой, гиперактивация которой при эстроген-зависимом РМЖ связана с резистентностью к эндокринной терапии [232, 233, 262]. Существуют значительные перекрестные связи между внутриклеточными путями ER $\alpha$  и PI3K/Akt/mTOR как с прямым, так и косвенным взаимодействием на разных уровнях каждого из них (Рисунок 4).

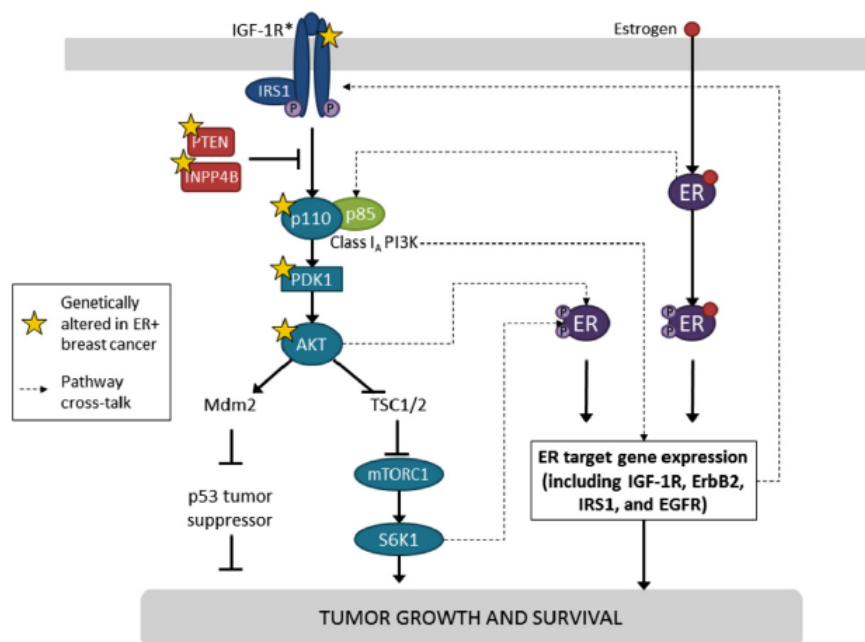


Рисунок 4 – Перекрестные связи между внутриклеточными путями ER $\alpha$  и PI3K/Akt/mTOR [72]

Показано, что PI3K/Akt/mTOR активирует эстроген-независимую транскрипционную активность эстрогенового рецептора [232], тем самым, способствуя клеточной пролиферации в отсутствие эстрогенов (например, при

терапии ингибиторами ароматазы) [211]. Механизм такой активации включает прямое фосфорилирование эстрогенового рецептора по сайту фосфорилирования Ser167 либо Akt, либо S6-киназой [274, 321]. Кроме того, Ras/PI3K/Akt сигнальный путь посредством фосфорилирования c-Jun активирует транскрипционный фактор AP-1, который вовлекается в процессы регуляции транскрипции ER $\alpha$  [232]. С другой стороны, ER $\alpha$  активирует транскрипцию генов, кодирующих вышестоящие эффекторы PI3K/Akt/mTOR, включая лиганды рецепторов факторов роста, рецепторные тирозинкиназы и адаптерные молекулы [232]. Существуют доказательства активации PI3K/Akt/mTOR посредством внеядерных ER $\alpha$ -зависимых механизмов. Так, прямое взаимодействие эстроген-связанной формы ER $\alpha$  с регуляторной субъединицей p85 PI3K приводит к стимуляции PI3K/Akt/mTOR сигнального пути [200]. Показано, что использование летрозола у ER-позитивных больных РМЖ в возрастной группе 65-70 лет значительно снижает уровень экспрессии PI3K и активных форм белков mTOR и S6 – pmTOR и pS6 – в опухолевой ткани [110, 271]. Таким образом, блокада эстрогенов у пациенток РМЖ зрелого возраста может являться эффективным механизмом в снижении активности PI3K/Akt/mTOR.

Клинико-экспериментальные исследования свидетельствуют, о том, что уровень экспрессии ER $\alpha$  в опухолевой ткани эстроген-зависимого РМЖ обратно пропорционален степени активации PI3K как на протеомном, так и транскриптомном уровне; тогда как низкий уровень экспрессии ER $\alpha$  и высокая активность PI3K коррелирует с резистентностью к эндокринной терапии [305]. Соответственно, потеря опухолевыми клетками экспрессии PTEN связана с низкими уровнями экспрессии ER $\alpha$  и неблагоприятным исходом [111]. Кроме того, было доказано, что конститутивная гиперэкспрессия Akt в клетках рака молочной железы линии MCF7 определяет резистентность к тамоксифену и фулвестранту [151]. Инактивация PI3K/Akt/mTOR сигнального каскада с использованием клеточных линий рака молочной железы приводит к повышению как экспрессии *ESR1*, так и его индуцибельных генов-мишеней, что повышает чувствительность опухолевых клеток к тамоксифену [305]. Видимо инактивация

данного сигнального пути за счет регуляторных механизмов экспрессии ER $\alpha$  может обеспечить восстановление гормонозависимости опухолевых клеток и их чувствительности к эндокринной терапии. Клинические исследования подтверждают взаимосвязь между активностью PI3K/Akt/mTOR и резистентностью к эндокринной терапии. Так, активация Akt и снижение экспрессии PTEN связаны с неэффективностью эндокринной терапии у больных метастатическим раком молочной железы или рецидивом заболевания у пациентов, получавших тамоксифен [26, 309, 350].

Генетические и эпигенетические нарушения в компонентах PI3K/Akt/mTOR пути, включая активирующие мутации генов *PIK3CA* и *Akt1*, а также мутации *PTEN*, приводят к активации сигнального каскада и вносят немаловажный вклад в механизмы эндокринной резистентности. Для эстроген-позитивных опухолей мутации гена *PIK3CA*, кодирующего каталитическую субъединицу p110 $\alpha$  PI3K, представляют наиболее распространенные генетические события, встречающиеся с частотой 30-50%. Большинство мутаций *PIK3CA* являются миссенс-мутациями, включая «hotspot» мутации E542K, E545K и H1047R, которые локализуются в хеликазном (экзон 9) и киназном доменах (экзон 20) и определяют высокую каталитическую активность PI3 киназы, приводящую к лиганд-независимой активации PI3K/Akt/mTOR пути [207, 283]. Реже регистрируются мутации *PTEN* (2-4%), *Akt1* (2-3%) и *PIK3R1* (1-2%) [52, 223]. На сегодняшний день нет однозначного мнения относительно прогностической роли мутаций *PIK3CA/Akt1* для ER $\alpha$ -позитивного РМЖ. Рядом исследований продемонстрирована взаимосвязь данных маркеров с благоприятным исходом заболевания, другие указывают на ассоциацию с неблагоприятным прогнозом; присутствуют исследования, не выявившие значительных корреляций между генетическими нарушениями *PIK3CA/Akt1* и прогнозом у больных с эстроген-позитивными опухолями [80, 243, 281, 282, 299, 339]. Рандомизированное клиническое исследование TEAM III фазы (Tamoxifen Exemestane Adjuvant Multinational) показало, что около 40% больных люминальным РМЖ имеют мутации гена *PIK3CA*. Хотя данные мутации были ассоциированы с благоприятными клинико-

морфологическими факторами (низкая степень злокачественности, небольшое количество вовлеченных лимфатических узлов, экспрессия рецепторов прогестерона) и высокими показателями пятилетней безрецидивной выживаемости пациентов, они не являлись независимыми предикторами исхода заболевания [243]. Результаты мета-анализа подтвердили взаимосвязь мутаций *PIK3CA* с позитивным статусом ER $\alpha$ , зрелым возрастом больных, низкой степенью злокачественности и ранними стадиями заболевания; однако наличие мутантных генотипов *PIK3CA* было значимо ассоциировано с высокими показателями безрецидивной выживаемости только в однофакторном регрессионном анализе [383]. Наличие активирующих мутаций в киназном домене гена *PIK3CA* являлось прогностическим благоприятным маркером безрецидивной выживаемости у ER $\alpha$ -позитивных больных, получавших летрозол или тамоксифен в неoadьювантном режиме, но не было ассоциировано с эффективностью этих гормональных препаратов [275]. По-видимому, исход заболевания в большей степени обусловлен внутренними биологическими особенностями ER $\alpha$ -позитивных опухолей, чем активирующими мутациями *PIK3CA*. Результаты изучения корреляционной зависимости мутаций *PIK3CA* с уровнем фосфорилированного Akt1 (Ser473 или Thr308), наиболее часто используемого маркера активации PI3K/Akt/mTOR, остаются противоречивыми, и включают как данные, подтверждающие положительную взаимосвязь данных маркеров [285], так и ее отсутствие [20, 297]. Следует отметить, что уровень экспрессии фосфорилированных форм Akt1, mTOR и p70S6K был значительно выше в опухолях с низкой экспрессией PTEN, по сравнению с высокоэкспрессирующими PTEN опухолями [33].

Таким образом, имеющиеся на сегодняшний день данные о фундаментальной роли PI3K/Akt/mTOR сигнального пути в механизмах эндокринной резистентности фактически обосновали подходы к преодолению ее развития с использованием сочетанного воздействия на опухоль гормональной терапии и PI3K/Akt/mTOR ингибиторов. В настоящее время, перечень PI3K/Akt/mTOR ингибиторов, которые исследуются в клинических испытаниях,

весьма существенен. Они направлены, прежде всего, на центральные эффекторы каскада, все имеющиеся изоформы PI3 киназы (пан-PI3K ингибиторы - ВКМ120 бупарлизиб, GDC-0941 пиктилизиб),  $\alpha$ -изоформы PI3 киназы ( $\alpha$ -специфичные ингибиторы PI3K - BYL719 альпелизиб, GDC-0032 тазелизиб), все изоформы Akt (пан-Akt ингибиторы МК2206, AZD5363), mTOR (CCI-779 темсиролимус, RAD001 эверолимус, AP23573 дефоролимус) и две мишени одновременно PI3K/mTOR (двойной ингибитор PI3K/mTOR GDC-0980). Первый успех от сочетанного применения эндокринной терапии с PI3K/Akt/mTOR ингибиторами был продемонстрирован в клинических испытаниях эверолимуса для лечения распространенного ER-позитивного РМЖ, резистентного к ингибиторам ароматазы. Согласно данным BOLERO-2, применение экземестана в сочетании с эверолимусом дало увеличение продолжительности жизни без прогрессирования, но не общей выживаемости у ER+/HER2- пациенток распространенным РМЖ, резистентным к летрозолу [149]. В рандомизированном исследовании II фазы TAMRAD использование тамоксифена в комбинации с эверолимусом было связано с высокими показателями общей выживаемости и безрецидивной выживаемости у больных ER-позитивным РМЖ в постменопаузе [308]. Кроме того, есть данные о клинической эффективности эверолимуса в комбинации с фулвестрантом у больных метастатическим ER-позитивным РМЖ, нечувствительным к ингибиторам ароматазы [15]. Многообещающую активность в первой фазе клинических испытаний продемонстрировал бупарлизиб (пан-PI3K ингибитор) в комбинации с летрозолом у больных с метастатическим ER-позитивным РМЖ, резистентным к эндокринной терапии [335]. Результаты рандомизированного клинического исследования пиктилизиба у больных ER+/HER2 РМЖ выявили его высокую эффективность в сочетании с анастрозолом [293]. Продолжающиеся клинические испытания прямых ингибиторов PI3K или Akt, а также двойных ингибиторов PI3K/mTOR, свидетельствуют об их потенциальной эффективности в механизмах инактивации PI3K/Akt/mTOR у группы больных с эстроген-зависимым РМЖ.

### 1.4.3 Активация PI3K/Akt/mTOR-сигнального каскада при эстроген-независимом раке молочной железы

В настоящее время доказано, что молекулярно-генетические изменения компонентов PI3K/Akt/mTOR, определяющие его функциональный статус, различны в пределах подтипов рака молочной железы, и более того, являются уникальными характеристиками каждого из них [52, 304]. Механизм активации PI3K/Akt/mTOR сигнального пути в эстроген-негативных опухолях во многом обусловлен высокой частотой генетических aberrаций фосфатаз PTEN и INPP4B [119]. Установлено, что базально-подобные опухоли характеризуются преимущественно генетическими изменениями *PTEN* (29%), включающими гомозиготные делеции и нарушения мРНК. Частота мутаций гена *PIK3CA* при таком фенотипе опухоли составляет 25% и является самой низкой среди всех молекулярных подтипов (для люминального А рака частота мутаций *PIK3CA* составляет 49%, для люминального В - 37%, HER2-позитивного- 47%) [100]. Всесторонний анализ статуса гена *PTEN* в образцах опухолей молочных желез показал, что потеря экспрессии *PTEN* ассоциирована с эстроген-негативным фенотипом опухоли [88]. Помимо PTEN, активация PI3K/Akt/mTOR в эстроген-независимых опухолях обеспечивается инозитолполифосфат 4-фосфатазой II (INPP4B), которая вовлечена в механизмы его регуляции. Супрессорная роль этого белка связана с дефосфорилированием PIP2 и истощением субстрата PI3K, соответственно, потеря экспрессии INPP4B ведет к усиленной PIP3-опосредованной передаче сигналов Akt и неблагоприятному исходу заболевания [192]. Показано, что потеря экспрессии белка INPP4B в первичных опухолях молочной железы, чаще ассоциирована с их высокой степенью злокачественности, большим размером опухолевого узла, отсутствием гормональных рецепторов и агрессивным базально-подобным фенотипом. Интересно отметить, что потеря экспрессии INPP4B часто наблюдается в опухолях с отсутствием экспрессии PTEN [191]. Кроме вышеуказанных фосфатаз, уровень экспрессии pAkt и уровень экспрессии общего пула Akt связаны с неблагоприятным исходом у ER-негативных больных, получавших антрациклин-

содержащие схемы химиотерапии [279, 301]. Согласно другим данным, уровень экспрессии pAkt, p70S6K и p90RSK не являлся значимым предиктором резистентности/чувствительности к терапии таксанами [277]. Несмотря на то, что в большинстве опухолей молочной железы мутации компонентов PI3K/Akt/mTOR приводят к конститутивной активации каскада, часть злокачественных новообразований имеют аномальную активность PI3K/Akt/mTOR в отсутствие каких-либо генетических aberrаций его компонентов [150].

Среди потенциальных механизмов, опосредующих такую активность, описан механизм CD44-зависимой активации Akt [213, 214]. CD44 как интегральный гликопротеин, вовлечен в процессы межклеточных взаимодействий, адгезии и миграции. Кроме того, клетки с фенотипом CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/low</sup> являются общепринятой популяцией с высоким опухолевым потенциалом и ассоциированы с инвазивностью и высоким метастатическим потенциалом опухоли [66, 295]. Альтернативный сплайсинг гена *CD44* приводит к образованию двух белковых изоформ CD44v и CD44s, различающихся наличием или отсутствием переменных экзонов и вовлеченностью в разные сигнальные системы. CD44v опосредует MAPK-каскад, тогда как CD44s определяет активность PI3K/Akt [59, 68]. В экспериментальных исследованиях продемонстрирована возможность переключения изоформ CD44v на CD44s, что способствует эпителиально-мезенхимальному переходу, одному из важнейших механизмов, определяющих развитие резистентности к различным видам терапевтических воздействий [60, 69, 130]. Недавние исследования показали, что изоформы CD44s стимулируют экспрессию гиалуронат синтазы HAS2 посредством активации Akt. HAS2 в свою очередь способна стимулировать CD44s-зависимый Akt сигналинг, формируя позитивный регуляторный цикл, поддерживающий активацию процессов эпителиально-мезенхимального перехода и пролиферации клеток. Выявлено, что уровень экспрессии как изоформы CD44s, так и гиалуронат синтазы значимо коррелирует с тройным негативным фенотипом опухоли, что свидетельствует об их потенциальном вкладе в механизмы развития клинически агрессивных форм рака молочной железы [213].

Предполагается, что комбинаторный терапевтический подход с использованием ингибиторов Akt и CD44, а также антагонистов HAS2 может открыть новые перспективы для лечения эстроген-независимых опухолей молочной железы.

Кроме того, базируясь на молекулярно-генетических исследованиях, внутренних биологических особенностях эстроген-негативного РМЖ, включающих статус *BRCA1/2* и *EGFR*, в настоящее время активно разрабатывается интегрированный подход для терапии, нацеленной на PI3K/Akt/mTOR и EGFR сигнальные пути [198]. Проведенные экспериментальные исследования *in vitro* и *in vivo* доказали чувствительность опухолей с тройным негативным фенотипом к ингибиторам PI3K/Akt/mTOR [183]. Показано, что ингибиторы mTOR и Akt индуцируют торможение роста ксенотрансплантатных моделей эстроген-независимых опухолей молочной железы [86]. Клинические испытания I фазы пан-PI3K ингибитора бупарлизиба (BKM120) у больных тройным негативным раком молочной железы показали его низкую токсичность, хорошую переносимость и потенциальную терапевтическую эффективность [270]. Добавление пан-Akt ингибитора МК2206 к паклитакселу в неoadьювантном режиме позволило добиться полных морфологических ответов опухоли в два раза больше, чем при использовании только схемы с паклитакселом у больных эстроген-независимым раком молочной железы [24]. Продолжаются рандомизированные исследования ингибиторов mTOR с целью выявления групп пациентов с тройным негативным РМЖ, которые получают наибольшее преимущество от добавления этих препаратов в стандартные схемы химиотерапевтического лечения.

### 1.5 Заключение по обзору литературы

Таким образом, значительные достижения в области изучения механизмов терапевтической чувствительности и резистентности эстроген-зависимых и эстроген-независимых опухолей молочной железы позволили определить множество молекулярных точек приложения для поиска маркеров эффективности

их лечения и прогноза заболевания. Особая роль в литературных источниках отводится изучению PI3K/Akt/mTOR как центральной сигнальной системы, которая специфически активирована при разных молекулярных вариантах РМЖ и способна коммуницировать с многочисленными внутриклеточными факторами. Однако интегративный подход к анализу PI3K/Akt/mTOR-ассоциированных компонентов при эстроген-зависимом и эстроген-независимом РМЖ в настоящее время отсутствует, что определяет актуальность и перспективность их исследования в качестве потенциальных маркеров эффективности терапии и исхода заболевания.

## ГЛАВА 2

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

## 2.1 Характеристика групп исследования

В исследование включено 625 больных операбельным раком молочной железы, получавших лечение на базе отделения общей онкологии НИИ онкологии Томского НИМЦ с 1999 по 2014 гг. Все пациентки были разделены на две группы - эстроген-зависимую (люминальный РМЖ, включающей люминальный А и В подтипы), и эстроген-независимую, представленную тройным негативным вариантом РМЖ.

Для классификации опухолей молочной железы, согласно молекулярно-генетическим подтипам, использована классическая панель иммуногистохимических маркеров ER $\alpha$ , PR, HER2, Ki67, CK5/6, EGFR. Опухоли, положительные по экспрессии к ER $\alpha$ /PR, без гиперэкспрессии белка HER2, с низким индексом пролиферативной активности Ki67(<20%) относили к опухолям люминального А подтипа. Люминальный В вариант был представлен опухолями, положительными по экспрессии к ER $\alpha$ /PR, без гиперэкспрессии HER2, с высоким индексом Ki67( $\geq$ 20%), а также опухолями, позитивными как по экспрессии рецепторов к стероидным гормонам, так и HER2. Опухоли, характеризующиеся отсутствием экспрессии рецепторов эстрогенов, прогестерона и HER2, определяли, как тройные негативные.

Эстроген-зависимую группу составили 524 пациентки с люминальным РМЖ, из которых у 300 больных диагностирован люминальный А РМЖ, 157 пациенток имели люминальный В РМЖ, у 67 больных молекулярный подтип опухоли не был определен из-за отсутствия оценки уровня пролиферативной активности Ki67. Критериями включения пациенток в исследование явились стадия и распространенность процесса T<sub>1-4</sub>N<sub>0-3</sub>M<sub>0</sub>, морфологически верифицированный диагноз, отсутствие неoadъювантного лечения, а также проведение адъювантной антиэстрогенной терапии тамоксифеном в стандартной

дозировке 20 мг/сут в течение 5 лет. Критериями исключения - выраженная сопутствующая патология, отказ от оперативного лечения. Средний возраст больных составил  $52,7 \pm 9,8$  лет. 214 (40,8%) пациенток были моложе 50 лет; 310 (59,2%) находились в возрастной категории 51-76 лет. Сохраненный менструальный цикл регистрировался у 235 (44,8%) пациенток, 289 больных (55,2%) были в состоянии менопаузы. У больных данной группы размер опухолевого узла не превышал 50мм, чаще выявлялся локализованный опухолевый процесс и в большем проценте случаев опухоли имели люминальный А молекулярный вариант. Следует отметить значительное преобладание протоковых карцином по сравнению с дольковыми и другими гистологическими типами РМЖ (Таблица 1).

Таблица 1 – Клинико-морфологические особенности больных эстроген-зависимым РМЖ

Параметры	Эстроген-зависимый РМЖ, n=524 абс. ч. (%)
Возраст	
≤50	214 (40,8)
>50	310 (59,2)
Состояние менструальной функции	
<i>сохранена</i>	235 (44,8)
<i>менопауза</i>	289 (55,2)
Размер первичного опухолевого узла	
<i>менее 50 мм</i>	486 (92,7)
<i>50 мм и более</i>	38 (7,3)
Состояние лимфатических узлов	
<i>N<sub>0</sub></i>	331 (63,2)
<i>N<sub>1-3</sub></i>	193 (36,8)
Гистологический тип	
<i>протоковый</i>	440 (84,0)
<i>дольковый</i>	42 (8,0)
<i>другие</i>	42 (8,0)
Молекулярно-генетический тип	
<i>люминальный А</i>	300 (57,3)
<i>люминальный В</i>	157 (30,0)
<i>не определено</i>	67 (12,7)
Адьювантная химиотерапия	
<i>да</i>	183 (34,9)
<i>нет</i>	341 (65,1)

Все больные получали комбинированное лечение в объеме радикального хирургического лечения (радикальная мастэктомия или органосохраняющая операция), лучевой и химиотерапии – по показаниям. В адъювантном режиме все пациентки получали тамоксифен в стандартной дозировке 20 мг/сут в течение 5 лет. Отдаленные результаты антиэстрогенной терапии оценивались по наличию прогрессирования заболевания в виде гематогенных метастазов или рецидива заболевания. Согласно результатам лечения, 129 (74,1%) больных не имели признаков прогрессирования заболевания (тамоксифен-чувствительная группа (ТАМ-Ч)), у 45 (25,9%) пациенток зарегистрировано гематогенное метастазирование или рецидив РМЖ (тамоксифен-резистентная группа (ТАМ-Р)). Все случаи прогрессирования наблюдались на фоне адъювантной терапии тамоксифеном. Среднее время до прогрессирования –  $28,6 \pm 17,8$  мес.

У всех пациенток до начала хирургического лечения был осуществлен забор образцов периферической крови для генотипирования ключевых генов, вовлеченных в процессы пролиферации и апоптоза опухоли с целью оценки их взаимосвязи с особенностями клинического течения люминального А и В РМЖ. В образцах опухолевой ткани, полученных после выполнения оперативного вмешательства, был проведен последовательный анализ распределения частот генотипов и аллелей генов основных эффекторов PI3K/Akt/mTOR каскада, изучен профиль экспрессии мРНК генов рецепторов ростовых факторов *EGFR*, *TGF- $\beta$ 1*, *VEGFR2*, *IGF1R* и их белковых продуктов, а также уровень экспрессии внутриклеточных регуляторов Akt(pS473), PTEN и содержание клеток с фенотипом стволовых  $CD44^+/CD24^{low}$ , с целью идентификации наиболее информативных маркеров, связанных с эффективностью адъювантной терапии тамоксифеном и создания математических моделей, позволяющих ее прогнозировать при различных молекулярных подтипах люминального РМЖ.

Дизайн исследования эстроген-зависимой группы больных представлен на Рисунке 5.

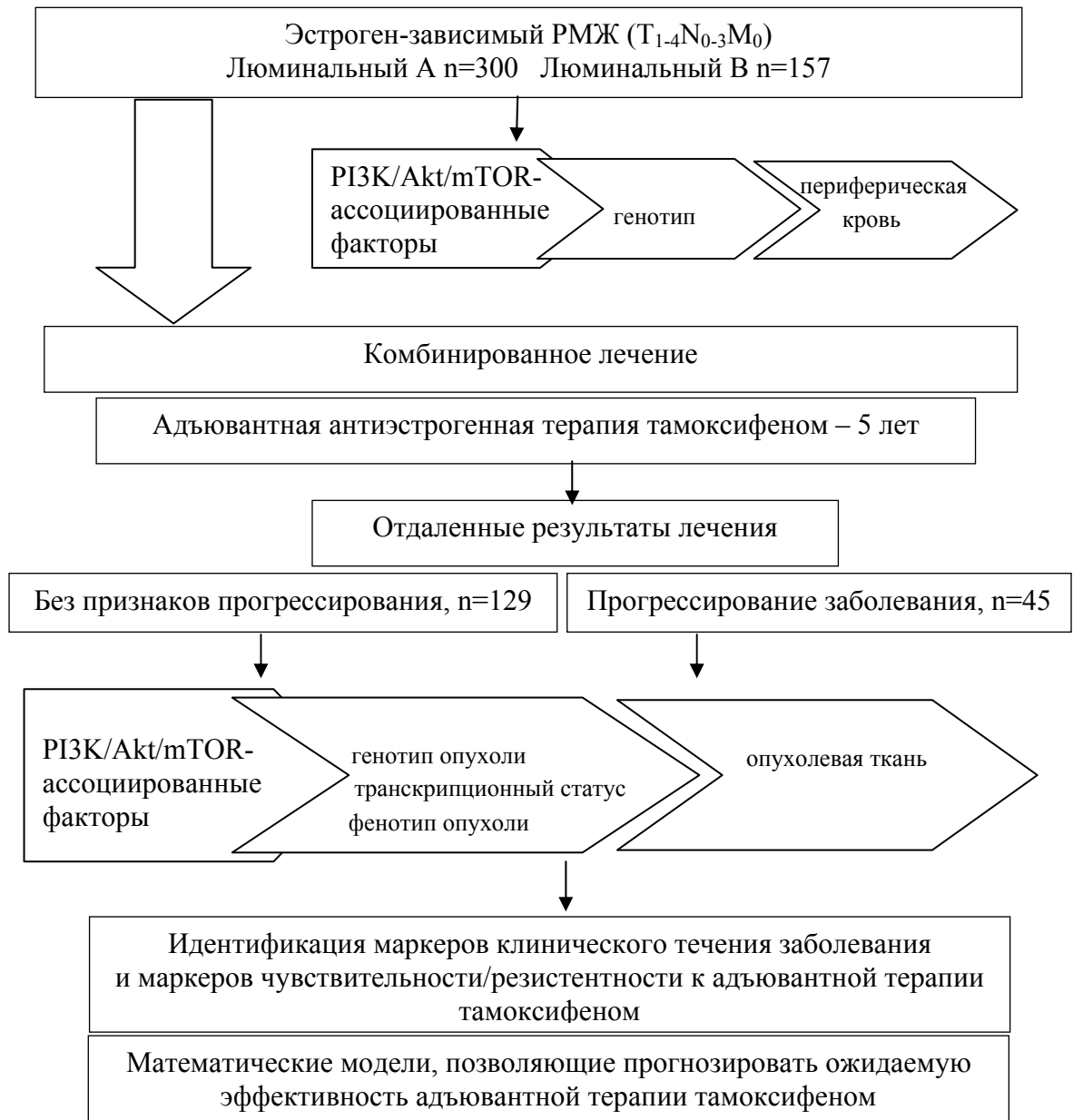


Рисунок 5 – Дизайн исследования эстроген-зависимой группы больных РМЖ

Во вторую группу исследования была включена 101 пациентка с эстроген-независимым (тройным негативным) РМЖ. Критериями включения пациенток в данную группу явились стадия и распространенность процесса  $T_{1-4}N_{0-3}M_0$ , морфологически верифицированный диагноз, проведение неадъювантной химиотерапии (НАХТ). Критерия исключения были аналогичны критериям для эстроген-зависимой группы исследования.

Клинико-морфологические особенности эстроген-независимой группы больных представлены в Таблице 2.

Таблица 2 – Клинико-морфологические особенности больных эстроген-независимым РМЖ

Параметры	Эстроген-независимый РМЖ, n=101 абс. ч. (%)
Возраст	
≤50	49 (48,5)
>50	52 (51,5)
Состояние менструальной функции	
<i>сохранена</i>	53 (52,3)
<i>менопауза</i>	48 (47,5)
Размер первичного опухолевого узла	
<i>менее 50 мм</i>	89 (88,1)
<i>50 мм и более</i>	12 (11,9)
Состояние лимфатических узлов	
<i>N<sub>0</sub></i>	65 (64,4)
<i>N<sub>1-3</sub></i>	36 (35,6)
Кi67 экспрессия	
≤20	31 (30,7)
>20	67 (66,3)
<i>не определено</i>	3 (3,0)
Гистологический тип	
<i>инвазивная карцинома</i>	72 (71,2)
<i>медулярный рак</i>	10 (9,9)
<i>другие</i>	19 (18,9)
Схема НАХТ	
<i>FAC</i>	36 (35,6)
<i>CAH</i>	65 (65,3)
RECIST	
<i>полная регрессия/частичная регрессия</i>	71 (70,3)
<i>стабилизация/прогрессирование</i>	30 (29,7)
Патоморфологический ответ (pCR)	
<i>полная регрессия</i>	35 (34,7)
<i>частичная регрессия и стабилизация</i>	66 (65,3)

Возраст больных варьировал от 30 до 71 лет, в среднем –  $51,5 \pm 9,9$  года. 48 (47,5%) пациенток, включенных в данную группу, находились в состоянии менопаузы, у 53 (52,3%) – менструальный цикл был сохранен. Преобладали опухоли с размером менее 50 мм (88,1%), а также опухоли с высокой пролиферативной активностью Ki67 (67,0%). У 65 (64,4%) пациенток отсутствовало метастатическое поражение аксиллярных лимфатических узлов, у 36 (35,6%) больных наблюдалось вовлечение лимфатических узлов в метастатический процесс. В 71,4% случаев у пациенток была выявлена

инвазивная карцинома неспецифического типа, в 9,9% встречался медуллярный рак; опухоли других гистологических типов составляли 18,9%.

Все больные ТНРМЖ получали в неoadъювантном режиме 2-4 курса полихимиотерапии по схеме FAC (5-фторурацил  $500 \text{ мг/м}^2$  в 1-ый день, адриамицин  $50 \text{ мг/м}^2$  в 1-ый день, циклофосфамид  $500 \text{ мг/м}^2$  в 1-ый день, внутривенно; интервал между курсами 21 день), или САХ (циклофосфан  $100 \text{ мг/м}^2$  внутримышечно в течение 14 дней, адриамицин  $30 \text{ мг/м}^2$  внутривенно в 1-й и 8-й дни, кселода  $1000 \text{ мг/м}^2$  2 раза в день, per os, в течение 14 дней; интервал между курсами 21 день) с последующим проведением хирургического лечения (в объеме радикальной мастэктомии или органосохраняющей операции). По показаниям в адъювантном режиме были проведены курсы полихимиотерапии (общим количеством до 6 курсов FAC) и лучевой терапии.

Оценка эффективности НАХТ осуществлялась по шкале RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, 2000) по результатам клинического осмотра, УЗИ молочных желез и маммографии. Непосредственная эффективность лечения оценивалась по сумме полных и частичных регрессий опухоли молочной железы, наличие стабилизации и прогрессирования заболевания рассматривалось как отсутствие эффективности лечения. Выраженность лекарственного патоморфоза в ткани молочной железы и регионарных лимфатических узлах оценивалась по классификации, предложенной Лушниковым Е.Ф. от 1977 года [1]. Диагноз «полная морфологическая регрессия» устанавливался при отсутствии опухолевых элементов, как в ткани молочной железы, так и в исследуемых лимфатических узлах. Сроки наблюдения за больными составили от 12 до 80 месяцев.

Дизайн исследования эстроген-независимой группы больных представлен на Рисунке 6. Материалом для исследования в данной группе исследования являлись образцы периферической крови и образцы опухолевой ткани, взятые до начала лечения (биопсийные), а также образцы опухоли после выполнения оперативного лечения (операционные).

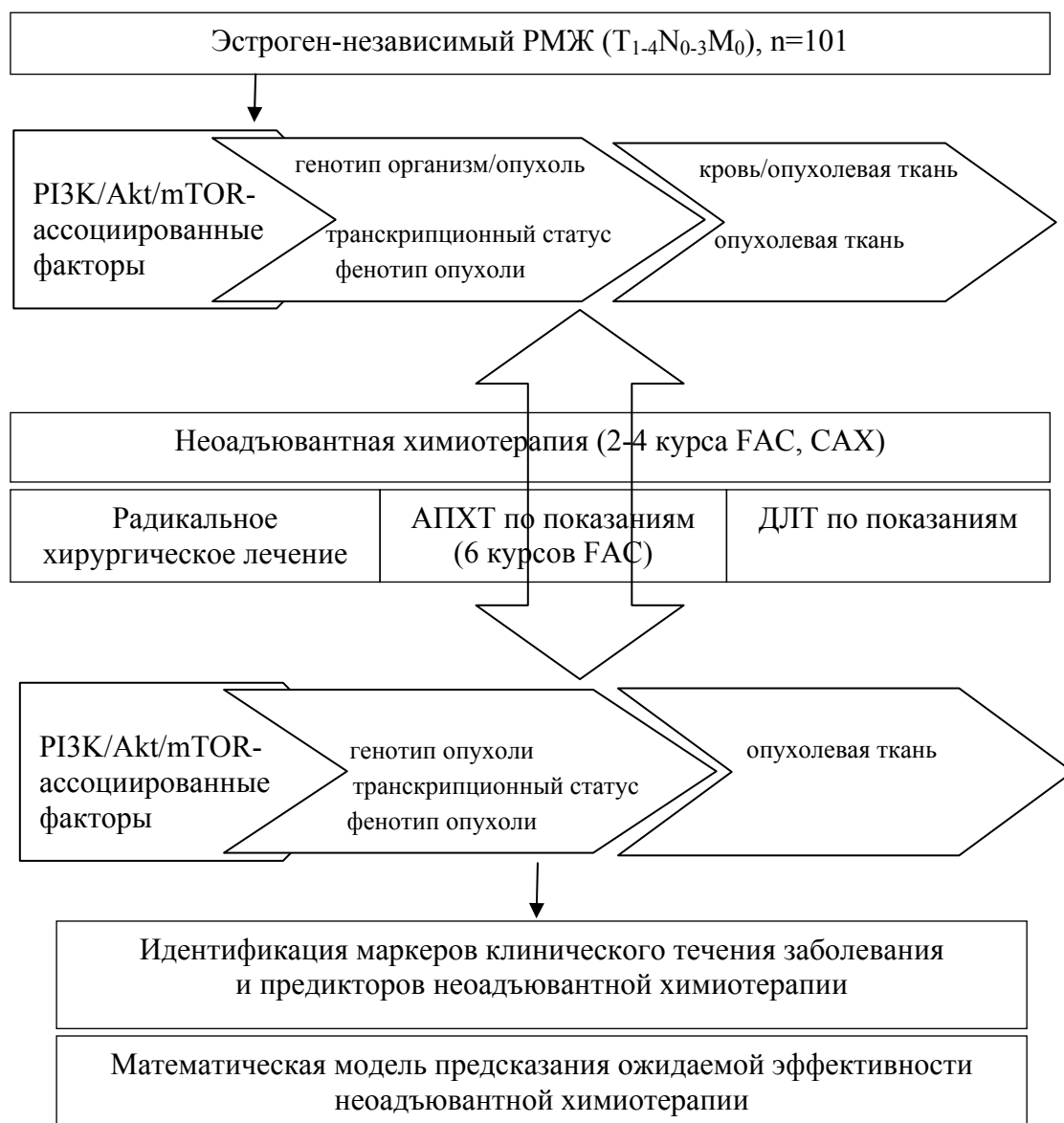


Рисунок 6 – Дизайн исследования эстроген-независимой группы больных РМЖ

В образцах периферической крови были изучены полиморфные варианты генов пролиферации и апоптоза, характеризующие индивидуально наследуемые особенности организма при эстроген-независимом РМЖ. Для поиска информативных предсказательных маркеров, и создания математической модели, позволяющей определять ожидаемую эффективность неoadъювантной химиотерапии, в биопсийных и операционных образцах опухолевой ткани изучены индивидуальные генетические особенности, уровень экспрессии мРНК и уровень белковой экспрессии основных компонентов PI3K/Akt/mTOR сигнального пути.

## 2.2 Методы исследования

### 2.2.1 Материал исследования

Материалом для исследования являлись образцы периферической крови и образцы опухолевой ткани, взятые до начала лечения (биопсийные) и после выполнения оперативного лечения (операционные).

Забор венозной крови проводился натошак из локтевой вены в вакуумные пробирки Vacuteiner (15% EDTA silicone-coated) с сиреневой крышкой в количестве 4 мл. Промежуток времени между забором крови и замораживанием не превышал 8 часов. Полученные образцы хранились при  $-80^{\circ}\text{C}$  до выделения ДНК.

Образцы опухолевой и прилежащей нормальной ткани, полученные во время биопсийного исследования или оперативного вмешательства ( $\sim 10\text{--}70\text{ мм}^3$ ), переносили в контейнер с жидким азотом. Хранение образцов осуществляли при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ . Для получения РНК образцы опухолевой и прилежащей нормальной ткани помещали в раствор RNeasy ( «Ambion», США), инкубировали 24 часа при  $+4^{\circ}\text{C}$  и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Кроме того, использованы образцы опухолевой ткани, полученные во время оперативного вмешательства, фиксированные в 10% рН-нейтральном формалине. Продолжительность фиксации образцов составляла не более 18–24 часов. Проводка материала осуществлялась по стандартному протоколу.

Все этапы получения, приготовления, консервации и хранения биологических образцов проведены согласно Стандартным Рабочим Процедурам (Standard Operation Procedures (SOPs)).

### 2.2.2 Выделение ДНК из образцов периферической крови

Для выделения геномной ДНК использован стандартный метод фенол-хлороформной экстракции [323]. Для получения лейкомаксы образцы крови центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин, затем лизировали

форменные элементы буфером (0,32 М сахараза; 10 мМ Трис-НСl, рН 7,5; 5 мМ MgCl<sub>2</sub>; 1% Тритон Х-100) и отмывали 2-3 раза 5-10 мин при 3000 об/мин. К полученной лейкоmasse добавляли буфер (0,5 М ЭДТА, 5 М NaCl, 1 М трис-НСl рН8,0), 0,5% SDS и протеиназу К («Медиген», Новосибирск) с последующей инкубацией при непрерывном перемешивании в течение 1-2 часов при 56°С. Затем добавляли 0,1 М NaCl, фенол (насыщенный трис-НСl, содержащий 0,2% 8-гидроксихинолина и 0,2% 2-меркаптоэтанола, «Helicon», Москва), встряхивали 15 сек и инкубировали при -20°С в течение 30 мин, после чего центрифугировали 2 мин при 12000 об/мин. Выделяли верхнюю фазу содержимого пробирки, добавляли к ней фенол-хлороформ-изоамиловый спирт в соотношении 25:24:1, встряхивали и центрифугировали в течение 2 мин при 12000 об/мин. Затем вновь отделяли верхнюю фазу содержимого пробирки, добавляли хлороформ с изоамиловым спиртом в соотношении 24:1, встряхивали и центрифугировали 2 мин при 12000 об/мин. Отделив верхнюю фазу в третий раз, вновь добавляли 0,1 М NaCl, изопропиловый спирт и аккуратно переворачивали до выпадения осадка. Затем инкубировали пробы при -20°С в течение 1 часа, после чего центрифугировали 10 мин при 12000 об/мин. Далее отмывали ДНК 96%-ным этиловым спиртом, и дважды 70% этиловым спиртом. Подсушивали полученный осадок, затем добавляли к осадку 400 мкл ТЕ буфера (рН=8,0) и аликвотировали. Аликвоты хранили при температуре -20°С.

### 2.2.3 Выделение ДНК из образцов опухолевой ткани

ДНК из опухолевых образцов, фиксированных в формалине, была выделена с помощью наборов Qiaamp DNA FFPE tissue kit («Qiagen», Германия). Готовые срезы 4-5 мкм ресуспендировали в 1мл о-ксилола в течение 10 секунд, затем центрифугировали при 8000 об/мин в течение 2 мин при комнатной температуре. Удаляли верхнюю фазу, к полученному осадку добавляли 1мл 96% этилового спирта и вновь центрифугировали при 8000 об/мин в течение 2 мин при комнатной температуре. Вновь удаляли верхнюю фазу, а затем инкубировали

осадок при 37°C в течение 10 мин до полного испарения спирта. Добавляли к осадку 180 мкл лизирующего буфера ATL, ресуспендировали, добавляли 20 мкл протеиназы K и вновь ресуспендировали. После двух последовательных инкубаций в течение 1 часа при 56°C и 90°C соответственно, пробы центрифугировали, последовательно добавляли 200 мкл буфера AL и 96% этанола и ресуспендировали. Переносили пробы в спин-колонки («QIAamp») и центрифугировали 1 мин при 8000 об/мин. Удаляли осадок, затем последовательно промывали спин-колонки буферами AW1 и AW2, добавляя по 500 мкл каждого из них, и центрифугировали после каждого добавления буфера при 8000 об/мин 1 мин. Далее переносили спин-колонки в пустые тубы и центрифугировали при 14000 об/мин 1 мин. После этого колонки переносили в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл и добавляли 30 мкл элюирующего буфера ATE, инкубировали при комнатной температуре в течение 1 мин и центрифугировали при 14000 об/мин также в течение 1 мин.

ДНК из нефиксированных в формалине образцов опухоли была выделена с помощью наборов QIAamp DNA mini Kit («Qiagen», Германия). Последовательность процесса выделения ДНК полностью соответствовала описанным выше этапам, за исключением этапа депарафинизации.

Качественная и количественная оценка выделенной ДНК проведена на спектрофотометре NanoDrop-1000 («Thermo Scientific», США). Концентрация ДНК составляла от 25 до 400 нг/мкл,  $A_{260}/A_{280} = 2.10-2.35$ .

#### 2.2.4 Выделение РНК из образцов опухолевой и прилежащей нормальной ткани

Для выделения тотальной РНК из опухолевой и прилежащей нормальной ткани использовали наборы RNeasy Plus mini Kit, содержащие ДНК-азу I («Qiagen», Германия). С целью денатурации и гомогенизации образцов, ткани измельчали ножницами в микроцентрифужных пробирках объемом 1,5 мл, добавляли 600 мкл буфера RLT и инкубировали 1 час при 56°C. После инкубации пробы центрифугировали в течение 3 мин при 14000 об/мин. Затем осторожно

удаляли верхнюю фазу, пропускали её через спин-колонок и центрифугировали 30 сек при 8 000 об/мин. Спин-колонок удаляли, к осадку добавляли 600 мкл 70% этилового спирта и ресуспендировали. Полученный лизат перемещали в спин-колонок 2 («MinElute RNeasy»), центрифугировали 15 сек при 10 000 об/мин и осторожно удаляли нижнюю фазу. Далее спин-колонок промывали, последовательно добавляя сначала 700 мкл буфера RW1, а затем дважды по 500 мкл буфера RPE и вновь удаляли нижнюю фазу. После подсушивания мембраны фильтра спин-колонок их переносили в пустые тубы и центрифугировали 1 мин при 14000 об/мин. Затем вновь переносили колонок в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл, добавляли 2 мкл ингибитора РНК-аз Ribolock («Fermentas», Литва) и 50 мкл RNase free H<sub>2</sub>O и центрифугировали 1 мин при 10 000 об/мин. Повторно добавляли 50 мкл RNase free H<sub>2</sub>O и центрифугировали образцы в течение 2,5 мин при 14000 об/мин при комнатной температуре. Концентрацию и качество очистки выделения РНК проводили на спектрофотометре NanoDrop-2000 («Thermo Scientific», США). Концентрация РНК составляла от 40 до 200 нг/мкл,  $A_{260}/A_{280} = 1,95-2,05$ .

### 2.2.5 Полимеразная цепная реакция и анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ)

Генотипирование полиморфных вариантов генов *FGFR2* (rs1219648, rs2981582), *XRCC1* (rs25487), *TP53* (rs1042522, rs17878362, rs1625895), *TGF-β1* (rs1800469, rs1800470), *VEGF* (rs699947), *MTHFR* (rs1801133, rs1801131), *MTR* (rs1805087), *DHFR* (rs70991108), *MTHFD1* (rs2236225), *MTRR* (rs1801394), *TS* (rs34743033, rs16430), *RFC1* (rs1051266) и *DNMT3b* (rs2424913) проведено с помощью ПЦР-анализа с последующим рестрикционным гидролизом образующихся фрагментов.

Для проведения ПЦР-ПДРФ использовали амплификатор ДНК «Бис» или автоматический термоциклер «Терцик» (оба «ДНК-технология», Россия). Реакционная смесь объемом 15-20 мкл включала 100 нг геномной ДНК; 0,5-1,5

мкл специфической пары праймеров с концентрацией 1-6 о.е./мл; 200 мкМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата; 1,2-2,0 мкл буфера (50 mM KCl и 10 mM Tris-HCl (pH 8.3)), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> и 0,5-1,0 ед. Taq ДНК-полимеразы («Медиген», Новосибирск). Температура отжига для каждой пары праймеров исследуемых генов и условия проведения амплификации представлены в Таблице 3.

Таблица 3 – Последовательность праймеров и условия проведения ПЦР-ПДРФ анализа исследуемых генов

Локус	Последовательность праймеров, 5'-3'	Температура отжига, °С	Фермент рестрикции
<i>FGFR2</i> rs1219648	GTGGAAAGGGACGAAGTT TTGGTGGAAGAGTCAGAAGA	55	HinpI I
<i>FGFR2</i> rs2981582	CCCTTTGGAGACAACGTGAGCC CAGGCACCAGGTGGACTCTGC	63	HinpI I
<i>XRCC1</i> rs25487	GCCCCGTCCCAGGTAAG AGCCCCAAGACCCTTTCAC T	55	MspI
<i>TP53</i> rs17878362	TGGGACTGACTTTCTGCTCTT TCAAATCATCCATTGCTTGG	57	-
<i>TP53</i> rs1042522	CTGGTAAGGACAAGGGTTGG ACTGACCGTGCAAGTCACAG	63	BstFN I
<i>TP53</i> rs1625895	TGGCCATCTACAAGCAGTCA TTGCACATCTCATGGGGTTA	57	MspI
<i>TGF-β1</i> rs1800469	CAGTAAATGTATGGGGTCGCAG GGTGTGAGTGGGAGGAGGG	60	Bse21I
<i>TGF-β1</i> rs1800470	CTCCGGGCTGCGGCTGCGGC CGGCACCTCCCCCTGGCTCG	64	CciN1
<i>VEGF</i> rs699947	GGGCCTTAGGACACCATAACC TGCCCCAGGGAACAAAGT	57	Bgl II
<i>MTHFR</i> rs1801133	TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA AGGACGGTGCGGTGAGAGTG	55	Hinf I
<i>MTHFR</i> rs1801131	ATGTGGGGGGAGGAGCTGAC GTCTCCCAACTTACCCTTCTCCC	55	Mbo II
<i>MTR</i> rs1805087	CATGGAAGAATATGAAGATATTAGAC GAACTAGAAGACAGAAATTCTCTA	55	Hae III
<i>DHFR</i> rs70991108	CCACGGTCGGGGTACCTGGG ACGGTCGGGGTGGCCGACTC AAAAGGGGAATCCAGTCGG	60	-
<i>MTHFD1</i> rs2236225	CACTCCAGTGTGTTGTCATG GCATCTTGAGAGCCCTGAC	64	Hpa II
<i>MTRR</i> rs1801394	GCAAAGGCCATCGCAGAAGACAT TGGTGGTATTAGTGCCTTTTG	55	FauND I
<i>TS</i> rs34743033	GTGGCTCCTGCGTTTCCCCC GCTCCGAGCCGGCCACAGGCATGGCGCGG	57	-
<i>TS</i> rs16430	CAAATCTGAGGGAGCTGAGT CAGATAAGTGGCAGTACAGA	57	Dra I
<i>RFC1</i> rs1051266	AGTGTCACCTTCGTCCCCTC CTCCCGCGTGAAGTTCTT	58	Hin6 I
<i>DNMT3b</i> rs2424913	TGCTGTGACAGGCAGAGCAG GGTAGCCGGAACTCCACGG	62	Avr II

Реакция начиналась с фазы предварительной денатурации (94°C, 3-5 мин), далее поддерживался определенный режим смены температур в течение 30-35 циклов: фаза денатурации (94°C, 30-50 сек), отжига при специфической температуре для каждой пары праймеров (55-64°C, 30 сек-1 мин) и синтеза (72°C, 30 сек-1 мин). Программу завершала финальная элонгация в течение 3-5 минут при 72°C.

После проведения ПЦР-анализа продукты амплификации подвергали гидролизу в течение 16 часов соответствующими ферментами рестрикции при оптимальной для каждого фермента температуре (Таблица 3). Рестрикционная смесь включала 1 ед. активности эндонуклеазы рестрикции, 1-кратный буфер (33 mM Tris-ацетат (pH 7.9 при 25°C); 10 mM магний-ацетат; 66mM калий-ацетат; 1mM DTT), 10 мкл продукта ПЦР и необходимый объем DNase free H<sub>2</sub>O. Анализ продуктов гидролиза осуществляли с помощью их электрофоретического разделения в агарозном или полиакриламидном геле в зависимости от размера продукта рестрикции (числа пар нуклеотидов) с последующим окрашиванием бромидом этидия (0,5 мг/мл) и визуализацией с применением УФ-трансиллюминатора («Vilber Lourmat», Франция) и видеосистемы с цифровой видеокамерой («DNA-Analyzer», Россия).

#### 2.2.6 Полимеразная цепная реакция с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени (РТ-ПЦР)

Методом ПЦР в режиме реального времени с использованием гибридизационных TaqMan зондов изучены полиморфные варианты генов *ESR1* (rs2228480, rs2077647), *EGFR* (rs1468727), *TGF-βR1* (rs334354), *IGFR1* (rs2016347) и *KDR* (rs2071559, rs2305948). Программа OligoAnalysisVector NTI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) была использована для подбора последовательностей всех праймеров и зондов исследуемых генов (Таблица 4).

Таблица 4 – Последовательность олигонуклеотидных праймеров и TaqMan зондов

Локус	Последовательность праймеров, 5'-3'	Последовательность зондов, 5'-3'	T, °C
<i>ESRI</i> rs2228480	GCTCTACTTCATCGCATTCCT TGCAGCAGGGATTATCTGAAC	FAM-AGGGTTTCCCTGCCACAGTCTG ROX-TTCCCTGCCACGGTCTGAGAG	60
<i>ESRI</i> rs2077647	CACGGACCATGACCATGAC GCTCCAGCTCGTTCCTT	FAM-CCACACCAAAGCATCCGGGA ROX-TCCACACCAAAGCATCTGGGATG	57
<i>EGFR</i> rs1468727	CCTGTTTTACTCTCTGGGCAT ATTATGTGATTTGTTCTGAGCCTAT	FAM-TATTTAGGAGCAGGATAAGAGGACCA ROX-GGAGTAGGATAAGAGGACCAAGTTCA	60
<i>TGF-β1</i> rs334354	TCGACGATGTTCCATTGGT GACAATTCTTGAACAACCTTCTGC	FAM-TGCTCTCCTCTCCCCCAATAGT ROX-TGCTCTCCTCTCCCCCAGTAGT	60
<i>IGF1R</i> rs2016347	TCTCTGTGCGAATCCCCA GGGATGGAGCAGCAGCA	FAM-AGCAAACCCAATGACCCACGC ROX-CAAACCCAATGCCACGC	60
<i>KDR</i> rs2071559	AATCTGGTTGCTCTTAATCAGAAA CACTCAAACCTGGAGCCG	FAM-TGCCCAGTTCGCCAGCATT ROX-CTTGCCCAGTTCGCCAACATT	60
<i>KDR</i> rs2305948	CTGTCTTCTTGGTCATCAGC TCTGGGAGTGAGATGAAGAAA	FAM-TGAGCACCTTAACTATAGATGGTATAACC ROX-TGAGCACCTTAACTATAGATGGTGTAAAC	61
Примечания T, °C - температура отжига			

Реакционная смесь для ПЦР объемом 15 мкл включала 100 нг геномной ДНК; 0,5-1,5 мкл специфической пары праймеров и зондов с концентрацией 1 о.е./мл; 200 мкМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата; 1,2-2,0 мкл буфера (60 мМ Tris-HCl (pH 8,5 при 25 °C), 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>; 25 мМ KCl; 10 мМ 2-меркаптоэтанол; 0,1 % Тритон X-100) и 0,5-1,0 ед. Taq ДНК-полимеразы («Медиген», Новосибирск). Программа амплификации предполагала предварительную денатурацию при 95°C в течение 2 минут, с последующими 40 циклами денатурации при 95°C (10 сек), отжиг при специфической температуре для каждой пары праймеров (30 сек) (Таблица 4). Анализ кривых накопления флуоресценции осуществлялся с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX96 Manager 3.1 («Bio-Rad», США). Оценка качества генотипирования была проведена реамплификацией 5% случайно отобранных образцов, которая подтвердила 100%-ую воспроизводимость полученных результатов.

### 2.2.7 Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

Использование ОТ-ПЦР позволило оценить уровень экспрессии генов *EGFR*, *TGF-β1*, *KDR* и *IGF1R* в опухолевой ткани у больных исследуемых групп. Комплементарную ДНК (кДНК) получали на матрице РНК с помощью набора

RevertAid™ («Fermentas», Литва). Для проведения реакции обратной транскрипции смешивали 11 мкл РНК и 1 мкл ДНК-праймеров в микроцентрифужных пробирках объемом 2 мл, инкубировали при 65°C в течение 5 мин. Затем добавляли 8 мкл смеси буфера, обратной транскриптазы и 10 mM дезоксинуклеотидтрифосфатов, амплифицировали в течение 5 мин при 25°C, 60 мин при 42°C и 5 мин при 70°C. Синтезированную кДНК использовали для проведения ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе CFX96 («Bio-Rad», США). Праймеры и зонды были подобраны с помощью программы OligoAnalysisVector NTI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (Таблица 5).

Таблица 5 – Последовательность олигонуклеотидных праймеров и TaqMan зондов для экспрессии исследуемых генов

Ген	Последовательность праймеров, 5'-3'	Последовательность зондов, 5'-3'
<i>EGFR</i>	CTCCATGCCTTTGAGAACCTA CCAAGGATGTTATGTTTCAGGCT	FAM- CGGCAGGACCAAGCAACAT
<i>TGF-β1</i>	TTCCGTGAGGCAGAGATTTAT AGTCCAAGTACCATTGTCTTTATTG	FAM-AACATCCTGGGATTTATAGCAGCA
<i>KDR</i>	ACTCTCTCTGCCTACCTCACCT TACTGACTGATTCCTGCTGTGTT	FAM-TGTATGGAGGAGGAGGAAGTATGTG
<i>IGF1R</i>	CGAGAAGGAGGAGGCTGAA TGACATCTCTCCGCTTCCTT	FAM- ACAACTCCATCTTCGTGCCCA

Реакцию амплификации проводили в триплетах, реакционная смесь объемом 15 мкл, включала 50 нг кДНК, 250 мкМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата, 300 нМ прямого и обратного праймеров, 200 нМ зонда, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, ПЦР буфер (67 mM Tris-HCl pH 8,8 при 25 °C, 16,6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01 % Tween – 20) и 2,5 ед. Taq ДНК-полимеразы («Sibenzyme», Россия). Температурный профиль реакции начинался с 10 минутного цикла нагрева при 94°C, 40 циклов в течение 10 сек при 94°C на первом шаге и 20 сек при 60°C – на втором.

Относительная экспрессия генов *EGFR*, *TGF-β1*, *VEGFR2* и *IGF1R* была определена по пороговой флуоресценции с помощью метода  $2^{-\Delta\Delta CT}$  [215]. Уровень экспрессии исследуемых генов нормировали по референсному гену GAPDH, кодирующему глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназу.

### 2.2.8 Иммуногистохимическое исследование

Изучение экспрессии ER $\alpha$ , PR, HER2 и Ki67, а также рецепторов факторов роста EGFR, TGF- $\beta$ R1, VEGFR2 проводили на парафиновых срезах с использованием стрептавидин–биотинового метода.

На первом этапе срезы были депарафинизированы в 3-х порциях 96% этанола, после чего промыты в дистиллированной воде 5 мин. Затем срезы погружали в 0,01 М цитратный буфер (pH = 6,0) и проводили демаскировку антигенов в микроволновой печи. Демаскировка была осуществлена в два этапа: 7 мин – P = 60, 1 мин – остывание, 7 мин – P = 40 (мощность СВЧ 700 Вт). После этого емкость со срезами остывала 20 мин при 20–25°C, затем срезы были промыты в фосфатном буфере по 5 мин два раза, после чего на стекла наносили блокирующий реагент («Dako», США) на 10 мин. На следующем этапе срезы последовательно промывали в дистиллированной воде и фосфатном буфере в течение 5 мин. Вслед за этим наносили первичные антитела и инкубировали стекла со срезами при 25°C в течение 60 мин. После инкубации срезы промывали в фосфатном буфере и наносили вторичные биотинилизированные антитела на 10 мин, затем также промывали в фосфатном буфере. Далее на срезы наносили стрептавидин–биотиновый комплекс, промывали трис–буфером и обрабатывали хромогенным субстратом (3,3–диаминобензидин в буферном растворе) в течение 10 мин. На заключительном этапе срезы были окрашены гематоксилином и заключены в бальзам. При визуализации была использована система LSAB2 System – HRP («Dako», США).

Антитела фирмы «Dako» были использованы для ER $\alpha$  (клон 1D5, RTU, мышинные), PR (клон PgR 636, RTU, мышинные), онкопротеина HER2 (рабочее разведение 1:500, кроличьи) и EGFR (клон SP9, 1:100). Антитела фирмы «Novus Biologicals» - для VEGFR2 (клон 1B6, 1:100). Для анализа экспрессии Ki67 и TGF- $\beta$ R1 применялись антитела фирмы «Novocastra» (клон MIB-1, RTU и клон 8A11, 1:50; соответственно). При использовании каждого из антител была проведена контрольная реакция (положительный и отрицательный контроль) на серийных срезах.

Результаты иммуногистохимических реакций рецепторов факторов роста оценивались полуколичественно, в зависимости от процента положительно окрашенных клеток и интенсивности их окрашивания, по меньшей мере, в десяти областях каждого среза при увеличении  $\times 400$ . Интенсивность окрашивания была оценена по шкале от 0 до 3, при этом значение 0 определялось как отрицательное окрашивание, 1+ как слабое окрашивание, 2+ как умеренное окрашивание и 3+ сильное окрашивание. Срезы с умеренной (2+) или сильной (3+) цитоплазматической и/или мембранной окраской в более чем 10% клеток считались положительными в отношении экспрессии рецепторов факторов роста, срезы с отрицательным окрашиванием (0) или слабой (1+) экспрессией в  $<10\%$  клеток как EGFR, TGF- $\beta$ R1 или VEGFR2 отрицательными.

Оценка экспрессии ER $\alpha$ /PR проведена полуколичественным методом с использованием системы histoscore (H-score). Histoscore рассчитывали, используя следующее уравнение  $H\text{-score} = 3 \times A + 2 \times B + 1 \times C$ , где 3, 2 или 1 - интенсивность окрашивания, представляющая сильное, умеренное или слабое окрашивание, соответственно; A, B или C - процент окрашенных клеток с соответствующей интенсивностью. Значения H-score варьировались от 0 до 300 [145].

Для изучения характера распределения ER $\alpha$  в опухолевой ткани была проведена качественная оценка срезов при увеличении  $\times 400$  на световом микроскопе Axiostar plus («Carl Zeiss», USA) по запатентованному ранее методу [5]. В дополнение к H-score использована визуальная оценка особенностей характера распределения ER $\alpha$ . Распределение ER $\alpha$  считали гомогенным, если наблюдалось позитивное окрашивание опухолевых клеток с одинаковой или подобной интенсивностью окрашивания. Распределение характеризовали как гетерогенное, если наблюдались как позитивно окрашенные клетки с разной интенсивностью окрашивания (сочетание клеток со слабой и умеренной интенсивностью окрашивания, либо сочетание клеток с высокой и умеренной интенсивностью окраски), так и клетки с негативной экспрессией ER $\alpha$  (Рисунок 7).

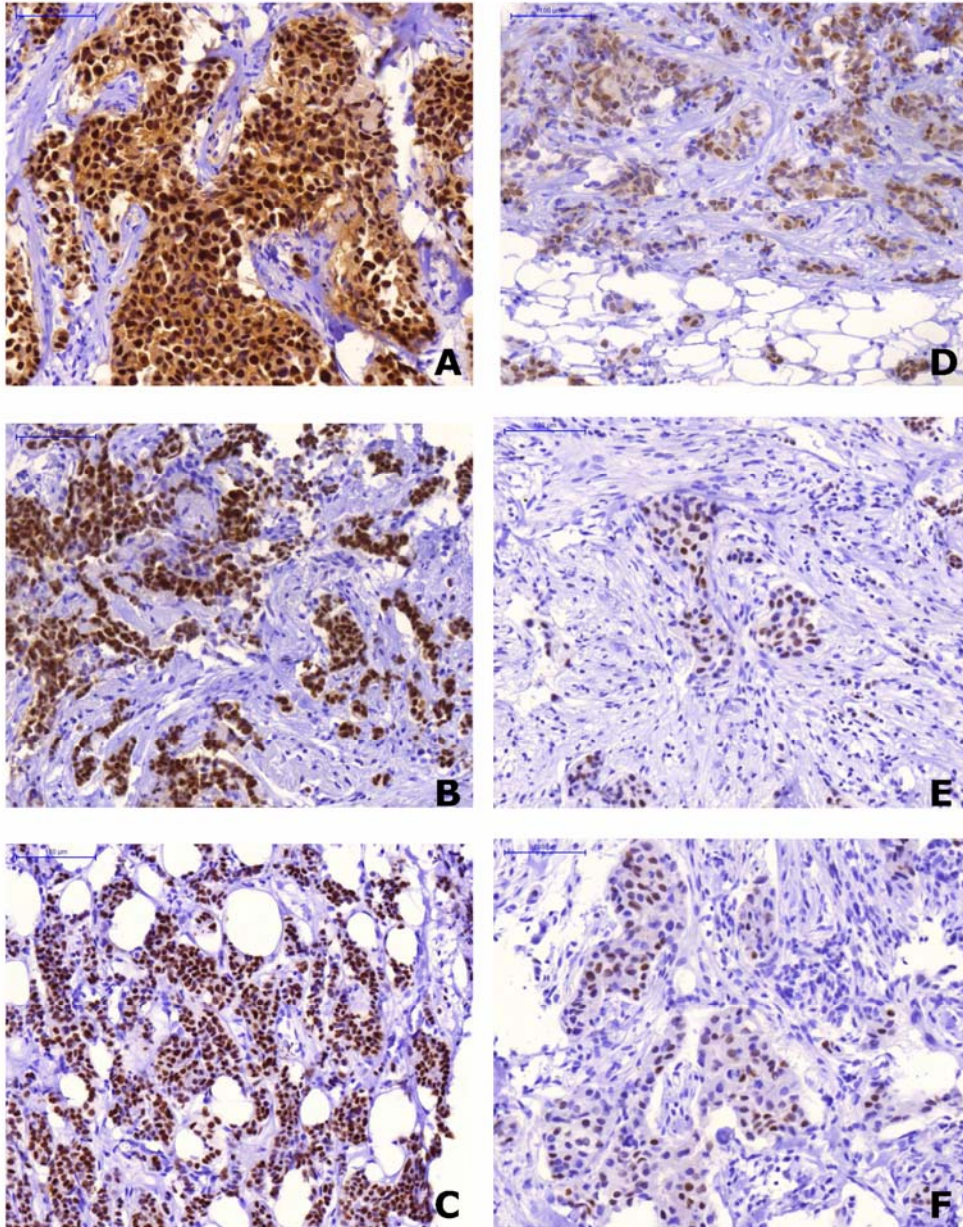


Рисунок 7 – Различный характер иммуногистохимического окрашивания ER $\alpha$  у нескольких пациентов (увеличение  $\times 400$ ); A, B, C – гомогенный характер распределения ER $\alpha$ ; D, E, F – гетерогенный характер распределения ER $\alpha$

### 2.2.9 Фенотипирование методом проточной цитофлуориметрии

Содержание субпопуляций опухолевых клеток  $CD44^+/CD24^{-low}$ ,  $CD44^-/CD24^+$ ,  $CD44^+/CD24^+$ ,  $CD44^-/CD24^-$ ; особенности внутриклеточной экспрессии белков Akt(pS473) и PTEN; а также содержание субпопуляций, коэкспрессирующих маркеры стволовых опухолевых клеток и рецепторов факторов роста  $CD44^+/CD24^-/PTEN^+$ ,  $CD44^-/CD24^+/PTEN^+$ ,  $CD44^+/CD24^+/PTEN^+$ ,  $CD44^-/CD24^-/PTEN^+$ ,  $CD44^+/CD24^-/PTEN^-$ ,  $CD44^-/CD24^+/PTEN^-$ ,  $CD44^+/CD24^+/PTEN^-$ ,  $CD44^-/CD24^-/PTEN^-$ ,  $CD44^+/IGF1R^-$ ,  $CD44^-/IGF1R^+$ ,  $CD44^+/IGF1R^+$ ,  $CD44^-/IGF1R^-$ ,  $CD24^+/TGF-\beta RI^-$ ,  $CD24^-/TGF-\beta RI^+$ ,  $CD24^+/TGF-\beta RI^+$ ,  $CD24^-/TGF-\beta RI^-$ ,  $IGF1R^-/Akt(pS473)^+$ ,  $IGF1R^+/Akt(pS473)^-$ ,  $IGF1R^+/Akt(pS473)^+$ ,  $IGF1R^-/Akt(pS473)^-$ ,  $VEGFR2^-/Akt(pS473)^+$ ,  $VEGFR2^+/Akt(pS473)^-$ ,  $VEGFR2^+/Akt(pS473)^+$  и  $VEGFR2^-/Akt(pS473)^-$  изучено с помощью проточной цитофлуориметрии на цитофлуориметре FACS Canto II («Becton Dickinson», США).

Для получения гомогенатов опухолевой ткани молочной железы использовали автоматическую систему для дезагрегации тканей Medimachine («Dako», США). Образцы тканей помещали в контейнеры Medicons («Dako», США), добавляли 0,5-1 мл фосфатно-солевого буфера и дезагрегировали в течение 60 сек. Суспензию клеток отбирали шприцем и пропускали через фильтры Falcon («Dako», США) с диаметром пор 50 мкм. Далее клеточную суспензию дважды отмывали фосфатно-солевым буфером при 1500 об/мин в течение 5 мин и доводили до конечной концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл.

Для анализа поверхностных клеточных маркеров к 100 мкл клеточной суспензии были добавлены 18-20 мкл первичных антител, конъюгированных с флуорохромами. Инкубировали образцы в течение 30 мин при температуре 4°C, а затем отмывали центрифугированием при 1500 об/мин в течение 5 мин. Окрашенные клетки разводили в 400 мкл фосфатно-солевого буфера и тотчас анализировали.

Для анализа внутриклеточных маркеров исследуемую клеточную суспензию подвергали фиксации и пермеабиллизации, используя систему буферов и растворов Cytofix/Cytoperm™ («Becton Dickinson», США). К 100 мкл клеточной

суспензии добавляли 250 мкл раствора для фиксации и пермеабиллизации, инкубировали в течение 20 мин при 4°C, затем дважды отмывали буфером Perm/Wash. Далее в клеточную суспензию вносили первичные антитела, инкубировали в течение 20 мин в темноте при 18-20°C, вновь отмывали буфером Perm/Wash и инкубировали с 4 мкл вторичных антител 20 мин также при 18-20°C в отсутствии дневного освещения. После процедуры окрашивания клетки отмывали в течение 5 мин при 1500 об/мин, разводили в 400 мкл фосфатно-солевого буфера и анализировали.

Для одновременного выявления поверхностных и внутриклеточных маркеров на этапе окрашивания были внесены антитела только к антигенам поверхностной мембраны. После инкубации была проведена фиксация с помощью системы Cytofix/Cytoperm<sup>TM</sup> и дальнейшая пробоподготовка была осуществлена по протоколу пермеабиллизация-внутриклеточное окрашивание.

В исследовании были использованы антитела фирмы «Becton Dickinson», (США) - CD44 FITC (Clone G44-26), CD24 PE (Clone ML5), CD221 PE (Clone IH7), CD309 PE (Clone 8906), anti-PTEN (Clone A2B1), anti-Akt (pS473, clone M89-61) и goat anti-mouse Ig FITC. Для анализа жизнеспособности клеток применяли йодистый пропидий (PI, 50 мг/мл, «Abcam», United Kingdom), в качестве маркера опухолевых клеток были выбраны антитела anti-human EPСAM (Clone EBA-1, «Becton Dickinson», США). Исследуемые образцы были гейтированы в последовательности – общая популяция клеток – PГ популяция клеток – EPСAM<sup>+</sup> популяция клеток – популяции клеток, экспрессирующие исследуемые поверхностные и внутриклеточные маркеры, что позволило выделить и детектировать среди общего пула клеток популяцию только живых опухолевых клеток. С целью исключения неспецифических сигналов флуоресценции от специфического свечения использовали изотипический контроль FITC IgG2b (clone 27-35) и PE IgG2a (clone G155-178, «Becton Dickinson», США) и отрицательные контроли (неокрашенные клетки). При анализе клеточных популяций, экспрессирующих несколько исследуемых маркеров было изучено распределение компенсации для удаления перекрывающихся сигналов

флуоресценции. В каждом исследуемом образце проанализировано не менее 10 000 клеток, результаты представлены в процентном отношении к общей популяции EpCAM<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> клеток.

Визуализация клеток и количественная оценка результатов фенотипирования была проведена с помощью программного обеспечения FACS Diva 6.1 («Becton Dickinson», США).

### 2.3 Методы статистической обработки результатов

Статистический анализ проведен с использованием программных пакетов SPSS 21.0 (IBM SPSS Statistics, Armonk, NY, USA), STATISTICA 6.1 (1203d, StatSoft Inc., 2007) и программного обеспечения R, версия 3.4.2 (<http://www.R-project.org>).

Проверка закона распределения признаков на соответствие нормальному закону проводилась с использованием критерия согласия Колмогорова-Смирнова. Распределение генотипов исследуемых генов было проверено на соответствие равновесию Харди-Вайнберга. Сравнение частот встречаемости аллелей и генотипов генов, оценка их взаимосвязи с клинико-морфологическими факторами в исследуемых группах проводилась с использованием точного двустороннего критерия Фишера и  $\chi^2$  с поправкой Йейтса.

Для оценки статистически значимых различий средних значений количественных показателей в изучаемых группах были использованы t-критерий Стьюдента для нормально распределенных групп и U-критерий Манна-Уитни для выборок, не подчиняющихся нормальному закону распределения.

Показатели безметастатической выживаемости изучены с помощью множительных оценок Каплана-Мейера. Логранговый критерий (log-rank test) применяли для сравнения кривых выживаемости.

Для построения моделей прогнозирования эффективности тамоксифена у больных эстроген-зависимым РМЖ и предсказания эффективности неоадьювантной химиотерапии у пациентов эстроген-независимым РМЖ был

использован однофакторный и многофакторный логистический регрессионный анализ. Были рассчитаны отношение шансов (OR) и 95% доверительный интервал (CI). Метод многократных генераций исходной выборки (bootstrap method) на основе 1000 наблюдений применяли для проверки точности многомерной модели логистической регрессии, рассчитывалась стандартная ошибка (SE) и смещение доверительного интервала (Bias).

## ГЛАВА 3

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

## 3.1 Полиморфизм генов, вовлеченных в процессы пролиферации и апоптоза опухолевых клеток при разных молекулярных подтипах рака молочной железы

При решении первой задачи для каждого из исследуемых генов был проведен последовательный анализ распределения частот генотипов и аллелей в группе больных эстроген-зависимым РМЖ (как в общей группе больных люминальным РМЖ, так и А и В подтипах), а также у пациентов эстроген-независимым РМЖ. Далее изучена ассоциация полиморфизмов исследуемых генов в зависимости от ряда клинико-морфологических параметров: возраста на момент постановки диагноза, размера первичной опухоли, вовлеченности в процесс регионарных лимфоузлов и характера распределения эстрогеновых рецепторов в опухоли.

3.1.1 Ассоциация полиморфных вариантов гена эстрогенового рецептора *ESR1* с клинико-морфологическими параметрами у больных люминальным РМЖ

Проведено исследование двух полиморфных локусов (rs2228480 и rs2077647), локализованных в экзонных областях гена эстрогенового рецептора у 122 больных люминальным РМЖ. Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов *ESR1*2014G>A rs2228480 показал, что мутантный генотип *ESR1*2014AA встречается в 3,3% опухолей люминального РМЖ. Обращает на себя внимание тот факт, что среди пациенток люминальным А РМЖ не выявлено ни одного случая носительства данного полиморфного варианта ( $p=0,036$ ; Таблица 6). Таким образом, наличие точечной мутации *ESR1*2014AA связано с опухолями преимущественно люминального В подтипа.

Для SNP в первом экзоне гена *ESR1* rs2077647 значимых различий с молекулярными подтипами люминального РМЖ не выявлено.

Таблица 6 – Частота встречаемости полиморфных вариантов гена эстрогенового рецептора у больных люминальным раком молочной железы

Генотип/аллель	РМЖ, n (%)			OR (95% CI)	P
	Люминальный общая n=122	Люминальный А n=70	Люминальный В n=52		
<i>ESR1</i> 2014G>A (rs2228480)					
<i>GG</i>	93 (76,2)	54 (77,1)	39 (75,0)	1,00	
<i>GA</i>	25 (20,5)	16 (22,9)	9 (17,3)	0,78 (0,28-2,12)	0,759
<i>AA</i>	4 (3,3)	0 (0,0)	4 (7,7)	1,10 (1,00-1,21)	0,036 <sup>1</sup>
G аллель	211 (86,5)	124 (88,6)	87 (83,7)	1,00	
A аллель	33 (13,5)	16 (11,4)	17 (16,3)	0,66 (0,30-1,46)	0,336
<i>ESR1</i> +30T>C (rs2077647)					
<i>TT</i>	35 (28,7)	19 (27,1)	16 (30,8)	1,00	
<i>TC</i>	47 (38,5)	27 (38,6)	20 (38,5)	0,88 (0,33-2,33)	0,951
<i>CC</i>	40 (32,8)	24/(34,3)	16 (30,7)	0,79 (0,29-2,19)	0,791
T аллель	117 (48,0)	71 (50,7)	52 (50,0)	1,00	
C аллель	127 (52,0)	69 (49,3)	52 (50,0)	0,97 (0,57-1,68)	0,984
Примечания					
1 <sup>1</sup> – значимые различия показателей между группами люминальный А и люминальный В РМЖ					

Частоты встречаемости генотипов и аллелей двух исследуемых точечных мутаций гена *ESR1* существенно не отличались в зависимости от возраста (Таблица 7) и вовлеченности регионарных лимфатических узлов в опухолевый процесс (Таблица 9).

Статистически значимые различия были получены как для *ESR1*2014G>A, так и для *ESR1*+30T>C SNPs в зависимости от размера первичной опухоли (Таблица 8). Так, частота мутантного варианта *ESR1*+30C была выше в общей группе больных люминальным РМЖ с размером опухоли T<sub>1</sub> (58,9%), чем среди таковых с T<sub>2</sub> (46,2%; p = 0,048). Кроме того, носители мутантных *ESR1*2014A (rs2228480) и *ESR1*+30C (rs2077647) аллелей чаще выявлялись среди женщин люминальным В РМЖ с малым размером опухоли (T<sub>1</sub>).

Полиморфный локус *ESR1*+30T>C был связан с гетерогенным характером распределения эстрогеновых рецепторов в опухолевой ткани у больных люминальным А РМЖ, хотя без статистической значимости (p = 0,074; Таблица 10).

Таблица 7 – Частота встречаемости полиморфных вариантов гена эстрогенового рецептора у больных люминальным РМЖ в зависимости от возраста

Генотип/ аллель	Люминальный РМЖ, n (%)				Люминальный А, n (%)				Люминальный В, n (%)			
	≤ 50 лет	>50 лет	OR (95% CI)	P	≤ 50 лет	>50 лет	OR (95% CI)	P	≤ 50 лет	>50 лет	OR (95% CI)	P
<i>ESR1</i> 2014G>A (rs2228480)												
<i>GG</i>	38(77,6)	55(75,3)	1,00		21(72,4)	33(80,5)	1,00		17(85,0)	22(68,8)	1,00	
<i>GA</i>	11(22,4)	14(19,2)	0,88 (0,33-2,30)	0,777	8(27,6)	8(19,5)	0,64 (0,18-2,24)	0,615	3(15,0)	6(18,7)	0,65 (0,11-3,58)	0,716
<i>AA</i>	0 (0,0)	4(5,5)	0,00 (0,00-2,37)	0,153	0 (0,0)	0 (0,0)	-		0 (0,0)	4(12,5)	0,00 (0,00-2,33)	0,140
G аллель	87(88,8)	124(84,9)	1,00		50(86,2)	74(90,2)	1,00		37(92,5)	50(78,1)	1,00	
A аллель	11(11,2)	22(15,1)	0,71 (0,31-1,64)	0,389	8(13,8)	8(9,8)	0,68 (0,21-2,14)	0,638	3(7,5)	14(21,9)	3,45 (0,84-1,60)	0,098
<i>ESR1</i> +30T>C (rs2077647)												
<i>TT</i>	16(32,7)	19(26,0)	1,00		10(34,5)	9(22,0)	1,00		6(30,0)	10(31,3)	1,00	
<i>TC</i>	17(34,7)	30(41,1)	0,67 (0,25-1,80)	0,383	9(31,0)	18(43,9)	0,45 (0,11-1,76)	0,315	8(40,0)	12(37,5)	1,11 (0,23-5,31)	0,848
<i>CC</i>	16(32,6)	24(32,9)	0,79 (0,29-2,19)	0,618	10(34,5)	14(34,1)	0,64 (0,16-2,55)	0,683	6(30,0)	10(31,2)	1,00 (0,19-5,29)	0,715
T аллель	49(50,0)	68(46,6)	1,00		29(50,0)	36(43,9)	1,00		20(50,0)	32(50,0)	1,00	
C аллель	49(50,0)	78(53,4)	0,87 (0,51-1,50)	0,599	29(50,0)	46(56,1)	0,78 (0,38-1,62)	0,476	20(50,0)	32(50,0)	1,00 (0,42-2,38)	0,840

Таблица 8 – Частота встречаемости полиморфных вариантов гена эстрогенового рецептора у больных люминальным РМЖ в зависимости от размера первичной опухоли

Генотип/ аллель	Люминальный РМЖ, n (%)				Люминальный А, n (%)				Люминальный В, n (%)			
	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	OR (95% CI)	P	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	OR (95% CI)	P	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	OR (95% CI)	P
<i>ESRI 2014G&gt;A (rs2228480)</i>												
<i>GG</i>	41(73,2)	52(78,8)	1,00		28(82,4)	26(72,2)	1,00		13(59,1)	26(86,7)	1,00	
<i>GA</i>	12(21,4)	13(19,7)	0,85 (0,32-2,26)	0,727	6(17,6)	10(27,8)	0,56 (0,15-1,99)	0,496	6(27,3)	3(10,0)	0,25 (0,04-1,40)	0,127
<i>AA</i>	3 (5,4)	1(1,5)	0,26 (0,01-3,01)	0,326	0 (0,0)	0 (0,0)	-		3(13,6)	1(3,3)	0,17 (0,01-2,13)	0,137
G аллель	94(83,9)	117(88,6)	1,00		62(91,2)	62(86,1)	1,00		32(72,7)	55(91,7)	1,00	
A аллель	18(16,1)	15(11,4)	0,67 (0,30-1,48)	0,284	6(8,8)	10(13,9)	1,67 (0,52-5,55)	0,499	12(27,3)	5(8,3)	4,13 (1,20-4,95)	0,021 <sup>1</sup>
<i>ESRI+30T&gt;C (rs2077647)</i>												
<i>TT</i>	12(21,4)	23(34,8)	1,00		7(20,6)	12(33,3)	1,00		5(20,7)	11(36,7)	1,00	
<i>TC</i>	22(39,3)	25(37,9)	0,59 (0,22-1,60)	0,255	15(44,1)	12(33,3)	0,47 (0,12-1,82)	0,211	7(31,8)	13(43,3)	0,84 (0,17-4,23)	0,906
<i>CC</i>	22(39,3)	18(27,3)	0,43 (0,15-1,20)	0,072	12(35,3)	12 (33,3)	0,58 (0,14-2,35)	0,388	10(45,5)	6(20,0)	3,67 (0,68-2,12)	0,156
T аллель	46(41,1)	71(53,8)	1,00		29(42,6)	36(50,0)	1,00		17(38,7)	35(58,3)	1,00	
C аллель	66(58,9)	61(46,2)	1,67 (0,97-2,87)	0,048 <sup>2</sup>	39(57,4)	36(50,0)	0,74 (0,36-1,53)	0,383	27(61,3)	25(41,7)	2,22 (0,93-5,33)	0,047 <sup>1</sup>
Примечания												
1 <sup>1</sup> – значимые различия показателей в группе люминальный В												
2 <sup>2</sup> – значимые различия показателей в группе люминальный РМЖ												

Таблица 9 – Частота встречаемости полиморфных вариантов гена эстрогенового рецептора у больных люминальным РМЖ в зависимости от наличия метастазов в регионарные лимфатические узлы

Генотип/ аллель	Люминальный РМЖ, n (%)				Люминальный А, n (%)				Люминальный В, n (%)			
	N <sub>0</sub>	N <sub>1-2</sub>	OR (95% CI)	P	N <sub>0</sub>	N <sub>1-2</sub>	OR (95% CI)	P	N <sub>0</sub>	N <sub>1-2</sub>	OR (95% CI)	P
<i>ESR1</i> 2014G>A (rs2228480)												
<i>GG</i>	60(76,9)	33(75,0)	1,00		37(78,7)	17(73,9)	1,00		23(74,2)	16(76,2)	1,00	
<i>GA</i>	16(20,5)	9(20,5)	0,98 (0,36-2,71)	0,851	10(21,3)	6(26,1)	0,77 (0,21-2,86)	0,883	6(19,4)	3(14,3)	0,72 (0,12-4,00)	0,488
<i>AA</i>	2 (2,6)	2(4,5)	0,55 (0,05-5,80)	0,618	0 (0,0)	0 (0,0)	-		2(6,4)	2(9,5)	0,70 (0,06-7,95)	0,562
G аллель	136(87,2)	75(85,2)	1,00		84(89,4)	40(87,0)	1,00		52(83,9)	35(83,3)	1,00	
A аллель	20(12,8)	13(14,8)	0,85 (0,38-1,92)	0,669	10(10,6)	6(13,0)	0,79 (0,24-2,67)	0,891	10(16,1)	7(16,7)	0,96 (0,30-3,19)	0,843
<i>ESR1</i> +30T>C (rs2077647)												
<i>TT</i>	16(32,7)	19(26,0)	1,00		10(34,5)	9(22,0)	1,00		6(30,0)	10(31,3)	1,00	
<i>TC</i>	17(34,7)	30(41,1)	0,67 (0,25-1,80)	0,383	9(31,0)	18(43,9)	0,45 (0,11-1,76)	0,314	8(40,0)	12(37,5)	1,11 (0,23-5,31)	0,848
<i>CC</i>	16(32,6)	24(32,9)	0,79 (0,29-2,19)	0,618	10(34,5)	14(34,1)	0,64 (0,16-2,55)	0,683	6(30,0)	10(31,2)	1,00 (0,19-5,29)	0,715
T аллель	49(50,0)	68(46,6)	1,00		29(50,0)	36(43,9)	1,00		20(50,0)	32(50,0)	1,00	
C аллель	49(50,0)	78(53,4)	1,15 (0,67-1,98)	0,599	29(50,0)	46(56,1)	1,28 (0,62-2,65)	0,476	20(50,0)	32(50,0)	1,00 (0,42-2,38)	0,840

Таблица 10 – Частота встречаемости полиморфных вариантов гена эстрогенового рецептора в зависимости от характера распределения эстрогеновых рецепторов в опухоли

Генотип/ аллель	Люминальный РМЖ, n (%)				Люминальный А, n (%)				Люминальный В, n (%)			
	гомо генное	гетеро генное	OR (95% CI)	P	гомо генное	гетеро генное	OR (95% CI)	P	гомо генное	гетеро генное	OR (95% CI)	P
<i>ESR1</i> 2014G>A (rs2228480)												
<i>GG</i>	35(72,3)	43(74,1)	1,00		22(75,9)	27(75,0)	1,00		13(68,4)	16(72,7)	1,00	
<i>GA</i>	12(25,0)	12(20,7)	0,81 (0,30-2,24)	0,659	7(24,1)	9(25,0)	0,95 (0,26-3,01)	0,843	5(26,3)	3(13,6)	0,49 (0,07-3,04)	0,447
<i>AA</i>	1 (2,1)	3(5,2)	0,41 (0,02-4,75)	0,627	0 (0,0)	0 (0,0)	-		1(5,3)	3(13,7)	0,41 (0,01-5,49)	0,620
G аллель	82(85,4)	98(84,5)	1,00		51(87,9)	63(87,5)	1,00		31(81,6)	35(79,6)	1,00	
A аллель	14(14,6)	18(15,5)	0,93 (0,41-2,11)	0,850	7(12,1)	9(12,5)	0,96 (0,30-3,07)	0,846	7(18,4)	9(20,4)	0,88 (0,26-2,98)	0,962
<i>ESR1</i> +30T>C (rs2077647)												
<i>TT</i>	15(31,3)	11(19,0)	1,00		8(27,6)	7(19,4)	1,00		7(36,8)	4(18,2)	1,00	
<i>TC</i>	19(39,6)	25(43,1)	1,79 (0,60-5,38)	0,241	14(48,3)	12(33,3)	0,98 (0,23-4,22)	0,769	5(26,3)	13(59,1)	4,55 (0,72-3,20)	0,119
<i>CC</i>	14(29,1)	22(37,9)	2,14 (0,68-6,83)	0,143	7(24,1)	17(47,3)	2,78 (0,60-1,33)	0,242	7(36,9)	5(22,7)	1,25 (0,17-9,32)	0,566
T аллель	49(51,0)	47(40,5)	1,00		30(51,7)	26(36,1)	1,00		19(50,0)	21(47,7)	1,00	
C аллель	47(49,0)	69(59,5)	1,53 (0,86-2,74)	0,125	28(48,3)	46(63,9)	1,90 (0,88-4,08)	0,074	19(50,0)	23(52,3)	1,10 (0,42-2,86)	0,837

Исследования, посвященные изучению двух описанных выше полиморфных локусов гена *ESR1*, крайне немногочисленны. Большинство из них выполнено на общих когортах больных РМЖ разных популяционных выборок, без учета молекулярно-генетической классификации. В популяциях европейского происхождения найдены ассоциации SNP rs2228480 с возрастом пациенток РМЖ [138]. У представительниц Северной Африки выявлена взаимосвязь носительства дикого генотипа *ESR1*2014GG с экспрессией HER2 в опухоли [167]. Тайваньское популяционное исследование показало ассоциацию мутантного варианта *ESR1*2014A (rs2228480) с лимфогенным метастазированием у больных РМЖ [146].

В ходе настоящего исследования установлены особенности распределения частот генотипов и аллелей двух полиморфных сайтов гена *ESR1* в общей группе люминальным РМЖ и определены их внутригрупповые различия. Согласно полученным данным, мутантный вариант *ESR1*2014AA ассоциирован преимущественно с люминальным В РМЖ. Выявлена ассоциированность обоих рассматриваемых нами SNPs (как *ESR1*2014G>A, так и *ESR1*+30T>C) с опухолями небольшого размера ( $T_1$ ) у больных люминального В подтипа.

### 3.1.2 Ассоциация полиморфных вариантов генов рецепторов ростовых факторов EGFR, TGF- $\beta$ R1, VEGFR2, IGF1R с клинико-морфологическими параметрами у больных люминальным А, В и тройным негативным РМЖ

Изучение распределения аллелей и генотипов генов рецепторов факторов роста в опухоли у больных люминальным и тройным негативным РМЖ выявило статистически значимые различия только для трех из исследуемых - *EGFR*, *TGF- $\beta$ R1*, *VEGFR2/KDR*. Показано, что носители мутантного генотипа *EGFR*CC гена рецептора эпидермального фактора роста преобладали среди пациенток тройным негативным подтипом в сравнении с люминальным В РМЖ ( $p = 0,046$ ; Таблица 11). Мутантный Int7G24A аллель гена *TGF- $\beta$ R1*, а также мутантные генотипы и

аллели гена *KDR-604T>C* чаще встречались у больных с люминальным А РМЖ по сравнению с люминальным В ( $p = 0,007$ ;  $p = 0,031$  и  $p = 0,019$  соответственно; Таблица 11).

Таблица 11 – Частота встречаемости полиморфных вариантов генов рецепторов факторов роста у больных раком молочной железы в зависимости от молекулярного подтипа

Генотип/ аллель	РМЖ, n (%)				OR (95% CI)	P
	Люминальный общая n=122	Люминальный А n=70	Люминальный В n=52	Тройной негативный n=22		
<i>TGF-βRI</i> Int7G24A (rs334354)						
<i>GG</i>	86 (70,5)	43 (61,4)	43 (82,7)	14 (63,6)	0,34 (0,15-0,78)	0,007 <sup>1</sup>
<i>GA</i>	29 (23,8)	21 (30,0)	8 (15,4)	7 (31,8)		
<i>AA</i>	7 (5,7)	6 (8,6)	1 (1,9)	1 (4,6)		
G аллель	201 (82,3)	107 (76,4)	94 (90,4)	35 (79,5)		
A аллель	43 (17,7)	33 (23,6)	10 (9,6)	9 (20,5)		
<i>KDR-604T&gt;C</i> (rs2071559)						
<i>TT</i>	43 (35,2)	21 (30,0)	22 (42,3)	9 (40,9)	0,29 (0,09-0,91)	0,031 <sup>1</sup>
<i>TC</i>	49 (40,2)	26 (37,1)	23 (44,2)	10 (45,5)		
<i>CC</i>	30 (24,6)	23 (32,9)	7 (13,5)	3 (13,6)		
T аллель	135 (55,3)	68 (48,6)	67 (64,4)	28 (63,6)		
C аллель	109 (44,7)	72 (51,4)	37 (35,6)	16 (36,4)		
<i>KDR 1192G&gt;A</i> (rs2305948)						
<i>GG</i>	103 (87,3)	57 (85,1)	46 (90,2)	18 (90,0)	> 0,05	
<i>GA</i>	12 (10,2)	8 (11,9)	4 (7,8)	2 (10,0)		
<i>AA</i>	3 (2,5)	2 (3,0)	1 (2,0)	0 (0,0)		
G аллель	218 (92,4)	122 (91,0)	96 (94,1)	38 (95,0)		
A аллель	18 (7,6)	12 (9,0)	6 (5,9)	2 (5,0)		
<i>EGFR</i> (rs1468727)						
<i>TT</i>	59 (49,6)	35 (52,2)	24 (46,2)	8 (40,0)	0,31 (0,09-1,14)	0,046 <sup>2</sup>
<i>TC</i>	23 (19,3)	14 (20,9)	19 (36,5)	4 (20,0)		
<i>CC</i>	37 (31,1)	18 (26,9)	9 (17,3)	8 (40,0)		
T аллель	141 (59,2)	84 (62,7)	67 (64,4)	20 (50,0)		
C аллель	97 (40,8)	50 (37,3)	37 (35,6)	20 (50,0)		
<i>IGFRI 3129G&gt;T</i> (rs2016347)						
<i>TT</i>	42 (34,4)	25 (35,7)	17 (32,7)	10 (45,5)	> 0,05	
<i>TG</i>	49 (40,2)	29 (41,4)	20 (38,5)	6 (27,3)		
<i>GG</i>	31 (25,4)	16 (22,9)	15 (28,8)	6 (27,2)		
T аллель	133 (54,5)	79 (56,4)	54 (51,9)	26 (59,1)		
G аллель	111 (45,5)	61 (43,6)	50 (48,1)	18 (40,9)		
Примечания						
1 <sup>1</sup> – значимые различия показателей между группами люминальный А и люминальный В РМЖ						
2 <sup>2</sup> – значимые различия показателей между группами люминальный В и тройной негативный РМЖ						

Сравнительный анализ частот полиморфных вариантов исследуемых генов в возрастном аспекте показал, что мутантный аллель С гена *EGFR* в два раза чаще выявлялся среди женщин моложе 50 лет, чем среди пациенток старшей возрастной группы тройного негативного РМЖ (80% и 40% соответственно,  $p = 0,031$ ; Таблица 12).

Распределение частот аллелей и генотипов исследуемых генов у больных в зависимости от размера первичной опухоли значимо не различалось (Таблица 13).

Обнаружена высокая частота встречаемости *KDR1192A* аллелей у больных люминальным В подтипом с метастазами в регионарные лимфатические узлы по сравнению с пациентками с локализованным процессом ( $p = 0,042$ ; Таблица 14). Для *IGFR13129TG+GG* полиморфных вариантов гена рецептора инсулиноподобного фактора роста I найдены ассоциации с лимфогенным метастазированием среди пациенток с тройным негативным фенотипом ( $p = 0,042$ ; Таблица 14). Мутантные варианты гена рецептора трансформирующего фактора роста бета I типа *Int7G24GA+AA* были связаны с менее агрессивным течением люминального А РМЖ ( $p = 0,049$  и  $p = 0,002$ ; Таблица 14).

Для люминального В РМЖ найден ряд ассоциаций исследуемых полиморфизмов с характером распределения эстрогеновых рецепторов в опухоли. Так, мутантный *TGF-βR1 A* аллель преобладал в группе больных с гомогенным распределением ( $p = 0,038$ ), тогда как вариантный *IGFR13129G* аллель – у пациенток с гетерогенным ( $p = 0,016$ ; Таблица 15).

Следует отметить отсутствие в литературе данных о частотах встречаемости полиморфных вариантов изучаемых нами генов в зависимости от молекулярно-генетического профиля опухоли. На сегодняшний день имеются лишь единичные исследования взаимосвязи полиморфизма гена *TGF-βR1* с клиническим течением рака молочной железы. Показана ассоциация мутантного *Int7G24A* аллеля с инвазивным и метастатическим РМЖ без связи с подтипом опухоли [197]. Выявлен высокий риск развития рецидивов у больных РМЖ с рецептор-положительным статусом опухоли, несущих мутантный вариант гена *IGFR1* [195].

Таблица 12 – Частота встречаемости полиморфных вариантов генов рецепторов факторов роста у больных люминальным и тройным негативным РМЖ в зависимости от возраста

Генотип/ аллель	Люминальный А, n (%)				Люминальный В, n (%)				Тройной негативный, n (%)			
	≤ 50 лет	> 50 лет	OR (95% CI)	P	≤ 50 лет	>50 лет	OR (95% CI)	P	≤ 50 лет	>50 лет	OR (95% CI)	P
<i>TGF-βRI Int7G24A (rs334354)</i>												
<i>GG</i>	20(68,9)	23(56,1)	1,00		16(80,0)	27(84,4)	1,00		4(80,0)	10(58,8)	1,00	
<i>GA+AA</i>	9(31,1)	18(43,9)	0,57 (0,19-1,74)	0,276	4(20,0)	5(15,6)	0,74 (0,14-3,94)	0,719	1(20,0)	7(41,2)	0,36 (0,01-5,08)	0,613
G аллель	48(82,8)	59(72,0)	1,00		35(87,5)	59(92,2)	1,00		9(90,0)	26(76,5)	1,00	
A аллель	10(17,2)	23(28,0)	0,53 (0,21-1,32)	0,138	5(12,5)	5(7,8)	0,59 (0,14-2,58)	0,502	1(10,0)	8(23,5)	0,36 (0,01-3,69)	0,658
<i>KDR -604T&gt;C (rs2071559)</i>												
<i>TT</i>	9(31,0)	12(29,3)	1,00		8(40,0)	14(43,8)	1,00		3(60,0)	6(35,3)	1,00	
<i>TC+CC</i>	20(69,0)	29(70,7)	1,09 (0,34-3,45)	0,916	12(60,0)	18(56,2)	1,17 (0,32-4,23)	0,982	2(40,0)	11(64,7)	0,36 (0,03-3,96)	0,609
T аллель	31(53,4)	37(45,1)	1,00		25(62,5)	42(65,6)	1,00		7(70,0)	21(61,8)	1,00	
C аллель	27(46,6)	45(54,3)	0,40 (0,67-2,90)	0,332	15(37,5)	22(34,4)	0,87 (0,35-2,15)	0,746	3(30,0)	13(38,2)	0,69 (0,12-3,83)	0,724
<i>KDR 1192G&gt;A (rs2305948)</i>												
<i>GG</i>	26(89,7)	31(81,6)	1,00		18(94,7)	28(87,5)	1,00		5(100,0)	13(86,7)	1,00	
<i>GA+AA</i>	3(10,3)	7(18,4)	0,51 (0,09-2,53)	0,495	1(5,3)	4(12,5)	0,39 (0,02-4,29)	0,639	0(0,0)	2(13,3)	0,00 (0,00-1,56)	0,553
G аллель	54(93,1)	68(89,5)	1,00		37(97,4)	59(92,2)	1,00		10(100,0)	28(93,3)	1,00	
A аллель	4(6,9)	8(10,5)	0,63 (0,15-2,48)	0,671	1(2,6)	5(7,8)	0,32 (0,01-3,01)	0,467	0(0,0)	2(6,7)	0,00 (0,00-3,96)	0,557
<i>EGFR (rs1468727)</i>												
<i>TT</i>	14(48,3)	21(55,3)	1,00		8(40,0)	16(50,0)	1,00		1(20,0)	7(46,7)	1,00	
<i>TC+CC</i>	15(51,7)	17(44,7)	0,76 (0,26-2,22)	0,570	12(60,0)	16(50,0)	0,67 (0,18-2,38)	0,482	4(80,0)	8(53,3)	3,50 (0,24-1,64)	0,603
T аллель	33(56,9)	51(67,1)	1,00		20(50,0)	37(57,8)	1,00		2(20,0)	18(60,0)	1,00	
C аллель	25(43,1)	25(32,9)	0,65 (0,30-1,39)	0,226	20(50,0)	27(42,2)	1,37 (0,57-3,27)	0,436	8(80,0)	12(40,0)	6,00 (0,91-4,90)	0,031 <sup>1</sup>
<i>IGFRI 3129G&gt;T (rs2016347)</i>												
<i>TT</i>	13(44,8)	12(29,8)	1,00		7(35,0)	10(31,3)	1,00		3(60,0)	7(41,2)	1,00	
<i>TG+GG</i>	16(55,2)	29(70,7)	0,96 (0,65-5,99)	0,181	13(65,0)	22(68,7)	0,18 (0,31-4,53)	0,779	2(40,0)	10(58,8)	0,47 (0,04-5,01)	0,625
T аллель	37(63,8)	42(51,2)	1,00		21(52,5)	33(51,6)	1,00		7(70,0)	19(55,9)	1,00	
G аллель	21(36,2)	40(48,8)	0,60 (0,28-1,25)	0,139	19(47,5)	31(48,4)	0,96 (0,40-2,29)	0,926	3(30,0)	15(44,1)	0,54 (0,09-2,97)	0,489
Примечания												
1 <sup>1</sup> – значимые различия показателей в группе тройной негативный РМЖ												

Таблица 13 – Частота встречаемости полиморфных вариантов генов рецепторов факторов роста у больных люминальным и тройным негативным РМЖ в зависимости от размера опухоли

Генотип/ аллель	Люминальный А, n (%)				Люминальный В, n (%)				Тройной негативный, n (%)			
	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	OR (95% CI)	P	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	OR (95% CI)	P	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	OR (95% CI)	P
<i>TGF-βRI Int7G24A (rs334354)</i>												
<i>GG</i>	17(50,0)	26(72,2)	1,00		17(77,3)	26(86,7)	1,00		8(72,7)	6(54,5)	1,00	
<i>GA+AA</i>	17(50,0)	10(27,8)	0,38 (0,13-1,16)	0,056	5(22,7)	4(13,3)	0,52 (0,10-2,71)	0,468	3(27,3)	5(45,5)	0,45 (0,05-3,63)	0,659
G аллель	48(70,6)	59(81,9)	1,00		38(86,4)	56(93,3)	1,00		19(86,4)	16(72,7)	1,00	
A аллель	20(29,4)	13(18,1)	0,53 (0,22-1,25)	0,114	6(13,6)	4(6,7)	0,45 (0,10-1,98)	0,316	3(13,6)	6(27,3)	0,42 (0,07-2,37)	0,457
<i>KDR -604T&gt;C (rs2071559)</i>												
<i>TT</i>	10(29,4)	11(30,6)	1,00		8(36,4)	14(46,7)	1,00		6(54,5)	3(27,3)	1,00	
<i>TC+CC</i>	24(70,6)	25(69,4)	1,06 (0,34-3,32)	0,916	14(63,6)	16(53,3)	1,53 (0,43-5,31)	0,475	5(45,5)	8(72,7)	0,31 (0,03-2,50)	0,383
T аллель	37(54,4)	31(43,1)	1,00		26(59,1)	41(68,3)	1,00		16(72,7)	12(54,5)	1,00	
C аллель	31(45,6)	41(56,9)	0,63 (0,31-1,30)	0,179	18(40,9)	19(31,7)	0,67 (0,27-1,63)	0,331	6(27,3)	10(45,5)	0,45 (0,11-1,87)	0,347
<i>KDR 1192G&gt;A (rs2305948)</i>												
<i>GG</i>	29(87,9)	28(82,4)	1,00		20(90,9)	26(89,7)	1,00		7(77,8)	11(100,0)	1,00	
<i>GA+AA</i>	4(12,1)	6(17,6)	0,64 (0,13-2,98)	0,733	2(9,1)	3(10,3)	0,87 (0,09-7,34)	0,633	2(22,2)	0(0,0)	0,00 (0,00-3,40)	0,189
G аллель	61(92,4)	61(89,7)	1,00		42(95,5)	54(93,1)	1,00		16(88,9)	22(100,0)	1,00	
A аллель	5(7,6)	7(10,3)	0,71 (0,18-2,69)	0,804	2(4,5)	4(6,9)	0,64 (0,08-4,30)	0,696	2(11,1)	0(0,0)	0,00 (0,00-3,34)	0,196
<i>EGFR (rs1468727)</i>												
<i>TT</i>	19(57,6)	16(47,1)	1,00		9(40,9)	15(50,0)	1,00		3(33,3)	5(45,5)	1,00	
<i>TC+CC</i>	14(42,4)	18(52,9)	0,65 (0,22-1,92)	0,389	13(59,1)	15(50,0)	1,44 (0,41-5,10)	0,516	6(66,7)	6(54,5)	1,67 (0,19-1,32)	0,669
T аллель	45(68,2)	39(57,4)	1,00		21(47,7)	36(60,0)	1,00		8(44,5)	12(54,5)	1,00	
C аллель	21(31,8)	29(42,6)	0,63 (0,29-1,35)	0,195	23(52,3)	24(40,0)	1,64 (0,70-3,89)	0,214	10(55,5)	10(45,5)	0,67 (0,16-2,79)	0,525
<i>IGFRI 3129G&gt;T (rs2016347)</i>												
<i>TT</i>	13(38,2)	12(33,4)	1,00		8(40,0)	9(30,0)	1,00		7(63,6)	3(27,3)	1,00	
<i>TG+GG</i>	21(61,8)	24(66,6)	1,24 (0,42-3,70)	0,669	14(60,0)	11(70,0)	0,33 (0,36-5,02)	0,629	4(36,4)	8(72,7)	4,67 (0,57-4,90)	0,198
T аллель	42(61,8)	37(51,4)	1,00		24(54,5)	30(50,0)	1,00		15(68,2)	11(50,0)	1,00	
G аллель	26(38,2)	35(48,6)	0,65 (0,32-1,35)	0,216	20(45,5)	30(50,0)	0,83 (0,35-1,96)	0,647	7(31,8)	11(50,0)	0,47 (0,11-1,87)	0,220

Таблица 14 – Частота встречаемости полиморфных вариантов генов рецепторов факторов роста у больных РМЖ в зависимости от наличия метастазов в регионарные лимфатические узлы

Генотип/ аллель	Люминальный А, n (%)				Люминальный В, n (%)				Тройной негативный, n (%)			
	N <sub>0</sub>	N <sub>1-2</sub>	OR (95% CI)	P	N <sub>0</sub>	N <sub>1-2</sub>	OR (95% CI)	P	N <sub>0</sub>	N <sub>1-2</sub>	OR (95% CI)	P
<i>TGF-βRI Int7G24A (rs334354)</i>												
<i>GG</i>	23(48,9)	20(87,0)	1,00		27(87,1)	16(76,2)	1,00		8(66,7)	6(60,0)	1,00	
<i>GA+AA</i>	24(51,1)	3(13,0)	6,96 (1,63-4,16)	0,049 <sup>1</sup>	4(12,9)	5(23,8)	0,47 (0,90-2,46)	0,457	4(33,3)	4(40,0)	0,75 (0,09-5,94)	0,546
G аллель	64(68,1)	43(93,5)	1,00		57(91,9)	37(88,1)	1,00		20(83,3)	15(75,0)	1,00	
A аллель	30(31,9)	3(6,5)	0,15 (0,03-0,56)	0,002 <sup>1</sup>	5(8,1)	5(11,9)	0,65 (0,15-2,82)	0,520	4(16,7)	5(25,0)	0,60 (0,11-3,23)	0,709
<i>KDR -604T&gt;C (rs2071559)</i>												
<i>TT</i>	14(29,8)	7(30,4)	1,00		14(45,2)	8(38,1)	1,00		6(50,0)	3(30,0)	1,00	
<i>TC+CC</i>	33(70,2)	16(69,6)	1,03 (0,30-3,46)	0,955	17(54,8)	13(61,9)	1,34 (0,37-4,83)	0,613	6(50,0)	7(70,0)	2,33 (0,30-1,97)	0,415
T аллель	46(48,9)	22(47,8)	1,00		41(66,1)	26(61,9)	1,00		17(70,8)	11(55,0)	1,00	
C аллель	48(51,1)	24(52,2)	1,05 (0,49-2,25)	0,902	21(33,9)	16(38,1)	0,83 (0,34-2,04)	0,659	7(29,2)	9(45,0)	0,50 (0,12-1,27)	0,276
<i>KDR 1192G&gt;A (rs2305948)</i>												
<i>GG</i>	38(86,4)	19(82,6)	1,00		29(96,7)	17(81,0)	1,00		8(80,0)	10(100,0)	1,00	
<i>GA+AA</i>	6(13,6)	4(17,4)	0,75 (0,16-3,66)	0,726	1(3,3)	4(19,0)	0,15 (0,01-1,61)	0,146	2(20,0)	0(0,0)	0,00 (0,00-4,35)	0,474
G аллель	80(90,9)	42(91,3)	1,00		59(98,3)	37(88,1)	1,00		18(90,0)	20(100,0)	1,00	
A аллель	8(9,1)	4(8,7)	0,95 (0,23-3,77)	0,606	1(1,7)	5(11,9)	0,13 (0,01-1,18)	0,042 <sup>2</sup>	2(10,0)	0(0,0)	0,00 (0,00-4,19)	0,487
<i>EGFR (rs1468727)</i>												
<i>TT</i>	26(57,8)	9(40,9)	1,00		14(45,2)	10(47,6)	1,00		3(30,0)	5(50,0)	1,00	
<i>TC+CC</i>	19(42,2)	13(59,1)	1,98 (0,62-6,35)	0,194	17(54,8)	11(52,4)	1,10 (0,31-3,88)	0,861	7(70,0)	5(50,0)	3,50 (0,34-2,94)	0,350
T аллель	61(67,8)	23(52,3)	1,00		34(54,8)	23(54,8)	1,00		8(40,0)	12(60,0)	1,00	
C аллель	29(32,2)	21(47,7)	0,52 (0,29-1,16)	0,081	28(45,2)	19(45,2)	1,00 (0,42-2,37)	0,994	12(60,0)	8(40,0)	2,25 (0,53-9,78)	0,206
<i>IGFRI 3129G&gt;T (rs2016347)</i>												
<i>TT</i>	18(38,3)	7(30,4)	1,00		13(41,9)	4(19,0)	1,00		8(66,7)	2(20,0)	1,00	
<i>TG+GG</i>	29(61,7)	16(69,6)	1,42 (0,43-4,72)	0,519	18(58,1)	17(81,0)	3,07 (0,72-3,96)	0,154	4(33,3)	8(80,0)	0,13 (0,01-1,19)	0,042 <sup>3</sup>
T аллель	53(56,4)	26(56,5)	1,00		37(59,7)	17(40,5)	1,00		17(70,8)	9(45,0)	1,00	
G аллель	41(43,6)	20(43,5)	0,99 (0,46-2,15)	0,988	25(40,3)	25(59,5)	0,46 (0,19-1,10)	0,054	7(29,2)	11(55,0)	0,34 (0,08-1,38)	0,083
Примечания												
1 <sup>1</sup> – значимые различия показателей в группе люминальный А												
2 <sup>2</sup> – значимые различия показателей в группе люминальный В												
3 <sup>3</sup> – значимые различия показателей в группе тройной негативный РМЖ												

Таблица 15 – Частота встречаемости полиморфных вариантов генов рецепторов факторов роста у больных РМЖ в зависимости от характера распределения эстрогеновых рецепторов в опухоли

Генотип/ аллель	Люминальный А, n (%)				Люминальный В, n (%)			
	гомогенное	гетерогенное	OR (95% CI)	P	гомогенное	гетерогенное	OR (95% CI)	P
<i>TGF-βRI</i> Int7G24A (rs334354)								
<i>GG</i>	20(69,0)	21(58,3)	1,00		12(63,2)	20(90,9)	1,00	
<i>GA+AA</i>	9(31,0)	15(41,7)	0,63 (0,20-1,80)	0,377	7(36,8)	2(9,1)	0,17 (0,02-1,15)	0,056
G аллель	47(81,0)	54(75,0)	1,00		30(78,9)	42(95,5)	1,00	
A аллель	11(19,0)	18(25,0)	0,70 (0,28-1,76)	0,411	8(21,1)	2(4,5)	0,18 (0,02-1,01)	0,038 <sup>1</sup>
<i>KDR</i> -604T>C (rs2071559)								
<i>TT</i>	8(27,6)	13(36,1)	1,00		10(52,6)	11(50,0)	1,00	
<i>TC+CC</i>	21(70,2)	23(63,9)	1,48 (0,45-4,91)	0,465	9(47,4)	11(50,0)	1,11 (0,27-4,55)	0,867
T аллель	28(48,3)	39(54,2)	1,00		26(68,4)	32(72,7)	1,00	
C аллель	30(51,7)	33(45,8)	0,79 (0,37-1,67)	0,504	12(31,6)	12(27,3)	0,81 (0,28-2,34)	0,669
<i>KDR</i> 1192G>A (rs2305948)								
<i>GG</i>	24(92,3)	29(80,6)	1,00		19(100,0)	20(90,9)	1,00	
<i>GA+AA</i>	2(7,7)	7(19,4)	0,35 (0,04-2,10)	0,282	0(0,0)	2(9,1)	0,00 (0,00-4,89)	0,490
G аллель	50(96,2)	63(87,5)	1,00		38(100,0)	41(93,2)	1,00	
A аллель	2(3,8)	9(12,5)	0,28 (0,04-1,49)	0,118	0(0,0)	3(6,8)	0,00 (0,00-2,59)	0,245
<i>EGFR</i> (rs1468727)								
<i>TT</i>	14(53,8)	18(50,0)	1,00		9(47,4)	11(50,0)	1,00	
<i>TC+CC</i>	12(46,2)	18(50,0)	0,86 (0,28-2,66)	0,765	10(52,6)	11(50,0)	1,11 (0,27-4,53)	0,867
T аллель	35(67,3)	43(59,7)	1,00		21(55,3)	27(61,4)	1,00	
C аллель	17(32,7)	29(40,3)	0,72 (0,32-1,62)	0,388	17(44,7)	17(38,6)	0,78 (0,29-2,06)	0,576
<i>IGFRI</i> 3129G>T (rs2016347)								
<i>TT</i>	12(41,4)	10(27,8)	1,00		9(47,4)	4(18,2)	1,00	
<i>TG+GG</i>	17(58,6)	26(72,2)	1,84 (0,58-5,91)	0,249	10(52,6)	18(81,8)	4,05 (0,82-1,30)	0,096
T аллель	36(62,1)	37(51,4)	1,00		24(63,2)	18(40,9)	1,00	
G аллель	22(37,9)	35(48,6)	0,65 (0,30-1,38)	0,222	14(36,8)	26(59,1)	2,48 (0,93-6,69)	0,016 <sup>1</sup>
Примечания								
1 <sup>1</sup> – значимые различия показателей в группе люминальный В								

Нами выявлены особенности распределения частот генотипов и аллелей генов рецепторов факторов роста у больных РМЖ в зависимости от молекулярного подтипа. Мы показали, что ТНРМЖ характеризуется высокой частотой встречаемости мутантного генотипа *EGFRCC*, преимущественно среди молодых пациенток. Полиморфные варианты гена *IGFR1* rs2016347 связаны с лимфогенными метастазами у больных данным подтипом. Люминальный А РМЖ ассоциирован с полиморфизмами генов *TGF-βR1* rs334354 и *KDR* rs2071559, причем высокая частота встречаемости мутантных вариантов гена *TGF-βR1* наблюдалась у больных без метастатического поражения регионарных лимфатических узлов. SNP rs2305948 гена *KDR* связан с агрессивным течением люминального В РМЖ. Обнаружена ассоциация полиморфизма гена *IGFR1* rs2016347 с гетерогенным распределением ERα, тогда как гомогенный характер распределения ERα был сопряжен с *TGF-βR1* rs334354 у больных люминальным В подтипом.

3.1.3 Ассоциация полиморфных вариантов генов апоптоза и репарации ДНК, генов факторов роста и рецепторов факторов роста, а также генов ферментов фолатного цикла с клинико-морфологическими параметрами у больных люминальным А, В и тройным негативным РМЖ

Проведено изучение комплекса полиморфных вариантов гена репарации ДНК *XRCC1* Arg399Gln (rs25487), гена-супрессора *TP53* (Ex4+119G>C rs1042522, IVS3+41ins16bp rs17878362, IVS6+62G>A rs1625895), гена трансформирующего ростового фактора бета 1 *TGF-β1* (-509C>T rs1800469, -29T>C rs1800470), гена сосудистого эндотелиального фактора роста *VEGF* -2578 C/A (rs699947), гена рецептора фактора роста фибробластов *FGFR2* (rs1219648, rs2981582), а также генов, вовлеченных в регуляцию фолатного цикла *MTHFR* (677C>T rs1801133, 1298A>C rs1801131), *MTR* 2756A>G (rs1805087), *DHFR* del19 (rs70991108), *MTHFD1* 1958G>A (rs2236225), *MTRR* 66G>A (rs1801394), *TS* (28-bp repeat rs34743033, 1494 6-bp deletion rs16430), *RFC1* 80G>A (rs1051266), *DNMT3b*

149C>T (rs2424913) в периферической крови у 429 больных раком молочной железы разных молекулярных подтипов.

При разделении больных по молекулярному подтипу опухоли статистически значимые различия были получены только для полиморфизма гена рецептора фактора роста фибробластов *FGFR2* rs1219648. Показано, что у женщин с люминальным подтипом чаще, чем у больных тройным негативным РМЖ встречаются мутантные генотипы *FGFR2GG* и аллели *FGFR2G* ( $p = 0,034$  и  $p = 0,021$ ; соответственно). Нами не было установлено существенных изменений в распределении генотипов и аллелей гена, снижающего концентрацию фолатов *RFC180G>A* и гена-онкосупрессора *TP53* между пациентами представленных подтипов, однако наблюдалась тенденция к повышению частот мутантных аллелей *RFC180A* и *TP53* IVS6+62A среди больных люминальным РМЖ ( $p = 0,075$  и  $p = 0,068$ , соответственно; Таблица 16).

Таблица 16 – Частота встречаемости полиморфных вариантов исследуемых генов у больных РМЖ в зависимости от молекулярного подтипа

Генотип/ аллель	РМЖ, n (%)		OR (95% CI)	P
	Люминальный общая	Тройной негативный		
<i>TP53</i> IVS6+62G>A (rs1625895)				
<i>GG</i>	166/234 (70,9)	33/39 (84,6)	0,00 (0,00-4,99)	0,592
<i>GA</i>	62/234 (26,5)	6/39 (15,4)		
<i>AA</i>	6/234 (2,6)	0/39 (0,0)		
G аллель	394 (84,2)	72 (92,3)	0,44 (0,17-1,11)	0,068
A аллель	74 (15,8)	6 (7,7)		
<i>FGFR2</i> (rs1219648)				
<i>AA</i>	93/350 (26,6)	32/79 (40,5)	0,45 (0,20-1,01)	0,034 <sup>1</sup>
<i>AG</i>	186/350 (53,1)	36/79 (45,6)		
<i>GG</i>	71/350 (20,3)	11/79 (13,9)		
A аллель	372 (53,1)	100 (63,3)	0,66 (0,45-0,95)	0,021 <sup>1</sup>
G аллель	328 (46,9)	58 (36,7)		
<i>RFC1</i> 80G>A (rs1051266)				
<i>GG</i>	48/154 (31,2)	14/28 (50,0)	0,45 (0,13-1,54)	0,152
<i>GA</i>	68/154 (44,2)	9/28 (32,1)		
<i>AA</i>	38/154 (24,6)	5/28 (17,9)		
G аллель	164 (53,2)	37 (66,1)	0,55 (0,31-1,10)	0,075
A аллель	144 (46,8)	19 (33,9)		
Примечания				
1 <sup>1</sup> – значимые различия показателей между группами люминальный и тройной негативный РМЖ				

Сравнительный анализ частот полиморфных вариантов генов репарации и апоптоза в зависимости от возраста показал увеличение частоты встречаемости вариантного генотипа гена *XRCC1* Arg399Gln rs25487 в старшей возрастной группе больных люминальным РМЖ по сравнению с группой пациенток моложе 50 лет (18,6% против 9,1%;  $p = 0,036$ ). Для полиморфизма гена *TP53* в четвертом экзоне обнаружена значимая взаимосвязь мутантного генотипа ( $p = 0,041$ ) и аллеля ( $p = 0,039$ ) с молодым возрастом у больных с тройным негативным фенотипом (Таблица 17). Для интронного полиморфизма *TP53*IVS3+41ins16bp rs17878362 выявлено преобладание гетерозигот среди женщин моложе 50 лет по сравнению с пациентками старше 50 лет, имеющих люминальный РМЖ ( $p = 0,036$ ). Схожая направленность изменений была определена при изучении полиморфизма гена *TP53* в шестом интроне, однако различия имели характер тенденции (Таблица 17).

Среди всех исследуемых вариантов генов факторов роста и рецепторов факторов роста найдены значимые ассоциации полиморфизма гена *VEGF*-2578 C/A rs69994 с возрастом больных эстроген-зависимым РМЖ. Показано, что у женщин репродуктивного возраста чаще, чем у больных более зрелого возраста встречаются как гетерозиготные, так и мутантные генотипы ( $p = 0,012$  и  $p = 0,021$ ; соответственно; Таблица 18).

Для полиморфных вариантов генов фолатзависимых ферментов метилентетрагидрофолатредуктазы *MTHFR* rs1801133 и дигидрофолатредуктазы *DHFR* rs70991108 выявлена тенденция к повышению частот встречаемости мутантных аллелей *MTHFR*-677T и гетерозигот *DHFR*ins/del в группах больных люминальным РМЖ старше 50 лет, по сравнению с группами пациенток до 50 лет ( $p = 0,099$  и  $p = 0,054$ ; соответственно, Таблица 18). Выявлена высокая частота встречаемости гетерозиготных генотипов *RFC1*-80GA гена, снижающего концентрацию фолатов у больных в возрастной категории 50 лет и старше, по отношению к пациенткам моложе 50 лет ( $p = 0,028$ ; Таблица 18).

Таблица 17 – Частота встречаемости полиморфных вариантов генов репарации ДНК и апоптоза у больных РМЖ в зависимости от возраста

Генотип/ аллель	Люминальный общая, n (%)				Тройной негативный, n (%)			
	≤ 50 лет	>50 лет	OR (95% CI)	P	≤ 50 лет	>50 лет	OR (95% CI)	P
<i>XRCC1</i> Arg399Gln (rs25487)								
<i>AA</i>	42 (38,2)	41 (31,8)	1,00		8 (38,1)	9 (40,9)	1,00	
<i>AG</i>	58 (52,7)	64 (49,6)	1,13 (0,32-2,05)	0,677	10 (47,6)	11 (50,0)	1,02 (0,23-4,47)	0,973
<i>GG</i>	10 (9,1)	24 (18,6)	2,46 (0,97-6,33)	0,036 <sup>1</sup>	3 (14,3)	2 (9,1)	0,59 (0,05-6,34)	0,500
A аллель	142 (64,5)	146 (56,6)	1,00		26 (61,9)	29 (65,9)	1,00	
G аллель	78 (35,5)	112 (43,4)	0,72 (0,49-1,05)	0,076	16 (38,1)	15 (34,1)	0,84 (0,32-2,22)	0,699
<i>TP53</i> Ex4+119G>C (rs1042522)								
<i>GG</i>	51 (45,9)	60 (45,8)	1,00		9 (39,1)	14 (60,9)	1,00	
<i>GC</i>	47 (42,3)	58 (44,3)	0,95 (0,54-1,69)	0,861	10 (43,5)	9 (39,1)	0,58 (0,14-2,35)	0,382
<i>CC</i>	13 (11,8)	13 (9,9)	0,85 (0,33-2,17)	0,709	4 (17,4)	0 (0,0)	0,00 (0,00-1,29)	0,041 <sup>2</sup>
G аллель	149 (67,1)	178 (67,9)	1,00		28 (60,9)	37 (80,4)	1,00	
C аллель	73 (32,9)	84 (32,1)	0,96 (0,65-1,44)	0,847	18 (39,1)	9 (19,6)	0,38 (0,13-1,06)	0,039 <sup>2</sup>
<i>TP53</i> IVS3+41ins16bp (rs17878362)								
<i>ww</i>	54 (67,5)	71 (81,6)	1,00		14 (87,5)	14 (82,4)	1,00	
<i>wm</i>	26 (32,5)	16 (18,4)	0,47 (0,21-1,01)	0,036 <sup>1</sup>	2 (12,5)	3 (17,6)	0,67 (0,06-6,16)	0,530
<i>mm</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	-		0 (0,0)	0 (0,0)	-	
w аллель	134 (83,8)	158 (90,8)	1,00		30 (93,8)	31 (91,2)	1,00	
m аллель	26 (16,2)	16 (9,2)	0,52 (0,25-1,06)	0,052	2 (6,2)	3 (8,8)	0,69 (0,07-5,61)	0,529
<i>TP53</i> IVS6+62G>A (rs1625895)								
<i>GG</i>	69 (65,1)	97 (75,8)	1,00		17 (89,5)	16 (80,0)	1,00	
<i>GA</i>	34 (32,1)	28 (21,9)	0,59 (0,31-1,10)	0,073	2 (10,5)	4 (20,0)	0,47 (0,05-3,08)	0,356
<i>AA</i>	3 (2,8)	3 (2,3)	0,71 (0,11-4,58)	0,696	0 (0,0)	0 (0,0)	-	
G аллель	172 (81,1)	222 (86,7)	1,00		36 (94,7)	36 (90,0)	1,00	
A аллель	40 (18,9)	34 (13,3)	0,66 (0,39-1,12)	0,099	2 (5,3)	4 (10,0)	0,50 (0,06-3,48)	0,362
Примечания								
1 <sup>1</sup> – значимые различия показателей в группе люминальный РМЖ								
2 <sup>2</sup> – значимые различия показателей в группе тройной негативный РМЖ								

Таблица 18 – Частота встречаемости полиморфных вариантов генов факторов роста и генов ферментов фолатного цикла у больных РМЖ в зависимости от возраста

Генотип/ аллель	Люминальный общая, n (%)				Тройной негативный, n (%)			
	≤ 50 лет	>50 лет	OR (95% CI)	P	≤ 50 лет	>50 лет	OR (95% CI)	P
<i>VEGF -2578 C/A</i> (rs699947)								
<i>CC</i>	15 (14,9)	36 (30,0)	1,00		6 (33,3)	5 (25,0)	1,00	
<i>CA</i>	55 (54,5)	54 (45,0)	2,44 (0,14-5,30)	0,012 <sup>1</sup>	9 (50,0)	11 (55,0)	1,47 (0,26-8,31)	0,611
<i>AA</i>	31 (30,6)	30 (25,0)	2,48 (1,06-5,87)	0,021 <sup>1</sup>	3 (16,7)	4 (20,0)	0,63 (0,06-6,16)	0,500
С аллель	85 (42,1)	126 (52,5)	1,00		21 (58,3)	21 (52,5)	1,00	
А аллель	117 (57,9)	114 (47,5)	0,66 (0,44-0,98)	0,029 <sup>1</sup>	15 (41,7)	19 (47,5)	0,79 (0,29-2,16)	0,610
<i>MTHFR 677C&gt;T</i> (rs1801133)								
<i>CC</i>	44 (59,5)	37 (46,3)	1,00		7 (50,0)	10 (71,4)	1,00	
<i>CT</i>	27 (36,5)	37 (46,3)	0,61 (0,30-1,25)	0,147	6 (42,9)	4 (28,6)	0,47 (0,07-2,97)	0,440
<i>TT</i>	3 (4,0)	6 (7,4)	0,42 (0,08-2,08)	0,199	1 (7,1)	0 (0,0)	0,00 (0,00-1,52)	0,444
С аллель	115 (77,7)	178 (67,9)	1,00		20 (71,4)	24 (85,7)	1,00	
Т аллель	33 (22,3)	84 (32,1)	0,65 (0,38-1,12)	0,099	8 (28,6)	4 (14,3)	0,42 (0,09-1,86)	0,192
<i>DHFR del19</i> (rs70991108)								
<i>ins/ins</i>	27 (36,5)	22 (27,5)	1,00		3 (21,4)	3 (21,4)	1,00	
<i>ins/del</i>	29 (39,2)	48 (60,0)	2,03 (0,92-4,49)	0,054	8 (57,1)	9 (64,3)	1,13 (0,12-1,31)	0,635
<i>del/del</i>	18 (24,3)	10 (12,5)	0,68 (0,23-1,96)	0,432	3 (21,5)	2 (14,3)	0,67 (0,03-3,47)	0,608
ins аллель	83 (56,1)	92 (57,5)	1,00		14 (50,0)	15 (53,6)	1,00	
del аллель	65 (43,9)	68 (42,5)	0,94 (0,59-1,52)	0,802	14 (50,0)	13 (46,4)	0,87 (0,27-2,82)	0,789
<i>RFC1 80G&gt;A</i> (rs1051266)								
<i>GG</i>	29 (39,2)	19 (23,8)	1,00		7 (50,0)	7 (50,0)	1,00	
<i>GA</i>	27 (36,5)	41 (51,2)	2,32 (1,02-5,30)	0,028 <sup>1</sup>	5 (35,7)	4 (28,6)	0,80 (0,11-5,85)	0,567
<i>AA</i>	18 (24,3)	20 (25,0)	0,59 (0,23-1,52)	0,227	2 (14,3)	3 (21,4)	0,67 (0,05-7,74)	0,556
G аллель	85 (57,4)	79 (49,4)	1,00		19 (67,9)	18 (64,3)	1,00	
A аллель	63 (42,6)	81 (50,6)	0,72 (0,45-1,16)	0,156	9 (32,1)	10 (35,7)	0,85 (0,24-2,97)	0,777
Примечания								
1 <sup>1</sup> – значимые различия показателей в группе люминальный РМЖ								

При изучении распределения генотипов исследуемых генов в зависимости от размера первичной опухоли было показано, что мутантные генотипы *VEGF*-2578AA и аллели *VEGF*-2578A гена сосудистого эндотелиального фактора роста чаще выявились среди пациенток с ранними стадиями (T<sub>1-2</sub>) люминального РМЖ по сравнению с группой T<sub>3-4</sub> (p = 0,026 и p = 0,014, соответственно; Таблица 19). Для SNP rs1800470 гена трансформирующего ростового фактора бета 1 найдена тенденция к увеличению частоты встречаемости мутантного генотипа *TGFβ1*-29CC среди пациенток люминальным подтипом рака с большим размером опухоли (T<sub>3-4</sub>) по сравнению с женщинами, имеющими опухоли T<sub>1-2</sub> (p = 0,073).

С поздними стадиями тройного негативного рака молочной железы оказались связаны мутантные генотипы гена *TGFβ1* rs1800469 (p = 0,002; Таблица 19).

Анализ полиморфных вариантов генов ферментов фолатного цикла показал, что носители гетерозиготных генотипов *TS1494* del/ins и мутантных аллелей *TS1494*ins гена тимидилатсинтетазы статистически значимо преобладали среди пациенток с поздними стадиями люминального рака молочной железы (56% и 44%, соответственно), чем среди таковых с T<sub>1-2</sub> (37,2% и 27,1%, соответственно; Таблица 20). Частота встречаемости гетерозиготных вариантов *DHFR*ins/del19 гена дигидрофолатредуктазы также была выше в группе больных с T<sub>3-4</sub>, однако различия не достигали статистической значимости (p = 0,059). Для полиморфизма в промоторной области гена тимидилатсинтетазы, напротив, наблюдалась тенденция к ассоциации с малым размером первичного опухолевого узла мутантных аллелей *TS2R* и генотипов *TS2R/2R* (p = 0,098 и p = 0,096; соответственно; Таблица 20).

В группе больных ТНРМЖ выявлено, что носители гетерозиготного генотипа *MTHFD1*1958GA гена метилентетрагидрофолатдегидрогеназы значимо чаще имели тенденцию к развитию T<sub>1-2</sub> опухолей (p = 0,029; Таблица 20).

Таблица 19 – Частота встречаемости полиморфных вариантов генов факторов роста у больных РМЖ в зависимости от размера опухоли

Генотип/ аллель	Люминальный общая, n (%)				Тройной негативный, n (%)			
	T <sub>1-2</sub>	T <sub>3-4</sub>	OR (95% CI)	P	T <sub>1-2</sub>	T <sub>3-4</sub>	OR (95% CI)	P
<i>TGFβ1-509C&gt;T</i> (rs1800469)								
<i>CC</i>	63 (39,4)	9 (29,0)	1,00		11 (37,9)	2 (28,6)	1,00	
<i>CT</i>	78 (48,8)	18 (58,1)	1,62 (0,63-4,20)	0,275	18 (62,1)	2 (28,6)	1,64 (0,14-9,91)	0,519
<i>TT</i>	19 (11,8)	4 (12,9)	0,68 (0,16-2,98)	0,509	0 (0,0)	3 (42,8)	0,00 (0,00-0,84)	0,002 <sup>2</sup>
С аллель	204 (63,8)	36 (58,1)	1,00		40 (69,0)	6 (42,9)	1,00	
Т аллель	116 (36,2)	26 (41,9)	0,79 (0,44-1,42)	0,397	18 (31,0)	8 (57,1)	0,34 (0,09-1,28)	0,069
<i>TGFβ1-29T&gt;C</i> (rs1800470)								
<i>TT</i>	58 (45,0)	10 (40,0)	1,00		10 (43,5)	2 (40,0)	1,00	
<i>TC</i>	65 (50,4)	11 (44,0)	0,98 (0,35-2,72)	0,969	11 (47,8)	2 (40,0)	0,91 (0,07-1,69)	0,672
<i>CC</i>	6 (4,6)	4 (16,0)	0,26 (0,05-1,34)	0,073	2 (8,7)	1 (20,0)	0,40 (0,01-7,75)	0,516
Т аллель	181 (70,2)	31 (62,0)	1,00		31 (67,4)	6 (60,0)	1,00	
С аллель	77 (29,8)	19 (38,0)	0,69 (0,35-1,37)	0,255	15 (32,6)	4 (40,0)	0,73 (0,15-3,67)	0,720
<i>VEGF -2578 C/A</i> (rs699947)								
<i>CC</i>	38 (20,8)	13 (34,2)	1,00		9 (30,0)	2 (25,0)	1,00	
<i>CA</i>	89 (48,6)	20 (52,6)	0,66 (0,28-1,57)	0,298	14 (46,7)	6 (75,0)	1,93 (0,25-7,72)	0,676
<i>AA</i>	56 (30,6)	5 (13,2)	3,83 (1,14-3,56)	0,026 <sup>1</sup>	7 (23,3)	0 (00,0)	0,00 (0,00-7,34)	0,497
С аллель	165 (45,1)	46 (60,5)	1,00		32 (53,3)	10 (62,5)	1,00	
А аллель	201 (54,9)	30 (39,5)	0,54 (0,31-0,91)	0,014 <sup>1</sup>	28 (46,7)	6 (37,5)	0,69 (0,19-2,41)	0,512
Примечания								
1 <sup>1</sup> – значимые различия показателей в группе люминальный РМЖ								
2 <sup>2</sup> – значимые различия показателей в группе тройной негативный РМЖ								

Таблица 20 – Частота встречаемости полиморфных вариантов генов ферментов фолатного цикла у больных РМЖ в зависимости от размера опухоли

Генотип/ аллель	Люминальный общая, n (%)				Тройной негативный, n (%)			
	T <sub>1-2</sub>	T <sub>3-4</sub>	OR (95% CI)	P	T <sub>1-2</sub>	T <sub>3-4</sub>	OR (95% CI)	P
<i>DHFR</i> del19 (rs70991108)								
<i>ins/ins</i>	45 (34,9)	4 (16,0)	1,00		5 (21,7)	1 (20,0)	1,00	
<i>ins/del</i>	61 (47,3)	16 (64,0)	2,95 (0,84-1,27)	0,059	14 (60,9)	3 (60,0)	1,07 (0,06-3,71)	0,729
<i>del/del</i>	23 (17,8)	5 (20,0)	0,41 (0,08-1,99)	0,272	4 (17,4)	1 (20,0)	0,80 (0,01-4,31)	0,727
<i>ins</i> аллель	151 (58,5)	24 (48,0)	1,00		24 (52,2)	5 (50,0)	1,00	
<i>del</i> аллель	107 (41,5)	26 (52,0)	1,53 (0,80-2,93)	0,169	22 (47,8)	5 (50,0)	0,92 (0,19-4,35)	0,587
<i>MTHFD1</i> 1958G>A (rs2236225)								
<i>GG</i>	41 (31,8)	9(36,0)	1,00		6 (26,1)	4 (80,0)	1,00	
<i>GA</i>	69 (53,5)	12 (48,0)	1,26 (0,44-3,57)	0,629	12 (52,2)	0 (00,0)	0,00 (0,00-1,10)	0,029 <sup>2</sup>
<i>AA</i>	19 (14,7)	4 (16,0)	0,96 (0,21-4,05)	0,614	5 (21,7)	1 (20,0)	0,30 (0,01-5,14)	0,588
<i>G</i> аллель	151 (58,5)	30 (60,0)	1,00		24 (52,2)	8 (80,0)	1,00	
<i>A</i> аллель	107 (41,5)	20 (40,0)	1,06 (0,55-2,06)	0,846	22 (47,8)	2 (20,0)	0,27 (0,04-1,64)	0,619
<i>TS</i> 28-bp repeat (rs34743033)								
<i>3R/3R</i>	37 (28,7)	10 (40,0)	1,00		9 (39,1)	1 (20,0)	1,00	
<i>3R/2R</i>	58 (45,0)	12 (48,0)	0,77 (0,27-2,15)	0,574	8 (34,8)	3 (60,0)	3,38 (0,22-4,36)	0,586
<i>2R/2R</i>	34 (26,3)	3 (12,0)	0,33 (0,06-1,45)	0,098	6 (26,1)	1 (20,0)	0,67 (0,01-1,09)	0,669
<i>3R</i> аллель	132 (51,2)	32 (64,0)	1,00		26 (56,5)	5 (50,0)	1,00	
<i>2R</i> аллель	126 (48,8)	18 (36,0)	0,59 (0,30-1,15)	0,096	20 (43,5)	5 (50,0)	0,77 (0,16-3,65)	0,738
<i>TS</i> 1494 6-bp deletion (rs16430)								
<i>del6/del6</i>	70 (54,3)	7 (28,0)	1,00		2 (8,7)	1 (20,0)	1,00	
<i>del6/ins6</i>	48 (37,2)	14 (56,0)	0,34 (0,11-1,00)	0,027 <sup>1</sup>	9 (39,1)	2 (40,0)	0,75 (0,06-9,66)	0,604
<i>ins6/ins6</i>	11 (8,5)	4 (16,0)	0,28 (0,06-1,35)	0,076	12 (52,2)	2 (40,0)	0,33 (0,01-4,55)	0,465
<i>del6</i> аллель	188 (72,9)	28 (56,0)	1,00		13 (28,3)	4 (40,0)	1,00	
<i>ins6</i> аллель	70 (27,1)	22 (44,0)	0,47 (0,24-0,92)	0,017 <sup>1</sup>	33 (71,7)	6 (60,0)	0,59 (0,12-3,03)	0,471
Примечания								
1 <sup>1</sup> – значимые различия показателей в группе люминальный РМЖ								
2 <sup>2</sup> – значимые различия показателей в группе тройной негативный РМЖ								

Анализ частот встречаемости аллельных вариантов генов репарации и апоптоза, генов ферментов фолатного цикла, а также генов факторов роста в зависимости от вовлеченности в опухолевый процесс лимфатических узлов выявил, что носители гетерозиготных генотипов и мутантных аллелей гена *TP53* IVS6+62G>A rs1625895, а также гена *FGFR2* rs1219648 преобладали среди пациенток люминальным подтипом рака молочной железы без метастазов в регионарные лимфатические узлы по отношению к группе сравнения (Таблица 21).

Высокая частота встречаемости вариантных генотипов *VEGF*-2578AA и аллелей *VEGF*-2578A гена сосудистого эндотелиального фактора роста была ассоциирована с более агрессивным течением тройного негативного рака молочной железы ( $p = 0,049$  и  $p = 0,024$ , соответственно; Таблица 21). Однако повышение частот встречаемости гетерозиготных генотипов *XRCC1*399AG было характерно для ТНРМЖ без метастатического поражения лимфатических узлов по сравнению с пациентками, имеющими распространенный опухолевый процесс (68,2% и 28,6%, соответственно;  $p = 0,024$ ).

Из восьми генов, вовлеченных в регуляцию фолатного цикла, наиболее значимые различия получены для гена тимидилатсинтетазы *TS* 14946-bpdeletion. Высокая частота встречаемости мутантных генотипов *TS* 1494ins/ins найдена среди больных люминальным РМЖ с лимфогенным метастазированием ( $p = 0,049$ ; Таблица 22). Подобная закономерность показана для носителей гетерозиготного варианта *DHFR*ins/del гена дигидрофолатредуктазы, однако, без статистической значимости ( $p = 0,084$ ).

Выявлена тенденция к увеличению частоты встречаемости мутантного аллеля *MTR*2756G гена метионинсинтазы среди женщин с тройным негативным фенотипом опухоли с метастатическим поражением регионарных лимфоузлов по сравнению с пациентками с локализованным процессом (34,6% и 13,3%, соответственно;  $p = 0,059$ ; Таблица 22).

Таблица 21 – Частота встречаемости полиморфных вариантов исследуемых генов в зависимости от наличия метастазов в регионарные лимфатические узлы

Генотип/ аллель	Люминальный общая, n (%)				Тройной негативный, n (%)			
	N <sub>0</sub>	N <sub>1-3</sub>	OR (95% CI)	P	N <sub>0</sub>	N <sub>1-3</sub>	OR (95% CI)	P
<i>XRCC1</i> Arg399Gln (rs25487)								
AA	38 (30,9)	45 (38,8)	1,00		5 (22,7)	12 (57,1)	1,00	
AG	67 (54,5)	55 (47,4)	0,69 (0,38-1,26)	0,199	15 (68,2)	6 (28,6)	6,00 (0,21-3,26)	0,024 <sup>2</sup>
GG	18 (14,6)	16 (13,8)	0,75 (0,31-1,80)	0,482	2 (9,1)	3 (14,3)	0,63 (0,05-7,69)	0,523
A аллель	143 (58,1)	145 (62,5)	1,00		25 (56,8)	30 (71,4)	1,00	
G аллель	103 (41,9)	87 (37,5)	0,83 (0,57-1,22)	0,329	19 (43,2)	12 (28,6)	0,53 (0,19-1,41)	0,158
<i>TP53</i> IVS6+62G>A (rs1625895)								
GG	77 (64,7)	89 (77,4)	1,00		15 (75,0)	18 (94,7)	1,00	
GA	38 (31,9)	24 (20,9)	0,55 (0,29-1,03)	0,045 <sup>1</sup>	5 (25,0)	1 (5,3)	0,17 (0,01-1,80)	0,181
AA	4 (3,4)	2 (1,7)	0,43 (0,05-2,85)	0,422	0 (0,0)	0 (0,0)	-	
G аллель	192 (80,7)	202 (87,8)	1,00		35 (87,5)	37 (97,4)	1,00	
A аллель	46 (19,3)	28 (12,2)	0,58 (0,34-0,99)	0,034 <sup>1</sup>	5 (12,5)	1 (2,6)	0,19 (0,01-1,82)	0,201
<i>VEGF</i> -2578 C/A (rs699947)								
CC	26 (22,8)	25 (23,4)	1,00		8 (40,0)	3 (16,7)	1,00	
CA	56 (49,1)	53 (49,5)	1,02 (0,50-2,08)	0,963	11 (55,0)	9 (50,0)	2,18 (0,35-1,45)	0,452
AA	32 (28,1)	29 (27,1)	0,94 (0,42-2,12)	0,876	1 (5,0)	6 (33,3)	0,06 (0,00-1,03)	0,049 <sup>2</sup>
C аллель	108 (47,4)	103 (48,1)	1,00		27 (67,5)	15 (41,7)	1,00	
A аллель	120 (52,6)	111 (51,9)	0,97 (0,66-1,43)	0,872	13 (32,5)	21 (58,3)	0,34 (0,12-0,97)	0,024 <sup>2</sup>
<i>FGFR2</i> (rs1219648)								
AA	33 (19,8)	60 (32,9)	1,00		19 (42,2)	12 (36,4)	1,00	
AG	97 (58,1)	88 (48,4)	2,00 (1,16-3,46)	0,008 <sup>1</sup>	21 (46,7)	15 (45,5)	1,13 (0,38-3,39)	0,806
GG	37 (22,1)	34 (18,7)	0,51 (0,26-1,00)	0,033 <sup>1</sup>	5 (11,1)	6 (18,1)	0,53 (0,11-2,57)	0,483
A аллель	163 (48,8)	208 (57,1)	1,00		59 (65,6)	39 (59,1)	1,00	
G аллель	171 (51,2)	156 (42,9)	0,71 (0,52-0,97)	0,027 <sup>1</sup>	31 (34,4)	27 (40,9)	0,76 (0,37-1,54)	0,409
Примечания								
1 <sup>1</sup> – значимые различия показателей в группе люминальный РМЖ								
2 <sup>2</sup> – значимые различия показателей в группе тройной негативный РМЖ								

Таблица 22 – Частота встречаемости полиморфных вариантов генов ферментов фолатного цикла в зависимости от наличия метастазов в регионарные лимфатические узлы

Генотип/ аллель	Люминальный общая, n (%)				Тройной негативный, n (%)			
	N <sub>0</sub>	N <sub>1-3</sub>	OR (95% CI)	P	N <sub>0</sub>	N <sub>1-3</sub>	OR (95% CI)	P
<i>MTR 2756A&gt;G</i> (rs1805087)								
<i>AA</i>	50 (61,0)	45 (62,5)	1,00		11 (73,3)	5 (57,7)	1,00	
<i>AG</i>	29 (35,4)	22 (30,6)	0,84 (0,40-1,77)	0,625	4 (27,7)	7 (53,8)	0,26 (0,04-1,69)	0,130
<i>GG</i>	3 (3,6)	5 (6,9)	0,54 (0,10-2,80)	0,479	0 (0,0)	1 (7,7)	0,60 (0,00-1,10)	0,353
A аллель	129 (78,7)	112 (77,8)	1,00		26 (86,7)	17 (65,4)	1,00	
G аллель	35 (21,3)	32 (22,2)	1,05 (0,59-1,87)	0,852	4 (13,3)	9 (34,6)	0,29 (0,06-1,27)	0,059
<i>DHFR del19</i> (rs70991108)								
<i>ins/ins</i>	30 (36,6)	19 (26,4)	1,00		2 (13,3)	4 (30,8)	1,00	
<i>ins/del</i>	35 (42,7)	42 (58,3)	1,89 (0,86-4,20)	0,084	10 (66,7)	7 (53,8)	2,86 (0,30-3,71)	0,371
<i>del/del</i>	17 (20,7)	11 (15,3)	0,98 (0,34-2,82)	0,965	3 (20,0)	2 (15,4)	0,33 (0,01-6,80)	0,567
ins аллель	95 (57,9)	80 (55,6)	1,00		14 (46,7)	15 (57,7)	1,00	
del аллель	69 (42,1)	64 (44,4)	0,91 (0,56-1,46)	0,675	16 (53,3)	11 (42,3)	0,64 (0,19-2,10)	0,410
<i>TS 1494 6-bp deletion</i> (rs16430)								
<i>del6/del6</i>	42 (51,2)	35 (48,6)	1,00		7 (46,7)	7 (53,8)	1,00	
<i>del6/ins6</i>	36 (43,9)	26 (36,1)	1,15 (0,56-2,40)	0,677	6 (40,0)	5 (38,5)	0,83 (0,13-5,39)	0,821
<i>ins6/ins6</i>	4 (4,9)	11 (15,3)	0,30 (0,07-1,16)	0,049 <sup>1</sup>	2 (13,3)	1 (7,7)	0,50 (0,01-1,32)	0,548
del6 аллель	120 (73,2)	96 (66,7)	1,00		20 (66,7)	19 (73,1)	1,00	
ins6 аллель	44 (26,8)	48 (33,3)	0,73 (0,44-1,23)	0,213	10 (33,3)	7 (29,9)	0,74 (0,20-2,69)	0,603
Примечания								
1 <sup>1</sup> – значимые различия показателей в группе люминальный РМЖ								

Таким образом, в ходе решения первой задачи было проведено генотипирование двух полиморфных вариантов гена эстрогенового рецептора *ESR1*2014G>A (rs2228480), *ESR1*+30T>C (rs2077647); семи полиморфных локусов генов рецепторов факторов роста *TGF-βR1* Int7G24A (rs334354), *KDR*-604T>C (rs2071559), *KDR* 1192G>A (rs2305948), *EGFR* (rs1468727), *IGFR1* 3129G>T(rs2016347), *FGFR2* (rs1219648, rs2981582); трех полиморфных вариантов генов факторов роста *TGF-β1*-509C>T (rs1800469), *TGF-β1*-29T>C (rs1800470), *VEGF*-2578C/A (rs699947); четырёх полиморфизмов генов репарации и апоптоза ДНК *XRCC1* Arg399Gln (rs25487), *TP53* (Ex4+119G>C rs1042522, IVS3+41ins16bp rs17878362, IVS6+62G>A rs1625895) и десяти полиморфизмов генов, вовлеченных в регуляцию фолатного цикла, *MTHFR* (677C>T rs1801133, 1298A>C (rs1801131), *MTR* 2756A>G (rs1805087), *DHFR* del19 (rs70991108), *MTHFD1* 1958G>A (rs2236225), *MTRR* 66G>A (rs1801394), *TS* (28-bp repeat rs34743033, 1494 6-bp deletion rs16430), *RFC1* 80G>A (rs1051266), *DNMT3b* 149C>T (rs2424913) у 573 больных раком молочной железы разных молекулярных подтипов.

Установлены наиболее значимые полиморфизмы, ассоциированные с разными молекулярными подтипами рака молочной железы: *FGFR2* (rs1219648) – для общей выборки эстроген-зависимых опухолей, *TGF-βR1* Int7G24A (rs334354) и *KDR*-604T>C (rs2071559) для люминального А подтипа, *ESR1*2014G>A (rs2228480) – для люминального В подтипа и *EGFR* (rs1468727) – для эстроген-независимого РМЖ.

Результаты изучения полиморфизмов исследуемых генов позволяют рассматривать *TP53*IVS3+41ins/del, *VEGF*-2578AA, *TS*1494 del/ins генотипы в качестве маркеров, ассоциированных с клинико-морфологическими признаками, характеризующими неблагоприятное клиническое течение эстроген-зависимого РМЖ (репродуктивный возраст, большой размер опухолевого узла, вовлеченность в процесс лимфоузлов, гетерогенный характер распределения эстрогеновых рецепторов в опухоли). Для люминального А подтипа наиболее существенным в плане неблагоприятного прогноза является *ESR1*+30CC аллельный вариант, для

люминального В - *KDR* 1192А и *IGFR1*3129G варианты. Эстроген-независимые опухоли с метастатическим поражением лимфатических узлов, которые имеют тенденцию к большему размеру опухолевого узла и чаще возникают в молодом возрасте, ассоциированы с носительством *TP53* Ex4+119С, *IGFR1* 3129TG+GG, *TGF-β1*-509ТТ и *VEGF*-2578AA полиморфных вариантов и мутантных аллелей гена *EGFR*.

На основании полученных данных с точки зрения клинически благоприятных признаков (небольшие размеры опухолевого узла, отсутствие метастатически пораженных лимфоузлов, гомогенный характер распределения рецепторов) для люминального А подтипа можно рассматривать *TGF-βR1* Int7G24GA+AA генотипы, для люминального В - *ESR1*2014А, *ESR1*+30С и *TGF-βR1* Int7G24А аллели. Для тройного негативного подтипа благоприятное клиническое течение ассоциировано с носительством *MTHFD1* 1958GA и *XRCC1* 399AG полиморфных вариантов.

### 3.2 Особенности белковой и генной экспрессии рецепторов ростовых факторов EGFR, TGF- $\beta$ R1, VEGFR2, IGF1R в образцах опухолевой и прилежащей нормальной ткани в зависимости от молекулярного подтипа РМЖ

В ходе выполнения второй задачи проанализирован профиль экспрессии мРНК генов рецепторов ростовых факторов и показатели экспрессии их белковых продуктов в опухолевой ткани у 153 больных РМЖ разных молекулярных подтипов. Высокий уровень экспрессии мРНК гена *EGFR* ( $8,68 \pm 4,39$ ) был характерен для больных люминальным А РМЖ по сравнению с люминальным В подтипом ( $0,45 \pm 0,17$ ;  $p = 0,038$ ; Рисунок 8А).

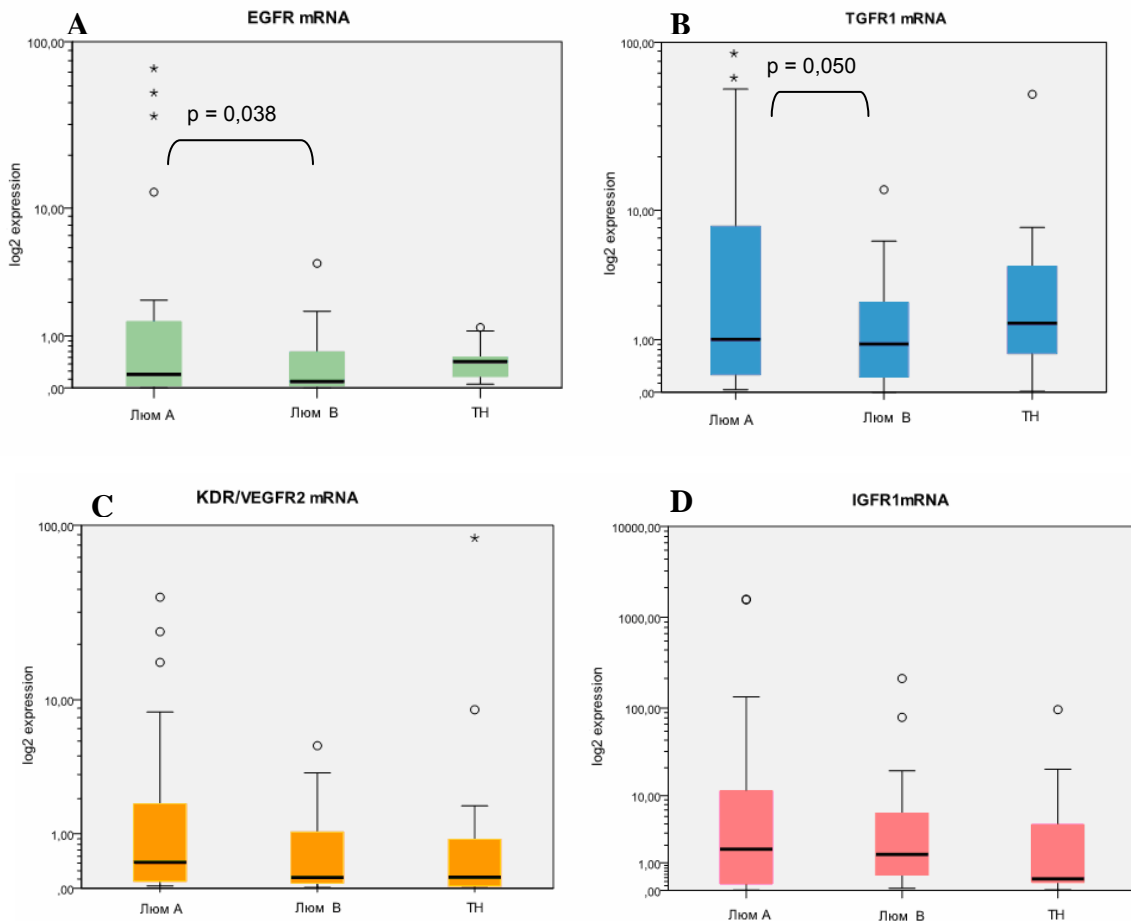


Рисунок 8 – Уровень экспрессии генов *EGFR* (А), *TGF- $\beta$ R1* (В), *KDR* (С), *IGF1* (D) в образцах опухолевой ткани у больных люминальным А (Люм А), люминальным В (Люм В) и тройным негативным (ТН) подтипом рака молочной железы. Результаты представлены в виде log<sub>2</sub> значений экспрессии

Кроме того, установлено, что у больных люминальным А подтипом уровень экспрессии гена *TGF-βRI* значимо выше ( $7,07 \pm 2,99$ ) по сравнению с люминальным В РМЖ ( $1,81 \pm 0,55$ ;  $p = 0,050$ ; Рисунок 8 В). Количественное содержание мРНК генов *KDR/VEGFR2* и *IGF1R* у больных РМЖ в зависимости от молекулярного подтипа значимо не различалось ( $p > 0,050$ ; Рисунок 8 С, D).

При анализе белковой экспрессии, позитивная экспрессия EGFR была выявлена у 85,7% пациенток с тройным негативным фенотипом опухоли по сравнению с 50,9% у больных люминальным А РМЖ ( $p = 0,001$ ; Рисунок 9). Кроме того, 78,2% женщин с положительной экспрессией VEGFR2 имели тройной негативный молекулярный подтип, тогда как только в 42,9% случаев экспрессия данного белка была позитивной при люминальном А РМЖ ( $p = 0,046$ ; Рисунок 9).

Статистически значимые различия также были получены при изучении экспрессии *TGF-βRI*. Однако в отличие от предыдущих данных, больший процент опухолей с позитивной экспрессией *TGF-βRI* был выявлен среди эстроген-позитивных пациенток как люминального А, так и В типа по сравнению с эстроген-негативным РМЖ ( $p = 0,003$  и  $p = 0,000$ ; соответственно, Рисунок 9).

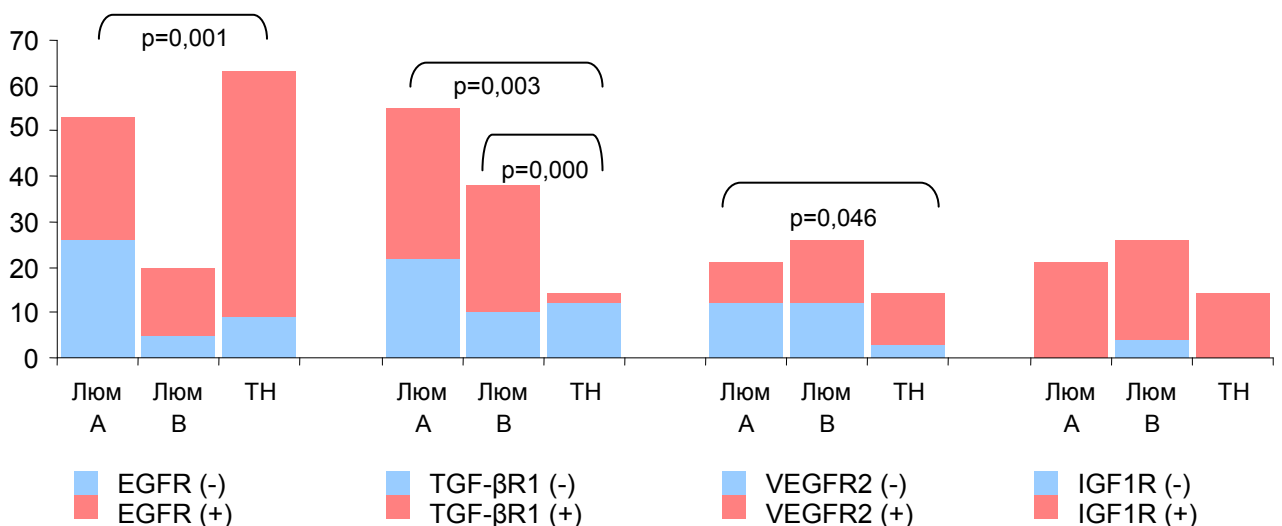


Рисунок 9 – Наличие экспрессии (позитивная/негативная) рецепторов факторов роста в образцах опухолевой ткани у больных люминальным А (Люм А), люминальным В (Люм В) и тройным негативным (ТН) подтипом рака молочной железы

Мы оценили процент экспрессии исследуемых белков у пациентов в зависимости от молекулярного фенотипа опухоли. Оказалось, что наиболее высокие показатели экспрессии EGFR ( $57,65 \pm 5,18$ ) были характерны для тройного негативного РМЖ по отношению к люминальному А ( $33,04 \pm 4,93$ ;  $p = 0,026$ , Рисунок 10). Опухоли с люминальным В фенотипом характеризовались высокими значениями экспрессии TGF- $\beta$ RI ( $23,91 \pm 3,78$ ) по сравнению с тройными негативными ( $2,03 \pm 0,53$ ;  $p = 0,007$ ). Следует обратить внимание на высокий процент позитивной белковой экспрессии IGF1R у больных РМЖ независимо от молекулярного подтипа. Однако статистически значимо высокие значения экспрессии IGF1R были найдены для люминального А ( $51,75 \pm 4,14$ ) нежели для тройного негативного РМЖ ( $36,87 \pm 4,51$ ;  $p = 0,033$ , Рисунок 10).

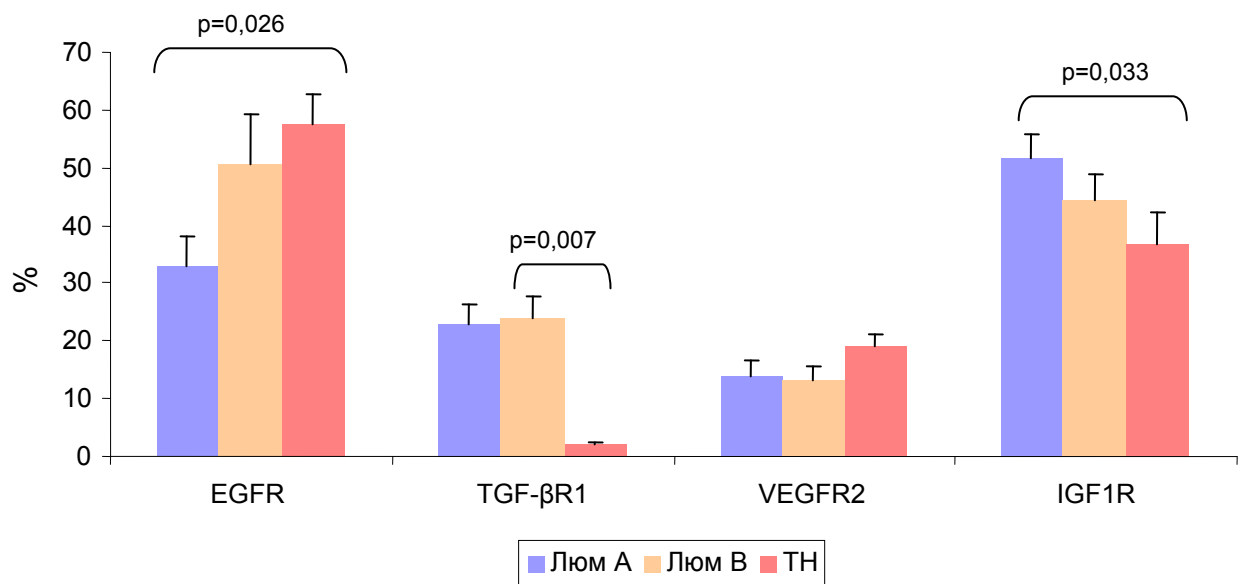


Рисунок 10 – Процент экспрессии рецепторов факторов роста в образцах опухолевой ткани у больных люминальным А (Люм А), люминальным В (Люм В) и тройным негативным (ТН) подтипом рака молочной железы

Для оценки связи белковой и генной экспрессии исследуемых рецепторов факторов роста нами был проведен корреляционный анализ Спирмена. Отрицательная корреляционная зависимость выявлена между уровнем экспрессии гена *TGF- $\beta$ RI* и уровнем экспрессии его белка как для люминального В ( $r = -0,44$ ;

$p = 0,024$ ), так и для тройного негативного рака молочной железы ( $r = -0,58$ ;  $p = 0,029$ , Рисунок 11).

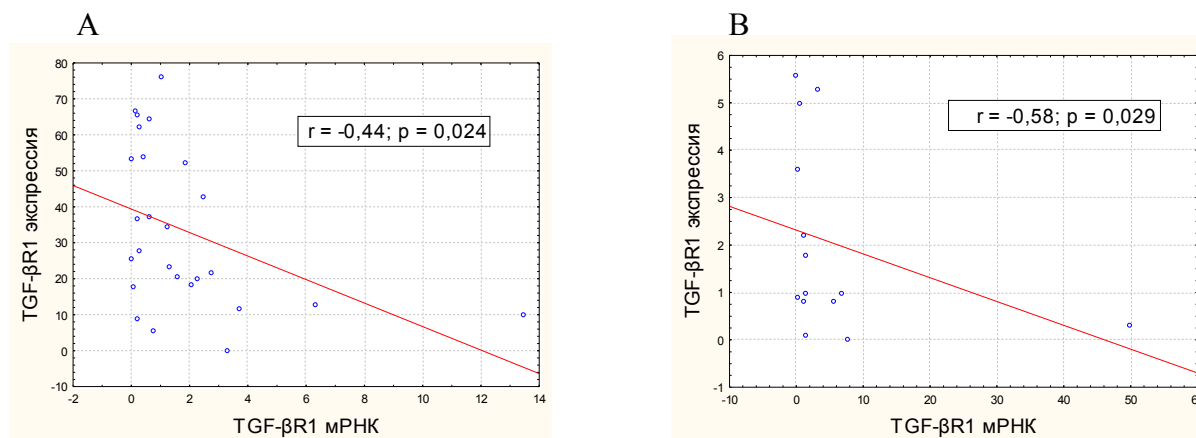


Рисунок 11 – Нелинейная зависимость между уровнем экспрессии гена *TGF-βR1* и его белка в группе больных люминальным В (А) и тройным негативным РМЖ (В)

Кроме того, проведен анализ белковой и генной экспрессии рецепторов ростовых факторов в зависимости от размера первичной опухоли, наличия лимфогенного метастазирования и характера распределения эстрогеновых рецепторов в опухоли.

Изучение особенностей экспрессии исследуемых генов в зависимости от размера опухоли выявило статистически значимые различия только для больных тройным негативным фенотипом. Показано, что высокий уровень экспрессии мРНК гена *TGF-βR1* наблюдался у больных с  $T_1$  ( $9,96 \pm 6,72$ ) по сравнению с пациентками с  $T_2$  ( $1,52 \pm 0,79$ ;  $p = 0,049$ ; Рисунок 12). В отношении экспрессии других исследуемых генов значимых ассоциаций с размером опухолевого узла получено не было. В этой группе пациентов процент опухолевых клеток, экспрессирующих белок TGF-βR1, также значимо различался в зависимости от размера опухоли. Однако в отличие от генной экспрессии *TGF-βR1*, высокий процент позитивной экспрессии его белка превалировал среди больных с  $T_2$  по сравнению с  $T_1$  ( $2,63 \pm 0,67$  и  $1,23 \pm 0,83$  соответственно;  $p = 0,046$ ; Таблица 23).

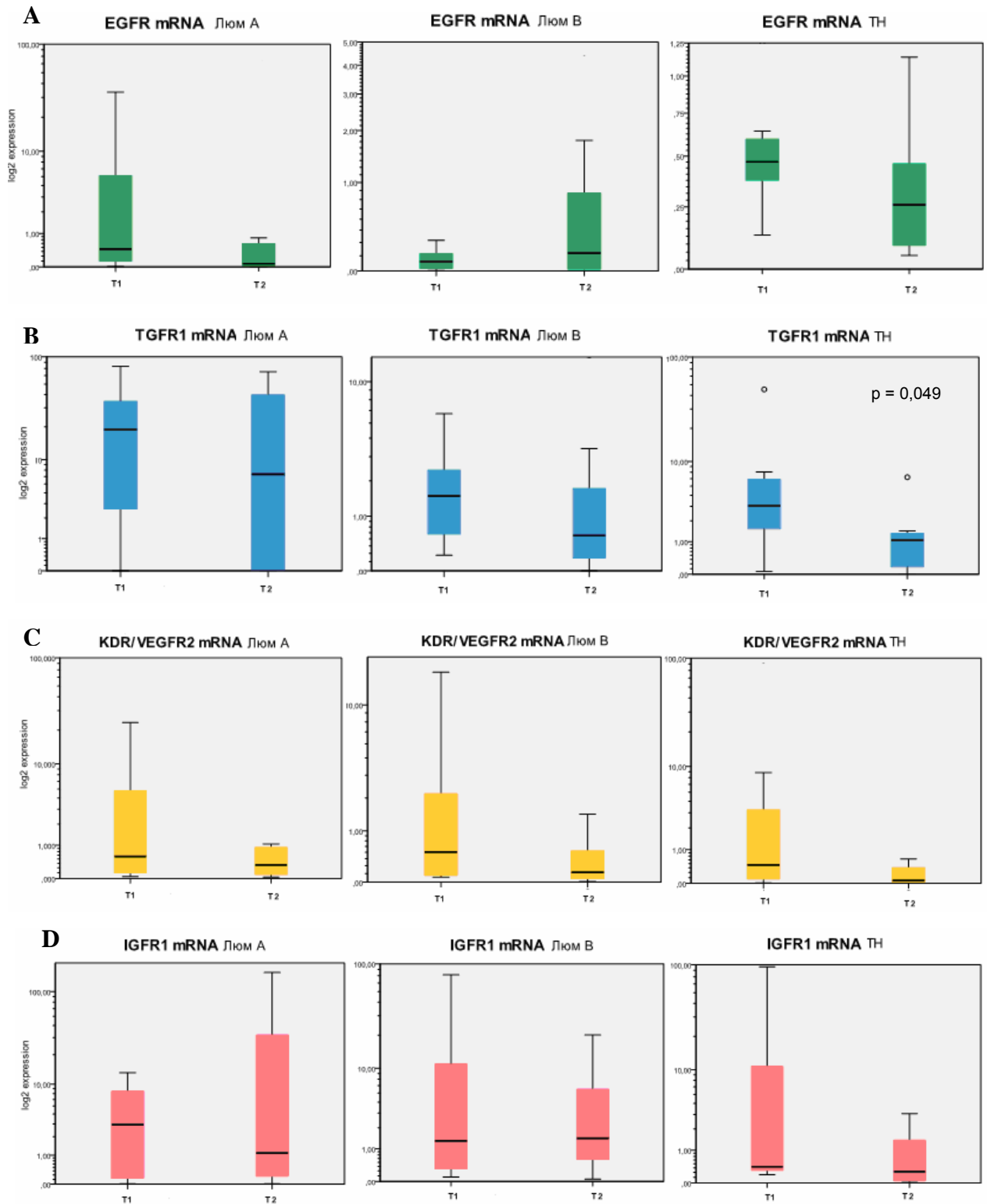


Рисунок 12 – Уровень экспрессии генов *EGFR* (A), *TGF-β1* (B), *KDR* (C), *IGFR1* (D) в зависимости от размера опухоли у больных люминальным А (Люм А), люминальным В (Люм В) и тройным негативным (ТН) подтипом рака молочной железы. Результаты представлены в виде log<sub>2</sub> значений экспрессии

Таблица 23 – Процент белковой экспрессии рецепторов факторов роста у больных разными молекулярными подтипами РМЖ в зависимости от размера первичной опухоли

Параметр	Люминальный А n=55			Люминальный В n=38			Тройной негативный n=60		
	T <sub>1</sub> M±m,%	T <sub>2</sub> M±m,%	P	T <sub>1</sub> M±m,%	T <sub>2</sub> M±m,%	P	T <sub>1</sub> M±m,%	T <sub>2</sub> M±m,%	P
EGFR	37,95± 7,41	27,96± 6,47	0,575	48,73± 12,11	53,00± 13,09	0,732	60,38± 16,11	58,08± 5,67	0,719
TGF-βR1	24,38± 4,68	21,76± 4,79	0,419	23,67± 6,48	24,08± 4,65	0,790	1,23± 0,83	2,63± 0,67	0,046 <sup>1</sup>
VEGFR2	10,01± 3,27	16,62± 4,34	0,477	14,10± 5,71	12,99± 1,98	0,504	20,47± 2,63	17,74± 3,77	0,519
IGF1R	47,08± 6,74	55,26± 5,19	0,394	46,35± 10,32	43,33± 5,03	0,331	45,52± 6,94	30,39± 5,14	0,121
Примечания									
1 <sup>1</sup> – значимые различия показателей в группе тройной негативный РМЖ									

Мы не обнаружили существенных различий по уровню экспрессии изучаемых генов у больных разных молекулярных подтипов в зависимости от вовлеченности в опухолевый процесс лимфатических узлов. Однако стоит отметить более высокий уровень экспрессии *TGF-βR1* у больных тройным негативным РМЖ без метастатического поражения регионарных лимфатических узлов по сравнению с пациентками с метастазами ( $8,03 \pm 5,29$  и  $1,60 \pm 1,08$  соответственно;  $p = 0,077$ ; Рисунок 13).

Анализ белковых продуктов генов *EGFR*, *TGF-βR1*, *VEGFR2*, *IGF1R* показал более выраженные изменения их экспрессии у больных тройным негативным и люминальным В РМЖ. Повышение процента TGF-βR1-позитивных клеток отмечено для больных ТНРМЖ при вовлечении в опухолевый процесс лимфатических узлов ( $p = 0,017$ ; Таблица 24). Для группы пациентов с люминальным В фенотипом опухоли, имеющих метастазы в лимфоузлы, определены тенденции к увеличению процента клеток, экспрессирующих белки EGFR и IGF1R ( $p = 0,088$  и  $p = 0,061$  соответственно; Таблица 24).

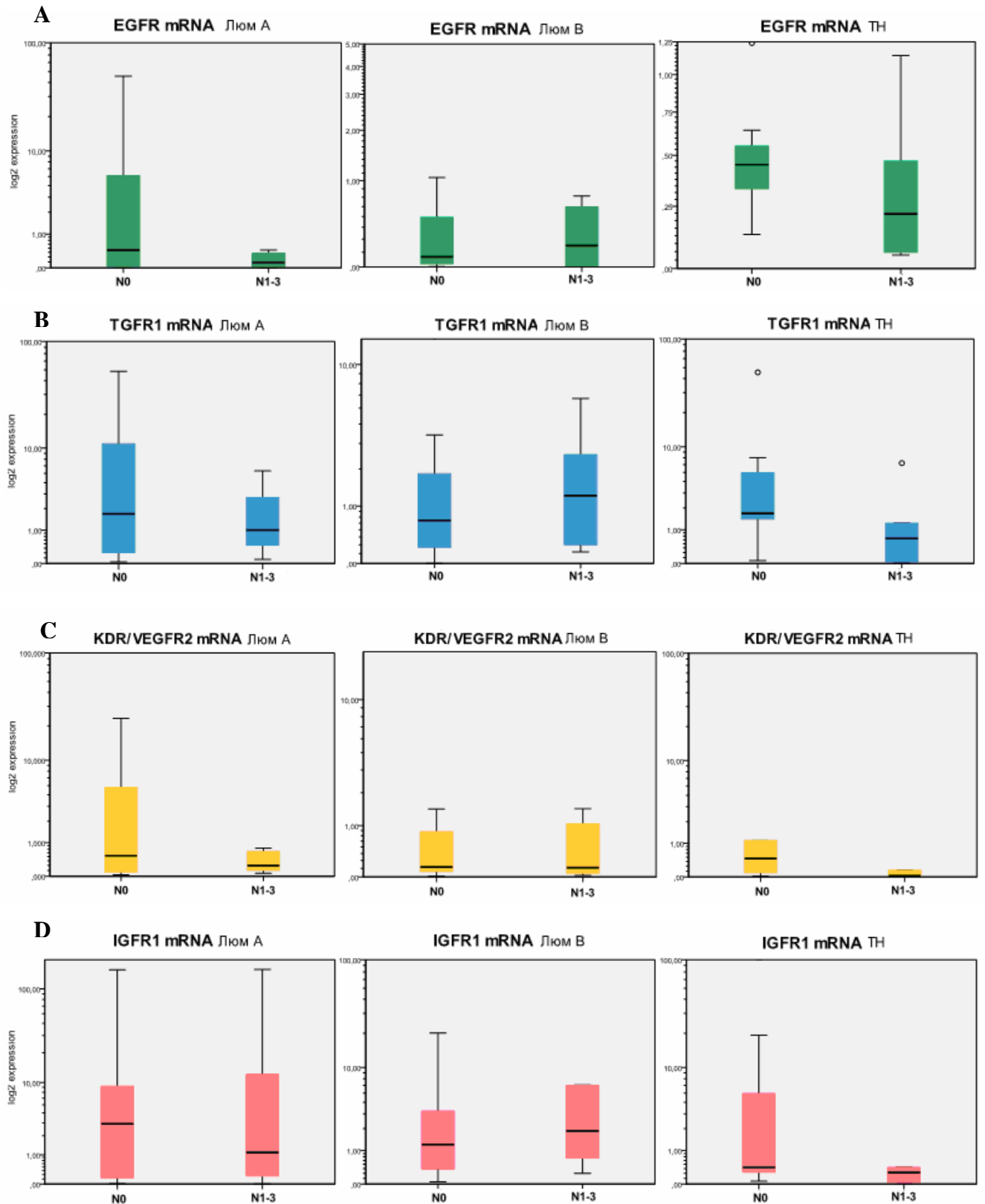


Рисунок 13 – Уровень экспрессии генов *EGFR* (A), *TGF-β1* (B), *KDR* (C), *IGFR1* (D) в зависимости от вовлеченности лимфатических узлов в опухолевый процесс у больных люминальным А (Люм А), люминальным В (Люм В) и тройным негативным (ТН) подтипом рака молочной железы. Результаты представлены в виде  $\log_2$  значений экспрессии

Таблица 24 – Процент белковой экспрессии рецепторов факторов роста у больных разными молекулярными подтипами РМЖ в зависимости от вовлеченности в опухолевый процесс лимфатических узлов

Параметр	Люминальный А n=55			Люминальный В n=38			Тройной негативный n=60		
	N <sub>0</sub> M±m,%	N <sub>1-2</sub> M±m,%	P	N <sub>0</sub> M±m,%	N <sub>1-2</sub> M±m,%	P	N <sub>0</sub> M±m,%	N <sub>1-2</sub> M±m,%	P
EGFR	29,59± 5,56	42,64± 10,33	0,229	36,69± 11,47	76,57± 4,40	0,088	56,38± 6,41	64,55± 8,23	0,486
TGF-βR1	22,18± 4,02	24,83± 6,05	0,795	25,97± 5,02	20,73± 5,79	0,531	1,15± 0,61	3,20± 0,75	0,017 <sup>1</sup>
VEGFR2	12,93± 3,69	14,93± 5,89	0,619	14,73± 3,20	11,11± 2,34	0,635	20,87± 2,92	16,38± 4,04	0,306
IGF1R	53,07± 5,25	50,00± 6,97	0,619	37,68± 6,20	54,79± 5,51	0,061	39,40± 6,51	33,50± 6,36	0,606

Примечания  
<sup>1</sup> – значимые различия показателей в группе тройной негативный РМЖ

Мы оценили особенности экспрессионного профиля изучаемых генов в зависимости от характера распределения ERα в опухоли у больных эстроген-положительным РМЖ. Оказалось, что количественное содержание мРНК генов *EGFR*, *TGF-βR1*, *KDR/VEGFR2* и *IGF1R* у больных люминальным А и В РМЖ не зависело от наличия данного маркера ( $p > 0,050$ ; Рисунок 14).

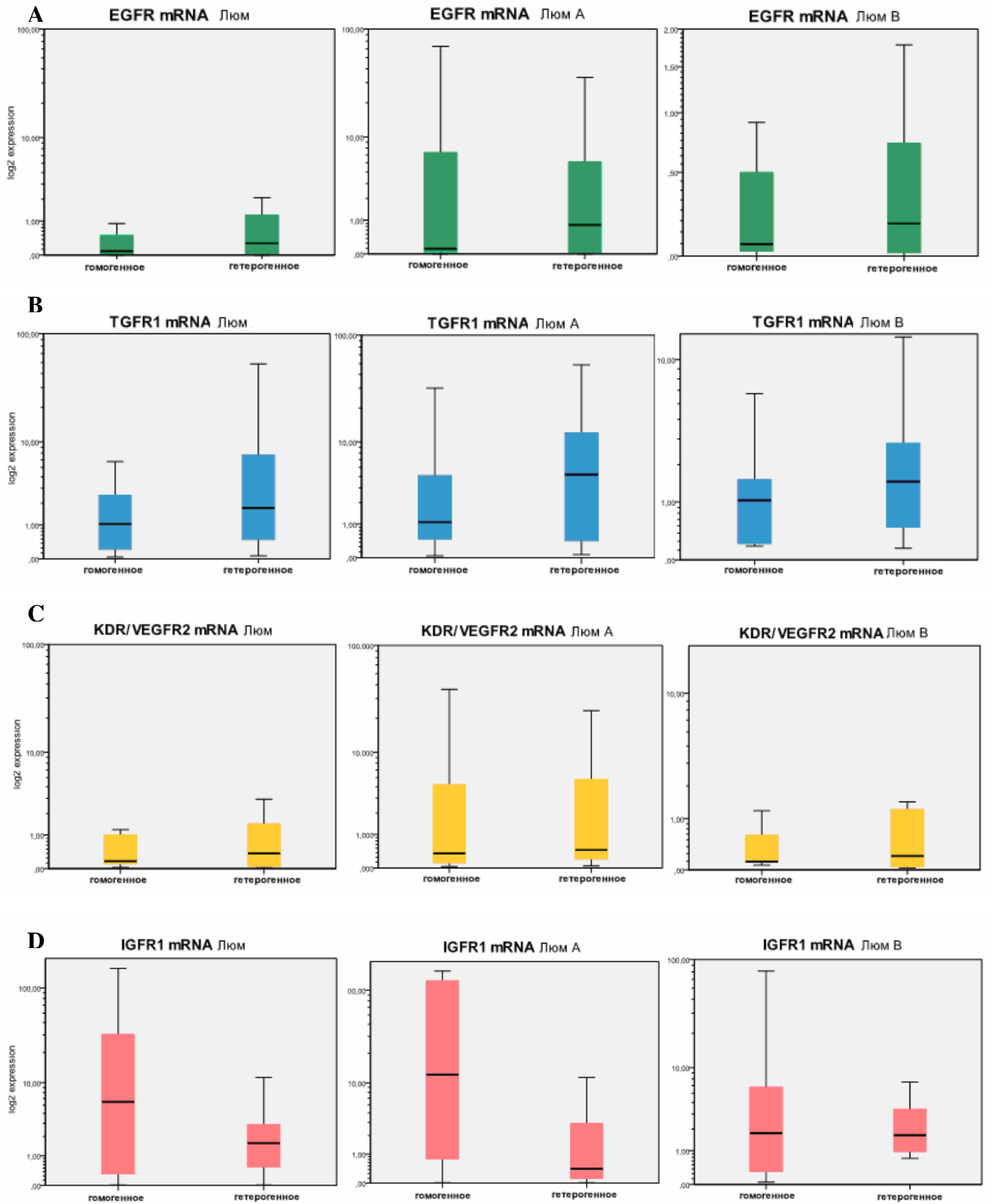


Рисунок 14 – Уровень экспрессии генов *EGFR* (A), *TGF-β1* (B), *KDR* (C), *IGFR1* (D) в зависимости от характера распределения ERα в опухоли у больных люминальным А (Люм А) и люминальным В (Люм В) раком молочной железы. Результаты представлены в виде log<sub>2</sub> значений экспрессии

Обращает на себя внимание высокий процент TGF- $\beta$ R1- позитивных клеток у больных с гомогенным распределением эстрогеновых рецепторов в опухолевой ткани, независимо от подтипа люминального РМЖ (Таблица 25).

Таблица 25 – Процент белковой экспрессии рецепторов факторов роста у больных эстроген-позитивным РМЖ в зависимости от характера распределения ER $\alpha$

Параметр	Люминальный РМЖ n=76			Люминальный А n=49			Люминальный В n=27		
	Гомогенное M $\pm$ m,%	Гетерогенное M $\pm$ m,%	P	Гомогенное M $\pm$ m,%	Гетерогенное M $\pm$ m,%	P	Гомогенное M $\pm$ m,%	Гетерогенное M $\pm$ m,%	P
EGFR	48,07 $\pm$ 7,53	31,87 $\pm$ 5,19	0,073	40,00 $\pm$ 9,26	29,15 $\pm$ 5,68	0,296	67,25 $\pm$ 10,66	39,58 $\pm$ 11,85	0,120
TGF- $\beta$ R1	27,89 $\pm$ 4,48	15,79 $\pm$ 3,16	0,028 <sup>1</sup>	27,76 $\pm$ 5,54	16,34 $\pm$ 4,07	0,085	28,12 $\pm$ 7,99	14,74 $\pm$ 5,08	0,079
VEGFR2	9,87 $\pm$ 3,38	12,41 $\pm$ 1,88	0,516	12,08 $\pm$ 6,04	12,54 $\pm$ 2,41	0,203	7,34 $\pm$ 2,57	12,29 $\pm$ 2,97	0,164
IGF1R	44,50 $\pm$ 6,14	44,49 $\pm$ 6,04	0,933	49,60 $\pm$ 7,66	47,03 $\pm$ 7,77	0,999	38,67 $\pm$ 9,99	42,26 $\pm$ 9,49	0,777
Примечания									
1 <sup>1</sup> – значимые различия показателей в группе люминальный РМЖ									

В литературных источниках представлены единичные исследования относительно количественного распределения содержания мРНК гена *EGFR* в опухоли больных РМЖ при разных молекулярных подтипах. Показано, что высокий уровень экспрессии гена *EGFR* ассоциирован с тройным негативным фенотипом опухоли [148]. Выявлена корреляционная взаимосвязь между мРНК гена *EGFR* и его белковым продуктом у больных тройным негативным РМЖ [303]. Исследованиям белковой экспрессии *EGFR* у больных разными молекулярными подтипами РМЖ уделено больше внимания, в частности, показано, что уровень экспрессии *EGFR* максимален при ТНРМЖ и достигает 42-76% [37, 43, 115, 116, 235]. Для подтипов люминального РМЖ представлены противоречивые данные, касающиеся изучения количественного определения экспрессии *EGFR*. Имеются исследования, демонстрирующие как высокие показатели уровня экспрессии *EGFR* у больных люминальным В подтипом по

сравнению с люминальным А, так и отсутствие значимых ассоциаций в зависимости от экспрессии этого белка [91, 154].

Литературные данные об экспрессии гена *TGF-βRI* и его белкового продукта при раке молочной железы немногочисленны, в основном, представленные исследования проводятся в общих группах больных без учета молекулярного подтипа опухоли, касаются или количественного распределения содержания мРНК, либо полуколичественной оценки белка в опухоли [178, 349]. Лишь в одном представленном исследовании показана вариабельность белковой и генной экспрессии рецепторов трансформирующего ростового фактора β1 при разных молекулярных подтипах РМЖ. Согласно Nachim et al., высокое количественное содержание мРНК гена *TGF-βRI* было характерно для HER2-позитивного РМЖ, тогда как для базально-подобного и люминального В фенотипа – низкое [10]. В отношении белковой экспрессии показан высокий процент позитивной *TGF-βRI* экспрессии для больных люминальным А (73,7%) и В (81,8%) подтипами и более низкий процент *TGF-βRI*-экспрессирующих клеток для тройного негативного подтипа (54,5%), что соотносится с полученными нами данными. Кроме того, авторами выявлены корреляции между уровнем белковой экспрессии *TGF-βRI* и размерами первичной опухоли, однако данные представлены для группы больных РМЖ без учета молекулярного фенотипа.

Таким образом, в результате изучения белковой и генной экспрессии рецепторов ростовых факторов нами продемонстрирована вариабельность экспрессии при различных подтипах рака молочной железы, что определяет их различный вклад в механизмы развития рака молочной железы. Выявлено, что люминальный А подтип характеризуется высоким уровнем экспрессии двух генов *EGFR* и *TGF-βRI*, а также высоким уровнем экспрессии белка IGF1R. Для люминального В РМЖ показан высокий уровень белковой экспрессии *TGF-βRI*; как для люминального А, так и люминального В подтипов выявлен высокий процент клеток с позитивной экспрессией белка *TGF-βRI*, который связан с гомогенным характером распределения ERα в опухоли. Тройной негативный РМЖ ассоциирован с высоким числом *EGFR*-позитивных/*VEGFR2*-позитивных

клеток и высоким уровнем экспрессии белка EGFR. Высокая экспрессия мРНК *TGF-βRI* у больных данным молекулярным типом рака связана с клинически более благоприятными факторами (минимальный размер опухоли, отсутствие регионарных метастазов), тогда как высокие показатели экспрессии белка TGF-βRI могут рассматриваться в качестве неблагоприятных прогностических маркеров, что свидетельствует о возможной внутригрупповой гетерогенности.

### 3.3 Особенности внутриклеточной экспрессии белков Akt (pS473) и PTEN в опухолевой ткани в зависимости от молекулярного подтипа РМЖ

С целью оценки возможности активации PI3K/Akt/mTOR сигнального пути, проведен анализ внутриклеточной экспрессии его ключевых белков – фосфорилированной формы Akt1 – Akt (pS473) и фосфатазы PTEN. Установлено, что средний процент клеток, экспрессирующих Akt (pS473) в эстроген-зависимых опухолях примерно одинаков и составляет  $53,75 \pm 5,92\%$  при люминальном А подтипе и  $52,61 \pm 5,19\%$  при люминальном В, что значительно превосходит их число при эстроген-независимом раке ( $2,46 \pm 0,97$ ;  $p = 0,000$  и  $p = 0,000$ , соответственно). Относительное количество клеток, экспрессирующих PTEN выше в опухолях с тройным негативным фенотипом ( $32,45 \pm 1,63$ ) как по сравнению с люминальными А ( $8,66 \pm 2,82$ ), так и люминальным В РМЖ ( $10,75 \pm 2,57$ ;  $p = 0,000$  и  $p = 0,000$ , соответственно; Рисунок 15).

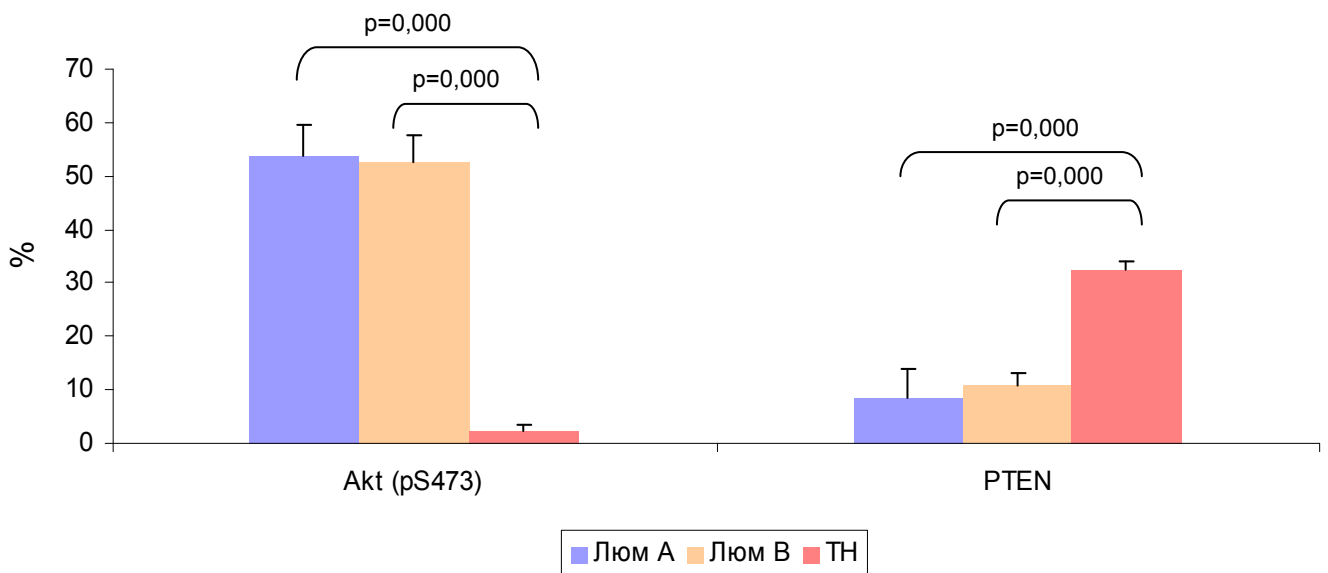


Рисунок 15 – Процент экспрессии Akt (pS473) и PTEN в образцах опухолевой ткани больных люминальным А (Люм А), люминальным В (Люм В) и тройным негативным (ТН) подтипом рака молочной железы

Снижение пропорции клеток, экспрессирующих PTEN и как, следствие, повышение числа клеток с экспрессией активной формы Akt1, выявленное нами, свидетельствует об активации PI3K/Akt/mTOR при эстроген-зависимом РМЖ.

Для определения вклада в реализацию сигнального пути рецепторов ростовых факторов, как их вышестоящих эффекторов, мы оценили экспрессию субпопуляций клеток, несущих комбинацию маркеров VEGFR2/Akt(pS473) и IGF1R/Akt(pS473). Выявлено, что число клеток, экспрессирующих IGF1R<sup>-</sup>/Akt(pS473)<sup>+</sup> выше в эстроген-зависимых опухолях по отношению к эстроген-независимым ( $p = 0,000$  и  $p = 0,000$ ; соответственно). Кроме того, для люминальных опухолей, независимо от подтипа, был характерен высокий процент VEGFR2<sup>-</sup>/Akt(pS473)<sup>+</sup> клеток, тогда как среди тройных негативных опухолей преобладала популяция VEGFR2<sup>+</sup>/Akt(pS473)<sup>-</sup> клеток (Таблица 26).

Таблица 26 – Средний процент субпопуляций клеток, экспрессирующих комбинации маркеров IGF1R/Akt(pS473) и VEGFR2/Akt(pS473) у больных разными молекулярными подтипами РМЖ

Параметр	Процент экспрессии, M±m,%		
	Люминальный А n=21	Люминальный В n=26	Тройной негативный n=14
IGF1R <sup>-</sup> /Akt(pS473) <sup>+</sup>	46,56±5,53 p=0,000 <sup>1</sup>	46,73±4,79 p=0,000 <sup>2</sup>	1,54±0,76
IGF1R <sup>+</sup> /Akt(pS473) <sup>-</sup>	0,05±0,00	0,00±0,00	0,28±0,22
IGF1R <sup>+</sup> /Akt(pS473) <sup>+</sup>	0,40±0,18	0,80±0,38	0,05±0,05
IGF1R <sup>-</sup> /Akt(pS473) <sup>-</sup>	53,03±5,57	53,17±4,85	98,07±0,78
VEGFR2 <sup>-</sup> /Akt(pS473) <sup>+</sup>	19,45±3,43 p=0,000 <sup>1</sup>	21,90±3,11 p=0,000 <sup>2</sup>	0,39±0,10
VEGFR2 <sup>+</sup> /Akt(pS473) <sup>-</sup>	12,11±2,63 p=0,032 <sup>1</sup>	9,75±1,86 p=0,004 <sup>2</sup>	21,19±2,07
VEGFR2 <sup>+</sup> /Akt(pS473) <sup>+</sup>	7,19±2,24 p=0,032 <sup>1</sup>	6,46±1,07 p=0,004 <sup>2</sup>	0,89±0,29
VEGFR2 <sup>-</sup> /Akt(pS473) <sup>-</sup>	63,18±3,62	61,92±3,10	77,52±2,11

Примечания  
<sup>1</sup> – значимые различия показателей между группами люминальный А и тройной негативный РМЖ  
<sup>2</sup> – значимые различия показателей между группами люминальный В и тройной негативный РМЖ

Следует обратить внимание на высокое количество клеток с двойным позитивным фенотипом  $VEGFR2^+/Akt(pS473)^+$  в опухоли у больных люминальным А и В подтипами по сравнению с тройным негативным РМЖ ( $p = 0,032$  и  $p = 0,004$ ; соответственно). Можно предположить, что активация PI3K/Akt/mTOR каскада в эстроген-зависимом раке молочной железы происходит, в том числе, и за счет вовлечения в каскад рецептора сосудистого эндотелиального фактора роста.

Для поиска взаимосвязи исследуемых маркеров с особенностями клинического течения различных молекулярных подтипов рака молочной железы мы проанализировали их экспрессию в зависимости от размера опухоли, уровня лимфогенного метастазирования и характера распределения ER $\alpha$ . Однако каких-либо значимых ассоциаций не было найдено (Рисунок 16).

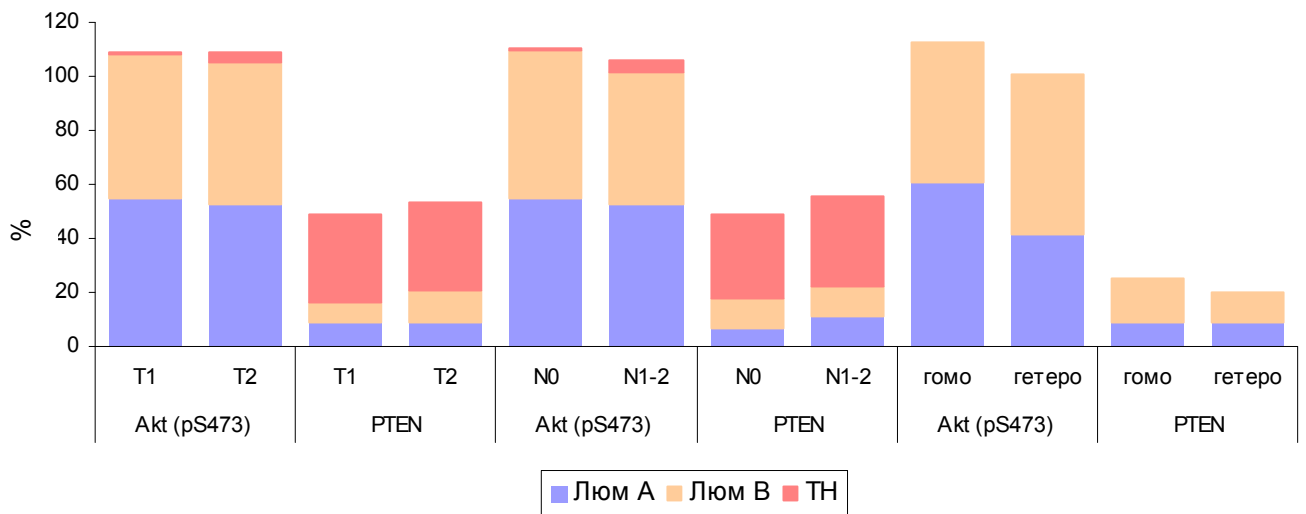


Рисунок 16 – Процент экспрессии Akt(pS473) и PTEN в образцах опухолевой ткани больных люминальным А (Люм А), люминальным В (Люм В) и тройным негативным (ТН) подтипом рака молочной железы в зависимости от основных клинико-морфологических параметров

Тем не менее, субпопуляция клеток, экспрессирующих двойной позитивный фенотип  $IGF1R^+/Akt(pS473)^+$  чаще выявлялась в опухоли больных люминальным А подтипом и размером опухолевого узла до 5 см по сравнению с новообразованиями, не превышающими 2 см в диаметре ( $p = 0,055$ ; Таблица 27).

Таблица 27 – Средний процент субпопуляций клеток, экспрессирующих комбинации маркеров IGF1R/Akt(pS473) и VEGFR2/Akt(pS473) у больных РМЖ в зависимости от размера опухоли

Параметр	Процент экспрессии, М±m,%					
	Люминальный А n=21		Люминальный В n=26		Тройной негативный n=14	
	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>
IGF1R <sup>-</sup> /Akt(pS473) <sup>+</sup>	47,73±7,92	45,68±7,90	48,72±9,99	45,84±5,48	0,63±0,76	0,28±0,22
	p=0,722		p=0,912		p=0,999	
IGF1R <sup>+</sup> /Akt(pS473) <sup>-</sup>	0,00±0,00	0,10±0,03	0,00±0,00	0,00±0,00	0,52±0,51	0,10±0,10
	p=0,386				p=0,846	
IGF1R <sup>+</sup> /Akt(pS473) <sup>+</sup>	0,00±0,00	0,71±0,28	0,05±0,05	1,13±0,54	0,00±0,00	0,09±0,08
	p=0,055		p=0,102		p=0,699	
IGF1R <sup>-</sup> /Akt(pS473) <sup>-</sup>	52,27±7,97	53,61±8,00	51,24±10,08	54,02±5,58	98,72±0,44	97,59 ±1,33
	p=0,722		p=0,956		p=0,606	
VEGFR2 <sup>-</sup> /Akt(pS473) <sup>+</sup>	17,52±4,01	20,91±5,32	26,08±5,78	20,05±3,72	0,35±0,22	0,43±0,09
	p=0,999		p=0,389		p=0,245	
VEGFR2 <sup>+</sup> /Akt(pS473) <sup>-</sup>	7,49±3,15	15,58±3,74	11,73±4,99	8,87±1,63	20,15±2,75	21,96±3,11
	p=0,135		p=0,677		p=0,747	
VEGFR2 <sup>+</sup> /Akt(pS473) <sup>+</sup>	3,77±1,09	9,77±3,73	6,81±1,38	6,31±1,45	0,97±0,64	0,83±0,24
	p=0,200		p=0,374		p=0,439	
VEGFR2 <sup>-</sup> /Akt(pS473) <sup>-</sup>	71,20±4,71	57,17±4,67	55,45±4,58	64,79±3,88	78,53±3,15	76,76 ±3,01
	p=0,064		p=0,148		p=0,699	

Ряд тенденций найден и для популяций клеток, несущих комбинацию маркеров VEGFR2/Akt(pS473). Число опухолевых клеток, экспрессирующих VEGFR2<sup>-</sup>/Akt(pS473)<sup>+</sup> было выше у больных люминальным В РМЖ при наличии метастазов в лимфатические узлы (29,13 ± 3,44) по сравнению с пациентками без метастатического поражения лимфоузлов (17,39 ± 4,28; p = 0,065). Эстроген-независимые опухоли в условиях наличия поражения лимфатических узлов характеризовались более высоким процентом клеток, экспрессирующих оба маркера VEGFR2<sup>+</sup>/Akt(pS473)<sup>+</sup> по отношению к опухолям без метастатического поражения (p = 0,053; Таблица 28).

Таблица 28 – Средний процент субпопуляций клеток, экспрессирующих комбинации маркеров IGF1R/Akt(pS473) и VEGFR2/Akt(pS473) у больных РМЖ в зависимости от вовлеченности в опухолевый процесс лимфатических узлов

Параметр	Процент экспрессии, М±m,%					
	Люминальный А n=21		Люминальный В n=26		Тройной негативный n=14	
	N <sub>0</sub>	N <sub>1-2</sub>	N <sub>0</sub>	N <sub>1-2</sub>	N <sub>0</sub>	N <sub>1-2</sub>
IGF1R <sup>-</sup> /Akt(pS473) <sup>+</sup>	47,70±6,82	45,03±9,61	50,37±6,14	40,90±7,72	0,58±0,25	2,83±1,67
	p=0,722		p=0,343		p=0,747	
IGF1R <sup>+</sup> /Akt(pS473) <sup>-</sup>	0,01±0,08	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,39±0,39	0,13±0,10
	p=0,386				p=0,948	
IGF1R <sup>+</sup> /Akt(pS473) <sup>+</sup>	0,36±0,20	0,47±0,33	1,26±0,60	0,05±0,04	0,00±0,00	0,12±0,12
	p=0,789		p=0,120		p=0,606	
IGF1R <sup>-</sup> /Akt(pS473) <sup>-</sup>	51,93±6,85	54,50±9,72	49,48±6,23	59,06±7,73	98,94±0,36	96,92 ±1,72
	p=0,722		p=0,292		p=0,796	
VEGFR2 <sup>-</sup> /Akt(pS473) <sup>+</sup>	21,37±5,56	16,91±3,26	17,39±4,28	29,13±3,44	0,33±0,17	0,48±0,09
	p=0,644		p=0,065		p=0,138	
VEGFR2 <sup>+</sup> /Akt(pS473) <sup>-</sup>	12,42±3,33	11,71±4,46	11,71±2,56	6,61±2,42	20,48±3,02	22,13±2,95
	p=0,669		p=0,206		p=0,651	
VEGFR2 <sup>+</sup> /Akt(pS473) <sup>+</sup>	3,85±0,78	11,71±4,46	5,62±1,03	7,81±2,28	0,75±0,49	1,07±0,24
	p=0,319		p=0,414		p=0,053	
VEGFR2 <sup>-</sup> /Akt(pS473) <sup>-</sup>	62,35±4,20	64,29±6,60	65,33±3,98	56,45±4,69	78,44±3,16	76,30 ±2,84
	p=0,722		p=0,170		p=0,606	

Кроме того, экспрессия клеток с двойным позитивным фенотипом VEGFR2<sup>+</sup>/Akt(pS473)<sup>+</sup> чаще встречалась у больных люминальным А раком молочной железы с гомогенным характером распределения эстрогеновых рецепторов (12,01 ± 4,81), нежели в опухолях с гетерогенным распределением (2,76 ± 0,47), однако различия не достигали статистической значимости (p = 0,064; Таблица 29).

Таблица 29 – Средний процент субпопуляций клеток, экспрессирующих комбинации маркеров IGF1R/Akt(pS473) и VEGFR2/Akt(pS473) у больных эстроген-зависимым РМЖ в зависимости от характера распределения ER $\alpha$

Параметр	Процент экспрессии, M $\pm$ m,%					
	Люминальный РМЖ n=47		Люминальный А n=21		Люминальный В n=26	
	гомо	гетеро	гомо	гетеро	гомо	гетеро
IGF1R <sup>-</sup> /Akt(pS473) <sup>+</sup>	49,14 $\pm$ 6,38	45,94 $\pm$ 4,93	50,86 $\pm$ 9,87	35,29 $\pm$ 5,40	46,93 $\pm$ 8,00	55,26 $\pm$ 6,54
	p=0,752		p=0,315		p=0,355	
IGF1R <sup>+</sup> /Akt(pS473) <sup>-</sup>	0,006 $\pm$ 0,006	0,00 $\pm$ 0,00	0,001 $\pm$ 0,001	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
	p=0,767		p=0,378			
IGF1R <sup>+</sup> /Akt(pS473) <sup>+</sup>	0,46 $\pm$ 0,23	0,74 $\pm$ 0,37	0,62 $\pm$ 0,37	0,33 $\pm$ 0,21	0,24 $\pm$ 0,23	1,10 $\pm$ 0,65
	p=0,649		p=0,748		p=0,296	
IGF1R <sup>-</sup> /Akt(pS473) <sup>-</sup>	50,40 $\pm$ 6,45	54,51 $\pm$ 5,07	48,51 $\pm$ 10,05	64,38 $\pm$ 5,34	52,83 $\pm$ 7,89	45,86 $\pm$ 7,23
	p=0,664		p=0,315		p=0,487	
VEGFR2 <sup>-</sup> /Akt(pS473) <sup>+</sup>	20,57 $\pm$ 2,37	16,62 $\pm$ 4,25	19,08 $\pm$ 2,48	11,09 $\pm$ 4,64	22,48 $\pm$ 4,52	21,46 $\pm$ 6,67
	p=0,429		p=0,266		p=0,954	
VEGFR2 <sup>+</sup> /Akt(pS473) <sup>-</sup>	8,93 $\pm$ 2,57	11,81 $\pm$ 2,63	11,51 $\pm$ 4,03	15,11 $\pm$ 4,88	5,60 $\pm$ 2,61	8,93 $\pm$ 2,35
	p=0,252		p=0,491		p=0,298	
VEGFR2 <sup>+</sup> /Akt(pS473) <sup>+</sup>	8,68 $\pm$ 2,87	3,57 $\pm$ 0,75	12,01 $\pm$ 4,81	2,76 $\pm$ 0,47	4,39 $\pm$ 1,42	4,28 $\pm$ 1,33
	p=0,192		p=0,064		p=0,954	
VEGFR2 <sup>-</sup> /Akt(pS473) <sup>-</sup>	64,44 $\pm$ 4,44	68,01 $\pm$ 3,38	61,99 $\pm$ 6,71	71,03 $\pm$ 2,70	67,59 $\pm$ 5,69	65,38 $\pm$ 5,94
	p=0,635		p=0,315		p=0,643	

PI3K/Akt/mTOR сигнальный каскад рассматривается в качестве одной из ключевых детерминант биологической агрессивности многих злокачественных новообразований, в том числе и рака молочной железы, однако единого мнения об экспрессионных особенностях ключевых белков каскада при разных молекулярных подтипах РМЖ в литературных источниках не установлено. Высокий уровень Akt(pS473)-позитивных клеток продемонстрирован для люминальных опухолей по отношению к опухолям с тройным негативным фенотипом, что соответствует полученным нами данным [81]. Несмотря на то, что общепринятым считается факт потери PTEN-позитивных клеток в тройных негативных опухолях [154, 376, 220], в ряде исследований отмечено повышение числа клеток, экспрессирующих PTEN [152, 382]. Предполагается, что увеличение экспрессии PTEN связано с наличием дефосфорилированной формы белка, поскольку известно, что процесс фосфорилирования PTEN по

специфическим остаткам оснований приводит к образованию неактивной формы с замкнутой конформацией [312].

Потеря белковой экспрессии PTEN и высокий процент клеток, экспрессирующих фосфорилированную форму Akt1, выявлен в опухоли больных РМЖ с метастазами в аксиллярные лимфоузлы, однако авторами представлены данные без молекулярного типирования групп пациентов [307]. Результаты исследования Lazaridis et al., указывают на то, что уровень экспрессии Akt(pS473) превалирует при HER2-позитивном РМЖ относительно других подтипов [297]. Наконец ряд работ вообще не показал значимую взаимосвязь экспрессии как Akt(pS473), так и PTEN с молекулярными подтипами РМЖ [287, 306, 338,]. Следует подчеркнуть, что все исследования Akt(pS473) и PTEN, представленные выше, были проведены с помощью иммуногистохимического анализа. Результаты собственных исследований, полученные нами при использовании проточной цитометрии, позволили детектировать только EpCAM<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> опухолевые жизнеспособные клетки с возможностью одновременной оценки относительного содержания различных клеточных популяций, экспрессирующих как единичные маркеры, так и их комбинации.

Таким образом, данные, полученные при изучении особенностей внутриклеточной экспрессии белков Akt(pS473) и PTEN в опухолевой ткани у больных РМЖ свидетельствуют об активации PI3K/Akt/mTOR преимущественно в люминальных, эстроген-зависимых опухолях при возможном участии VEGFR2 как потенциального триггера данного сигналинга. Возможное ингибирование каскада за счет высокой активности PTEN, по-видимому, может приводить к запуску альтернативных сигнальных каскадов в эстроген-независимых опухолях.

### 3.4 Особенности содержания субпопуляций клеток CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-low</sup>, CD44<sup>-</sup>/CD24<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup>, CD44<sup>-</sup>/CD24<sup>-</sup> в опухолевой ткани больных с разными молекулярными подтипами РМЖ

Иммунофенотип с положительной экспрессией CD44 и отсутствием/слабой экспрессией CD24 (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-low</sup>) признается в качестве общепринятого маркера стволовости при РМЖ. Мы проанализировали относительное содержание четырех популяций клеток, экспрессирующих сочетание поверхностных маркеров опухолевых клеток CD44 и CD24 в зависимости от молекулярного подтипа рака молочной железы. Результаты типирования не показали значимых ассоциаций исследуемых субпопуляций с молекулярными вариантами РМЖ (Таблица 30).

Таблица 30 – Средний процент субпопуляций клеток, экспрессирующих комбинацию маркеров CD44/CD24 у больных РМЖ в зависимости от молекулярного подтипа

Параметр	Процент экспрессии, M±m,%		
	Люминальный А n=21	Люминальный В n=26	Тройной негативный n=20
CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-low</sup>	6,28±1,71 p=0,981 <sup>1</sup>	6,87±1,44 p=0,828 <sup>2</sup>	7,96±1,38 p=0,721 <sup>3</sup>
CD44 <sup>-</sup> /CD24 <sup>+</sup>	33,95±3,63 p=0,820 <sup>1</sup>	33,50±2,21 p=0,484 <sup>2</sup>	38,46±5,32 p=0,479 <sup>3</sup>
CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>+</sup>	37,81±9,97 p=0,932 <sup>1</sup>	38,37±3,81 p=0,843 <sup>2</sup>	39,88±7,45 p=0,784 <sup>3</sup>
CD44 <sup>-</sup> /CD24 <sup>-</sup>	21,86±9,44 p=0,891 <sup>1</sup>	21,26±1,79 p=0,727 <sup>2</sup>	13,73±9,06 p=0,387 <sup>3</sup>
Примечания			
1 <sup>1</sup> – различия показателей между группами люминальный А и люминальный В РМЖ			
2 <sup>2</sup> – различия показателей между группами люминальный В и тройной негативный РМЖ			
3 <sup>3</sup> – различия показателей между группами люминальный А и тройной негативный РМЖ			

Для поиска возможной взаимосвязи изучаемых маркеров стволовых опухолевых клеток с PI3K/Akt/mTOR сигнальным путем мы изучили популяции клеток, экспрессирующих CD44 и CD24 в сочетании с внутриклеточной экспрессией PTEN. Пропорция клеток с тройным позитивным фенотипом CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup>/PTEN<sup>+</sup> превалировала в эстроген-зависимых опухолях, однако при сравнении люминального А РМЖ с тройным негативным подтипом различия

были значимы ( $p = 0,033$ ), при сравнении люминального В с тройным негативным – имели характер тенденций ( $p = 0,072$ ; Таблица 31). Коэкспрессия маркеров стволовых опухолевых клеток с негативной экспрессией фосфатазы PTEN была выше в опухолях люминального А варианта РМЖ ( $6,96 \pm 1,97$ ), чем в опухолях люминального В, однако различия не достигали статистической значимости ( $3,91 \pm 0,83$ ;  $p = 0,074$ ; Таблица 31).

Таблица 31 – Средний процент субпопуляций клеток, экспрессирующих комбинации маркеров CD44, CD24 и PTEN у больных РМЖ в зависимости от молекулярного подтипа

Параметр	Процент экспрессии, М±m,%		
	Люминальный А n=21	Люминальный В n=26	Тройной негативный n=20
CD44 <sup>+</sup> / CD24 <sup>-</sup> /PTEN <sup>+</sup>	3,45±0,84 p=0,585 <sup>1</sup>	6,87±1,79 p=0,505 <sup>2</sup>	6,29±2,05 p=0,173 <sup>3</sup>
CD44 <sup>-</sup> / CD24 <sup>+</sup> /PTEN <sup>+</sup>	12,32±2,99 p=0,487 <sup>1</sup>	11,07±3,01 p=0,909 <sup>2</sup>	5,40±1,64 p=0,381 <sup>3</sup>
CD44 <sup>+</sup> / CD24 <sup>+</sup> /PTEN <sup>+</sup>	0,40±0,17 p=0,563 <sup>1</sup>	0,60±0,22 p=0,072 <sup>2</sup>	0,35±0,06 p=0,033 <sup>3</sup>
CD44 <sup>-</sup> / CD24 <sup>-</sup> /PTEN <sup>+</sup>	83,83±3,09 p=0,889 <sup>1</sup>	81,46±3,43 p=0,671 <sup>2</sup>	87,96±2,27 p=0,724 <sup>3</sup>
CD44 <sup>+</sup> / CD24 <sup>-</sup> /PTEN <sup>-</sup>	6,96±1,97 p=0,074 <sup>1</sup>	3,91±0,83 p=0,571 <sup>2</sup>	3,54±0,70 p=0,232 <sup>3</sup>
CD44 <sup>-</sup> / CD24 <sup>+</sup> /PTEN <sup>-</sup>	16,60±1,74 p=0,856 <sup>1</sup>	15,55±1,24 p=0,478 <sup>2</sup>	14,06±0,71 p=0,590 <sup>3</sup>
CD44 <sup>+</sup> / CD24 <sup>+</sup> /PTEN <sup>-</sup>	0,92±0,51 p=0,500 <sup>1</sup>	0,56±0,26 p=0,609 <sup>2</sup>	0,38±0,10 p=0,762 <sup>3</sup>
CD44 <sup>-</sup> / CD24 <sup>-</sup> /PTEN <sup>-</sup>	75,53±2,81 p=0,304 <sup>1</sup>	79,99±1,52 p=0,660 <sup>2</sup>	79,23±3,09 p=0,281 <sup>2</sup>

Примечания  
<sup>1</sup> – различия показателей между группами люминальный А и люминальный В РМЖ  
<sup>2</sup> – различия показателей между группами люминальный В и тройной негативный РМЖ  
<sup>3</sup> – различия показателей между группами люминальный А и тройной негативный РМЖ

Далее мы попытались определить фенотипический профиль молекулярных типов РМЖ в зависимости от коэкспрессии маркеров стволовых опухолевых клеток и рецепторов факторов роста. Выявлено, что субпопуляции клеток с положительной экспрессией поверхностного гликопротеина CD44 и отрицательной экспрессией IGF1R, а также клеточные субпопуляции с положительной экспрессии CD24 и отрицательной TGF-βRI были наиболее

выражены в тройных негативных опухолях, по сравнению с люминальными ( $p = 0,019$  и  $p = 0,000$ ; соответственно; Таблица 32). Популяция опухолевых клеток с одновременным отсутствием экспрессии CD24 при позитивности экспрессии TGF- $\beta$ RI является наиболее часто выявляемой популяцией для эстроген-зависимого РМЖ. Однако все же в большем проценте случаев в опухолях люминального типа регистрируется клеточная популяция со взаимной экспрессией CD24 и TGF- $\beta$ RI ( $p = 0,000$  как для люминального А, так и В РМЖ в сравнении с тройным негативным; Таблица 32).

Таблица 32 – Средний процент субпопуляций клеток, экспрессирующих комбинации маркеров CD44/ IGF1R и CD24/ TGF- $\beta$ RI у больных РМЖ в зависимости от молекулярного подтипа

Параметр	Процент экспрессии, М $\pm$ м, %		
	Люминальный А n=21	Люминальный В n=26	Тройной негативный n=20
CD44 <sup>+</sup> / IGF1R <sup>-</sup>	4,95 $\pm$ 1,81 p=0,900 <sup>1</sup>	3,49 $\pm$ 0,90 p=0,019 <sup>2</sup>	11,57 $\pm$ 2,49 p=0,063 <sup>3</sup>
CD44 <sup>-</sup> / IGF1R <sup>+</sup>	37,45 $\pm$ 3,56 p=0,484 <sup>1</sup>	41,06 $\pm$ 3,59 p=0,000 <sup>2</sup>	19,41 $\pm$ 4,13 p=0,003 <sup>3</sup>
CD44 <sup>+</sup> / IGF1R <sup>+</sup>	26,55 $\pm$ 4,87 p=0,392 <sup>1</sup>	21,53 $\pm$ 3,44 p=0,698 <sup>2</sup>	23,60 $\pm$ 3,31 p=0,656 <sup>3</sup>
CD44 <sup>-</sup> / IGF1R <sup>-</sup>	31,91 $\pm$ 4,90 p=0,769 <sup>1</sup>	33,93 $\pm$ 4,72 p=0,120 <sup>2</sup>	45,41 $\pm$ 4,45 p=0,063 <sup>3</sup>
CD24 <sup>+</sup> / TGF- $\beta$ RI <sup>-</sup>	22,15 $\pm$ 4,29 p=0,924 <sup>1</sup>	20,42 $\pm$ 3,20 p=0,000 <sup>2</sup>	63,29 $\pm$ 4,83 p=0,000 <sup>3</sup>
CD24 <sup>-</sup> / TGF- $\beta$ RI <sup>+</sup>	9,61 $\pm$ 2,03 p=0,829 <sup>1</sup>	13,14 $\pm$ 2,04 p=0,000 <sup>2</sup>	0,20 $\pm$ 0,08 p=0,000 <sup>3</sup>
CD24 <sup>+</sup> / TGF- $\beta$ RI <sup>+</sup>	32,37 $\pm$ 5,79 p=0,230 <sup>1</sup>	26,49 $\pm$ 3,63 p=0,000 <sup>2</sup>	1,34 $\pm$ 0,47 p=0,000 <sup>3</sup>
CD24 <sup>-</sup> / TGF- $\beta$ RI <sup>-</sup>	34,92 $\pm$ 4,03 p=0,490 <sup>1</sup>	38,79 $\pm$ 4,54 p=0,872 <sup>2</sup>	35,06 $\pm$ 4,77 p=0,872 <sup>2</sup>

Примечания  
1<sup>1</sup> – различия показателей между группами люминальный А и люминальный В РМЖ  
2<sup>2</sup> – различия показателей между группами люминальный В и тройной негативный РМЖ  
3<sup>3</sup> – различия показателей между группами люминальный А и тройной негативный РМЖ

Процентное содержание субпопуляций клеток, экспрессирующих комбинации исследуемых маркеров было изучено в зависимости от клинико-морфологических особенностей молекулярных вариантов РМЖ (Таблица 33).

Таблица 33 – Средний процент субпопуляций клеток, экспрессирующих комбинации маркеров CD44, CD24, PTEN, IGF1R и TGF-βRI у больных РМЖ в зависимости от размера опухоли

Параметр	Процент экспрессии, M±m,%					
	Люминальный А n=21		Люминальный В n=26		Тройной негативный n=14	
	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>
CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-/low</sup>	4,98±2,08	7,25±1,54	8,53±2,60	6,14±1,43	8,75±2,42	7,75±2,14
	p=0,201		p=0,541		p=0,846	
CD44 <sup>-</sup> /CD24 <sup>+</sup>	31,42±4,69	35,85±3,92	28,49±5,05	35,73±5,89	45,53±7,77	36,04±9,03
	p=0,434		p=0,487		p=0,651	
CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>+</sup>	44,04±5,69	34,63±6,37	36,66±5,36	39,13±6,40	37,58±6,66	35,78±9,93
	p=0,414		p=0,813		p=0,912	
CD44 <sup>-</sup> /CD24 <sup>-</sup>	21,33±7,69	22,26±4,99	26,34±6,19	19,00±6,55	10,13±6,34	20,44±9,30
	p=0,644		p=0,134		p=0,121	
CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup> /PTEN <sup>+</sup>	3,33±0,81	3,54±1,38	11,18±4,38	4,96±1,60	2,97±0,45	8,79±3,39
	p=0,414		p=0,165		p=0,302	
CD44 <sup>-</sup> /CD24 <sup>+</sup> /PTEN <sup>+</sup>	9,24±3,87	14,63±4,38	11,70±7,20	10,78±3,12	6,25±2,20	4,76±2,45
	p=0,434		p=0,889		p=0,244	
CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>+</sup> /PTEN <sup>+</sup>	0,30±0,20	0,48±0,25	0,48±0,32	0,66±0,29	0,33±0,02	0,36±0,10
	p=0,593		p=0,485		p=0,896	
CD44 <sup>-</sup> /CD24 <sup>-</sup> /PTEN <sup>+</sup>	87,10±3,94	81,38±4,54	76,66±6,98	83,59±3,89	90,45±2,51	86,09±3,49
	p=0,455		p=0,470		p=0,605	
CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup> /PTEN <sup>-</sup>	8,97±4,31	5,45±1,33	4,51±1,50	3,64±1,02	2,27±0,43	4,49±1,09
	p=0,644		p=0,487		p=0,155	
CD44 <sup>-</sup> /CD24 <sup>+</sup> /PTEN <sup>-</sup>	13,37±1,26	19,07±2,75	15,34±2,27	15,64±1,52	15,37±1,32	13,08±0,64
	p=0,136		p=0,637		p=0,156	
CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>+</sup> /PTEN <sup>-</sup>	0,50±0,13	1,24±0,90	0,19±0,05	0,72±0,38	0,37±0,14	0,39±0,17
	p=0,266		p=0,351		p=0,794	
CD44 <sup>-</sup> /CD24 <sup>-</sup> /PTEN <sup>-</sup>	77,19±4,88	74,29±3,43	79,95±3,29	80,01±1,78	82,05±1,64	77,11±5,32
	p=0,356		p=0,739		p=0,897	
CD44 <sup>+</sup> /IGF1R <sup>-</sup>	7,12±3,93	3,33±1,20	3,08±0,87	3,67±1,26	10,73±5,06	12,20±2,51
	p=0,400		p=0,887		p=0,783	
CD44 <sup>-</sup> /IGF1R <sup>+</sup>	34,79±6,94	39,45±3,64	38,00±4,79	42,42±4,77	29,65±7,79	11,73±1,76
	p=0,354		p=0,374		p=0,024 <sup>1</sup>	
CD44 <sup>+</sup> /IGF1R <sup>+</sup>	23,13±7,31	29,12±6,70	21,33±5,95	21,63±4,31	20,25±5,11	26,11±4,43
	p=0,570		p=0,802		p=0,403	
CD44 <sup>-</sup> /IGF1R <sup>-</sup>	34,96±8,38	29,63±6,08	37,63±7,39	32,28±6,06	39,35±5,89	49,95±6,22
	p=0,373		p=0,374		p=0,253	
CD24 <sup>+</sup> /TGF-βRI <sup>-</sup>	20,59±5,52	23,31±6,41	15,98±4,43	22,39±4,17	74,18±6,04	55,11±5,82
	p=0,831		p=0,331		p=0,121	
CD24 <sup>-</sup> /TGF-βRI <sup>+</sup>	7,52±2,15	11,18±3,17	16,05±3,82	11,85±2,43	0,22±0,14	0,19±0,09
	p=0,477		p=0,279		p=0,886	
CD24 <sup>+</sup> /TGF-βRI <sup>+</sup>	30,80±9,67	33,55±7,43	30,95±8,58	24,51±3,72	0,35±0,24	2,08±0,71
	p=0,887		p=0,559		p=0,027 <sup>1</sup>	
CD24 <sup>-</sup> /TGF-βRI <sup>-</sup>	38,86±7,13	31,96±4,70	37,00±8,30	39,58±5,58	25,28±5,86	42,39±6,14
	p=0,394		p=0,889		p=0,107	
Примечания						
1 <sup>1</sup> – значимые различия показателей в группе тройной негативный РМЖ						

Показано, что процент  $CD44^-/IGF1R^+$  клеток выше в небольших опухолях  $T_1$ , имеющих тройной негативный фенотип, в сравнении с  $T_2$  ( $29,65 \pm 7,79$  против  $11,73 \pm 1,76$ ;  $p = 0,024$ ). Популяция клеток с коэкспрессией  $CD24^+/TGF-\beta R1^+$  ассоциирована с опухолями данного молекулярного варианта РМЖ большего размера ( $2,08 \pm 0,71$  для  $T_2$  против  $0,35 \pm 0,24$  для  $T_1$ ;  $p = 0,027$ ; Таблица 33). Подобная направленность изменений содержания клеточных субпопуляций наблюдалась и в зависимости от наличия метастазов в лимфоузлы (Таблица 34). Наличие клеток, экспрессирующих  $CD44^-/IGF1R^+$  оказалось связано с меньшей распространенностью тройного негативного рака молочной железы ( $26,30 \pm 6,15$  для группы больных с локализованным процессом против  $10,21 \pm 1,74$  для пациенток с местно-распространенным РМЖ;  $p = 0,020$ ). Тогда как субпопуляция клеток  $CD24^+/TGF-\beta R1^+$ , напротив, ассоциирована с клинически более агрессивным поведением этого молекулярного варианта РМЖ ( $0,41 \pm 0,19$  для группы больных с локализованным процессом против  $2,57 \pm 0,86$  для пациенток с местно-распространенным РМЖ;  $p = 0,027$ ). Для опухолей люминального А типа субпопуляция  $CD44^+IGF1R^-$  идентифицирована в качестве клинически благоприятного маркера, связанного с отсутствием лимфогенных метастазов ( $p = 0,031$ ; Таблица 34).

Изучив содержание исследуемых популяций клеток в зависимости от характера распределения  $ER\alpha$ , мы отметили значимые различия только для опухолей люминального А типа. Оказалось, что наличие в опухоли клеток, экспрессирующих  $CD44^+IGF1R^-$  или  $CD24^+/TGF-\beta R1^+$  ассоциировано с гетерогенным распределением  $ER\alpha$  ( $p = 0,024$  и  $p = 0,039$ ; соответственно). Наличие  $CD24^-/TGF-\beta R1^+$  клеток, напротив, связано с гомогенным характером  $ER\alpha$  ( $p = 0,004$ ; Таблица 35).

Таблица 34 – Средний процент субпопуляций клеток, экспрессирующих комбинации исследуемых маркеров у больных РМЖ в зависимости от лимфогенного метастазирования

Параметр	Процент экспрессии, М±m,%					
	Люминальный А n=21		Люминальный В n=26		Тройной негативный n=14	
	N <sub>0</sub>	N <sub>1-2</sub>	N <sub>0</sub>	N <sub>1-2</sub>	N <sub>0</sub>	N <sub>1-2</sub>
CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-/low</sup>	6,93±1,89	5,40±1,51	6,03±1,67	8,23±1,94	7,96±1,92	8,47±2,76
	p=0,669		p=0,316		p=0,746	
CD44 <sup>-</sup> /CD24 <sup>+</sup>	33,18±4,08	34,98±4,57	38,97±6,51	24,76±3,19	41,14±10,6	36,73±10,4
	p=0,859		p=0,132		p=0,651	
CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>+</sup>	40,74±5,31	33,90±7,46	33,41±5,71	46,31±7,68	33,68±9,28	40,38±13,9
	p=0,394		p=0,206		p=0,606	
CD44 <sup>-</sup> /CD24 <sup>-</sup>	18,97±4,75	25,72±7,77	21,61±5,98	20,70±6,04	17,21±9,52	14,43±6,60
	p=0,644		p=0,978		p=0,245	
CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup> /PTEN <sup>+</sup>	2,83±0,58	4,28±1,84	7,97±2,47	5,11±2,49	7,65±3,46	4,48±1,44
	p=0,943		p=0,291		p=0,605	
CD44 <sup>-</sup> /CD24 <sup>+</sup> /PTEN <sup>+</sup>	11,28±3,22	13,71±5,73	12,52±4,27	8,74±3,99	5,44±1,71	5,35±3,29
	p=0,669		p=0,257		p=0,300	
CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>+</sup> /PTEN <sup>+</sup>	0,25±0,15	0,60±0,33	0,54±0,25	0,71±0,44	0,33±0,03	0,38±0,14
	p=0,532		p=0,880		p=0,947	
CD44 <sup>-</sup> /CD24 <sup>-</sup> /PTEN <sup>+</sup>	85,64±3,44	81,41±5,72	78,97±4,73	85,45±4,72	86,59±3,40	89,78±2,91
	p=0,722		p=0,303		p=0,438	
CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup> /PTEN <sup>-</sup>	4,39±1,02	10,38±4,28	3,91±1,21	3,91±1,05	3,83±1,13	3,15±0,75
	p=0,644		p=0,304		p=0,987	
CD44 <sup>-</sup> /CD24 <sup>+</sup> /PTEN <sup>-</sup>	14,84±1,23	18,93±3,70	16,45±1,74	14,10±1,62	14,50±1,22	13,47±0,79
	p=0,776		p=0,493		p=0,699	
CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>+</sup> /PTEN <sup>-</sup>	1,25±0,89	0,49±0,18	0,72±0,43	0,30±0,10	0,38±0,10	0,38±0,22
	p=0,886		p=0,727		p=0,359	
CD44 <sup>-</sup> /CD24 <sup>-</sup> /PTEN <sup>-</sup>	79,54±2,25	70,19±5,51	78,91±2,11	81,71±2,07	81,33±1,33	76,43±7,22
	p=0,256		p=0,598		p=0,439	
CD44 <sup>+</sup> /IGF1R <sup>-</sup>	7,33±2,91	1,79±1,19	3,20±0,71	3,95±2,13	11,04±3,71	12,28±3,43
	p=0,031 <sup>2</sup>		p=0,572		p=0,517	
CD44 <sup>-</sup> /IGF1R <sup>+</sup>	34,45±3,67	41,46±6,76	39,04±4,68	44,30±5,72	26,30±6,15	10,21±1,74
	p=0,592		p=0,598		p=0,020 <sup>1</sup>	
CD44 <sup>+</sup> /IGF1R <sup>+</sup>	27,62±5,81	25,13±8,72	19,11±4,06	25,41±6,21	20,81±3,79	27,32±5,92
	p=0,413		p=0,328		p=0,366	
CD44 <sup>-</sup> /IGF1R <sup>-</sup>	30,59±5,35	33,67±9,32	38,68±7,07	26,33±4,16	41,84±4,62	50,17±8,50
	p=0,721		p=0,399		p=0,302	
CD24 <sup>+</sup> /TGF-βRI <sup>-</sup>	22,33±5,71	21,90±6,87	23,88±4,68	14,88±3,18	63,83±8,11	62,57±4,28
	p=0,943		p=0,176		p=0,903	
CD24 <sup>-</sup> /TGF-βRI <sup>+</sup>	10,00±3,29	9,09±2,02	12,23±2,79	14,61±3,00	0,16±0,11	0,25±0,11
	p=0,830		p=0,581		p=0,316	
CD24 <sup>+</sup> /TGF-βRI <sup>+</sup>	34,32±7,84	29,78±9,01	27,72±4,60	24,52±6,18	0,41±0,19	2,57±0,86
	p=0,708		p=0,677		p=0,027 <sup>1</sup>	
CD24 <sup>-</sup> /TGF-βRI <sup>-</sup>	31,68±5,16	39,24±6,46	34,29±5,84	45,98±6,98	35,64±8,04	34,28±4,16
	p=0,366		p=0,217		p=0,894	
Примечания						
1 <sup>1</sup> – значимые различия показателей в группе тройной негативный РМЖ						
2 <sup>2</sup> – значимые различия показателей в группе люминальный А РМЖ						

Таблица 35 – Средний процент субпопуляций клеток, экспрессирующих комбинации исследуемых маркеров у больных РМЖ в зависимости от характера распределения ERα

Параметр	Процент экспрессии, М±m,%					
	Люминальный РМЖ n=47		Люминальный А n=21		Люминальный В n=26	
	гомо	гетеро	гомо	гетеро	гомо	гетеро
CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-/low</sup>	5,94±1,39	8,12±1,77	6,22±2,12	7,41±2,61	5,57±1,84	8,74±2,57
	p=0,352		p=0,594		p=0,385	
CD44 <sup>-</sup> /CD24 <sup>+</sup>	31,30±4,55	32,93±4,01	30,98±5,50	37,73±4,75	31,71±8,16	28,74±6,16
	p=0,827		p=0,368		p=0,685	
CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>+</sup>	39,11±6,13	35,67±5,48	42,97±8,44	29,04±3,78	34,14±9,23	41,46±9,57
	p=0,953		p=0,315		p=0,562	
CD44 <sup>-</sup> /CD24 <sup>-</sup>	23,65±6,16	23,15±5,24	19,82±7,38	25,53±6,72	28,57±10,8	21,06±8,22
	p=0,781		p=0,427		p=0,523	
CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup> /PTEN <sup>+</sup>	3,59±1,11	3,25±0,85	4,22±1,84	2,54±0,93	2,79±1,05	3,88±1,39
	p=0,889		p=0,671		p=0,524	
CD44 <sup>-</sup> /CD24 <sup>+</sup> /PTEN <sup>+</sup>	13,81±4,57	9,73±2,82	11,11±5,27	16,74±4,14	17,27±8,26	3,59±2,32
	p=0,693		p=0,186		p=0,080	
CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>+</sup> /PTEN <sup>+</sup>	0,16±0,09	0,60±0,30	0,11±0,01	0,43±0,25	0,23±0,16	0,75±0,54
	p=0,273		p=0,144		p=0,948	
CD44 <sup>-</sup> /CD24 <sup>-</sup> /PTEN <sup>+</sup>	82,47±4,70	86,41±2,98	84,59±5,17	80,27±4,82	79,74±8,82	91,78±2,70
	p=0,968		p=0,427		p=0,563	
CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup> /PTEN <sup>-</sup>	5,20±1,09	5,27±1,29	6,68±1,59	4,94±1,57	3,30±1,14	5,56±2,08
	p=0,921		p=0,672		p=0,524	
CD44 <sup>-</sup> /CD24 <sup>+</sup> /PTEN <sup>-</sup>	18,36±2,29	14,07±1,06	19,17±3,67	15,59±1,49	13,33±2,56	12,75±1,43
	p=0,220		p=0,186		p=0,082	
CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>+</sup> /PTEN <sup>-</sup>	0,36±0,09	1,09±0,72	0,38±0,16	2,00±1,51	0,34±0,09	0,30±0,15
	p=0,647		p=0,144		p=0,144	
CD44 <sup>-</sup> /CD24 <sup>-</sup> /PTEN <sup>-</sup>	76,08±2,69	79,57±1,81	73,78±3,90	77,48±3,34	79,04±3,54	81,39±1,70
	p=0,406		p=0,427		p=0,563	
CD44 <sup>+</sup> /IGF1R <sup>-</sup>	4,16±1,47	6,43±2,38	2,54±1,29	10,50±4,66	6,24±2,87	2,88±0,98
	p=0,279		p=0,024 <sup>1</sup>		p=0,413	
CD44 <sup>-</sup> /IGF1R <sup>+</sup>	35,50±4,62	39,70±4,74	38,42±6,00	32,83±5,80	31,74±7,45	45,71±6,93
	p=0,268		p=0,791		p=0,183	
CD44 <sup>+</sup> /IGF1R <sup>+</sup>	28,95±5,65	18,36±3,73	33,89±8,75	14,53±3,05	23,24±6,46	21,71±6,47
	p=0,268		p=0,124		p=0,870	
CD44 <sup>-</sup> /IGF1R <sup>-</sup>	32,54±6,53	35,50±6,08	27,69±9,43	42,13±3,01	38,77±8,91	29,70±11,0
	p=0,752		p=0,313		p=0,165	
CD24 <sup>+</sup> /TGF-βRI <sup>-</sup>	14,96±2,15	24,30±4,29	16,44±3,42	33,04±7,23	13,06±2,89	16,65±3,50
	p=0,09		p=0,039 <sup>1</sup>		p=0,523	
CD24 <sup>-</sup> /TGF-βRI <sup>+</sup>	10,43±1,66	9,29±2,39	12,13±2,03	2,69±1,14	8,23±2,71	15,08±3,20
	p=0,453		p=0,004 <sup>1</sup>		p=0,08	
CD24 <sup>+</sup> /TGF-βRI <sup>+</sup>	35,23±6,18	23,75±6,39	36,56±7,83	30,50±12,6	33,51±10,6	17,85±4,85
	p=0,123		p=0,368		p=0,247	
CD24 <sup>-</sup> /TGF-βRI <sup>-</sup>	38,14±6,03	40,64±5,22	32,67±6,22	33,74±6,46	45,17±11,2	50,43±7,24
	p=0,580		p=0,957		p=0,908	
Примечания						
1 <sup>1</sup> – значимые различия показателей в группе люминальный А РМЖ						

Современная концепция внутриопухолевой гетерогенности предполагает существование в опухоли нескольких популяций опухолевых клеток, обладающих различным молекулярным профилем и биологическими свойствами. Доказано, что наличие субпопуляции с фенотипом опухолевых стволовых клеток во многом предопределяет вариабельность клинического течения и прогноз рака молочной железы [187, 360].

В настоящее время в качестве маркеров стволовых опухолевых клеток описаны разнообразные мембранные рецепторы CD44, CD10, CD29, CD133, цитозольные ферменты ALDH1, рецепторы семейства хемокинов, однако фенотип CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-low</sup> продолжает оставаться наиболее изученным. Показано, что субпопуляции, экспрессирующие поверхностный антиген CD44 и неэкспрессирующие или слабо экспрессирующие CD24, ассоциированы с ER/PR-негативным статусом, высоким индексом Ki67 и лимфогенным метастазированием у больных РМЖ [351, 353, 369]. Особый интерес представляют исследования роли фенотипа CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-low</sup> при молекулярных вариантах РМЖ. Наиболее ранние работы демонстрируют распределение содержания CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-low</sup> клеток, которое возрастает в ряду нормальная ткань, доброкачественная опухоль, злокачественная опухоль, указывая на происхождение популяции в качестве клеток-предшественников, не определяющих молекулярный подтип и клинико-морфологические параметры у больных инвазивной протоковой карциномой [62]. Однако Yang et al., показано, что опухоли разных молекулярных типов РМЖ содержат различное количество CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-low</sup> клеток, при этом их максимальное содержание отмечается в опухолях тройного негативного рака по сравнению с другими типами опухолей [397]. Эти результаты были многократно подтверждены другими независимыми исследованиями [50, 67, 81, 366].

В проведенном нами исследовании не удалось установить взаимосвязь популяции CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> с молекулярными подтипами РМЖ, однако впервые изучено и определено содержание клеток, экспрессирующих маркеры стволовых опухолевых клеток в сочетании с тирозинкиназами и фосфатазой PTEN для

каждого варианта рака молочной железы. Установлено, что эстроген-зависимые опухоли люминального А и люминального В типа характеризуются высоким содержанием таких клеточных популяций, как  $CD44^+/IGF1R^+$ ,  $CD24^+/TGF-\beta RI^+$  и  $CD44^+/CD24^+/PTEN^+$ , а тройные негативные -  $CD44^+/IGF1R^-$  и  $CD24^+/TGF-\beta RI^-$ . Оказалось, что субпопуляции клеток, ассоциированные с особенностями клинического течения молекулярных вариантов РМЖ, отличаются противоположным фенотипом. В частности, для люминальных А опухолей фенотипы  $CD44^+/IGF1R^-$  и  $CD24^+/TGF-\beta RI^-$  выявлены в качестве маркеров, связанных с неблагоприятными клинико-морфологическими параметрами; в случае тройных негативных опухолей таким фенотипом являлся  $CD24^+/TGF-\beta RI^+$ .

Известно, что адгезивная молекула CD24, являясь лигандом для Р-селектина, может быть вовлечена в процессы метастазирования опухолевых клеток [57, 202]. Исследования, проведенные *in vitro* и *in vivo*, дают основания предполагать прогностическую значимость CD24 как маркера, отражающего инвазивный и пролиферативный потенциал опухолей молочной железы [56, 241]. Кроме того, показано, что клеточные линии базально-подобного рака молочной железы характеризуются высокой экспрессией мезенхимальных маркеров, включая TGF- $\beta$ I и его рецепторы [84]. Видимо совместная экспрессия CD24 и TGF- $\beta$ RI в тройных негативных опухолях может рассматриваться в качестве потенциального фенотипически агрессивного маркера. В опухолях люминального типа вовлечение CD44/CD24- положительных клеток в реализацию механизмов прогрессии возможно посредством активации внутриклеточных каскадов, включая PI3K/Akt/mTOR, минуя тирозинкиназы IGF1R и TGF- $\beta$ RI.

Таким образом, изучение особенностей содержания субпопуляций стволовых опухолевых клеток, а также содержания рецепторов факторов роста и PTEN в качестве их ко-маркеров, позволило сформировать определенный фенотип каждого молекулярного варианта РМЖ, характеризующейся экспрессией определенного набора маркеров.

### 3.5 Анализ связи исследуемых молекулярно-генетических маркеров с эффективностью гормональной терапии тамоксифеном у больных эстроген-зависимым РМЖ

На следующем этапе работы проведено изучение полиморфизма генов *ESR1*, *EGFR*, *TGF- $\beta$ 1*, *VEGFR2/KDR*, *IGF1R*, особенностей их генной и белковой экспрессии, содержания белков Akt (pS473), PTEN и субпопуляций стволовых опухолевых клеток в трех группах больных эстроген-зависимым РМЖ (люминальный общая, люминальный А, люминальный В), которые были разделены на подгруппы в зависимости от отдаленных результатов лечения тамоксифеном. Критерием эффективности лечения являлось отсутствие прогрессирования заболевания в виде гематогенного метастазирования или рецидива рака молочной железы на фоне адъювантной терапии тамоксифеном. Соответственно данным критериям, 45 пациенток с прогрессированием заболевания составили тамоксифен-резистентную подгруппу (ТАМ-Р), 129 больных без признаков прогрессирования на фоне проведенной терапии тамоксифен-чувствительную подгруппу (ТАМ-Ч).

#### 3.5.1 Ассоциация полиморфных вариантов исследуемых генов с эффективностью гормональной терапии тамоксифеном

Результаты генотипирования выявили значимое увеличение частоты встречаемости мутантного *ESR1* 2014AA генотипа в ТАМ-Р группе по сравнению с ТАМ-Ч в общей выборке больных люминальным РМЖ ( $p = 0,040$ ) и пациенток с люминальным В подтипом ( $p = 0,045$ ; Таблица 36). Хотя синонимичная замена в 8 экзоне гена *ESR1* не затрагивает аминокислотную последовательность экспрессируемого белка, *ESR1*2014G>A (rs2228480) может влиять на белковую экспрессию, изменяя сплайсинг или стабильность мРНК и, соответственно, эффективность процессов трансляции [137]. Можно предполагать, что мутации в этой области приводят к образованию транскрипционно-неактивного рецептора, изменяют способность ER $\alpha$  взаимодействовать с тамоксифеном и потенциально способствуют резистентности.

Таблица 36 – Частота встречаемости полиморфных вариантов гена эстрогенового рецептора у больных люминальным РМЖ в зависимости от эффективности лечения тамоксифеном

Генотип/ аллель	Люминальный РМЖ, n (%)				Люминальный А, n (%)				Люминальный В, n (%)			
	ТАМ-Ч	ТАМ-Р	OR (95% CI)	P	ТАМ-Ч	ТАМ-Р	OR (95% CI)	P	ТАМ-Ч	ТАМ-Р	OR (95% CI)	P
<i>ESRI 2014G&gt;A (rs2228480)</i>												
<i>GG</i>	73(76,8)	20(74,1)	1,00		42(77,8)	12(75,0)	1,00		31(75,6)	8(72,7)	1,00	
<i>GA</i>	21(22,1)	4(14,8)	0,70 (0,18-2,49)	0,544	12(22,2)	4(25,0)	0,86 (0,20-3,85)	0,528	9(22,0)	0(0,0)	0,00 (0,00-2,88)	0,322
<i>AA</i>	1 (1,1)	3(11,1)	0,09 (0,00-1,08)	0,040 <sup>1</sup>	0 (0,0)	0 (0,0)	-		1(2,4)	3(27,3)	0,09 (0,00-1,16)	0,045 <sup>3</sup>
Г аллель	167(87,9)	44(81,5)	1,00		96(88,9)	28(87,5)	1,00		71(86,6)	16(72,7)	1,00	
А аллель	23(12,1)	10(18,5)	1,65 (0,68-3,97)	0,224	12(11,1)	4(12,5)	1,14 (0,28-4,25)	0,761	11(13,4)	6(27,3)	0,41 (0,12-1,48)	0,189
<i>ESRI+30T&gt;C (rs2077647)</i>												
<i>TT</i>	25(26,3)	10(37,0)	1,00		14(25,9)	5(31,3)	1,00		11(26,8)	5(45,5)	1,00	
<i>TC</i>	38(40,0)	9(33,3)	0,59 (0,19-1,87)	0,317	21(38,9)	6(37,5)	0,80 (0,17-3,83)	0,508	17(41,5)	3(27,3)	0,39 (0,06-2,46)	0,422
<i>CC</i>	32(33,7)	8(26,7)	0,63 (0,19-2,05)	0,386	19(35,2)	5(31,2)	0,74 (0,14-3,75)	0,728	13(31,7)	3(27,2)	0,51 (0,07-3,33)	0,685
Т аллель	88(46,3)	29(53,7)	1,00		49(45,4)	16(50,0)	1,00		39(47,6)	13(59,1)	1,00	
С аллель	66(53,7)	25(46,3)	0,74 (0,39-1,42)	0,337	59(54,6)	16(50,0)	0,83 (0,35-1,96)	0,645	43(52,4)	9(40,9)	0,63 (0,22-1,78)	0,337
Примечания												
ТАМ-Ч – тамоксифен-чувствительная группа, ТАМ-Р – тамоксифен-резистентная группа												
1 <sup>1</sup> – значимые различия показателей в группе люминальный РМЖ												
2 <sup>3</sup> – значимые различия показателей в группе люминальный В												

Для гена *EGFR* rs1468727 получены отличия TAM-P группы больных от TAM-Ч группы люминального А подтипа по частоте гетерозиготных генотипов, однако, только на уровне тенденций ( $p = 0,075$ ; Таблица 37). Доля гетерозигот *IGFRI* 3129TG преобладала в TAM-P группе как в общей выборке больных люминальным РМЖ, так и среди больных люминального А подтипа ( $p = 0,014$  и  $p = 0,003$ ; соответственно, Таблица 37). Кроме того, мутантный аллель G гена *IGFRI* rs2016347 был также ассоциирован с резистентностью к терапии тамоксифеном в двух исследуемых группах ( $p = 0,046$  для люминального РМЖ и  $p = 0,040$  для люминального А; Таблица 37). Учитывая расположение данного полиморфизма в пределах 3'нетранслируемой области гена (3'UTR), с которой взаимодействуют микроРНК и РНК-связывающие белки, полагают, что *IGFRI* rs2016347 может влиять на стабильность мРНК и эффективность процессов трансляции [246]. Видимо наличие мутантного варианта гена *IGFRI* приводит к увеличению экспрессии мРНК, что может определять усиление активации IGF/IGFR1-сигнальных путей и способствовать развитию резистентности.

Оценка полиморфных вариантов гена *KDR* rs2305948 показала, что в TAM-Ч группе больных люминальным РМЖ (как в общей выборке, так и люминальном А типе) чаще встречается мутантный аллель А ( $p = 0,015$  и  $p = 0,032$ ; соответственно, Таблица 38). Интересно отметить, что и для второго полиморфного локуса гена *KDR* rs2071559 выявлена тенденция к взаимосвязи с благоприятными результатами лечения больных люминальным РМЖ ( $p = 0,073$ ; Таблица 38). Эти закономерности, по-видимому, отражают вовлеченность гена *KDR* в механизмы опухолевой прогрессии. Снижая уровень экспрессии VEGFR2 (rs2071559) или изменяя степень сродства VEGFR2 к его лигандам (rs2305948), данные мутации могут влиять на активность VEGFR2- опосредованных сигнальных каскадов и определять эффективность проводимой терапии.

Частота встречаемости полиморфных вариантов гена *TGF- $\beta$ RI* rs334354 значимо не различалась у больных эстроген-зависимым РМЖ в зависимости от эффективности лечения тамоксифеном (Таблица 38).

Таблица 37 – Частота встречаемости полиморфных вариантов генов *EGFR* и *IGFR1* у больных люминальным РМЖ в зависимости от эффективности лечения тамоксифеном

Генотип/ аллель	Люминальный РМЖ, n (%)				Люминальный А, n (%)				Люминальный В, n (%)			
	ТАМ-Ч	ТАМ-Р	OR (95% CI)	P	ТАМ-Ч	ТАМ-Р	OR (95% CI)	P	ТАМ-Ч	ТАМ-Р	OR (95% CI)	P
<i>EGFR</i> (rs1468727)												
<i>TT</i>	47(51,1)	12(44,4)	1,00		29(56,9)	6(37,5)	1,00		18(43,9)	6(54,5)	1,00	
<i>TC</i>	15(16,3)	8(29,6)	2,03 (0,63-6,89)	0,171	8(15,7)	6(37,5)	0,28 (0,06-1,32)	0,075	7(17,1)	2(18,2)	0,86 (0,09-6,83)	0,626
<i>CC</i>	30(32,6)	7(16,0)	0,91 (0,29-2,87)	0,865	14(27,4)	4(27,4)	0,72 (0,14-3,71)	0,719	16(39,0)	3(27,3)	0,56 (0,09-3,20)	0,708
T аллель	109(59,2)	32(59,3)	1,00		66(64,7)	18(56,3)	1,00		43(52,4)	14(63,6)	1,00	
C аллель	75(40,8)	22(40,7)	1,00 (0,51-1,93)	0,998	36(35,3)	14(43,7)	1,43 (0,59-3,45)	0,388	39(47,6)	8(36,4)	0,63 (0,21-1,83)	0,349
<i>IGFR1</i> 3129G>T (rs2016347)												
<i>TT</i>	38(40,0)	4(14,8)	1,00		24(44,5)	1(6,2)	1,00		14(34,1)	3(27,3)	1,00	
<i>TG</i>	34(38,5)	15(55,6)	4,19 (1,14-6,70)	0,014 <sup>1</sup>	18(33,3)	11(68,8)	14,8 (1,66-2,15)	0,003 <sup>2</sup>	16(39,0)	4(36,4)	1,17 (0,17-8,19)	0,596
<i>GG</i>	23(24,2)	8(29,6)	0,30 (0,07-1,29)	0,064	12(22,2)	4(25,0)	0,13 (0,00-1,45)	0,066	11(26,9)	4(36,3)	1,70 (0,24-2,56)	0,678
T аллель	110(57,9)	23(42,6)	1,00		66(61,1)	13(40,7)	1,00		44(53,7)	10(45,5)	1,00	
G аллель	80(42,1)	31(57,4)	1,85 (0,96-3,57)	0,046 <sup>1</sup>	42(38,9)	19(59,3)	2,30 (0,96-5,55)	0,040 <sup>2</sup>	38(46,3)	12(54,5)	1,39 (0,49-3,96)	0,494
Примечания												
ТАМ-Ч – тамоксифен-чувствительная группа, ТАМ-Р – тамоксифен-резистентная группа												
1 <sup>1</sup> – значимые различия показателей в группе люминальный РМЖ												
2 <sup>2</sup> – значимые различия показателей в группе люминальный А												

Таблица 38 – Частота встречаемости полиморфных вариантов генов *TGF-β1* и *VEGFR2/KDR* у больных люминальным РМЖ в зависимости от эффективности лечения тамоксифеном

Генотип/ аллель	Люминальный РМЖ, n (%)				Люминальный А, n (%)				Люминальный В, n (%)			
	ТАМ-Ч	ТАМ-Р	OR (95% CI)	P	ТАМ-Ч	ТАМ-Р	OR (95% CI)	P	ТАМ-Ч	ТАМ-Р	OR (95% CI)	P
<i>TGF-β1</i> Int7G24A (rs334354)												
<i>GG</i>	66(69,5)	20(74,1)	1,00		32(59,3)	11(68,8)	1,00		34(82,9)	9(81,8)	1,00	
<i>GA</i>	23(24,2)	6(22,2)	0,86 (0,27-2,64)	0,775	17(31,5)	4(25,0)	0,68 (0,15-2,85)	0,755	6(14,6)	2(18,2)	1,26 (0,15-9,05)	0,557
<i>AA</i>	6 (6,3)	1(3,7)	0,55 (0,02-5,15)	0,502	5 (9,2)	1 (6,2)	0,58 (0,02-6,34)	0,540	1(2,5)	0(0,0)	0,00 (0,00-7,45)	0,795
G аллель	155(81,6)	46(85,2)	1,00		81(75,0)	26(81,3)	1,00		74(90,2)	20(90,9)	1,00	
A аллель	35(18,4)	8(14,8)	0,77 (0,31-1,88)	0,539	27(25,0)	6(18,7)	0,69 (0,23-2,02)	0,464	8(9,8)	2(9,1)	0,93 (0,00-5,33)	0,644
<i>KDR-604T&gt;C</i> (rs2071559)												
<i>TT</i>	31(32,6)	12(24,4)	1,00		14(25,9)	7(43,8)	1,00		17(41,5)	5(45,5)	1,00	
<i>TC</i>	39(41,1)	10(37,0)	0,66 (0,23-1,92)	0,400	20(37,0)	6(37,5)	0,60 (0,14-2,59)	0,435	19(46,3)	4(36,4)	0,72 (0,13-3,82)	0,557
<i>CC</i>	25(26,3)	5(18,5)	0,52 (0,14-1,88)	0,264	20(37,1)	3(18,7)	0,30 (0,05-1,64)	0,155	5(12,2)	2(18,1)	1,36 (0,13-12,8)	0,556
T аллель	101(53,2)	34(63,0)	1,00		48(44,4)	20(62,5)	1,00		53(64,6)	14(63,6)	1,00	
C аллель	89(46,8)	20(37,0)	0,67 (0,34-1,38)	0,201	60(35,6)	12(37,5)	0,48 (0,20-1,16)	0,073	29(35,4)	8(36,4)	1,04 (0,35-3,07)	0,931
<i>KDR 1192G&gt;A</i> (rs2305948)												
<i>GG</i>	77(83,7)	26(100,0)	1,00		41(80,4)	16(100,0)	1,00		36(87,8)	10(100,0)	1,00	
<i>GA</i>	12(13,0)	0(0,0)	0,00 (0,00-1,38)	0,065	8(15,7)	0(0,0)	0,00 (0,00-1,98)	0,184	4(9,8)	0(0,0)	0,00 (0,00-6,76)	0,571
<i>AA</i>	3(3,3)	0(0,0)	0,00 (0,00-7,14)	0,426	2(3,9)	0(0,0)	0,00 (0,00-11,7)	0,528	1(2,4)	0(0,0)	0,00 (0,00-1,50)	0,787
G аллель	166(90,2)	52(100,0)	1,00		90(88,2)	32(100,0)	1,00		76(92,7)	20(100,0)	1,00	
A аллель	18(9,8)	0(0,0)	0,00 (0,00-0,93)	0,015 <sup>1</sup>	12(11,8)	0(0,0)	0,00 (0,00-1,29)	0,032 <sup>2</sup>	6(7,3)	0(0,0)	0,00 (0,00-3,94)	0,595
Примечания												
ТАМ-Ч – тамоксифен-чувствительная группа, ТАМ-Р – тамоксифен-резистентная группа												
1 <sup>1</sup> – значимые различия показателей в группе люминальный РМЖ												
2 <sup>2</sup> – значимые различия показателей в группе люминальный А												

В современных источниках литературы, исследований, касающихся связи описанных выше SNP с эффективностью гормональной терапии, представлено крайне мало. Относительно недавно опубликованная работа по изучению полиморфных вариантов гена *IGFR1*, показала, что *IGFR1* rs2016347 может рассматриваться в качестве независимого прогностического маркера эстроген-позитивных опухолей [195]. Результаты нашего исследования полностью согласуются с данными этой работы, в которой авторы продемонстрировали ассоциацию мутантного аллеля G rs2016347 с высоким риском прогрессирования у больных эстроген-позитивным РМЖ, получавшим тамоксифен в адъювантном режиме. Авторы полагают, что данная нуклеотидная замена может приводить к увеличению активности *IGFR1* как тирозинкиназного рецептора, посредством усиления его транскрипционной активности, тем самым, индуцируя резистентность к тамоксифену.

Следует отметить, что отличительной особенностью нашего исследования является поиск функционально-значимых SNP, связанных с ответом на тамоксифен в эстроген-зависимых опухолях с учетом их молекулярного типирования. Полученные данные свидетельствуют о том, что резистентность к тамоксифену у больных люминальным А РМЖ ассоциирована с мутантным аллелем G гена *IGFR1* rs2016347, чувствительность к проводимой гормональной терапии – с мутантным аллелем A гена *KDR* rs2305948. Для пациенток люминальным В РМЖ носительство мутантного варианта *ESR1*2014AA (rs2228480) может быть связано с высоким риском не ответить на гормональную терапию тамоксифеном.

### 3.5.2 Анализ связи белковой и генной экспрессии рецепторов факторов роста с эффективностью гормональной терапии тамоксифеном

Анализ экспрессионного профиля мРНК исследуемых генов показал значимые ассоциации с эффективностью лечения только для гена, кодирующего рецептор трансформирующего фактора роста  $\beta$  1 (*TGF- $\beta$ RI*) (Рисунок 17).

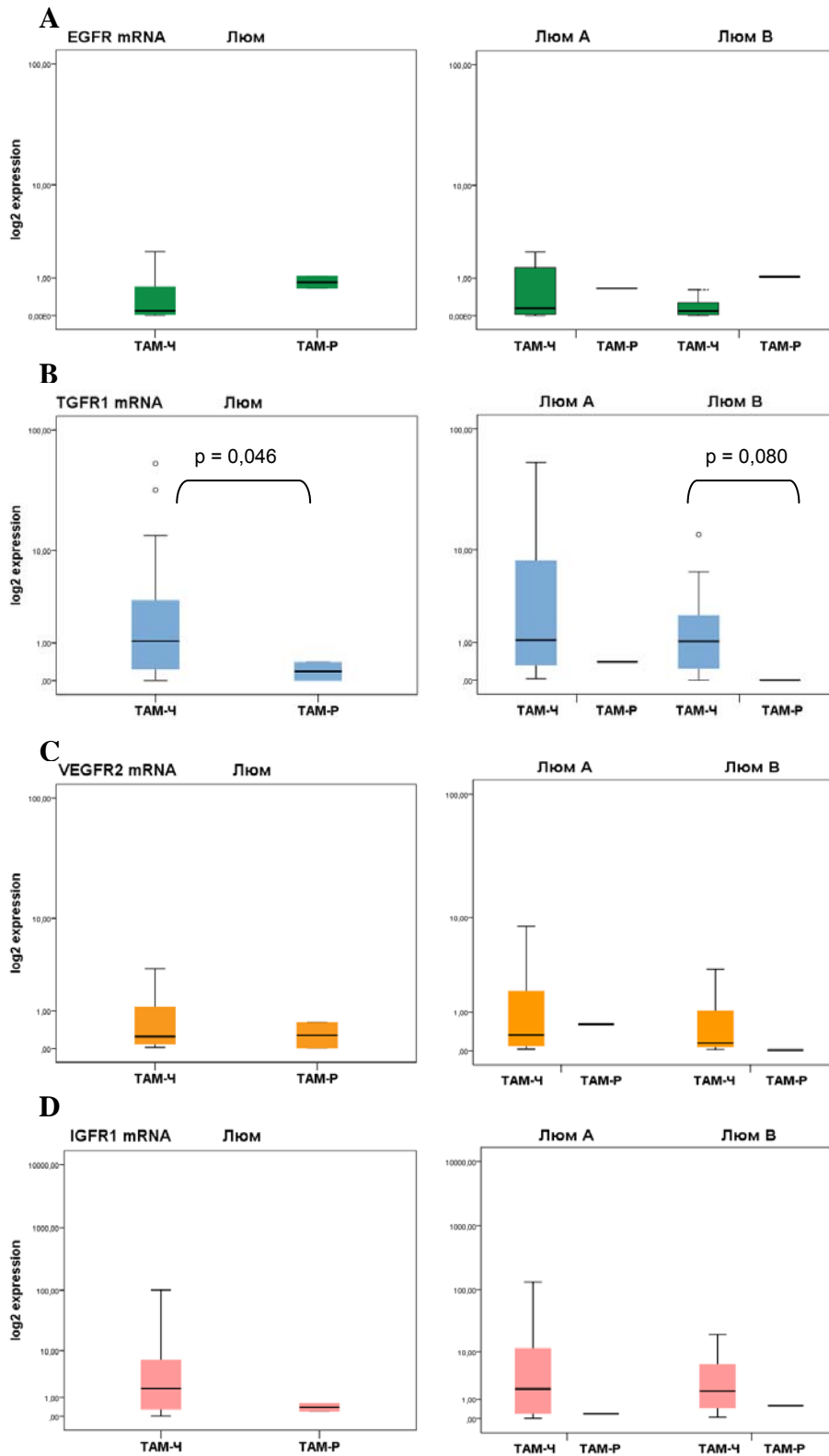


Рисунок 17 – Уровень экспрессии генов *EGFR* (A), *TGF- $\beta$ 1* (B), *KDR* (C), *IGFR1* (D) в зависимости от эффективности терапии тамоксифеном в общей группе больных люминальным раком молочной железы, люминальным А (Люм А) и люминальным В (Люм В) типами. Результаты представлены в виде log<sub>2</sub> значений экспрессии

Уровень экспрессии гена *TGF-βRI* в опухоли тамоксифен-чувствительных пациенток люминальным РМЖ (общая группа) почти в 10 раз превосходил таковой в образцах опухолевой ткани тамоксифен-резистентной группы ( $4,64 \pm 1,56$  и  $0,47 \pm 0,19$ ;  $p = 0,046$ ). Стратификация пациенток в зависимости от молекулярного подтипа подтвердила выявленные различия только для люминального В РМЖ, однако, без статистической значимости ( $p = 0,080$ ; Рисунок 17).

Обнаружено, что показатели белковой экспрессии *TGF-βRI* также связаны с отдаленными результатами лечения больных эстроген-зависимым РМЖ. Позитивная экспрессия *TGF-βRI* выявлена в 72,1% люминальных опухолей ТАМ-Ч группы по сравнению с 48,0% в ТАМ-Р ( $p = 0,030$ ; Рисунок 18). ТАМ-Ч опухоли люминального А варианта также характеризовались высокой долей *TGF-βRI*-позитивных клеток в сравнении с ТАМ-Р опухолями, но различия не значимы (67,5% и 40% соответственно;  $p = 0,063$ ).

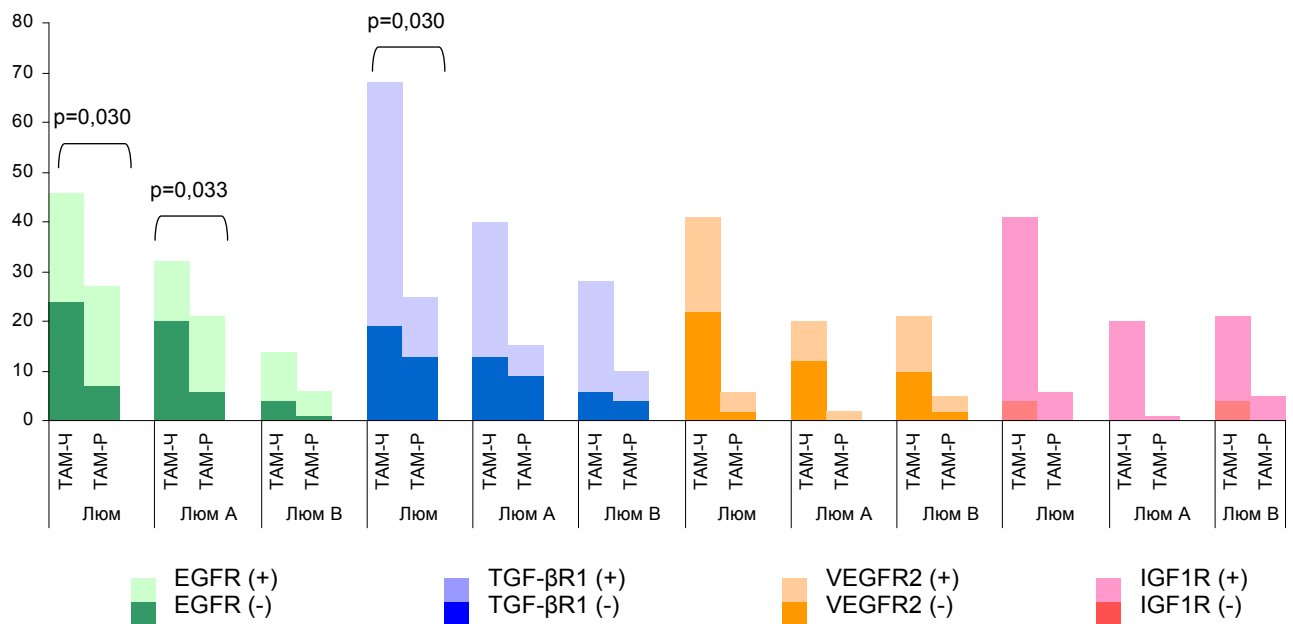


Рисунок 18 – Наличие экспрессии (позитивная/негативная) рецепторов факторов роста в образцах опухолевой ткани больных люминальным (Люм), люминальным А (Люм А) и люминальным В (Люм В) раком молочной железы в зависимости от эффективности терапии тамоксифеном

Напротив, преобладающее большинство TAM-Р опухолей имело высокий позитивный уровень экспрессии EGFR в отличие от TAM-Ч опухолей. Значимые различия показаны как для общей выборки люминального РМЖ, так и для люминального А типа ( $p = 0,030$  и  $p = 0,033$  соответственно; Рисунок 18).

Средние показатели белковой экспрессии рецепторов факторов роста были примерно сопоставимы между исследуемыми группами, за исключением показателей экспрессии TGF- $\beta$ RI. Выявлена тенденция к взаимосвязи высоких значений экспрессии белка TGF- $\beta$ RI с чувствительностью к терапии тамоксифеном среди больных люминальным раком молочной железы как при А, так и В подтипах ( $p = 0,096$ ; Рисунок 19).

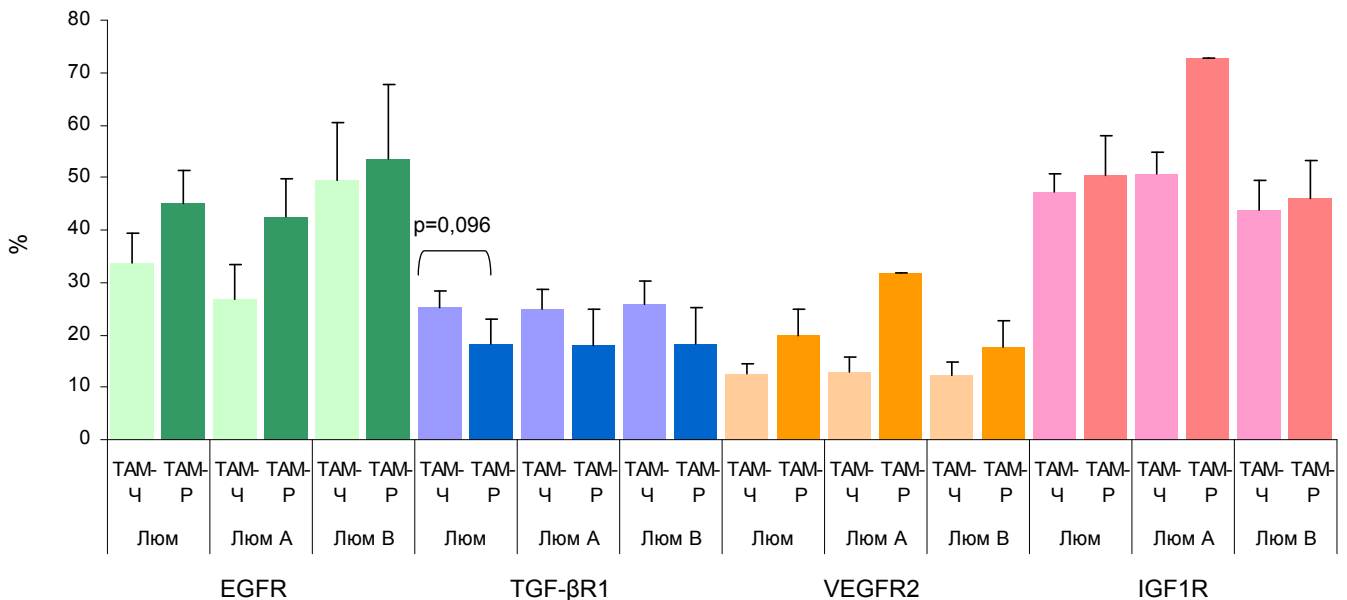


Рисунок 19 – Процент экспрессии рецепторов факторов роста в образцах опухолевой ткани больных люминальным (Люм), люминальным А (Люм А) и люминальным В (Люм В) раком молочной железы в зависимости от эффективности терапии тамоксифеном

Многочисленные экспериментальные и клинические исследования свидетельствуют о том, что экспрессия мРНК EGFR и его продукта значительно увеличена как в тамоксифен-резистентных клеточных линиях рака молочной железы, так и в опухолевой ткани больных, не отвечающих на терапию тамоксифеном, что указывает на несомненный вклад данной тирозинкиназы в

механизмы неэффективности гормональной терапии [104, 185, 228, 252, 318, 384]. Недавно опубликованные данные подтверждают результаты нашего исследования об ассоциации позитивной экспрессии в опухоли EGFR с неблагоприятным прогнозом больных люминальным А РМЖ, получавших тамоксифен [342]. Предполагается, что резистентность к тамоксифену инициируется активацией сигнальных каскадов EGFR (через MAPK и Akt), по крайней мере, частично посредством запуска негеномного механизма активации ER $\alpha$ , поскольку классический ER $\alpha$  геномный путь в значительной степени супрессирован тамоксифеном.

В отличие от рецептора эпидермального фактора роста роль рецептора трансформирующего фактора роста  $\beta$  первого типа в механизмах развития резистентности/чувствительности опухоли к гормональной терапии остается малоизученной. В основном исследования касаются анализа экспрессии рецептора трансформирующего фактора роста второго типа (TGF- $\beta$ RII) как маркера чувствительности к адъювантному лечению тамоксифеном у больных РМЖ. Выявлен низкий уровень экспрессии мРНК *TGF- $\beta$ RII* в опухолевой ткани у тамоксифен-резистентной группы больных РМЖ [18]. Показано, что низкий уровень белковой экспрессии TGF- $\beta$ RII ассоциирован с резистентностью к тамоксифену у пременопаузальных больных РМЖ [219]. Проведенное нами исследование указывает на то, что низкий уровень экспрессии как гена *TGF- $\beta$ RI*, так и кодируемого им белка является одним из факторов, связанных с неэффективностью лечения тамоксифеном у больных люминальным РМЖ. Можно предположить, что низкая функциональная активность TGF- $\beta$ RI обуславливает неполноценную функциональную реализацию TGF- $\beta$ 1/Smad сигнальной трансдукции, что приводит к активации пролиферативных процессов в опухоли, в том числе и посредством запуска альтернативных сигнальных каскадов. Ключевую роль при этом, вероятно, имеет функциональный статус эстрогеновых рецепторов (активация ER $\alpha$ , наличие мутаций и точечных замен), которые могут быть вовлечены в супрессию TGF- $\beta$ 1/Smad пути.

Таким образом, проведенное исследование указывает на то, что опухоли люминального А типа, экспрессирующие высокие значения EGFR потенциально резистентны к тамоксифену. Эстроген-зависимые опухоли (люминального А и В подтипов), высоко экспрессирующие *TGF-βRI* и его белковый продукт, потенциально чувствительны к гормональной терапии тамоксифеном.

### 3.5.3 Ассоциация экспрессии белков Akt(pS473) и PTEN с эффективностью терапии тамоксифеном

Методом проточной цитофлуориметрии проведен анализ содержания ключевых белков PI3K/Akt/mTOR сигнального пути у больных исследуемых групп, результаты которого представлены на Рисунке 20.

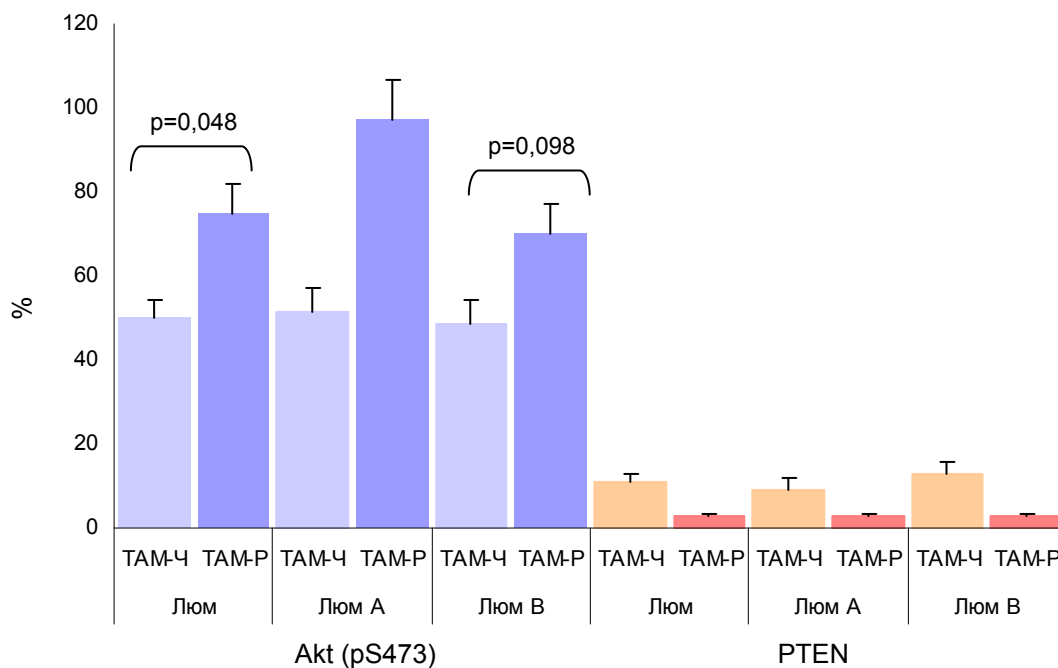


Рисунок 20 – Процент экспрессии Akt (pS473) и PTEN в образцах опухолевой ткани больных люминальным (Люм), люминальным А (Люм А) и люминальным В (Люм В) раком молочной железы в зависимости от эффективности терапии тамоксифеном

Выявлено, что в ТАМ-Р опухолях показатели экспрессии фосфорилированной формы Akt1 в 1,5 выше по сравнению с таковыми в ТАМ-Ч опухолях, что свидетельствует о значимой активности Akt-зависимых каскадов, определяющих формирование устойчивости к антиэстрогенам ( $74,67 \pm 7,13$  против  $49,97 \pm 4,09$ ;  $p = 0,048$ ). Высокая активность Akt(pS473) в опухолевых клетках наблюдалась не только у больных общей группы люминальных опухолей, ТАМ-Р опухоли люминального В типа также экспрессировали Akt(pS473) в большей степени, чем ТАМ-Ч опухоли этого молекулярного варианта ( $70,20 \pm 6,80$  против  $48,42 \pm 5,91$ ;  $p = 0,098$ ). Содержание белка PTEN в опухоли больных с разными молекулярными подтипами РМЖ не было сопряжено с эффективностью антиэстрогенной терапии тамоксифеном (Рисунок 20).

Оценка количества клеток, экспрессирующих комбинации маркеров IGF1R/Akt(pS473) и VEGFR2/Akt(pS473) не показала их значимый вклад в формирование устойчивости/чувствительности опухоли к терапии тамоксифеном. Однако отчетливая тенденция связи с резистентностью к тамоксифену определена для клеток, экспрессирующих фенотип IGF1R<sup>-</sup>/Akt(pS473)<sup>+</sup> в опухолях общей группы люминальных раков ( $p = 0,091$ ) и образцах опухолей люминального А подтипа ( $p = 0,081$ ). Стоит обратить внимание на высокий процент клеток с двойным позитивным фенотипом VEGFR2<sup>+</sup>/Akt(pS473)<sup>+</sup> в ТАМ-Р опухолях вне зависимости от отнесения к люминальным А и В подтипам РМЖ ( $p = 0,074$ ; Таблица 39).

Известно, что регуляция активности Akt1 происходит за счет двух сайтов фосфорилирования Thr-308 внутри активационной петли киназного домена и Ser-473 гидрофобного мотива, при этом фосфорилирование по аминокислотному остатку Ser-473 имеет решающее значение для полной функциональной активации Akt1. Показано, что фосфорилирование треонина 308 в отсутствие фосфорилирования по серину 473 определяет лишь 60% активности Akt1 при двойном ингибировании mTORC1 и mTORC2 [240]. Поэтому изучение содержания клеток, экспрессирующих именно Akt(pS473), представляется

обоснованным для определения изменения степени активации PI3K/Akt/mTOR пути в опухолевых клетках в процессе антиэстрогенной терапии.

Таблица 39 – Средний процент популяций клеток, экспрессирующих комбинации маркеров IGF1R/Akt(pS473) и VEGFR2/Akt(pS473) у больных РМЖ в зависимости от эффективности лечения тамоксифеном

Параметр	Процент экспрессии, М±m,%					
	Люминальный РМЖ n=47		Люминальный А n=21		Люминальный В n=26	
	ТАМ-Ч	ТАМ-Р	ТАМ-Ч	ТАМ-Р	ТАМ-Ч	ТАМ-Р
IGF1R <sup>-</sup> /Akt(pS473) <sup>+</sup>	44,36±3,86	62,33±7,48	44,41±5,35	89,60±8,90	44,31±5,67	56,88±6,27
	p=0,091		p=0,081		p=0,310	
IGF1R <sup>+</sup> /Akt(pS473) <sup>-</sup>	0,01±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	p=0,986		p=0,999		p=0,127	
IGF1R <sup>+</sup> /Akt(pS473) <sup>+</sup>	0,34±0,11	2,55±1,46	0,43±0,18	0,00±0,00	0,26±0,13	3,06±1,67
	p=0,208		p=0,086		p=0,193	
IGF1R <sup>-</sup> /Akt(pS473) <sup>-</sup>	55,74±3,89	35,13±6,45	55,17±5,41	10,40±1,40	56,28±5,71	40,08 ±5,06
	p=0,056		p=0,086		p=0,193	
VEGFR2 <sup>-</sup> /Akt(pS473) <sup>+</sup>	20,61±2,49	22,20±6,27	19,28±3,60	23,10±3,10	21,88±3,49	22,02±7,67
	p=0,899		p=0,819		p=0,986	
VEGFR2 <sup>+</sup> /Akt(pS473) <sup>-</sup>	10,78±1,73	10,98±3,34	11,68±2,73	20,90±2,90	9,93±2,20	9,00±3,29
	p=0,886		p=0,994		p=0,162	
VEGFR2 <sup>+</sup> /Akt(pS473) <sup>+</sup>	6,55±1,30	8,42±1,61	6,99±2,34	11,20±1,12	6,13±1,26	7,86±1,85
	p=0,074		p=0,899		p=0,439	
VEGFR2 <sup>-</sup> /Akt(pS473) <sup>-</sup>	63,07±2,56	58,45±5,64	64,09±3,68	44,90±4,44	62,09±3,69	61,16 ±6,06
	p=0,515		p=0,269		p=0,908	
Примечания						
ТАМ-Ч – тамоксифен-чувствительная группа, ТАМ-Р – тамоксифен-резистентная группа						

Экспериментальные исследования *in vitro* и *in vivo* свидетельствуют, что высокий уровень экспрессии фосфорилированной Akt1 коррелирует с ERα-независимым усилением mTOR активности и резистентностью к тамоксифену [27, 188, 189]. Клинические работы, касающиеся взаимосвязи Akt(pS473) экспрессии с эффективностью тамоксифена у больных эстроген-зависимым РМЖ не столь убедительны. Высокий уровень ядерной экспрессии Akt(pS473) ассоциирован с резистентностью к тамоксифену с пограничной статистической значимостью у постменопаузальных больных без распространенного опухолевого процесса [22].

Резюмируя представленные нами результаты, можно полагать о значимом вовлечении Akt(pS473) в механизмы формирования чувствительности и

резистентности к тамоксифену в опухолях люминального типа и потенциальном вкладе в эти процессы рецепторов факторов роста.

### 3.5.4 Содержание субпопуляций опухолевых клеток CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-low</sup>, CD44<sup>-</sup>/CD24<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup>, CD44<sup>-</sup>/CD24<sup>-</sup> в зависимости от эффективности терапии тамоксифеном

Анализ популяций клеток, экспрессирующих сочетание поверхностных маркеров опухолевых клеток CD44/CD24 методом проточной цитофлуориметрии, позволил оценить изменение их числа в зависимости от эффективности антиэстрогенной терапии тамоксифеном. Оказалось, что для опухолей люминального А типа с высоким количеством CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-low</sup> клеток в большей степени характерна устойчивость к тамоксифену (p = 0,050; Таблица 40).

Таблица 40 – Средний процент субпопуляций клеток, экспрессирующих комбинацию маркеров CD44/CD24 у больных РМЖ в зависимости от эффективности лечения тамоксифеном

Параметр	Процент экспрессии, M±m,%					
	Люминальный РМЖ n=47		Люминальный А n=21		Люминальный В n=26	
	ТАМ-Ч	ТАМ-Р	ТАМ-Ч	ТАМ-Р	ТАМ-Ч	ТАМ-Р
CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-low</sup>	6,71±0,96 p=0,774	5,87±2,54	5,76±1,19 p=0,050 <sup>2</sup>	16,70±0,50	7,63±1,48 p=0,283	3,70±1,61
CD44 <sup>-</sup> /CD24 <sup>+</sup>	34,29±3,04 p=0,599	29,72±4,98	34,82±2,99 p=0,202	16,70±0,50	33,79±5,30 p=0,696	32,32±5,20
CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>+</sup>	37,87±3,32 p=0,842	39,82±11,7	36,37±4,32 p=0,142	66,70±6,70	39,30±5,08 p=0,690	28,46±12,7
CD44 <sup>-</sup> /CD24 <sup>-</sup>	21,07±3,23 p=0,860	24,63±8,73	22,95±4,31 p=0,886	0,00±0,40	19,28±4,85 p=0,283	29,56 ±8,73
Примечания ТАМ-Ч – тамоксифен-чувствительная группа, ТАМ-Р – тамоксифен-резистентная группа 1 <sup>2</sup> – значимые различия показателей в группе люминальный А						

Эти данные позволяют полагать, что клетки с фенотипом стволовых могут способствовать формированию не только клинически агрессивных тройных

негативных опухолей, но и устойчивых в плане ответа на антиэстрогенную терапию эстроген-зависимых опухолей.

Также показано, что доля  $CD44^+/CD24^-/PTEN^+$  клеток в люминальных опухолях, резистентных к тамоксифену составляет 8,25% в сравнении с 4,91% для опухолей, чувствительных к данному препарату, однако значимости различий не достигнуто ( $p = 0,085$ ; Таблица 41).

Таблица 41 – Средний процент субпопуляций клеток, экспрессирующих комбинации маркеров CD44, CD24 и PTEN у больных РМЖ в зависимости от эффективности лечения тамоксифеном

Параметр	Процент экспрессии, $M \pm m, \%$					
	Люминальный РМЖ n=47		Люминальный А n=21		Люминальный В n=26	
	ТАМ-Ч	ТАМ-Р	ТАМ-Ч	ТАМ-Р	ТАМ-Ч	ТАМ-Р
$CD44^+/CD24^-/PTEN^+$	4,91±1,11 p=0,085	8,25±3,72	3,42±0,88 p=0,980	4,20±0,04	6,35±1,98 p=0,142	9,06±4,45
$CD44^-/CD24^+/PTEN^+$	11,85±2,34 p=0,949	10,10±4,85	12,91±3,09 p=0,999	0,70±0,07	10,85±3,55 p=0,515	11,98±5,47
$CD44^+/CD24^+/PTEN^+$	0,46±0,15 p=0,435	0,85±0,49	0,42±0,17 p=0,999	0,00±0,00	0,50±0,24 p=0,313	1,02±0,57
$CD44^-/CD24^-/PTEN^+$	82,76±2,49 p=0,655	80,77±7,05	83,27±3,19 p=0,890	95,10±0,09	82,31±3,88 p=0,398	77,90 ±7,89
$CD44^+/CD24^-/PTEN^-$	5,52±1,14 p=0,679	3,55±1,15	6,95±2,08 p=0,898	7,10±0,07	4,17±0,99 p=0,625	2,84±1,10
$CD44^-/CD24^+/PTEN^-$	16,06±1,16 p=0,643	15,74±1,40	16,75±1,82 p=0,800	13,50±1,35	15,40±1,50 p=0,515	16,18±1,62
$CD44^+/CD24^+/PTEN^-$	0,76±0,31 p=0,513	0,47±0,18	0,96±0,54 p=0,798	0,20±0,02	0,57±0,33 p=0,268	0,52±0,21
$CD44^-/CD24^-/PTEN^-$	77,66±1,72 p=0,924	80,28±2,13	75,35±2,94 p=0,814	79,20±0,72	79,87±1,80 p=0,820	80,50±2,60
Примечания ТАМ-Ч – тамоксифен-чувствительная группа, ТАМ-Р – тамоксифен-резистентная группа						

Важно отметить, что процентное содержание популяций клеток с двойным позитивным фенотипом  $CD44^+/IGF1R^+$  преобладало в тамоксифен-резистентных опухолях, тогда как процент клеток с двойным негативным фенотипом  $CD44^-/IGF1R^-$  - в тамоксифен-чувствительных ( $p = 0,041$  и  $p = 0,036$  соответственно; Таблица 42). Недавно на моделях ксенотрансплантатов рака молочной железы было показано, что экспрессия IGF1R может являться маркером стволовых

опухолевых клеток, запускающим PI3K/Akt/mTOR сигнальный путь в тройных негативных опухолях [367]. Видимо фенотип с коэкспрессией CD44<sup>+</sup>/IGF1R<sup>+</sup> следует рассматривать в качестве фенотипа с высоким прогностическим потенциалом не только для тройного негативного рака, но и эстроген-зависимых опухолей.

Таблица 42 – Средний процент субпопуляций клеток, экспрессирующих комбинации маркеров CD44/ IGF1R и CD24/ TGF-βRI у больных РМЖ в зависимости от эффективности лечения тамоксифеном

Параметр	Процент экспрессии, M±m,%					
	Люминальный РМЖ n=47		Люминальный А n=21		Люминальный В n=26	
	ТАМ-Ч	ТАМ-Р	ТАМ-Ч	ТАМ-Р	ТАМ-Ч	ТАМ-Р
CD44 <sup>+</sup> / IGF1R <sup>-</sup>	4,39±1,07	2,45±1,10	5,20±1,88	0,00±0,00	3,62±1,09	2,94±1,21
	p=0,524		p=0,980		p=0,974	
CD44 <sup>-</sup> / IGF1R <sup>+</sup>	38,71±2,80	44,50±5,16	37,51±3,74	36,40±3,64	39,86±4,22	46,12±5,99
	p=0,451		p=0,949		p=0,503	
CD44 <sup>+</sup> / IGF1R <sup>+</sup>	21,64±3,01	38,40±7,30	24,70±4,73	63,60±6,36	18,72±3,77	33,36±6,47
	p=0,041 <sup>1</sup>		p=0,199		p=0,093	
CD44 <sup>-</sup> / IGF1R <sup>-</sup>	35,71±3,63	14,67±4,55	33,51±4,87	0,00±0,00	37,81±5,44	17,60 ±4,26
	p=0,036 <sup>1</sup>		p=0,980		p=0,111	
CD24 <sup>+</sup> / TGF-βRI <sup>-</sup>	22,41±2,87	12,87±3,82	23,02±4,41	4,80±1,21	21,83±3,80	14,48±4,24
	p=0,214		p=0,999		p=0,375	
CD24 <sup>-</sup> / TGF-βRI <sup>+</sup>	10,78±1,51	16,95±4,71	9,09±2,06	20,00±2,45	12,38±2,18	16,34±5,73
	p=0,166		p=0,262		p=0,456	
CD24 <sup>+</sup> / TGF-βRI <sup>+</sup>	29,01±3,69	29,83±4,93	32,03±6,07	39,20±5,11	26,14±4,35	27,96±5,58
	p=0,524		p=0,998		p=0,841	
CD24 <sup>-</sup> / TGF-βRI <sup>-</sup>	37,80±3,37	31,98±7,34	35,87±4,12	16,00±3,55	39,65±5,35	35,18±8,09
	p=0,587		p=0,151		p=0,706	
Примечания						
ТАМ-Ч – тамоксифен-чувствительная группа, ТАМ-Р – тамоксифен-резистентная группа						
1 <sup>1</sup> – значимые различия показателей в группе люминальный РМЖ						

Особый интерес в современных клинических и экспериментальных исследованиях направлен на изучение прогностической значимости CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>low</sup> и связи этой популяции клеток с ответом на противоопухолевую химиотерапию [55, 67, 125, 291]. Намного меньше данных имеется о роли маркеров стволовых опухолевых клеток рака молочной железы в клиническом течении и эффективности антиэстрогенной терапии. Описаны механизмы,

посредством которых  $CD44^+/CD24^{-/low}$  могут быть вовлечены в формирование устойчивости к тамоксифену [336]. На экспериментальных моделях *in vitro* продемонстрировано, что  $CD44^+/CD24^{-/low}$ , выделенные из линии MCF-7 рака молочной железы не связаны с резистентностью к тамоксифену [400]. В более ранней клинической работе Abraham et al., не показали значимой ассоциации клеток, экспрессирующих  $CD44^+/CD24^{-/low}$  с ответом на тамоксифен у больных РМЖ без деления на молекулярные подтипы [295]. Недавние исследования, проведенные с участием эстроген-позитивных больных РМЖ, получавших тамоксифен в адьювантном режиме, подтверждают эти данные [65]. Однако авторы полагают, что большую прогностическую ценность в плане эффективности проводимой терапии тамоксифеном имеет изучение не комбинации маркеров CD44 и CD24, а определение статуса CD24-экспрессирующих клеток ввиду его значимой прометастатической активности, что находит подтверждение в некоторых проанализированных ими источниках [103, 241].

Наши данные свидетельствуют о потенциальной связи популяции клеток  $CD44^+/CD24^{-/low}$  с неэффективностью тамоксифена преимущественно в люминальных А опухолях, а также преобладании популяции клеток с коэкспрессией CD44 и IGF1R в опухолях резистентных к тамоксифену люминального А и В подтипов, что несомненно, требует дальнейшего подтверждения на более широких выборках пациентов.

### 3.5.5 Связь характера распределения ER $\alpha$ в опухоли с ответом на тамоксифен у больных эстроген-зависимым РМЖ

Принимая во внимание полученные ранее нашими коллегами данные о корреляции гетерогенного характера распределения ER $\alpha$  с такими прогностически неблагоприятными клинико-морфологическими параметрами как гематогенное метастазирование и мультифокусный/мультицентричный рост опухоли [4], мы

предположили, что наличие гетерогенного распределения эстрогеновых рецепторов в опухоли может отражать ее агрессивные биологические свойства.

Изучив характер распределения ER $\alpha$  в TAM-Ч/TAM-Р группах, мы показали, что у больных люминальным РМЖ (как в общей группе, так и люминального А подтипа), нечувствительных к тамоксифену, чаще встречается гетерогенный характер экспрессии по сравнению с пациентами, отвечающими на тамоксифен (Рисунок 21).

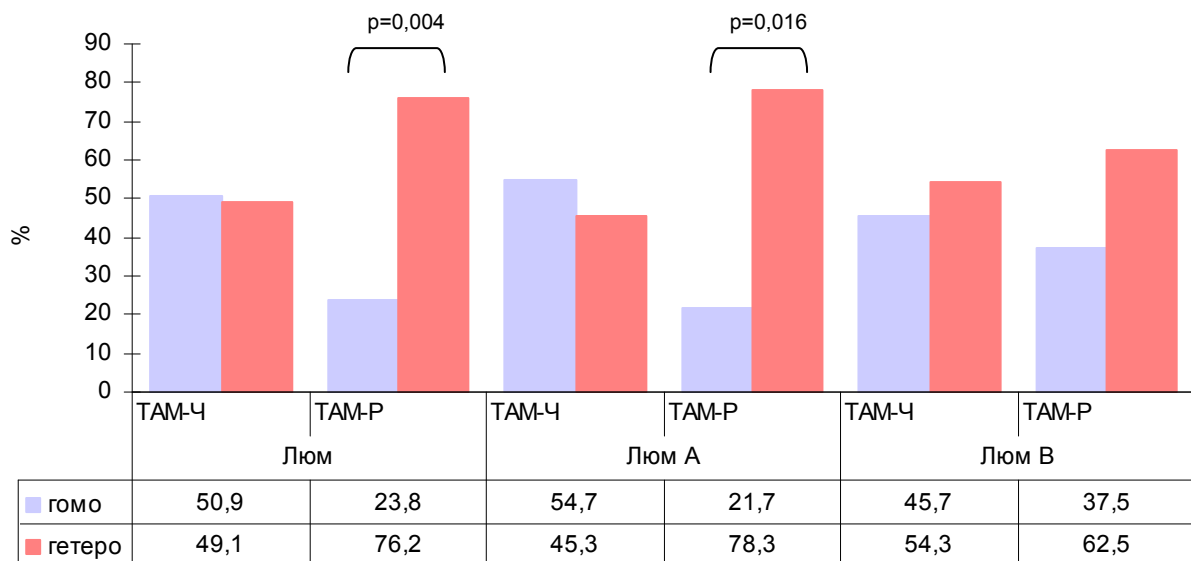


Рисунок 21 – Характер распределения ER $\alpha$  у больных люминальным (Люм), люминальным А (Люм А) и люминальным В (Люм В) раком молочной железы в зависимости от эффективности терапии тамоксифеном

Далее мы предприняли попытку оценить, насколько характер распределения ER $\alpha$  в сочетании с выявленными в настоящем исследовании потенциальными маркерами неэффективности тамоксифена будет иметь прогностическую силу. При анализе связи характера экспрессии ER $\alpha$  с полиморфизмом гена *ESR1*2014G>A (rs2228480) показано, что мутантный А аллель в 23,3% случаев был ассоциирован с гетерогенным характером распределения рецепторов у TAM-Р больных люминальным РМЖ и не встречается среди пациенток этой группы с гомогенным распределением рецепторов ( $p = 0,048$ ). Аналогичные результаты отмечены и для люминального В варианта РМЖ ( $p = 0,034$ ; Рисунок 22).

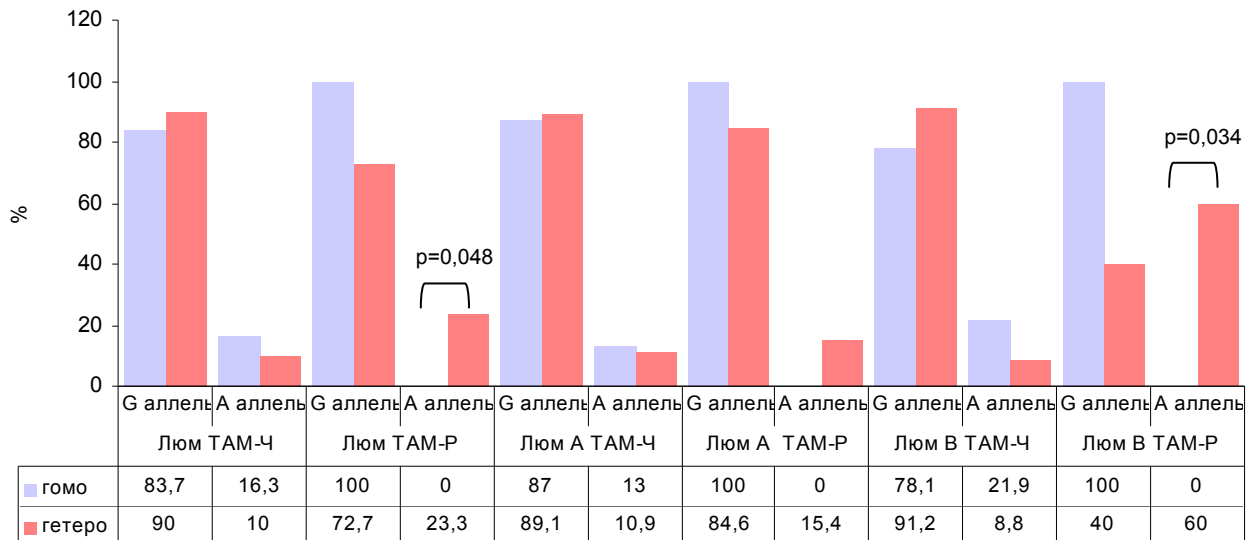


Рисунок 22 – Связь характера распределения ERα с полиморфизмом гена *ESR1* (rs2228480) у больных люминальным (Люм), люминальным А (Люм А) и люминальным В (Люм В) раком молочной железы в зависимости от эффективности терапии тамоксифеном

Кроме того, выявлено, что наличие гетерогенного характера распределения ERα и отсутствие экспрессии в опухоли белка TGF-βR1 ассоциировано с прогрессированием заболевания как в общей группе больных люминальным РМЖ ( $p = 0,005$ ), так и пациенток с люминальным А подтипом ( $p = 0,044$ ; Рисунок 23).

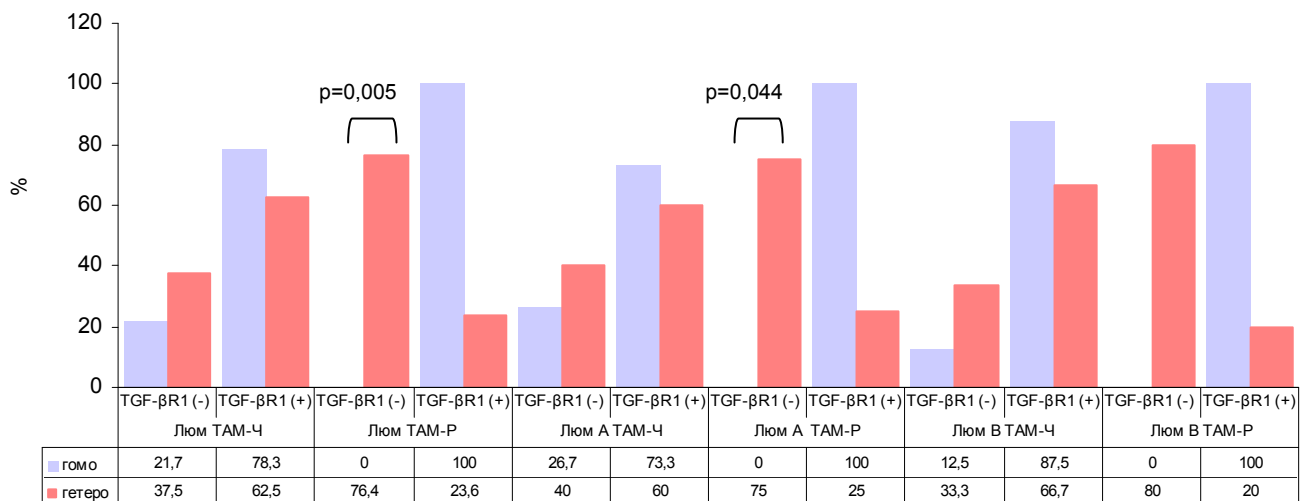


Рисунок 23 – Связь характера распределения ERα с показателями белковой экспрессии TGF-βR1 у больных люминальным (Люм), люминальным А (Люм А) и люминальным В (Люм В) раком молочной железы в зависимости от эффективности терапии тамоксифеном

Следует отметить, SNP генов *IGFR1*3129G>T (rs2016347), *KDR*1192G>A (rs2305948), уровень генной экспрессии *TGF-βRI*, содержание CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-low</sup> и Akt(pS473) во взаимосвязи с особенностями характера экспрессии ERα в опухоли не показали прогностическую значимость в качестве маркеров, связанных с эффективностью терапии тамоксифеном.

В целом можно заключить, что одновременный анализ нескольких неблагоприятных в плане чувствительности к антиэстрогенной терапии молекулярно-генетических параметров позволяет определить маркеры с наиболее выраженным прогностическим потенциалом.

### 3.5.6 Ассоциация исследуемых молекулярно-генетических маркеров с показателями безметастатической выживаемости у больных эстроген-зависимым РМЖ

Интегральным показателем эффективности любого вида противоопухолевой терапии является оценка показателей выживаемости больных. Мы оценили показатели безметастатической выживаемости у эстроген-позитивной группы больных с разными молекулярными вариантами в зависимости от исследуемых маркеров.

Выявлено, что показатели выживаемости значимо ниже у пациентов общей выборки эстроген-зависимого РМЖ с мутантными генотипами *ESR1*2014AA по сравнению с носителями диких и гетерозиготных вариантов *ESR1*2014GG+GA ( $p = 0,043$ ; Рисунок 24 А). Отсутствие мутантных гомозигот гена *ESR1*2014G>A (rs2228480) в группе больных люминальным А РМЖ не позволило построить кривые выживаемости. Для пациенток люминальным В вариантом разницы в показателях выживаемости не найдено (Рисунок 24 В).

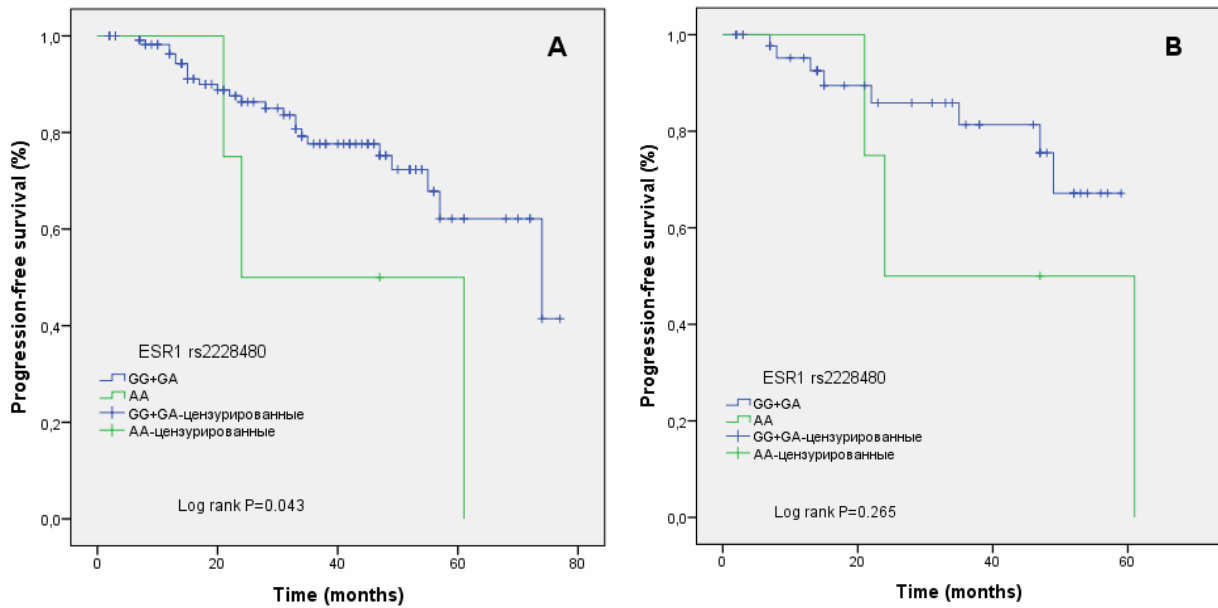


Рисунок 24 – Показатели безметастатической выживаемости в общей группе больных люминальным раком молочной железы (А) и люминальным В типом (В) в зависимости от генотипов гена *ESR1* (rs2228480)

Полиморфизм гена *IGFR13129G>T* (rs2016347) также явился прогностическим фактором, определяющим продолжительность жизни без прогрессирования у больных эстроген-зависимым РМЖ. Выявлено, что наличие гетерозигот и мутантных генотипов в этом полиморфном локусе значимо коррелирует с низкими показателями выживаемости больных люминальным А вариантом и имеет тенденцию к их снижению в общей выборке пациентов ( $p = 0,026$  и  $p = 0,074$  соответственно; Рисунок 25 В,А). Для SNP гена *KDR* (rs2305948) сочетание генотипов *KDR1192GA+AA* связано с высокими показателями безметастатической выживаемости сразу в двух рассматриваемых группах – общей и люминального А РМЖ ( $p = 0,012$  и  $p = 0,031$  соответственно; Рисунок 25 D,Е).

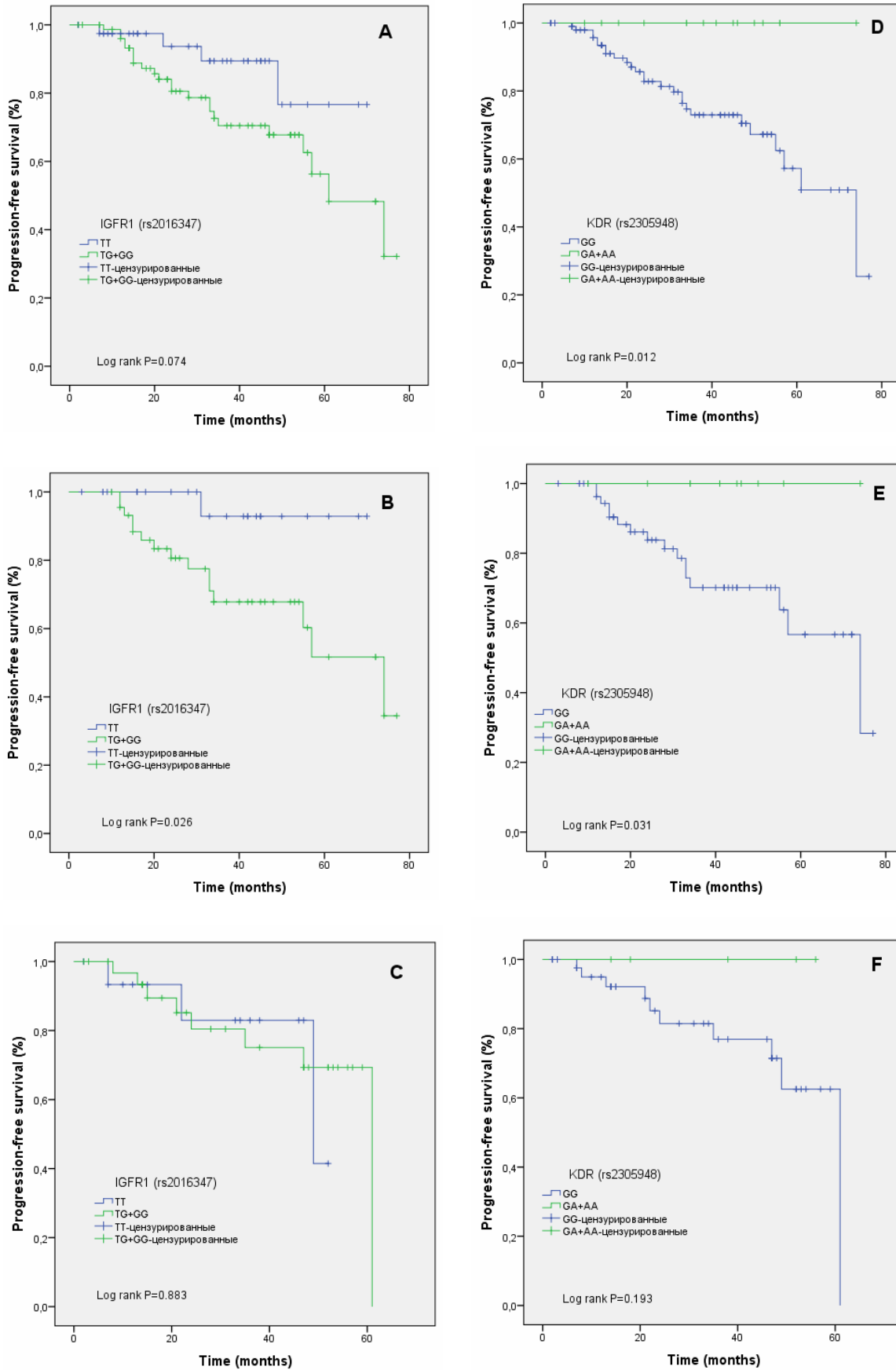


Рисунок 25 – Показатели безметастатической выживаемости в общей группе больных люминальным раком молочной железы (A,D), люминальным А типом (B,E) и люминальным В вариантом (C,F) в зависимости от полиморфизма генов *IGFR1* (rs2016347) и *KDR* (rs2305948)

Таким образом, настоящим исследованием продемонстрировано, что пациенты, с наличием в опухолевой ткани мутаций в генах *ESR1* (rs2228480) и *IGFR1* (rs2016347) характеризуются не только резистентностью к тамоксифену, но и имеют низкие показатели безметастатической выживаемости. Пациенты с наличием в опухоли мутации в гене *KDR* (rs2305948), напротив, чувствительны к данной антиэстрогенной терапии и имеют высокие показатели выживаемости без прогрессирования.

Показатели безметастатической выживаемости больных люминальным РМЖ были изучены в отношении экспрессии матричной РНК изучаемых генов, однако значимых ассоциаций не выявлено.

Анализ результатов выживаемости больных в зависимости от уровня белковой экспрессии рецепторов факторов роста показал, что отсутствие экспрессии TGF- $\beta$ RI в опухолевой ткани связано с низкими показателями выживаемости у больных объединенной группы эстроген-зависимого РМЖ ( $p = 0,032$ ; Рисунок 26 А). Не отмечено преимуществ в выживаемости без прогрессирования для больных люминальным А и люминальным В подтипом в зависимости от экспрессии данного белка ( $p = 0,272$  и  $p = 0,899$  соответственно; Рисунок 26 В,С). В отличие от данных по экспрессионному статусу TGF- $\beta$ RI, для показателей белковой экспрессии EGFR прогностически неблагоприятным оказался его позитивный уровень, что подтверждают кривые выживаемости. Причем, прогностическая значимость определена как для общей группы, так и группы люминального А рака молочной железы ( $p = 0,014$  и  $p = 0,029$  соответственно; Рисунок 26 D,E).

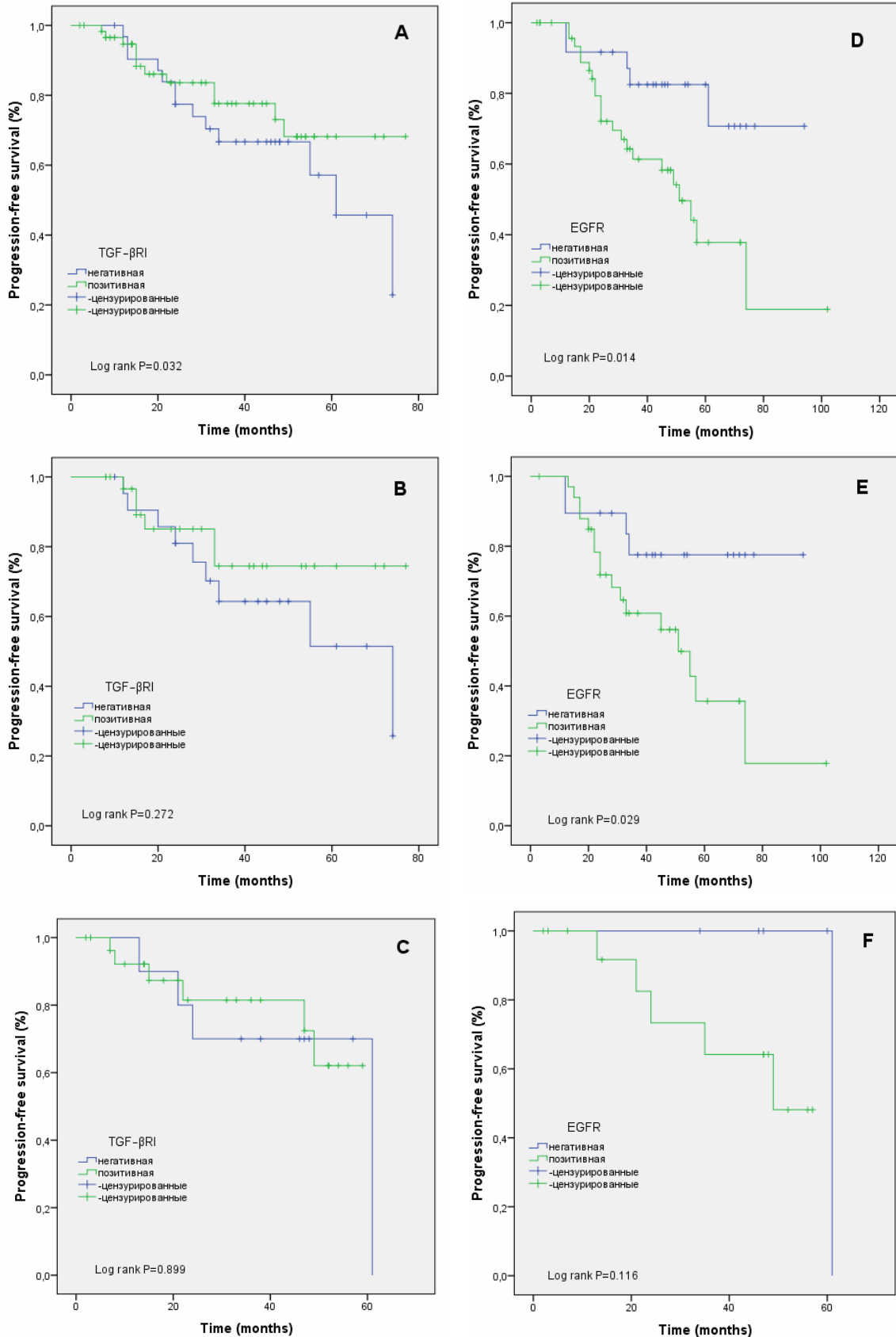


Рисунок 26 – Показатели безметастатической выживаемости в общей группе больных люминальным раком молочной железы (A,D), люминальным А типом (B,E) и люминальным В вариантом (C,F) в зависимости от белковой экспрессии TGF-βRI и EGFR

Анализ безметастатической выживаемости в зависимости от экспрессии внутриклеточных белков, выявил взаимосвязи только с содержанием Akt(pS473) в опухолевой ткани. Показано, что выживаемость без прогрессирования была значительно хуже у больных с высоким уровнем экспрессии фосфорилированной формы белка Akt1 независимо от молекулярного подтипа опухоли ( $p = 0,048$ ; Рисунок 27 А).

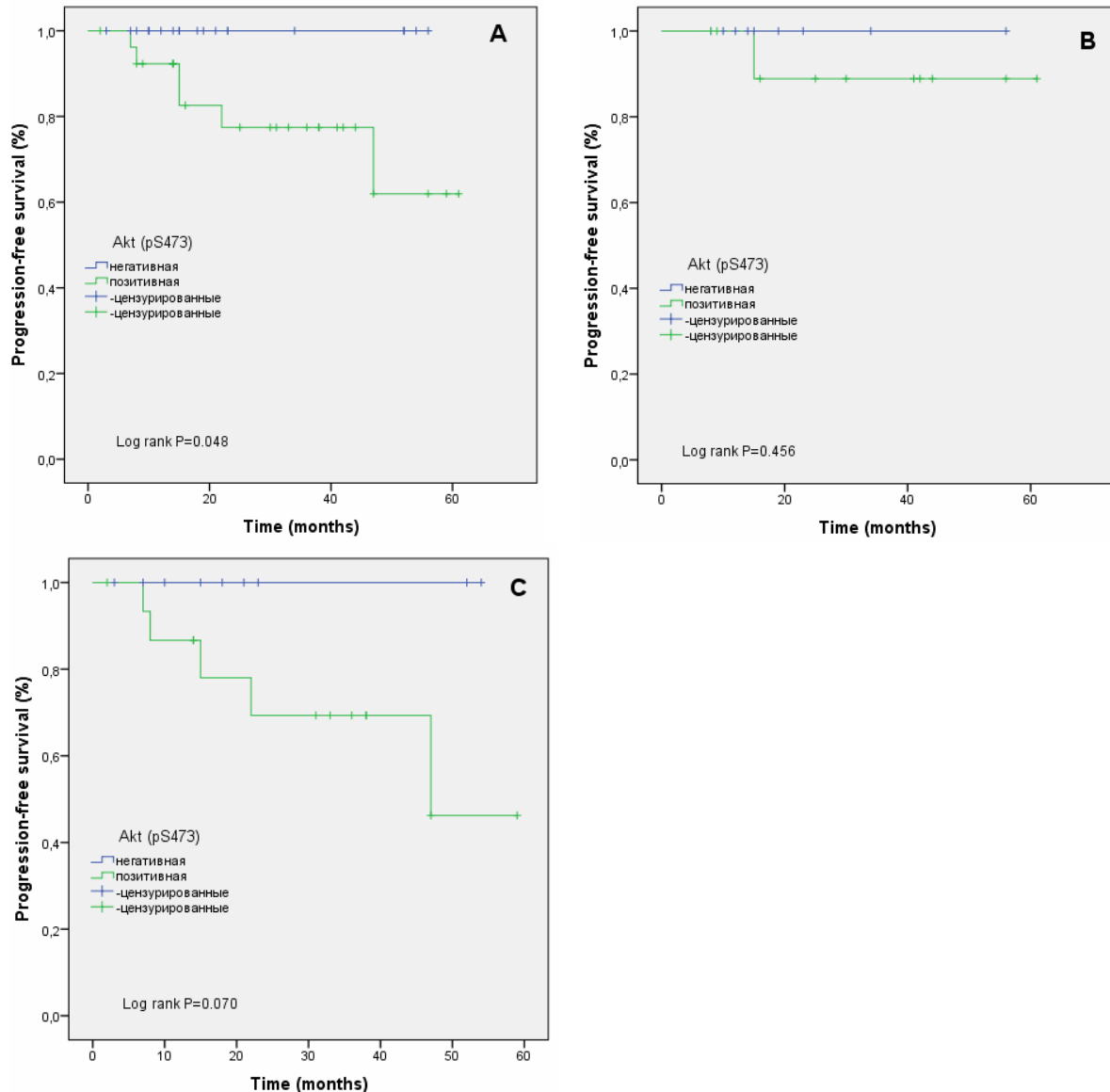


Рисунок 27 – Показатели безметастатической выживаемости в общей группе больных люминальным раком молочной железы (А), люминальным А типом (В) и люминальным В вариантом (С) в зависимости от экспрессии Akt(pS473)

Обнаружена тенденция к ухудшению выживаемости больных люминальным В подтипом с высоким процентом экспрессии Akt(pS473), однако различия в

показателях статистически не значимы ( $p = 0,070$ ; Рисунок 27 С). Стоит отметить наиболее низкие показатели безметастатической выживаемости больных этого молекулярного варианта рака с высоким содержанием Akt(pS473) в опухолевой ткани среди всех рассматриваемых групп пациентов.

Проведен блок исследований по оценке прогностической роли характера распределения ER $\alpha$  в опухоли в комбинации с другими молекулярно-генетическими характеристиками организма и опухоли (Рисунок 28).

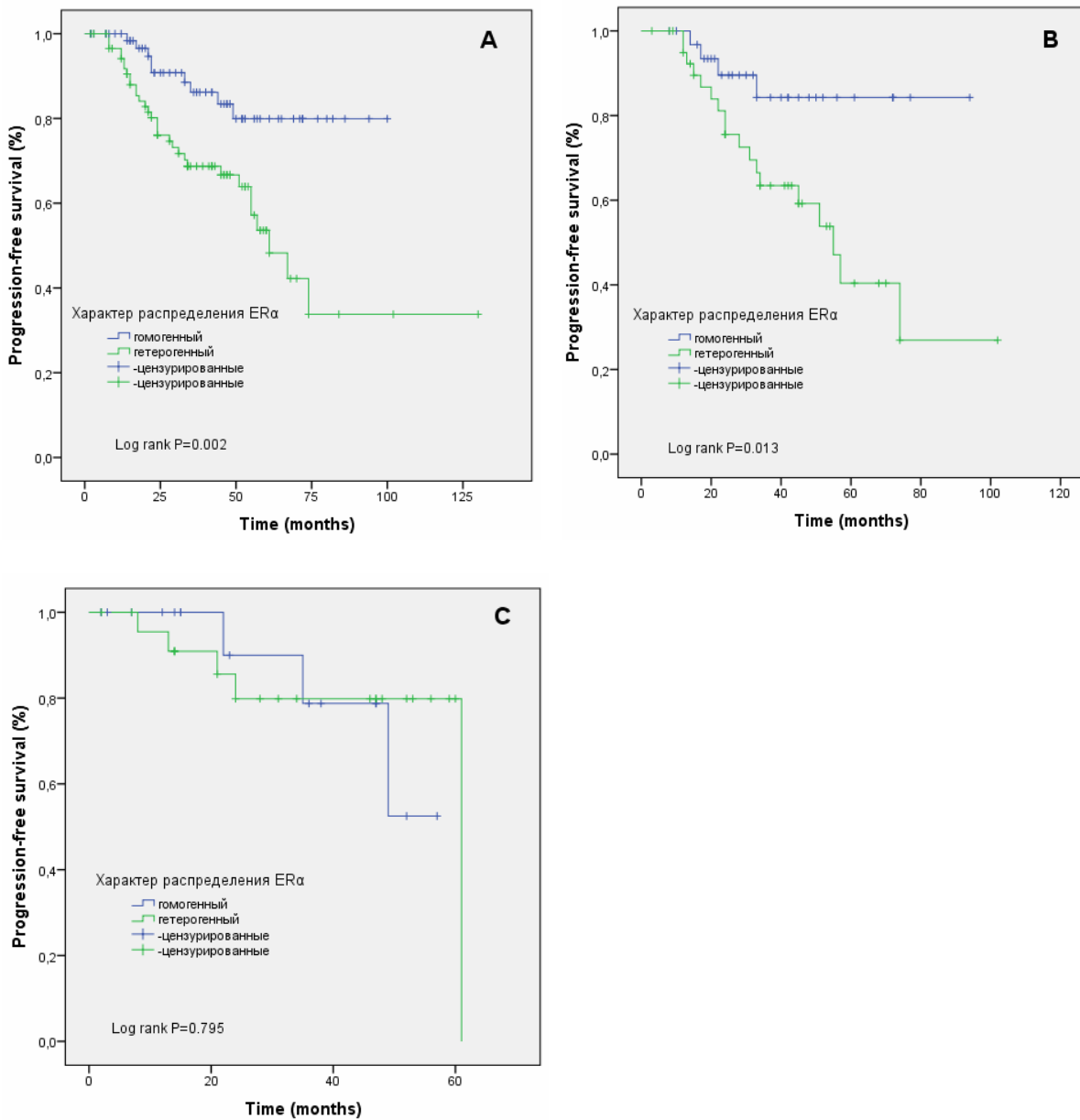


Рисунок 28 – Показатели безметастатической выживаемости в общей группе больных люминальным раком молочной железы (А), люминальным А типом (В) и люминальным В вариантом (С) в зависимости от характера распределения ER $\alpha$

Статистически значимо низкие показатели безметастатической выживаемости отмечены для опухолей с гетерогенным распределением ER $\alpha$  в общей выборке эстроген-зависимого рака и люминальной А подгруппе ( $p = 0,002$  и  $p = 0,013$  соответственно; Рисунок 28 А,В).

Сочетанный ассоциативный анализ характера распределения ER $\alpha$  с полиморфными вариантами гена *ESR1* (rs2228480) показал, что наличие гетерогенного распределения ER $\alpha$  и мутации гена в этом полиморфном локусе значительно сокращает период выживаемости без прогрессирования у больных эстроген-зависимым РМЖ ( $p = 0,006$ ; Рисунок 29 А).

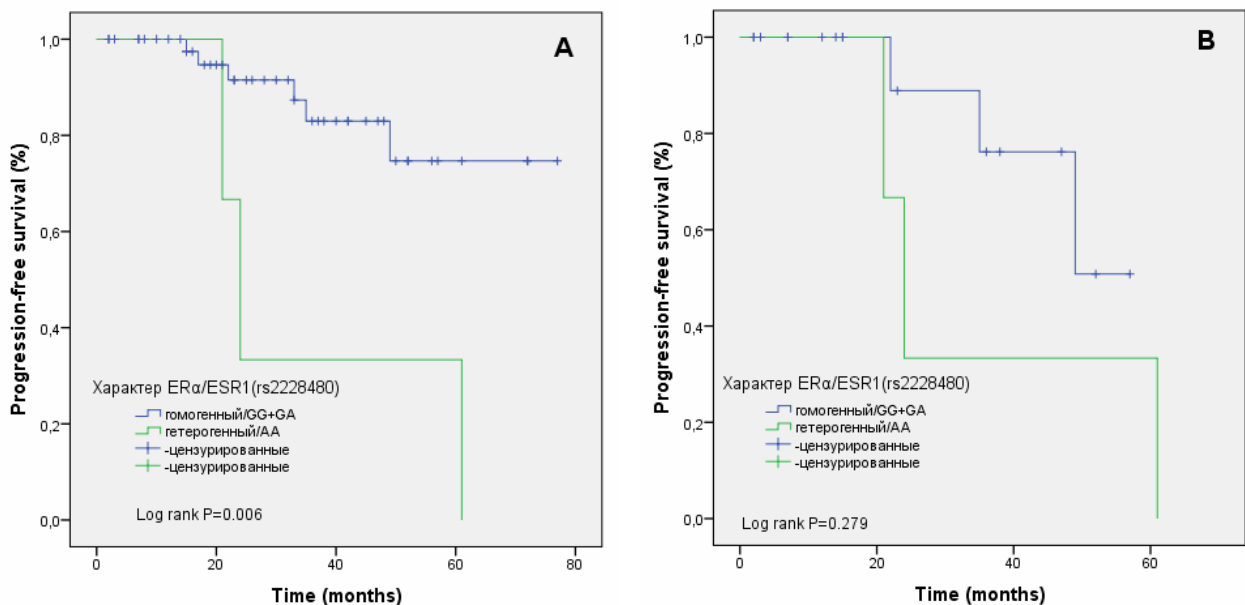


Рисунок 29 – Показатели безметастатической выживаемости в общей группе больных люминальным раком молочной железы (А) и люминальным В типом (В) в зависимости от сочетания характера распределения ER $\alpha$  и полиморфизма гена *ESR1* (rs2228480)

Поскольку, как было показано выше, мутации гена *ESR1* 2014G>A не детектировались в люминальных А опухолях, кривые выживаемости для пациентов с этим молекулярным типом построены не были. Для больных люминальным В РМЖ сочетание рассматриваемых нами маркеров в опухоли не влияло на показатели безметастатической выживаемости ( $p = 0,279$ ; Рисунок 29 В).

При наличии в опухоли гетерогенного распределения ER $\alpha$  и отсутствия содержания белка TGF- $\beta$ RI имеет место статистически значимое снижение показателей безметастатической выживаемости в двух исследуемых группах, кроме люминального В подтипа ( $p = 0,019$ ;  $p = 0,025$  и  $p = 0,631$  соответственно; Рисунок 30 А,В,С). Кроме того, наличие гетерогенного ER $\alpha$  и высоких показателей экспрессии EGFR в опухоли значительно ассоциировано с неблагоприятным прогнозом у больных люминальным РМЖ и люминальным А подтипом ( $p = 0,013$  и  $p = 0,013$  соответственно; Рисунок 30 D,E). Ввиду незначительного количества цензурированных наблюдений в группе люминального В РМЖ, показатели выживаемости рассчитать не представилось возможным.

Таким образом, в плане безметастатической выживаемости прогностическая значимость подтверждена для ряда белковых маркеров (TGF- $\beta$ RI, EGFR, Akt(pS473)), морфологических особенностей опухоли (гетерогенный характер распределения ER $\alpha$ ), а также их сочетаний, которая была ранее нами продемонстрирована как предсказательная в отношении ответа на антиэстрогенную терапию тамоксифеном у больных люминальным РМЖ.

Следует отметить, что прогностическая ценность генетических характеристик, рассматриваемых нами, практически не освещена в литературных источниках. Лишь в единичных исследованиях изучалась взаимосвязь полиморфизмов *ESR1*2014G>A (rs2228480), *IGFR1*3129G>T (rs2016347), *KDR*1192G>A (rs2305948) с отдаленными результатами лечения тамоксифеном эстроген-позитивных больных. Однако ни наличие мутации в полиморфном локусе 2014G>A гена *ESR1*, ни в полиморфном локусе 1192G>A гена *KDR*, не было ассоциировано с изменением общей и безрецидивной выживаемости больных [138, 251]. Лишь Winder et al., выдвинули гипотезу о влиянии *IGFR1*3129G>T SNP на прогноз у эстроген-позитивных больных, леченных тамоксифеном и подтвердили её, продемонстрировав связь мутантного аллеля *IGFR1*3129G с низкими показателями выживаемости [195].

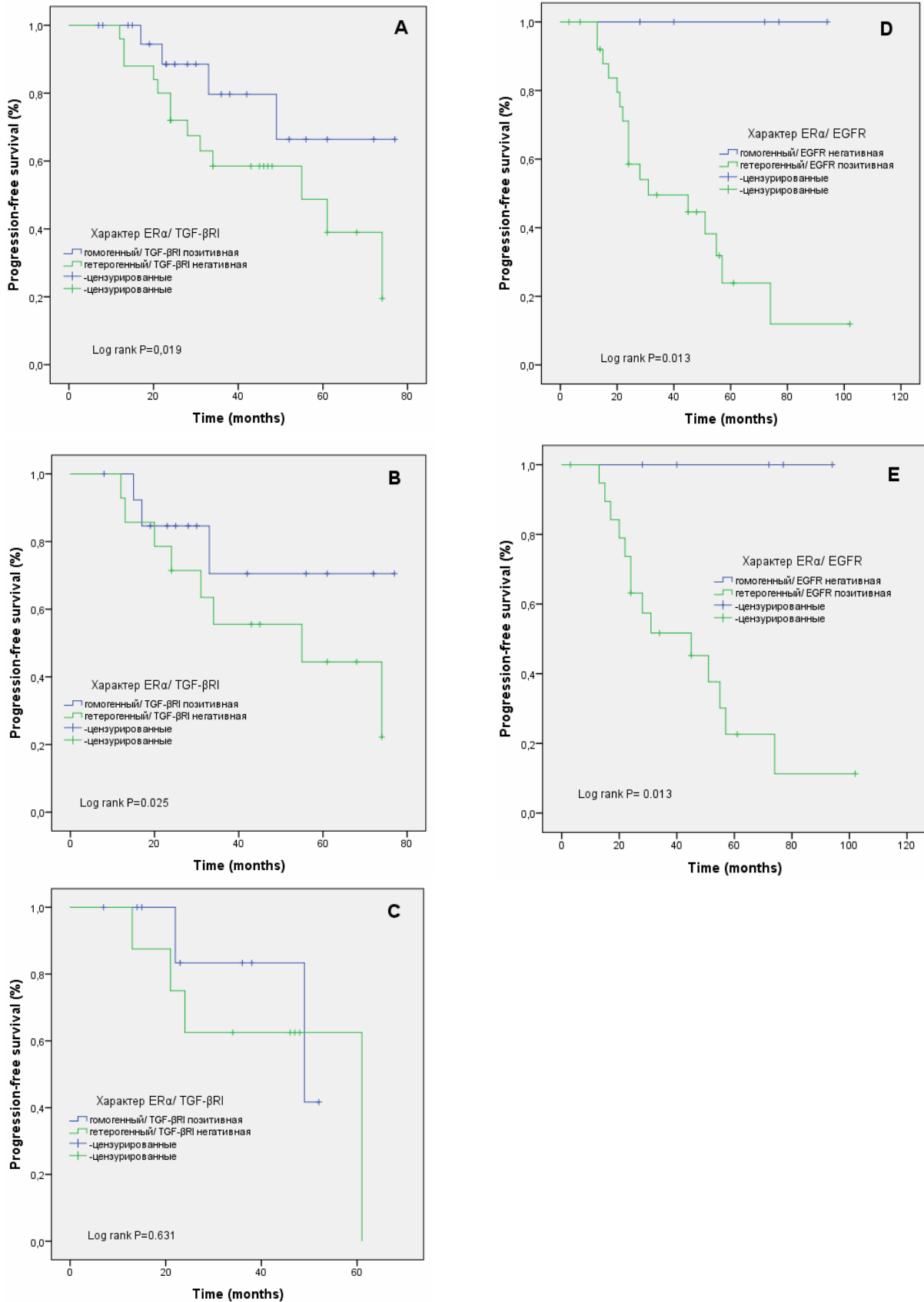


Рисунок 30 – Показатели безметастатической выживаемости в общей группе больных люминальным (A,D), люминальным А типом (B,E) и люминальным В РМЖ (C) в зависимости от сочетания характера распределения ER $\alpha$  и белковой экспрессии TGF- $\beta$ RI и EGFR

На сегодняшний день не вызывает сомнений наличие значимой корреляции высокого уровня экспрессии EGFR в опухолевой ткани эстроген-позитивных больных с неблагоприятным прогнозом на фоне терапии тамоксифеном, описанная как в литературе [129, 342], так и представленная в настоящем исследовании. В отношении экспрессии TGF- $\beta$ RI подобных работ нам не встретилось.

Литературные источники подтверждают низкую выживаемость ER-позитивных пациентов, получавших тамоксифен при выявлении высокого содержания Akt(pS473) в опухолевой ткани [22, 26]. Полученные нами данные вполне согласуются с описанными выше результатами.

Таким образом, можно полагать, что показатели безметастатической выживаемости больных люминальным РМЖ значимо ассоциированы с полиморфизмами генов *ESR1*2014G>A, *IGFR1*3129G>T, *KDR*1192G>A; уровнем экспрессии белков TGF- $\beta$ RI, EGFR, Akt(pS473); характером распределения ER $\alpha$  в опухоли, а также сочетанием двух маркеров одновременно (характер ER $\alpha$ /*ESR1* SNP, характер ER $\alpha$ /TGF- $\beta$ RI экспрессия и характер ER $\alpha$ /EGFR экспрессия). Прогностическое значение в отношении люминального А подтипа имеют SNPs *IGFR1*3129G>T, *KDR*1192G>A; уровень экспрессии EGFR; характер распределения ER $\alpha$ , а также сочетания характер ER $\alpha$ /TGF- $\beta$ RI экспрессия и характер ER $\alpha$ /EGFR экспрессия.

### 3.5.7 Математические модели прогноза клинического течения и эффективности терапии тамоксифеном у больных эстроген-зависимым РМЖ

С целью оценки вероятности развития прогрессирования заболевания на фоне терапии тамоксифеном для пациентов общей группы люминального РМЖ, люминального А и люминального В подтипов был применен логистический регрессионный анализ. На основании результатов представленного выше исследования были выбраны информативные молекулярно-генетические маркеры для каждой из трех рассматриваемых групп, ассоциированные с особенностями

клинического течения и чувствительностью/резистентностью к тамоксифену, которые были последовательно включены в однофакторный регрессионный анализ. Далее, все параметры, показавшие свою статистическую значимость, были включены в многофакторный анализ для подтверждения прогностической состоятельности.

Наиболее информативными факторами прогрессии в общей выборке пациентов люминальным РМЖ по данным однофакторного анализа явились: характер распределения эстрогеновых рецепторов в опухоли, полиморфизмы *ESR1*2014G>A (rs2228480) и *IGFR1*3129G>T (rs2016347), наличие в опухоли экспрессии белков TGF- $\beta$ RI и EGFR, а также содержание фосфорилированной формы белка Akt1 (Таблица 43).

Таблица 43 – Маркеры прогрессирования заболевания у больных общей группы люминального РМЖ по данным однофакторного и многофакторного регрессионного анализа

Параметры	Однофакторный анализ			Многофакторный анализ		
	Odd's ratio	95% CI	P-value	Odd's ratio	95% CI	P-value
Возраст ≤50 vs >50	0,983	0,483-1,999	0,962	-		
Размер опухоли <50 мм vs >50 мм	1,074	0,544-2,120	0,858	-		
Состояние лимфоузлов N <sub>0</sub> vs N <sub>1-3</sub>	1,638	0,996-1,086	0,163	-		
Характер ER $\alpha$ гомо vs гетеро	3,608	1,614-8,392	0,002	3,763	1,241-11,410	0,019
<i>ESR1</i> (rs2228480) GG+GA vs AA	3,428	1,082-10,864	0,036	3,382	1,014-11,273	0,047
<i>IGFR1</i> (rs2016347) TT vs TG+GG	3,833	1,228-11,936	0,021	3,994	0,714-22,336	0,115
<i>KDR</i> (rs2305948) GG vs GA+AA	1,807	0,891-3,664	0,101	-		
мРНК TGF- $\beta$ RI низкая vs высокая	6,111	0,653-7,150	0,113	-		
TGF- $\beta$ RI негативная vs позитивная	0,365	0,142-0,942	0,037	0,401	0,037-4,309	0,451
EGFR негативная vs позитивная	3,096	0,996-9,629	0,050	2,897	0,763-10,998	0,118
CD44 <sup>+</sup> /IGF1R <sup>+</sup> низкая vs высокая	1,040	0,996-1,086	0,076	-		
Akt(pS473) негативная vs позитивная	1,057	1,002-1,116	0,042	-		
Примечания						
Odd's ratio – отношение шансов						
95% CI – доверительный интервал						

Однако из всех данных параметров только характер распределения ER $\alpha$  в опухоли и полиморфизм *ESR1* в локусе 2014G> A, явились независимыми маркерами исхода заболевания при проведении многофакторного анализа. Чувствительность модели составила 98%, специфичность – 30%.

В качестве прогностических маркеров для люминального А РМЖ рассматривались такие параметры как возраст пациенток, размер первичной опухоли, состояние регионарных лимфатических узлов, характер распределения ER $\alpha$ , полиморфизм генов *IGFR1*3129G>T (rs2016347) и *KDR*1192G>A (rs2305948), уровень генной и белковой экспрессии TGF- $\beta$ RI и EGFR, содержание клеточных популяций CD44<sup>-</sup>/IGF1R<sup>+</sup>, CD24<sup>+</sup>/TGF- $\beta$ RI<sup>+</sup> и VEGFR2<sup>+</sup>/Akt(pS473)<sup>+</sup> (Таблица 44).

Таблица 44 – Маркеры прогрессирования заболевания у больных люминальным А РМЖ по данным однофакторного и многофакторного регрессионного анализа

Параметры	Однофакторный анализ			Многофакторный анализ		
	Odd's ratio	95% CI	P-value	Odd's ratio	95% CI	P-value
Возраст ≤50 vs >50	0,854	0,321-2,272	0,752	-		
Размер опухоли <50 мм vs >50 мм	0,950	0,361-2,500	0,917	-		
Состояние лимфоузлов N <sub>0</sub> vs N <sub>1-3</sub>	6,463	1,309-31,905	0,022	5,172	1,069-25,026	0,041
Характер ER $\alpha$ гомо vs гетеро	5,437	1,620-18,251	0,006	13,564	2,356-58,075	0,004
<i>IGFR1</i> (rs2016347) TT vs TG+GG	12,000	1,479-27,421	0,020	8,158	0,890-74,800	0,063
<i>KDR</i> (rs2305948) GG vs GA+AA	2,563	0,775-8,477	0,610	-		
мРНК TGF- $\beta$ RI низкая vs высокая	0,375	0,006-23,751	0,643	-		
мРНК EGFR низкая vs высокая	0,910	0,453-1,830	0,792	-		
TGF- $\beta$ RI негативная vs позитивная	0,079	0,009-0,659	0,019	0,419	0,032-5,443	0,506
EGFR негативная vs позитивная	3,750	1,031-13,646	0,045	6,561	1,382-31,142	0,018
CD44 <sup>-</sup> /IGF1R <sup>+</sup> низкая vs высокая	0,996	0,877-1,130	0,946	-		
CD24 <sup>+</sup> /TGF- $\beta$ RI <sup>+</sup> низкая vs высокая	1,010	0,938-1,088	0,789	-		
VEGFR2 <sup>+</sup> /Akt(pS473) <sup>+</sup> низкая vs высокая	1,030	0,891-1,189	0,692	-		
Примечания						
Odd's ratio – отношение шансов						
95% CI – доверительный интервал						

При проведении однофакторного регрессионного анализа выявлено достоверное влияние на исход заболевания таких факторов, как состояние регионарных лимфатических узлов, характер распределения ER $\alpha$ , полиморфизм гена *IGFR13129G>T* (rs2016347) и показатели белковой экспрессии TGF- $\beta$ RI и EGFR. Однако многофакторная модель подтвердила прогностическую значимость только трех маркеров – наличия/отсутствия метастазов в лимфоузлы, характера распределения ER $\alpha$  и экспрессии EGFR – с высокой чувствительностью и специфичностью (80% и 76%; соответственно).

Единственным фактором прогноза, значимо влияющим на исход заболевания у больных люминальным В подтипом, было наличие/отсутствие мутации в полиморфном локусе 2014G>A гена *ESR1* (Таблица 45).

Таблица 45 – Маркеры прогрессирования заболевания у больных люминальным В РМЖ по данным однофакторного и многофакторного регрессионного анализа

Параметры	Однофакторный анализ			Многофакторный анализ		
	Odd's ratio	95% CI	P-value	Odd's ratio	95% CI	P-value
Возраст ≤50 vs >50	1,641	0,379-7,107	0,508	-	-	-
Размер опухоли <50 мм vs >50 мм	2,000	0,464-8,619	0,352	-	-	-
Состояние лимфоузлов N <sub>0</sub> vs N <sub>1-3</sub>	0,840	0,213-3,321	0,804	-	-	-
Характер ER $\alpha$ гомо vs гетеро	1,481	0,305-7,206	0,626	-	-	-
<i>ESR1</i> (rs2228480) <i>GG+GA</i> vs <i>AA</i>	3,824	1,159-12,619	0,028	3,824	1,159-12,619	0,028
<i>ESR1</i> (rs2077647) <i>TT</i> vs <i>TC+CC</i>	0,313	0,050-1,938	0,212	-	-	-
мРНК TGF- $\beta$ RI <i>низкая</i> vs <i>высокая</i>	0,336	0,070-1,612	0,173	-	-	-
TGF- $\beta$ RI <i>негативная</i> vs <i>позитивная</i>	0,718	0,165-3,133	0,659	-	-	-
CD44/IGF1R <sup>+</sup> <i>низкая</i> vs <i>высокая</i>	1,024	0,963-1,083	0,488	-	-	-
CD24 <sup>+</sup> /TGF- $\beta$ RI <sup>+</sup> <i>низкая</i> vs <i>высокая</i>	1,005	0,954-1,060	0,840	-	-	-
IGF1R/Akt(pS473) <sup>+</sup> <i>низкая</i> vs <i>высокая</i>	1,025	0,978-1,073	0,305	-	-	-
Akt(pS473) <i>негативная</i> vs <i>позитивная</i>	1,046	0,988-1,107	0,124	-	-	-
Примечания						
Odd's ratio – отношение шансов						
95% CI – доверительный интервал						

Очевидно, что в такой чрезвычайно гетерогенной группе пациентов формирование оптимальной модели прогнозирования риска прогрессирования требует большей выборки пациентов.

Таким образом, на основании многофакторного логистического регрессионного анализа определены значимые молекулярно-генетические маркеры, дающие возможность прогнозировать ожидаемый риск развития прогрессирования на фоне адъювантной терапии тамоксифеном у эстроген-зависимых больных в общей выборке и когорте люминального А РМЖ. В целом, можно заключить, что характер распределения эстрогеновых рецепторов и наличие точечных мутаций гена *ESR1*(rs2228480) в опухолевой ткани потенциально могут оказывать влияние на течение и прогноз эстроген-зависимого РМЖ.

### 3.6 Анализ связи молекулярно-генетических маркеров с эффективностью неoadъювантной химиотерапии у больных тройным негативным РМЖ

Учитывая высокую степень вовлеченности, прежде всего, рецепторов эпидермального и сосудистого эндотелиального факторов роста в механизмы активации PI3K/Akt/mTOR сигнального пути, проведен анализ уровня их белковой экспрессии в опухолевой ткани до и после неoadъювантной химиотерапии, а также изучены полиморфные сайты их генов у 70 больных тройным негативным РМЖ.

Предсказательная значимость данных молекулярно-генетических маркеров анализировалась в зависимости от клинической и патоморфологической эффективности НАХТ у больных ТНРМЖ.

#### 3.6.1 Экспрессия рецепторов факторов роста в процессе НАХТ у больных тройным негативным РМЖ

Для анализа изменений показателей экспрессии EGFR и VEGFR2 мы оценили содержание клеток с негативной и позитивной экспрессией данных маркеров до неoadъювантной химиотерапии в биопсийных образцах, и после лечения в послеоперационных образцах опухоли. Выявлено, что показатели экспрессии как EGFR, так и VEGFR2 в процессе проведения НАХТ значительно изменялись. Содержание клеток с позитивной экспрессией EGFR снижалось с 85,7% до 44,8%; количество EGFR-негативных клеток, напротив, увеличивалось с 14,3% до 55,2% ( $p = 0,000$ ; Рисунок 31 А). Аналогично, число VEGFR2-позитивных клеток до лечения составляло 81,2% с последующим снижением их количества после терапии до 44,9%; содержание клеток с негативной экспрессией VEGFR2 трехкратно возрастало в процессе НАХТ с 18,8% до 55,1% ( $p = 0,000$ ; Рисунок 31 В).

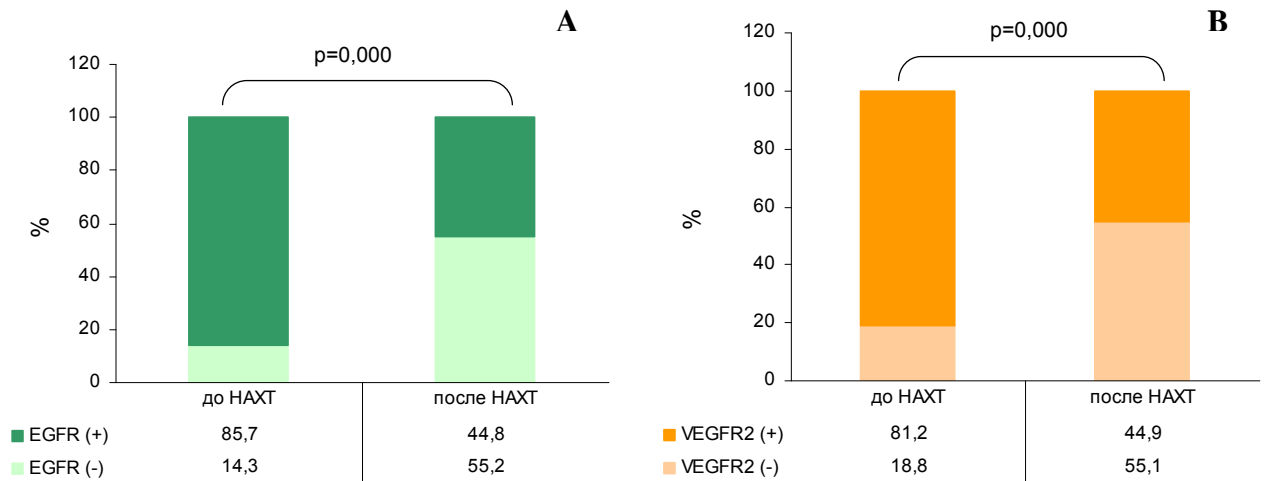


Рисунок 31 – Наличие экспрессии (позитивная/негативная) EGFR (А) и VEGFR2 (В) в образцах опухоли до и после проведения неoadъювантной химиотерапии (НАХТ)

Анализируя процент экспрессируемых белков, следует отметить, что до преоперационной терапии средние значения экспрессии EGFR составляли 55,5% (10-98), достигая нулевых значений после НАХТ 0,0% (0-75). Средний процент VEGFR2-экспрессирующих клеток до лечения был несколько выше 70,5% (12-99), приближаясь к значениям 28,7% (12-99) после проведенной терапии.

Поскольку установлено, что применение НАХТ приводит к снижению уровня экспрессии рассматриваемых рецепторов факторов роста, возникает вопрос, насколько связаны такие изменения с ответом опухоли на терапию. Проанализировав число клеток, экспрессирующих исследуемые белки до лечебного воздействия, мы обнаружили высокий процент VEGFR2-позитивных клеток в опухолях с объективным клиническим и полным патоморфологическим ответом, однако только в отношении полных морфологических регрессий различия были статистически значимы ( $p = 0,023$ ; Рисунок 32 А). После проведенной неoadъювантной химиотерапии наблюдалось снижение числа клеток с позитивной экспрессией как EGFR, так и VEGFR2, тогда как число клеток с негативной экспрессией как EGFR, так и VEGFR2 возрастало, что было значимо ассоциировано с клиническим и патоморфологическим ответом опухоли (Рисунок 32 В). Таким образом, изначально высокий уровень в опухоли VEGFR2-позитивных клеток может являться показателем чувствительности опухоли к

НАХТ. Помимо этого, негативный уровень или отсутствие экспрессии как EGFR, так и VEGFR2 после проведенного неoadьювантного лечения может также являться предиктором эффективности НАХТ.



Рисунок 32 – Связь экспрессии (положительная/негативная) EGFR и VEGFR2 в опухоли до (A) и после лечения (B) с эффективностью НАХТ

Применение двух различных химиотерапевтических схем CAX и FAC в неoadьювантном режиме предопределило поиск корреляций показателей экспрессии исследуемых белков с эффективностью каждой из них. Выявлено, что содержание EGFR и VEGFR2 до проведения химиотерапии с включением капецитабина не связано с ответом опухоли (Рисунок 33 A). Более значимым явилось определение статуса экспрессии данных белков после использования

данной схемы химиотерапии. Показано, что негативный уровень экспрессии EGFR ассоциирован как с объективным клиническим ( $p = 0,014$ ), так и патоморфологическим ответом опухоли ( $p = 0,000$ ; Рисунок 33 В). Определение содержания VEGFR2-экспрессирующих клеток, в частности наличие негативной VEGFR2 экспрессии, может быть также полезно в плане прогноза объективного ответа и полных морфологических регрессий опухоли на химиотерапию с капецитабином ( $p = 0,003$  и  $p = 0,000$  соответственно; Рисунок 33 В).

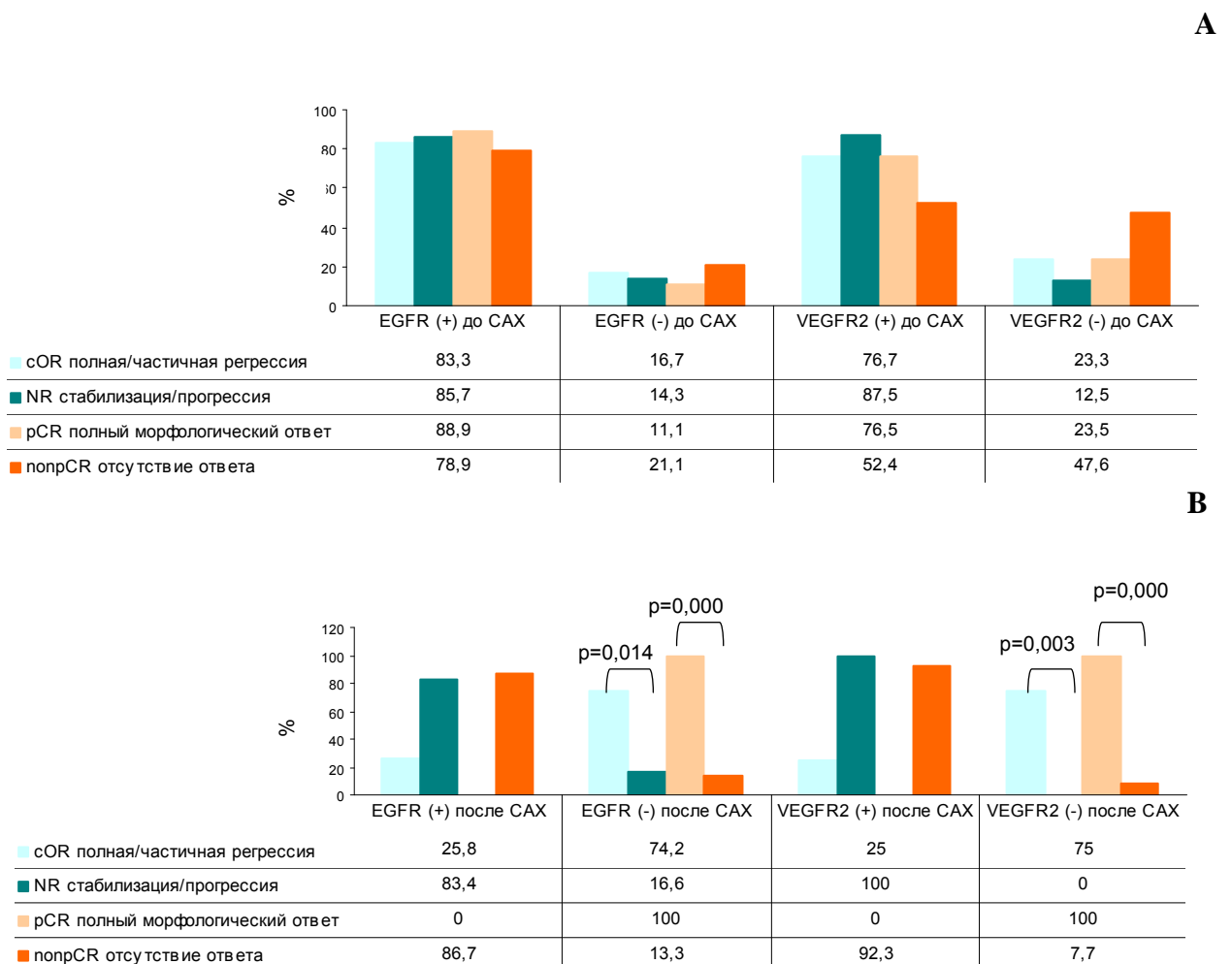


Рисунок 33 – Связь экспрессии (положительная/негативная) EGFR и VEGFR2 в опухоли до (А) и после лечения (В) с эффективностью НАХТ по схеме САХ

Отмечена высокая вероятность неэффективности НАХТ при использовании стандартной схемы FAC для пациентов с EGFR-положительным статусом экспрессии в опухоли до предоперационного лечения ( $p = 0,085$ ;

Рисунок 34 А). Наличие полных морфологических регрессий значимо ассоциировано либо с EGFR-негативным, либо VEGFR2-негативным уровнем экспрессии в опухоли после применения схемы FAC ( $p = 0,003$  и  $p = 0,036$  соответственно; Рисунок 34 В).

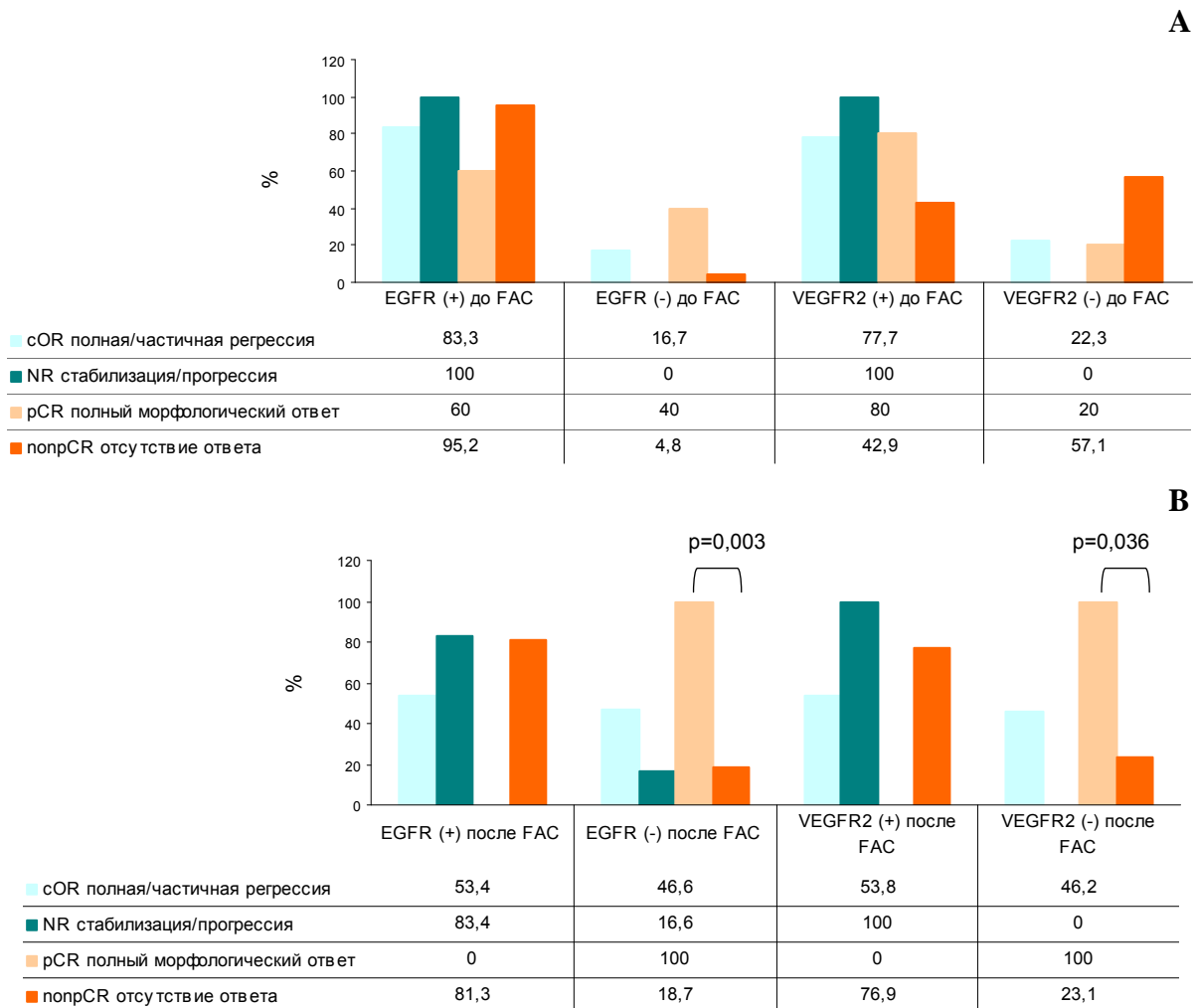


Рисунок 34 – Связь экспрессии (положительная/негативная) EGFR и VEGFR2 в опухоли до (А) и после лечения (В) с эффективностью НАХТ по схеме FAC

Полученные нами данные отчасти находят подтверждение в литературных источниках. Показано, что использование стандартных комбинаций алкилирующих агентов и таксанов при местнораспространенном или метастатическом РМЖ приводит к снижению изначально высокого уровня экспрессии EGFR, что имеет прогностическую значимость [332]. Однако Guarneri et al., не найдено ассоциаций экспрессии VEGFR2 с частотой полных

морфологических регрессий у больных РМЖ, получавших НАХТ антрациклинами или антрациклин/таксанами [16]. В недавнем исследовании уровни экспрессии VEGFR2 в сыворотке не имели значимой корреляции с полным морфологическим ответом опухоли на химиотерапию с бевацизумабом [179]. Стоит отметить, что предиктивная ценность белков EGFR и VEGFR2 у больных тройным негативным РМЖ остается в настоящее время мало изученной.

Проведенное нами исследование у больных тройным негативным РМЖ выявило связь показателей экспрессии рецепторов факторов роста, анализируемых в опухолевой ткани как до, так и после применения CAX/FAC схем неoadьювантной химиотерапии с регрессией опухоли, что определяет их предикторный потенциал.

### 3.6.2 Связь полиморфных вариантов генов рецепторов факторов роста с эффективностью НАХТ

В образцах периферической крови пациентов с тройным негативным раком молочной железы проанализированы полиморфные варианты генов *EGFR* и *KDR* - *EGFR* (rs1468727), *EGFR* (rs2227983), *KDR* -604T>C (rs2071559), *KDR* 1192G>A (rs2305948) - в отношении их возможной вовлеченности в реализацию механизмов чувствительности опухоли к неoadьювантной химиотерапии. При анализе объективного клинического ответа выявлено, что частота встречаемости мутантного генотипа *EGFRCC* в локусе rs1468727 у пациенток со стабилизацией/прогрессированием заболевания более чем в два раза превосходила таковую у больных с полной/частичной регрессией, однако без статистических различий ( $p = 0,114$ ). Изучение полных морфологических регрессий позволило получить значимую ассоциацию данного мутантного варианта с неэффективным ответом опухоли ( $p = 0,042$ ; Таблица 46).

Таблица 46 – Связь полиморфизмов генов *EGFR* и *KDR* с эффективностью НАХТ

Генотип/ аллель	Объективный клинический ответ, n (%)				Полный патоморфологический ответ, n (%)			
	полная/ частичная регрессия	стабилизация/ прогрессирование	OR (95% CI)	P	полный ответ	отсутствие ответа	OR (95% CI)	P
<i>EGFR</i> (rs1468727)								
<i>TT</i>	25 (54,4)	7 (46,7)	1,00		12 (54,5)	20 (51,3)	1,00	
<i>TC</i>	17 (36,9)	5 (33,3)	1,00		10 (45,5)	12 (30,8)	1,00	
<i>CC</i>	4 (8,7)	3 (20,0)	0,38 (0,06-2,54)	0,348	0 (0,0)	7 (17,9)	1,22(1,05-1,44)	0,042 <sup>1</sup>
T аллель	67 (72,8)	19 (63,3)	1,00		34 (77,3)	52 (66,7)	1,00	
C аллель	25 (27,2)	11 (36,7)	0,64 (0,25-1,69)	0,322	10 (22,7)	26 (33,3)	0,59(0,23-1,48)	0,217
<i>EGFR</i> (rs2227983)								
<i>GG</i>	25 (54,4)	7 (46,7)	1,00		12 (54,5)	20 (51,3)	1,00	
<i>GA</i>	19 (41,3)	6 (40,0)	1,00		10 (45,5)	15 (38,5)	1,00	
<i>AA</i>	2 (4,3)	2 (13,3)	0,30 (0,03-3,34)	0,251	0 (0,0)	4 (10,2)	1,11(1,00-1,24)	0,287
G аллель	69 (75,0)	20 (66,6)	1,00		34 (77,3)	55 (70,6)	1,00	
A аллель	23 (25,0)	10 (33,4)	0,67 (0,25-1,79)	0,372	10 (22,7)	23 (29,4)	0,70(0,27-1,79)	0,420
<i>KDR</i> -604T>C (rs2071559)								
<i>TT</i>	17 (36,9)	5 (33,3)	1,00		10 (45,5)	12 (30,8)	1,00	
<i>TC</i>	17 (36,9)	6 (40,0)	1,00		6 (27,3)	17 (43,6)	1,00	
<i>CC</i>	12 (26,2)	4 (26,7)	0,97 (0,22-4,46)	0,604	6 (27,2)	10 (25,6)	1,09(0,28-4,10)	0,889
T аллель	51 (55,4)	16 (53,3)	1,00		26 (59,1)	41 (52,6)	1,00	
C аллель	41 (44,6)	14 (46,7)	0,92 (0,37-2,27)	0,841	18 (40,9)	37 (47,4)	0,77(0,34-1,79)	0,487
<i>KDR</i> 1192G>A (rs2305948)								
<i>GG</i>	41 (89,1)	14 (93,3)	1,00		22 (100,0)	33 (84,6)	1,00	
<i>GA</i>	5 (10,9)	1 (6,7)	1,00		0 (0,0)	6 (15,4)	1,00	
<i>AA</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	1,71 (0,16-4,04)	0,539	0 (0,0)	0 (0,0)	1,18(1,03-1,35)	0,058
G аллель	87 (94,6)	29 (96,7)	1,00		44 (100,0)	72 (92,3)	1,00	
A аллель	5 (5,4)	1 (3,3)	1,67 (0,18-9,28)	0,541	0 (0,0)	6 (7,7)	1,08(1,02-1,16)	0,086
Примечания								
1 <sup>1</sup> – различия показателей между группами полный ответ и отсутствие ответа								

Показано, что гетерозиготный генотип *KDR*1192GA и мутантный аллель *KDR*1192A гена *KDR* (rs2305948) на уровне тенденции чаще встречались в группе больных, не отвечающих на предоперационную химиотерапию по сравнению с пациентками, достигшими полного патоморфологического ответа опухоли ( $p = 0,058$  и  $p = 0,086$  соответственно; Таблица 46). Другие полиморфизмы не показали существенной связи с чувствительностью/резистентностью к НАХТ.

Изучение взаимосвязи аллельных вариантов исследуемых генов с эффективностью НАХТ в отношении используемой схемы лечения позволило

выявить высокую частоту встречаемости гетерозиготных и мутантных генотипов *KDR* -604TC+CC (rs2071559) у больных с отсутствием полных морфологических регрессий на фоне применения капецитабин-содержащей схемы (p = 0,016; Таблица 47).

Таблица 47 – Связь полиморфизмов исследуемых генов с эффективностью САХ/ФАС НАХТ

Генотип	САХ режим			ФАС режим		
	объективный клинический ответ, n (%)					
	полная/ частичная регрессия	стабилизация/ прогрессирование	Р	полная/ частичная регрессия	стабилизация/ прогрессирование	Р
<i>EGFR</i> (rs1468727)						
<i>TT</i>	17 (58,6)	2 (28,6)	0,219	8 (47,1)	5 (62,5)	0,672
<i>TC+ CC</i>	12 (41,4)	5 (71,4)		9 (52,9)	3 (37,5)	
<i>EGFR</i> (rs2227983)						
<i>GG</i>	17 (58,6)	2 (28,6)	0,219	8 (47,1)	5 (62,5)	0,672
<i>GA+ AA</i>	12 (41,4)	5 (71,4)		9 (52,9)	3 (37,5)	
<i>KDR</i> -604T>C (rs2071559)						
<i>TT</i>	11 (37,9)	2 (28,6)	0,500	6 (35,2)	3 (37,5)	0,626
<i>TC+ CC</i>	18 (62,1)	5 (71,4)		11 (64,8)	5 (62,5)	
<i>KDR</i> 1192G>A (rs2305948)						
<i>GG</i>	27 (93,1)	6 (85,7)	0,488	14 (82,4)	8 (100,0)	0,527
<i>GA+AA</i>	2 (6,9)	1 (14,3)		3 (17,6)	0 (0,0)	
полный патоморфологический ответ, n (%)						
	полный ответ	отсутствие ответа	Р	полный ответ	отсутствие ответа	Р
<i>EGFR</i> (rs1468727)						
<i>TT</i>	9 (52,9)	10 (52,6)	0,985	3 (60,0)	10 (50,0)	0,549
<i>TC+ CC</i>	8 (47,1)	9 (47,4)		2 (40,0)	10 (50,0)	
<i>EGFR</i> (rs2227983)						
<i>GG</i>	9 (52,9)	10 (52,6)	0,985	3 (60,0)	10 (50,0)	0,549
<i>GA+ AA</i>	8 (47,1)	9 (47,4)		2 (40,0)	10 (50,0)	
<i>KDR</i> -604T>C (rs2071559)						
<i>TT</i>	9 (52,9)	4 (21,1)	0,016 <sup>1</sup>	1 (20,0)	8 (40,0)	0,621
<i>TC+ CC</i>	8 (47,1)	15 (78,9)		4 (80,0)	12 (60,0)	
<i>KDR</i> 1192G>A (rs2305948)						
<i>GG</i>	17 (100,0)	16 (84,2)	0,230	5 (100,0)	17 (85,0)	0,999
<i>GA+AA</i>	0 (0,0)	3 (15,8)		0 (0,0)	3 (15,0)	
Примечания						
1 <sup>1</sup> – различия показателей между группами полный ответ и отсутствие ответа						

Показатели эффективности применения САХ и ФАС схем не были связаны с другими рассматриваемыми полиморфизмами генов.

Учитывая выявленный прогностический потенциал исследуемых полиморфных локусов, мы проанализировали их связь с уровнем экспрессии соответствующих белковых продуктов. Установлено, что до проведения НАХТ EGFR-позитивные опухоли выявлялись в 60% у носителей мутантных генотипов *EGFR*CC локуса rs1468727 ( $p = 0,047$ ; Рисунок 35 А). По окончании лечения позитивная экспрессия EGFR регистрировалась у всех пациентов (100%), имеющих мутации в данном полиморфном локусе ( $p = 0,038$ ; Рисунок 35 В).

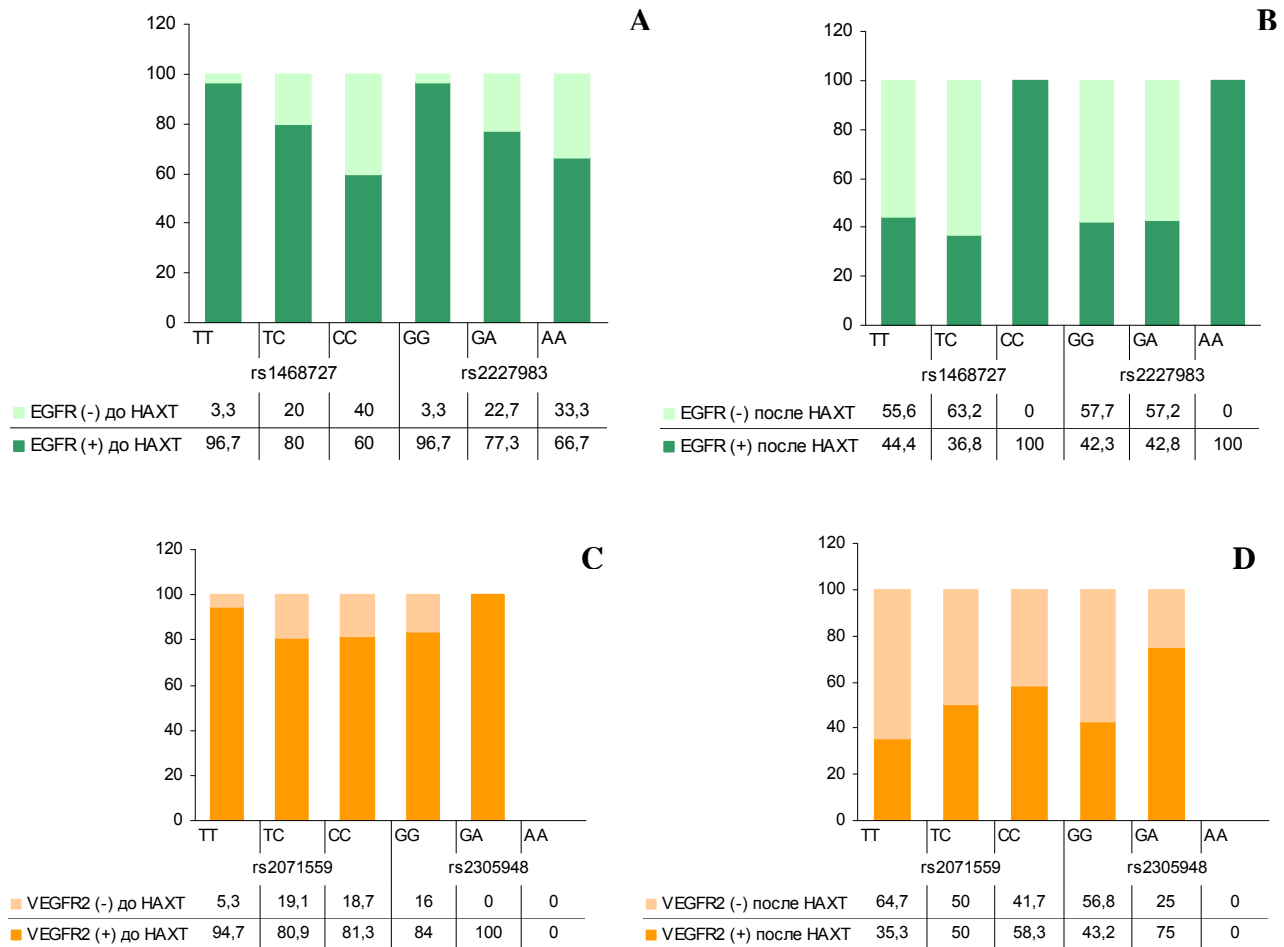


Рисунок 35 – Связь экспрессии (позитивная/негативная) EGFR и VEGFR2 в опухоли до (А,С) и после лечения (В,Д) с полиморфизмами генов *EGFR* и *KDR* в зависимости от эффективности НАХТ

Полиморфный вариант rs1468727 затрагивает интронную область гена *EGFR* и напрямую не изменяет аминокислотную последовательность белка. Однако мутации внутри интронов могут оказывать существенное влияние на уровень

процесса транскрипции и стабильность РНК. Предполагается, что мутантный вариант *EGFRCC* локуса rs1468727 связан с увеличением активности рецептора, его экспрессии или стабильности, что ведет к активации *EGFR*-опосредованных сигналов и значительному увеличению пролиферативного потенциала опухоли [112]. Эта гипотеза находит подтверждение в наших исследованиях, поскольку *EGFRCC* мутантный генотип связана с отсутствием ответа опухоли на НАХТ. Важно, что до 60% *EGFR*-позитивных опухолей, выявляемых до предоперационной терапии у больных тройным негативным раком молочной железы, несут данную мутацию, которая может обуславливать высокую активность *EGFR* в таких опухолях, способствующую неэффективному лечению. Исследованный нами полиморфизм гена *EGFR* практически не описан в литературе, продемонстрирована лишь связь мутации rs1468727 с прогнозом глиом [40].

Другим наиболее информативным генетическим маркером, ассоциированным с эффективностью НАХТ у больных тройным негативным РМЖ, явился полиморфизм в промоторном участке гена *KDR*-604Т>С rs2071559. Показано, что наличие мутантного варианта *KDR*-604СС связано с подавлением транскрипционной активности контролируемого гена и изменением экспрессии или активности *VEGFR2* [289]. В нашей работе данный генотип определяет отсутствие эффективного ответа на предоперационную химиотерапию. Однако снижение экспрессионной активности *KDR* видимо не приводит к снижению активности белкового продукта, что определяет высокую функциональность *VEGFR2*-опосредованных факторов, способствующую прогрессированию заболевания. Следует особо подчеркнуть отсутствие доступных в литературе данных о влиянии SNP rs2071559 на эффективность лечения у пациентов с тройным негативным РМЖ.

Таким образом, полиморфные варианты гена рецептора эпидермального фактора роста и гена рецептора сосудистого эндотелиального фактора роста могут быть существенным образом вовлечены в механизмы

чувствительности/резистентности к неоадьювантной химиотерапии у больных ТНРМЖ.

### 3.6.3 Показатели безметастатической выживаемости у больных тройным негативным РМЖ в зависимости от исследуемых маркеров

Проведен анализ зависимости показателей безметастатической выживаемости у больных тройным негативным РМЖ от изменения уровня экспрессии рецепторов факторов роста, а также носительства полиморфных вариантов их генов.

При сравнении показателей выживаемости у больных ТНРМЖ с негативным и позитивным уровнем экспрессии в опухоли EGFR, выявленным до предоперационной химиотерапии, значимых различий получено не было ( $p = 0,151$ ; Рисунок 36 А). Однако у больных с EGFR-негативной экспрессией, наблюдаемой после проведения неоадьювантного лечения, выживаемость без прогрессирования была значительно выше, чем у больных с EGFR-позитивной экспрессией; при этом различия приближались к границе значимости ( $p = 0,066$ ; Рисунок 36 В).

Пациенты с позитивной экспрессией в опухоли VEGFR2 до НАХТ демонстрировали высокие показатели безметастатической выживаемости по сравнению с VEGFR2-негативными ( $p = 0,027$ ; Рисунок 36 С). Зависимости между содержанием VEGFR2-экспрессирующих клеток в опухоли после проведенной терапии и показателями безметастатической выживаемости у больных ТНРМЖ получено не было ( $p = 0,338$ ; Рисунок 36 D).

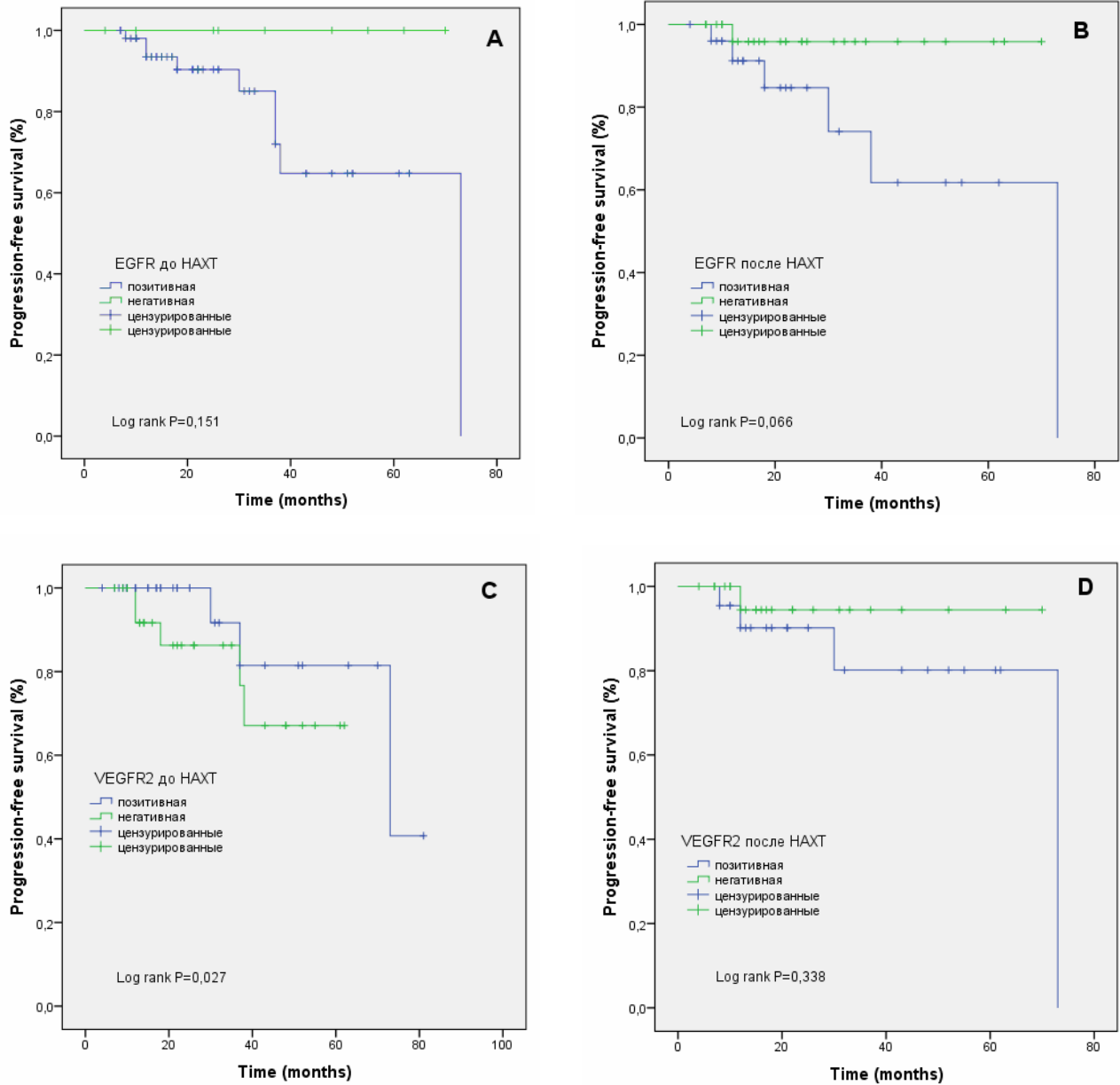


Рисунок 36 – Показатели безметастатической выживаемости у больных тройным негативным РМЖ в зависимости от экспрессии EGFR и VEGFR2 до (A,C) и после (B,D) HAXT

Мы проанализировали взаимосвязь показателей выживаемости и экспрессии исследуемых белков у больных ТНРМЖ в зависимости от схемы HAXT. При изучении уровня экспрессии EGFR и VEGFR2 в опухоли у больных, получавших химиотерапию по схеме САХ, значимых ассоциаций с показателями безметастатической выживаемости не выявлено. Однако наличие позитивной экспрессии EGFR в опухоли после HAXT было связано с низкими показателями

выживаемости у больных ТНРМЖ после применения схемы FAC ( $p = 0,047$ ; Рисунок 37 В). Уровень экспрессии VEGFR2 статистически значимо не влиял на выживаемость больных, получавших эту комбинацию химиопрепаратов.

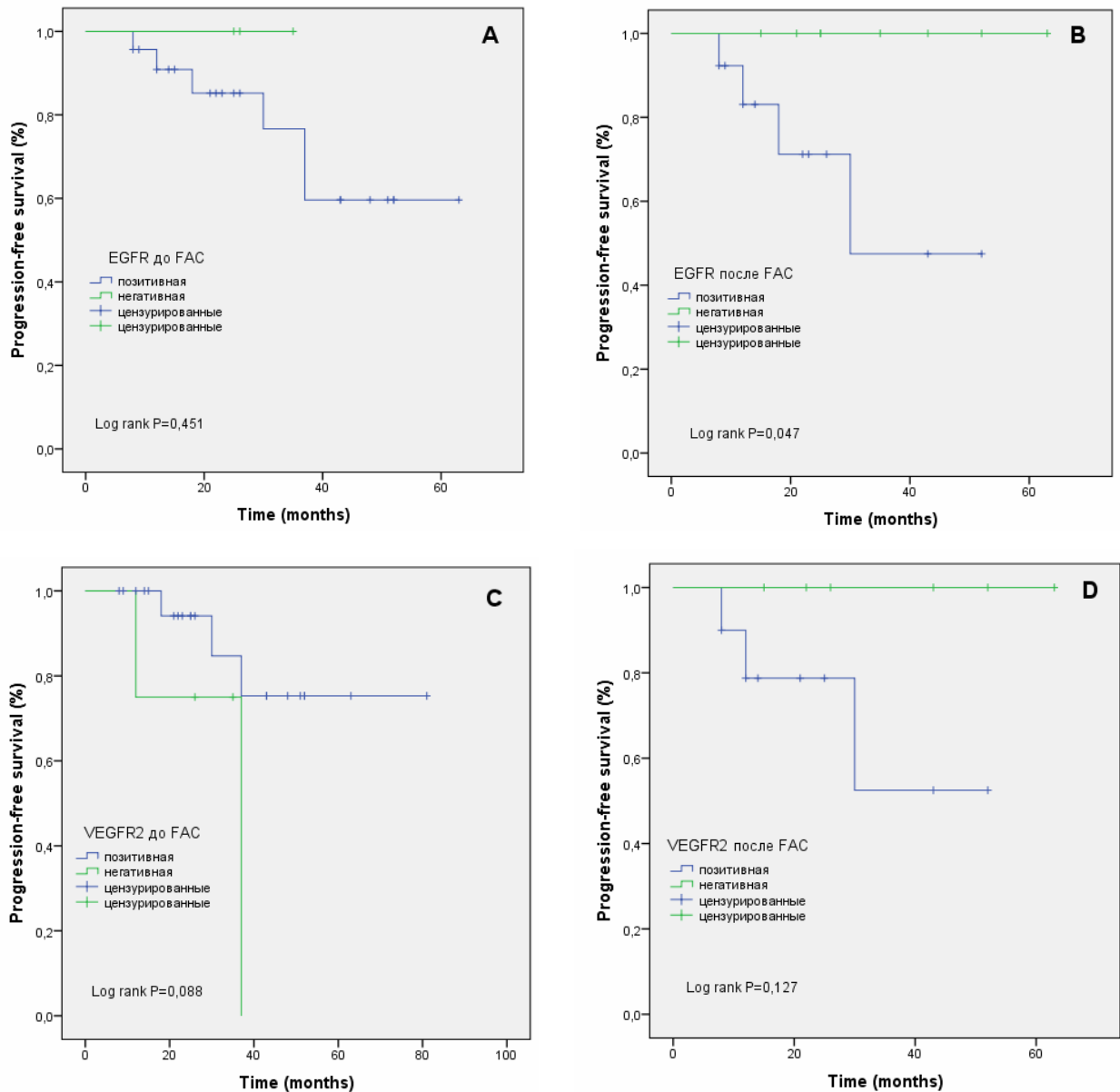


Рисунок 37 – Показатели безметастатической выживаемости у больных тройным негативным РМЖ в зависимости от экспрессии EGFR и VEGFR2 до (A,C) и после (B,D) схемы FAC

Носительство того или иного генотипа исследуемого гена не было связано с показателями безметастатической выживаемости больных ТНРМЖ.

Известно, что гиперэкспрессия EGFR как до, так и после проведения предоперационной терапии, связана с низкими показателями выживаемости

больных тройным негативным РМЖ [332]. Выявлено, что наличие в опухоли позитивно экспрессирующихся EGFR клеток ассоциировано с неблагоприятным прогнозом у больных местнораспространенном РМЖ, получавших химиотерапию по схеме FAC [128]. Избыточная экспрессия EGFR может способствовать активации большого количества внутриклеточных мессенджеров, в том числе PI3K/Akt, Ras/MAPK, STAT, что приводит к стимуляции пролиферативных процессов и увеличению инвазивности опухоли. Совокупность этих процессов определяет платформу для прогрессии опухоли и как следствие ведет к сокращению времени до прогрессирования больных.

Данные о прогностической значимости VEGFR2 при раке молочной железы, представленные в основном в зарубежных публикациях, крайне немногочисленны. Высокий уровень экспрессии VEGFR2 в опухолевой ткани считается предиктором неблагоприятного прогноза у больных тройным негативным раком молочной железы, получавших адъювантную химиотерапию [126].

Таким образом, определение уровня экспрессии EGFR и VEGFR2 в опухоли в процессе НАХТ, в том числе при использовании схем САХ и FAC, позволяет рассматривать их экспрессионный статус в качестве предсказательных маркеров эффективности лечения и исхода заболевания.

#### 3.6.4 Математическая модель, позволяющая предсказывать ожидаемую эффективность НАХТ у больных тройным негативным РМЖ

Для предсказания ожидаемой эффективности неoadъювантной химиотерапии у больных тройным негативным раком молочной железы были использованы методы математического моделирования. Установлено, что в однофакторном регрессионном анализе предикторами эффективности применения неoadъювантного лечения являются возраст пациенток на момент

диагноза, состояние регионарных лимфатических узлов, уровень маркера Ki67, экспрессия VEGFR2 до лечения и схема НАХТ (Таблица 48).

Таблица 48 – Предикторы эффективности НАХТ у больных ТНРМЖ по данным однофакторного и многофакторного регрессионного анализа

Параметры	Однофакторный анализ			Многофакторный анализ		
	Odd's ratio	95% CI	P-value	Odd's ratio	95% CI	P-value
Возраст ≤50 vs >50	4,370	1,520-12,559	0,006	1,545	0,448-2,643	0,005
Состояние лимфоузлов N <sub>0</sub> vs N <sub>1-3</sub>	3,760	1,104-12,801	0,034	1,893	0,332-10,777	0,472
Ki67 экспрессия <20 vs > 20	0,232	0,068-0,796	0,020	1,178	0,204-6,822	0,855
EGFR до НАХТ <i>негативная vs позитивная</i>	0,679	0,163-2,831	0,595	-		
EGFR после НАХТ <i>негативная vs позитивная</i>	1,148	0,650-1,524	0,600	-		
VEGFR2 до НАХТ <i>негативная vs позитивная</i>	3,740	1,165-12,009	0,027	1,102	0,009-2,196	0,048
VEGFR2 после НАХТ <i>негативная vs позитивная</i>	1,130	0,890-1,490	0,668	-		
Схема НАХТ FAC vs CAH	1,528	0,389-2,666	0,005	0,293	0,073-1,172	0,083
EGFR (rs1468727) TT vs TC+CC	0,365	0,142-0,942	0,937	-		
KDR (rs2071559) TT vs TC+CC	1,875	0,637-5,522	0,289	-		
KDR (rs2305948) GG vs GA+AA	0,533	0,129-2,209	0,386	-		
Примечания Odd's ratio – отношение шансов 95% CI – доверительный интервал						

Многофакторный анализ подтвердил зависимость с эффективностью НАХТ лишь двух из вышеперечисленных факторов – возраста пациенток и статуса экспрессии VEGFR2 до лечения ( $p = 0,005$  и  $p = 0,048$  соответственно; Таблица 48). Чувствительность модели составила 90%, специфичность – 65%. Далее мы валидировали полученные результаты, используя бутстреп метод (Bootstrap method), основанный на многократных генерациях исходной выборки, и доказали статистическую значимость выявленных маркеров как независимых предикторов ответа на НАХТ (Таблица 49).

Таблица 49 – Предикторы эффективности НАХТ у больных ТНРМЖ по данным многофакторного регрессионного анализа и бутстреп метода

Параметры	Многофакторный анализ (n=70)				Бутстреп метод (n=1000)		
	Odd's ratio estimate	SE	95% CI	P-value	Bias	SE	95% CI
Возраст ≤50 vs >50	1,545	0,559	0,448-2,643	0,005	0,131	0,814	0,455-2,686
VEGFR2 до НАХТ <i>негативная vs позитивная</i>	1,102	0,557	-0,009-2,196	0,048	0,053	0,593	-0,015-2,348
Примечания Odd's ratio estimate – отношение шансов 95% CI – доверительный интервал SE – стандартная ошибка Bias – смещение доверительного интервала							

Прогнозирование эффективности применения двух используемых схем НАХТ показало, что возраст пациенток и полиморфизм гена *KDR* rs2071559 ассоциированы с ответом на химиотерапию по схеме САХ (Таблица 50).

Таблица 50 – Предикторы эффективности НАХТ по схеме САХ у больных ТНРМЖ по данным однофакторного и многофакторного регрессионного анализа

Параметры	Однофакторный анализ			Многофакторный анализ		
	Odd's ratio	95% CI	P-value	Odd's ratio	95% CI	P-value
Возраст ≤50 vs >50	3,556	0,933-12,773	0,047	1,410	0,101-2,922	0,067
Состояние лимфоузлов N <sub>0</sub> vs N <sub>1-3</sub>	3,897	0,967-17,516	0,076	-	-	-
Ki67 экспрессия <20 vs > 20	0,295	0,050-1,745	0,178	-	-	-
EGFR до НАХТ <i>негативная vs позитивная</i>	2,133	0,340-13,402	0,419	-	-	-
EGFR после НАХТ <i>негативная vs позитивная</i>	0,682	0,149-1,724	0,253	-	-	-
VEGFR2 до НАХТ <i>негативная vs позитивная</i>	2,955	0,721-12,107	0,132	-	-	-
VEGFR2 после НАХТ <i>негативная vs позитивная</i>	0,650	0,114-2,690	0,227	-	-	-
EGFR (rs1468727) <i>TT vs TC+CC</i>	1,118	0,189-3,946	0,739	-	-	-
<i>KDR</i> (rs2071559) <i>TT vs TC+CC</i>	4,219	0,982-18,115	0,016	1,390	0,147-2,926	0,085
<i>KDR</i> (rs2305948) <i>GG vs GA+AA</i>	0,425	0,072-2,511	0,345	-	-	-
Примечания Odd's ratio – отношение шансов 95% CI – доверительный интервал						

Потенциальным предиктором ответа на химиотерапию по схеме FAC может являться статус экспрессии белка EGFR в опухоли до лечения, для которого определена тенденция к взаимосвязи с эффективностью такой схемы лечения ( $p = 0,085$ ; Таблица 51).

Таблица 51 – Предикторы эффективности НАХТ по схеме FAC у больных ТНРМЖ по данным однофакторного и многофакторного регрессионного анализа

Параметры	Однофакторный анализ			Многофакторный анализ		
	Odd's ratio	95% CI	P-value	Odd's ratio	95% CI	P-value
Возраст $\leq 50$ vs $> 50$	4,000	0,633-17,929	0,106	-		
Состояние лимфоузлов $N_0$ vs $N_{1-3}$	2,769	0,264-29,047	0,396	-		
Ki67 экспрессия $< 20$ vs $> 20$	0,462	0,064-3,345	0,444	-		
EGFR до НАХТ <i>негативная vs позитивная</i>	0,075	0,005-1,105	0,085	-		
EGFR после НАХТ <i>негативная vs позитивная</i>	3,200	0,950-8,125	0,985	-		
VEGFR2 до НАХТ <i>негативная vs позитивная</i>	5,333	0,506-16,236	0,164	-		
VEGFR2 после НАХТ <i>негативная vs позитивная</i>	0,950	0,019-3,090	0,220	-		
EGFR (rs1468727) <i>TT vs TC+CC</i>	4,008	0,109-11,426	0,939	-		
KDR (rs2071559) <i>TT vs TC+CC</i>	0,375	0,035-3,990	0,621	-		
KDR (rs2305948) <i>GG vs GA+AA</i>	0,755	0,012-1,798	0,999	-		
Примечания Odd's ratio – отношение шансов 95% CI – доверительный интервал						

Однако согласно данным многофакторного регрессионного анализа эффективных маркеров ответа как на САХ-, так и на FAC- неоадьювантную химиотерапию выявить не удалось.

Таким образом, методы математического моделирования позволяют подтвердить предсказательную значимость стандартных клинико-морфологических факторов, таких, как возраст больных, а также установить высокую степень значимости в плане ответа на неоадьювантную химиотерапию молекулярных маркеров, а именно, статуса экспрессии белка VEGFR2 в опухоли до предоперационного лечения.

### 3.7 Методологические подходы к прогнозированию исхода заболевания и предсказанию эффективности терапии РМЖ разных молекулярных подтипов

Разработка методологических подходов к прогнозированию клинического течения и эффективности терапии рака молочной железы продиктовано на сегодняшний день необходимостью оптимизации лечения гетерогенных по своей природе опухолей молочной железы в пользу персонификации.

В основе предложенной нами методологии лежит комплексный системный подход с учетом не только основных клинико-морфологических факторов заболевания и состояния рецепторного аппарата опухоли, но и её молекулярно-генетических особенностей, что позволит сформировать уникальный клинико-морфо-генотипический портрет опухоли. Реализация этого подхода осуществлялась посредством одновременного анализа индивидуальных генетических особенностей, экспрессии мРНК и белковой экспрессии основных компонентов интегрального для опухолевых клеток PI3K/Akt/mTOR сигнального пути. Основные этапы методологии представлены на рисунке 38.

На первом этапе для анализа маркеров на уровне генотипических особенностей были выбраны не только гены основных эффекторов PI3K/Akt/mTOR каскада, но и ключевые гены, вовлеченные в процессы пролиферации и апоптоза опухоли. Генотипирование двадцати шести полиморфных вариантов исследуемых генов позволило отобрать наиболее значимые из них как в плане внутренних молекулярных вариантов, так и клинического течения заболевания РМЖ. На втором этапе проведена оценка экспрессионной составляющей на уровне мРНК основных исследуемых генов, что дало возможность сопоставить индивидуально наследуемую генетическую компоненту с функциональной активностью гена. Далее были проанализированы особенности экспрессии рецепторных тирозинкиназ, внутриклеточных регуляторов PI3K/Akt/mTOR каскада и субпопуляций стволовых опухолевых клеток с целью понимания насколько функциональный потенциал генов реализуется в конечный белковый продукт.



Рисунок 38 – Этапы методологии системного анализа маркеров прогноза и предсказания эффективности терапии РМЖ

Использование методов описательной статистики, логистического регрессионного анализа и математического моделирования позволило выделить наиболее информативные маркеры, связанные с эффективностью терапии различных молекулярных подтипов РМЖ. Таким образом, с использованием математических моделей продемонстрирована возможность прогнозирования эффективности терапии тамоксифеном у больных эстроген-зависимым РМЖ (люминальный А и

В подтипы) и предсказания эффективности неoadъювантной терапии у пациентов эстроген-независимым РМЖ (тройной негативный подтип).

Совокупный анализ всех рассматриваемых маркеров позволил определить предполагаемую вероятность активации PI3K/Akt/mTOR сигнального пути для определения возможных механизмов формирования резистентности к терапии в опухолях разных молекулярных вариантов.

Так, формирование тамоксифен-чувствительного фенотипа опухоли у больных эстроген-зависимым РМЖ возможно при участии белков семейства трансформирующего и сосудистого эндотелиального факторов роста (Рисунок 39).

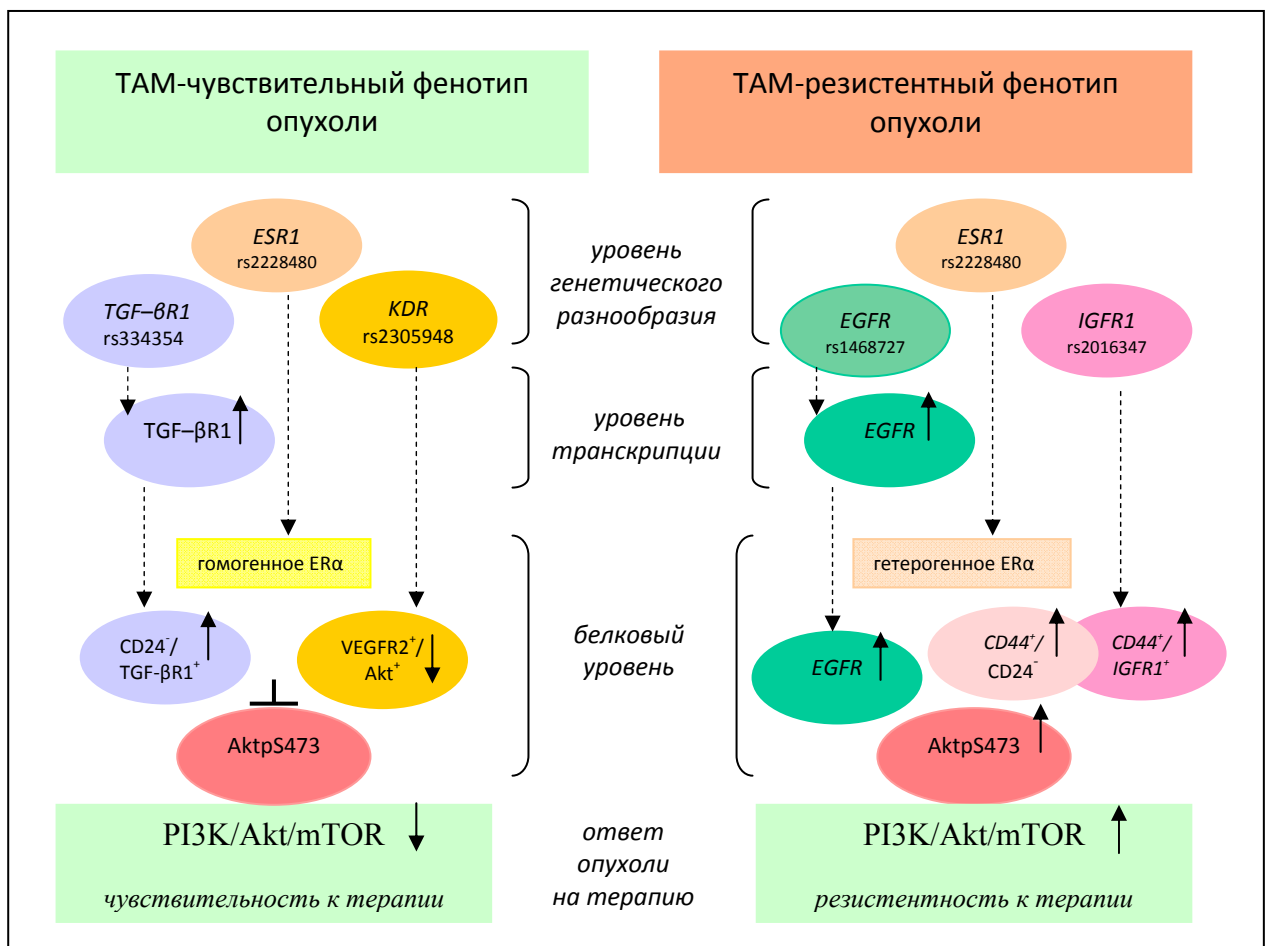


Рисунок 39 – Схема вовлечения молекулярно-генетических маркеров в механизмы формирования чувствительности/резистентности к тамоксифену в эстроген-зависимых опухолях

Наличие точечных мутаций гена *TGF-βR1* в локусе rs334354, по-видимому, приводит к высокой транскрипционной активности гена и, соответственно, высокой экспрессии кодируемого продукта, что может коррелировать со снижением активности Akt(pS473) и усилением TGF-β1/Smad - ассоциированных антипролиферативных сигналов в опухолях, преимущественно, люминального В подтипа рака молочной железы. Отсутствие мутаций *ESR1* и гомогенный характер распределения эстрогеновых рецепторов, ассоциированный с позитивной экспрессией TGF-βR1 в опухоли и высоким процентом клеток CD24<sup>-</sup>/TGF-βR1<sup>+</sup>, в значительной степени могут способствовать эффективному ответу опухоли на терапию тамоксифеном. Вклад белков семейства сосудистого эндотелиального фактора роста может быть опосредован точечной заменой rs2305948 гена *KDR*, которая определяет низкую эффективность связывания лиганда с рецептором и, соответственно, низкую активность VEGFR2-опосредованных сигнальных каскадов, в том числе и PI3K/Akt/mTOR, в опухолях люминального А варианта РМЖ. Отсутствие активации PI3K/Akt/mTOR может частично быть обусловлено незначительным содержанием популяции опухолевых клеток с фенотипом VEGFR2<sup>+</sup>/Akt(pS473)<sup>+</sup>.

Развитие тамоксифен-резистентного фенотипа опухолей люминального В типа РМЖ напрямую связано с экзонным полиморфизмом гена *ESR1*(rs2228480), который ведет к нарушению процесса взаимодействия рецептора с лигандом, делая ERα потенциально неактивным для связывания с тамоксифеном. Можно полагать, что при сочетанном наличии данной мутации и гетерогенного характера распределения эстрогеновых рецепторов опухоль приобретает высокоагрессивные свойства и становится не чувствительной к гормональной терапии. В опухолях люминального А подтипа особая роль в формировании резистентности к тамоксифену принадлежит тирозинкиназам IGF1R и EGFR. Полиморфизм в 3'UTR области гена *IGFR1* (rs2016347) определяет повышение экспрессии мРНК, что ведет к усилению процессов активации IGF1R-связанных каскадов, таких как PI3K/Akt/mTOR. Поддержанию их функциональной активности способствует высокая доля CD44<sup>+</sup>/IGF1R<sup>+</sup> и CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> популяций

клеток, имеющих потенциал агрессивного фенотипа. Мутантный вариант гена *EGFR* локуса rs1468727 может оказывать существенное влияние на процессы транскрипции, приводя к увеличению экспрессии, как гена, так и белка и запуску PI3K/Akt/mTOR сигнального пути через EGFR как вышестоящий эффектор.

Примечательно, что активация пролиферативных процессов посредством сигнальной системы EGFR, является преимущественным механизмом неэффективного ответа на неoadьювантную химиотерапию в эстроген-независимых опухолях (Рисунок 40).

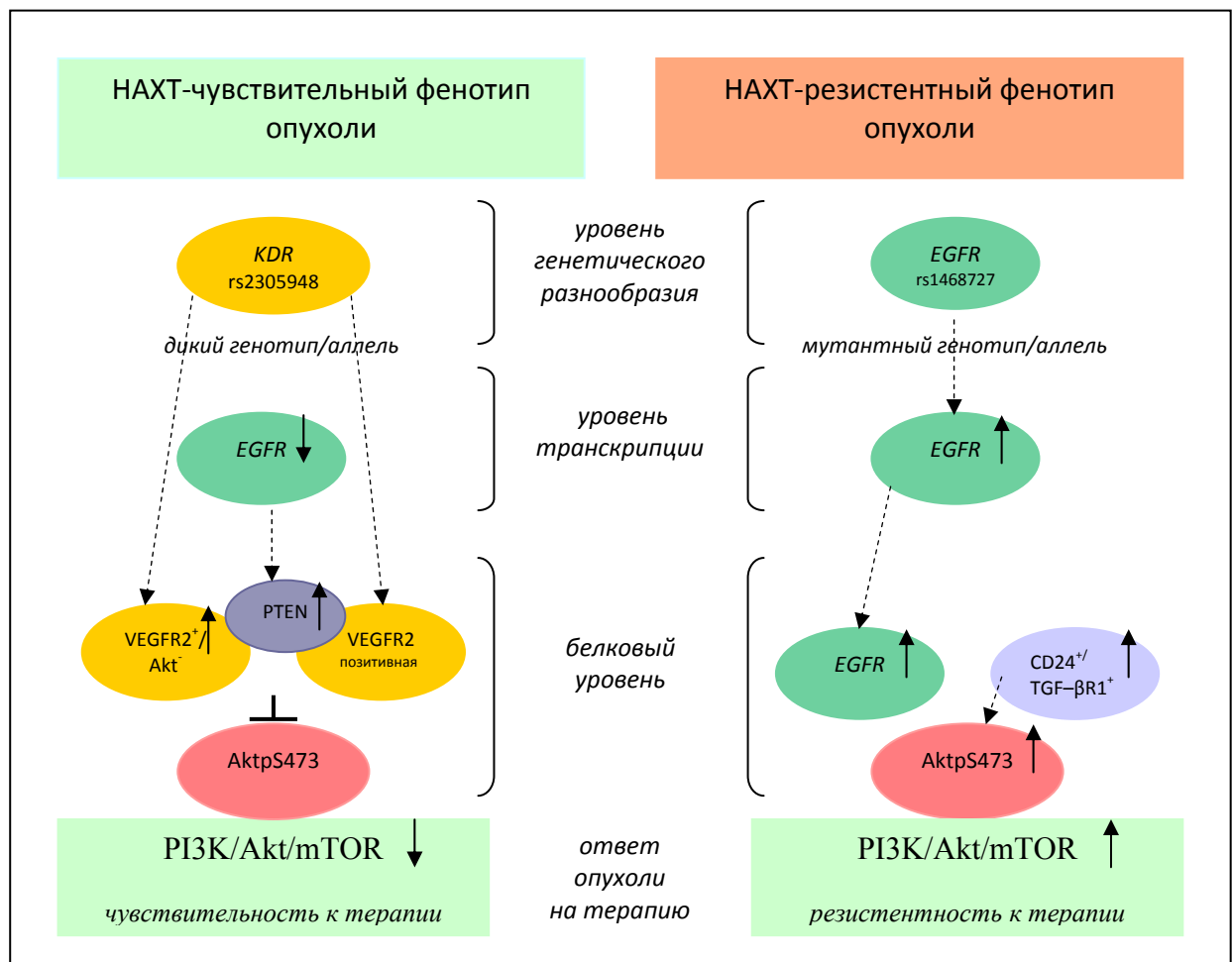


Рисунок 40 – Схема вовлечения молекулярно-генетических маркеров в механизмы формирования чувствительности/резистентности к НАХТ в эстроген-независимых опухолях

Мутации гена *EGFR*, определяемые в большинстве EGFR-положительных опухолей в настоящем исследовании, могут обуславливать высокую активность EGFR, обеспечивающую устойчивость к предоперационному лечению. Потенциальным

фенотипически агрессивным маркером исхода лечения заболевания может быть коэкспрессия опухолевыми клетками CD24<sup>+</sup>/TGF-βRI<sup>+</sup>. Видимо, высока вероятность активации TGF-β1-опосредованных внутриклеточных каскадов и стимуляции экспрессии мезенхимальных маркеров, что запускает процессы эпителиально-мезенхимального перехода и развития химиорезистентности.

Чувствительность опухолей с тройным негативным фенотипом к НАХТ может определяться вовлечением в процессы регуляции пролиферации VEGFR2-связанных факторов. Для эффективного ответа на предоперационную терапию представляется важным наличие изначально высокого содержания в опухоли VEGFR2-позитивных клеток, которое снижается в процессе лечения, что приводит к ингибированию VEGFR2/PI3K-регуляторных механизмов. На внутриклеточном уровне высокое содержание PTEN-экспрессирующих клеток и VEGFR2<sup>+</sup>/Akt(pS473)<sup>-</sup> популяций клеток свидетельствует об отсутствии активации PI3K/Akt/mTOR, способствующей реализации благоприятного в плане ответа на терапию опухолевого фенотипа.

Таким образом, представленный методологический подход определяет возможность определения фенотипа чувствительности и устойчивости к терапии разных молекулярных вариантов рака молочной железы, что может являться дополнительным прогностическим и предсказательным инструментом в клинической практике.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка молекулярного типирования опухолей молочной железы в течение последних двух десятилетий привела к признанию мировым научным сообществом существования четырех клинически и биологически гетерогенных вариантов РМЖ, требующих различных терапевтических подходов. Назначение химиотерапевтических режимов при опухолях с тройным негативным фенотипом, применение анти-HER2 препаратов и химиотерапии для HER2-экспрессирующих опухолей и эндокринной терапии при двух подтипах эстроген-позитивного РМЖ является на сегодняшний день общепринятой тактикой ведения пациентов в клинической практике. Однако на недавнем симпозиуме St. Gallen-2017, прошедшем под девизом «Эскалация и деэскалация терапии раннего рака молочной железы», был поднят один из важнейших вопросов практической онкологии – как достичь оптимального клинического решения для каждого конкретного пациента, избежав «сверх» - либо «недолечения». «Распознавание» пациентов, которые получают или не получают выгоду от специализированной терапии остается актуальной задачей, направленной на поиск дополнительных молекулярно-генетических маркеров прогноза и эффективности лечения рака молочной железы.

Биологическая природа резистентности и чувствительности как к антиэстрогенной терапии, так и химиотерапевтическому лечению мультифакториальна, в механизмах развития которой задействовано множество сигнальных каскадов, обеспечивающих пролиферативный потенциал опухоли. PI3K/Akt/mTOR как интегратор внутриклеточных сигнальных взаимодействий может рассматриваться в качестве универсальной модельной системы, позволяющей оценить роль каждого из его компонентов в процессах формирования устойчивости к терапии разных молекулярных вариантов РМЖ. Несмотря на широкую научную востребованность в исследованиях различных звеньев PI3K/Akt/mTOR сигнального пути (от рецепторных тирозинкиназ до внутриклеточных регуляторных белков), отсутствует их комплексный анализ, позволяющий оценить статус каждого с учетом трех регуляторных уровней –

генетического полиморфизма, экспрессии генетических вариаций и детекции их белковых продуктов.

С учетом вышеизложенного представляется обоснованным разработка методологических подходов к прогнозированию возможного исхода заболевания и предсказанию ожидаемой эффективности терапии при разных молекулярных подтипах РМЖ на основе системного анализа основных PI3K/Akt/mTOR-ассоциированных компонентов.

Для реализации данного подхода мы последовательно оценили и проанализировали полиморфный статус, экспрессионный и белковый профиль тирозинкиназных рецепторов (*EGFR*, *TGF-β1*, *IGFR1* и *KDR*), изучили особенности экспрессии ключевых белков PI3K/Akt/mTOR каскада (Akt pS473 и PTEN), а также содержание популяций клеток с фенотипом стволовых (CD44/CD24) в двух группах пациентов – эстроген-зависимой (люминальный А и В подтипы РМЖ) и эстроген-независимой (тройной негативный РМЖ). Следует отметить, что исследование маркеров на уровне генотипа опухоли (полиморфизм генов) и фенотипа опухоли (анализ белковой экспрессии) в совокупности с транскрипционным уровнем (экспрессия мРНК) и фенотипированием маркеров стволовых опухолевых клеток и внутриклеточных белков, определило возможность проведения всестороннего анализа.

Результаты изучения двадцати шести полиморфных вариантов исследуемых генов *ESR1* 2014G>A rs2228480, *ESR1*+30T>C rs2077647, *TGF-β1* Int7G24A rs334354, *KDR*-604T>C rs2071559, *KDR*1192G>A rs2305948, *EGFR* rs1468727, *IGFR1*3129G>T rs2016347, *FGFR2* rs1219648, *FGFR2* rs2981582, *TGF-β1*-509C>T rs1800469, *TGF-β1*-29T>C rs1800470, *VEGF*-2578C/A rs699947, *XRCC1*Arg399Gln rs25487, *TP53*Ex4+119G>C rs1042522, *TP53*IVS3+41ins16bp rs17878362, *TP53* IVS6+62G>A rs1625895, *MTHFR* 677C>T rs1801133, *MTHFR* 1298A>C rs1801131, *MTR* 2756A>G rs1805087, *DHFR* del19 rs70991108, *MTHFD1*1958G>A rs2236225, *MTRR* 66G>A rs1801394, *TS* 28-bp repeat rs34743033, *TS* 1494 6-bp deletion rs16430, *RFC1* 80G>A rs1051266, *DNMT3b* 149C>T rs2424913 свидетельствуют о том, что разные молекулярные варианты РМЖ имеют разные генетические особенности.

Полиморфный локус rs1219648 гена *FGFR2* ассоциирован с общей когортой эстроген-зависимых опухолей, полиморфные варианты rs334354 гена *TGF-βRI* и rs2071559 гена *KDR* – с опухолями люминального А варианта, полиморфизм гена эстрогенного рецептора rs2228480 – с опухолями люминального В подтипа, с эстроген-независимым РМЖ связан локус rs1468727 гена *EGFR*. Проанализировав профиль экспрессии исследуемых генов и их белковых продуктов, мы показали, что в опухолях люминального А типа высокоэкспрессированы гены *EGFR* и *TGF-βRI*. В отношении рецептора трансформирующего фактора роста высокая функциональная активность гена обуславливает высокое содержание белка в эстроген-зависимых опухолях (как люминального А, так и В подтипов). Для опухолей с тройным негативным фенотипом отмечено преобладание опухолевых клеток с высокой экспрессией *EGFR* и *VEGFR2*. Отличительной особенностью эстроген-зависимых опухолей является значительное содержание клеток, экспрессирующих фосфорилированную форму Akt, а также популяций клеток с фенотипом  $VEGFR2^-/Akt(pS473)^+/IGF1R^-/Akt(pS473)^+$ . Тройные негативные опухоли, напротив, характеризуются высоким процентом  $PTEN^+$ - и  $VEGFR2^+/Akt(pS473)^+$  клеточных популяций. Несмотря на отсутствие взаимосвязи популяции  $CD44^+/CD24^{-/low}$  клеток с молекулярными подтипами РМЖ в данном исследовании, нами описаны их фенотипы на основе коэкспрессии маркеров стволовых опухолевых клеток и тирозинкиназ/фосфатазы *PTEN*. В опухолях люминального А и В типа наиболее выражена экспрессия  $CD44^-/IGF1R^+$ ,  $CD24^+/TGF-βRI^+$  и  $CD44^+/CD24^+/PTEN^+$  клеток, эстроген-независимые опухоли представлены в большей степени  $CD44^+/IGF1R^-$  и  $CD24^+/TGF-βRI^-$  субпопуляциями.

Таким образом, каждый молекулярный вариант РМЖ характеризуется определенными показателями генетического фона, экспрессионного и белкового профиля маркеров, ассоциированных с PI3K/Akt/mTOR-путем, что вероятно может обуславливать не только их различное клиническое поведение, но и ответ на терапевтическое воздействие.

В связи с этим мы провели анализ исследуемых маркеров во взаимосвязи с основными клинико-морфологическими параметрами пациентов – возрастом на момент постановки диагноза, размером первичной опухоли, вовлеченностью в процесс регионарных лимфоузлов и характером распределения эстрогеновых рецепторов в опухоли. В результате исследования определен набор SNPs, связанных с особенностями клинического течения каждого молекулярного типа РМЖ. В формирование неблагоприятного с клинических позиций эстроген-зависимого фенотипа РМЖ (репродуктивный возраст больных, размер опухоли более 50 мм в наибольшем измерении, вовлеченность в процесс лимфоузлов, гетерогенный характер распределения рецепторов в опухоли) могут быть вовлечены гетерозиготные варианты генов *TP53* rs17878362 и *TS* rs16430, а также мутантные генотипы гена *VEGF* rs699947. Наличие мутантных вариантов гена *ESR1* rs2077647 ассоциировано с неблагоприятным прогнозом у больных люминальным А РМЖ, наличие мутантных аллелей генов *KDR* rs2305948 и *IGFR1* rs2016347 – у пациентов люминальным В типом. Для опухолей с тройным негативным фенотипом наиболее значимыми в отношении неблагоприятного прогноза генетическими маркерами являются мутантные аллели генов *EGFR* rs1468727 и *TP53* rs1042522, а также мутантные генотипы *IGFR1* rs2016347, *TGF-β1* rs1800469 и *VEGF* rs699947. На экспрессионном уровне значимых факторов агрессивного течения эстроген-зависимого РМЖ выявить не удалось, однако для эстроген-независимых опухолей с метастатическим поражением лимфоузлов отмечен высокий процент TGF-βR1-позитивных клеток. Ряд тенденций, которые были получены при изучении экспрессии внутриклеточных белков в комбинации с рецепторами факторов роста, позволяют полагать о потенциальном вовлечении популяции VEGFR2<sup>-</sup>/Akt(pS473)<sup>+</sup> в механизмы прогрессирования люминальных опухолей; двойной позитивной популяции VEGFR2<sup>+</sup>/Akt(pS473)<sup>+</sup> – в механизмы прогрессии тройного негативного РМЖ. Показана ассоциация клеток с фенотипом CD44<sup>+</sup>/IGF1R<sup>-</sup> и CD24<sup>+</sup>/TGF-βR1<sup>-</sup> с агрессивным течением опухолей люминального А подтипа; подобная взаимосвязь описана для CD24<sup>+</sup>/TGF-βR1<sup>+</sup> клеток при тройном негативном РМЖ.

Рассматривая исследуемые маркеры с точки зрения благоприятных клинических признаков (размеры опухолевого узла менее 50 мм, отсутствие метастатически пораженных лимфоузлов, гомогенный характер распределения эстрогеновых рецепторов), следует отнести к таковым гетерозиготные и мутантные генотипы гена *TGF-β1* rs334354 для пациентов люминальной А группы, мутантные аллели генов *ESR1* rs2228480, *ESR1* rs2077647 и *TGF-β1* rs334354 для больных люминальным В РМЖ, гетерозиготные варианты генов *MTHFD1* rs2236225 и *XRCC1* rs25487 – для пациентов с тройным негативным фенотипом опухоли. Вероятно, точечные мутации гена *TGF-β1* могут обуславливать высокий уровень продукции его белка, который связан с гомогенным характером распределения ERα у пациенток люминальным РМЖ. Высокая функциональная активность гена *TGF-β1* у больных тройным негативным РМЖ, ассоциированная в нашем исследовании с опухолями небольшого размера, требует дальнейшего изучения для обоснованного вклада рецептора трансформирующего фактора роста в механизмы прогрессии этого молекулярного типа. Требуют подтверждения данные, относительно популяций клеток с взаимной коэкспрессией белков IGF1R/Akt(pS473) и VEGFR2/Akt(pS473), которые пока не столь убедительны в плане взаимосвязи с неагрессивным поведением эстроген-зависимых опухолей.

Принципиально разные терапевтические подходы к выбору лечебной тактики у исследуемых групп пациентов предопределили вектор направления дальнейшего этапа работы – поиск прогностических и предсказательных маркеров, касающихся эффективности терапии тамоксифеном у больных эстроген-зависимым РМЖ (люминальный А и В подтипы), а также факторов, ассоциированных с эффективностью неoadьювантной химиотерапии у пациентов эстроген-независимым РМЖ (тройной негативный подтип).

Вклад индивидуальных генетических особенностей в механизмы чувствительности/резистентности к терапии РМЖ может быть чрезвычайно весомым, поскольку наследуемый набор аллельных вариантов генов определяет уровень экспрессии мРНК или активность кодируемых ими продуктов, что может

обеспечивать значительную вариабельность активности эффекторных реакций, опосредованных соответствующими белками. Мы продемонстрировали ассоциативную связь мутантных генотипов гена *ESR1* rs2228480, а также гетерозигот и мутантных аллелей гена *IGFR1* rs2016347 с резистентностью к тамоксифену у больных эстроген-зависимым РМЖ. Причем, точечные мутации гена *ESR1* rs2228480 могут рассматриваться в качестве генетических факторов, определяющих неэффективность ответа на тамоксифен у пациентов люминальным В подтипом, тогда как мутантные варианты гена *IGFR1* rs2016347 в большем проценте случаев ассоциированы с риском прогрессирования у больных люминальным А РМЖ. Стоит отметить, что уровень экспрессии мРНК исследуемых генов в зависимости от отдаленных результатов адъювантной терапии тамоксифеном значимо не различался, однако содержание их белковых продуктов, в частности EGFR, было существенно повышено в люминальных опухолях (особенно, люминального А варианта), нечувствительных к тамоксифену, что отражает их выраженные пролиферативные возможности. Мы доказали присутствие функционально активного PI3K/Akt/mTOR сигнального пути в люминальных опухолях, резистентных к тамоксифену, поскольку они характеризовались значительным преобладанием клеток, экспрессирующих фосфорилированную форму белка Akt. Примечательна связь CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/low</sup> и популяции клеток с коэкспрессией CD44 и IGF1R с низкой эффективностью лечения тамоксифеном в опухолях люминального типа (для CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/low</sup> только в люминальном А РМЖ), которые могут быть вовлечены в механизмы формирования чувствительности/резистентности к антиэстрогенам. По всей вероятности, «включение» PI3K/Akt/mTOR во всех типах люминальных опухолей реализуется как посредством EGFR/PI3K сигналинга, так и IGF1R/PI3K каскадов, причем активации последних может значительно способствовать полиморфный статус *IGFR1*, определяющий при наличии мутантных генотипов/аллелей высокую транскрипционную активность гена. В опухолях люминального А типа стимуляция EGFR-опосредованных внутриклеточных путей может являться пусковым звеном в индукции фенотипов стволовых опухолевых клеток,

резистентных к тамоксифену, что в значительной степени подтверждают данные экспериментальных исследований [263, 314].

Мы показали, что чувствительность опухолевых клеток к тамоксифену может быть ассоциирована с наличием мутантных аллелей гена *KDR* rs2305948, определяющих низкую эффективность взаимодействия VEGF-VEGFR2, которое вероятно приводит к неполноценному функционированию последнего. Не исключено, что экспрессия мРНК одних генов может регулироваться аллельными вариантами других, обеспечивая перекрестное внутриклеточное взаимодействие. На уровне транскрипционной активности генов наиболее существенная связь с эффективным ответом на тамоксифен у больных эстроген-зависимым РМЖ показана для гена *TGF-βRI*. Высокое содержание TGF-βRI-позитивных клеток подтверждает эффективность процессов трансляции в люминальных опухолях, чувствительных к тамоксифену. Интересно отметить высокий процент популяции клеток с двойным негативным фенотипом CD44<sup>-</sup>/IGF1R<sup>-</sup> в тамоксифен-чувствительных опухолях независимо от молекулярного типа. Примечательно, что в опухолях, отвечающих на тамоксифен, значительно чаще эстрогеновые рецепторы распределены гомогенно, такие опухоли, как правило, не имеют точечных мутаций гена *ESR1* и экспрессируют TGF-βRI. Можно полагать, что в условиях функционально (как генетически, так и фенотипически) полноценного ERα и отсутствии гиперактивации тирозинкиназ, TGF-βI способен реализовать не EMT-опосредованную программу, а альтернативную, направленную на антипролиферативную активность и эффективный ответ к антиэстрогенной терапии.

Чрезвычайно важной задачей исследования явилось сопоставление выявленных нами маркеров чувствительности и резистентности с показателями выживаемости больных, поскольку именно эта оценка позволяет определить их прогностический потенциал. Оказалось, что таким потенциалом обладает ряд генетических маркеров (мутации *ESR1* rs2228480), белковые маркеры (высокое содержание EGFR- и AktpS473-позитивных клеток), гетерогенный характер распределения эстрогеновых рецепторов в опухоли и сочетание двух маркеров

одновременно (гетерогенное распределение ER $\alpha$ /мутации гена *ESR1* rs2228480, гетерогенное распределение ER $\alpha$ /положительный уровень экспрессии EGFR), которые ассоциированы не только с резистентностью к тамоксифену, но и низкой безметастатической выживаемостью больных эстроген-зависимым РМЖ. Группу пациенток люминальным А РМЖ отличало от общей группы больных люминальным РМЖ отсутствие в данном перечне генетических маркеров *ESR1* rs2228480 и присутствие *IGFR1* rs2016347.

Увеличение показателей выживаемости без прогрессирования заболевания у больных эстроген-зависимым РМЖ связано с наличием точечных мутаций гена *KDR* rs2305948, высоким содержанием TGF- $\beta$ RI-положительных клеток, гомогенным распределением ER $\alpha$  и комбинацией двух маркеров одновременно гомогенного характера ER $\alpha$ /TGF- $\beta$ RI-положительной экспрессии, для которых нами определена связь с эффективностью терапии тамоксифеном. Значимыми в плане выживаемости маркерами для люминального А варианта РМЖ остаются все вышеперечисленные факторы, за исключением белковой экспрессии TGF- $\beta$ RI.

Поиск предиктивных маркеров эффективности НАХТ осуществлялся с акцентом на белковый и генетический статус рецепторов эпидермального и сосудистого эндотелиального факторов роста, как основных триггеров PI3K/Akt/mTOR каскада в опухолях с тройным негативным фенотипом. Нам удалось продемонстрировать, что показатели экспрессии этих белков значительно снижаются в процессе лечения, причем высокий уровень VEGFR2-положительных клеток до предоперационной терапии и низкий уровень экспрессии EGFR/VEGFR2 белков после проведенного лечения связаны с объективным клиническим и полным патоморфологическим ответом опухоли. Следует отметить, что предиктивная значимость данных маркеров не зависела от применения САХ и FАС схем неoadьювантной химиотерапии. Ценность исследуемых белков как маркеров прогноза подтверждена данными анализа выживаемости. Наличие VEGFR2-положительных клеток в опухоли до предоперационной терапии может определять высокие показатели безметастатической выживаемости у больных тройным негативным РМЖ.

Низкий уровень экспрессии либо отсутствие экспрессии EGFR в опухоли после применения FAC схемы НАХТ значительно увеличивало время до прогрессирования в исследуемой группе больных.

Существенный вклад в механизмы резистентности к НАХТ вносят гены, кодирующие исследуемые белки. Отсутствие эффективного ответа на предоперационную химиотерапию связано с носительством мутантных генотипов *EGFR* локуса rs1468727, причем у 60% таких пациентов опухоли характеризуются положительной экспрессией EGFR. Таким образом, возможна регуляция экспрессии *EGFR* на уровне процессов транскрипции и стабильности мРНК, приводящая к продуктивному синтезу белка и, соответственно, высокой EGFR/PI3K-ассоциированной активности. Взаимосвязь с резистентностью к НАХТ с включением капецитабина показана и для SNP rs2071559 гена *KDR*. Однако в данном случае, одним из потенциальных механизмов отсутствия терапевтического эффекта у больных при наличии точечной мутации в этом полиморфном локусе может рассматриваться модуляция экспрессионной активности гена *KDR*, результатом которой является не снижение, а повышение продукции VEGFR2, что и определяет его дальнейшее участие в тирозинкиназ-регулируемых сигнальных каскадах.

Использование методов математического моделирования позволило обозначить информативные маркеры для разных молекулярных подтипов РМЖ, обладающих высокой прогностической и предсказательной значимостью. Большинство из них обладало независимым потенциалом в однофакторном анализе, однако при многофакторном анализе лишь нескольких факторов были включены в математическую модель. Было получено две логистические регрессионные модели, позволяющие прогнозировать неэффективность адьювантной терапии тамоксифеном и как следствие, риск развития прогрессирования заболевания у больных эстроген-зависимым РМЖ и модель предсказания эффективности НАХТ у больных тройным негативным РМЖ. Логистическая модель для общей группы эстроген-позитивных опухолей включала переменные-факторы полиморфизм гена *ESR1* в локусе rs2228480 и

характер распределения ER $\alpha$  в опухоли. Независимыми факторами прогноза, составляющими модель для опухолей люминального А типа, являлись три маркера – наличие/отсутствие метастазов в лимфоузлы, характер распределения ER $\alpha$  и экспрессии EGFR. Для люминального В РМЖ адекватной модели пока не найдено, но стоит отметить зависимость SNP rs2228480 гена *ESR1* с исходом заболевания. Факторами, предсказывающими эффективность неoadъювантной химиотерапии у больных тройным негативным РМЖ, являются возраст пациенток и статус экспрессии VEGFR2 до предоперационной терапии. Статистическая значимость полученной модели была подтверждена бутстреп анализом.

На основании установленных закономерностей нами определены возможные механизмы формирования фенотипов чувствительности/резистентности в опухолях с разным молекулярным типом.

Для реализации тамоксифен-чувствительного фенотипа в ER-позитивных опухолях ключевым моментом является, по-видимому, отсутствие функционально-активного PI3K/Akt/mTOR каскада. Сигнальные системы двух факторов роста TGF- $\beta$ 1 и VEGF могут активно этому способствовать. Высокая транскрипционная и экспрессионная активность TGF- $\beta$ R1, вероятно определит запуск TGF- $\beta$ 1 посредством Smad-зависимых механизмов, что приведет к ингибированию трансдукции сигнала через PI3K [403], а слабая функциональность VEGFR2, обусловленная мутациями гена *KDR*, скорее всего – к супрессии VEGF/PI3K/Akt. Можно полагать что, с одной стороны блокада эстрогенов (в том числе и тамоксифеном) ведет к значительному снижению PI3K/Akt-активности в опухолевой ткани, с другой стороны дисрегуляция каскада обеспечивается координированным вовлечением TGF- $\beta$ 1- и VEGF-ассоциированных белков. Интегральным связующим звеном в этом комплексном взаимодействии выступают эстрогеновые рецепторы, которые способны осуществлять ответ на антиэстрогенный стимул при генетически стабильном статусе ER $\alpha$ , лишенном точечных мутаций в экзонах, кодирующих E/F и A/B домены *ESR1*.

«Включение» PI3K/Akt/mTOR сигнального пути в ER-позитивных опухолях, резистентных к тамоксифену, является на сегодняшний день неоспоримым, причем в большей степени при участии тирозинкиназ IGF1R и EGFR. Это подтверждают данные экспериментальных, клинических работ [104, 117, 199] и результаты представленного выше исследования. Несмотря на кроссрегуляцию между IGF1R/EGFR и ER $\alpha$ , когда эстрогеновые рецепторы активируют рецепторы факторов роста и их нижестоящие эффекторы (в том числе и Akt), а IGF1R/EGFR в свою очередь способны к лиганд-независимой активации ER $\alpha$ , ER $\alpha$  остаются центральной мишенью этих взаимодействий. Помимо известной и доказанной в настоящее время гиперэкспрессии в опухоли IGF1R и EGFR, мы показали значимый вклад их генетической составляющей, которая в совокупности с полиморфным статусом *ESR1* может определять резистентный опухолевый фенотип. Вероятно, при наличии транскрипционно неактивного рецептора в результате точечных замен гена *ESR1*, локализованных в области транскрипционной активации AF2 (rs2228480), кратно возрастает реализация негеномных механизмов действия эстрогенового рецептора посредством факторов роста, что обеспечивает эстрогеннезависимое поведение опухоли и усугубляет резистентность к антиэстрогенам. Оказалось, что опухоли, резистентные к тамоксифену, наряду с мутацией гена *ESR1* характеризуются выраженным гетерогенным рисунком распределения ER $\alpha$ . Можно полагать, что неоднородный характер экспрессии, определяемый по качественной и количественной оценке иммуногистохимического окрашивания эстрогеновых рецепторов в опухоли, есть проявление её генетической гетерогенности, а совокупность двух маркеров (гетерогенного распределения и мутации) определяет опухоль как агрессивно-устойчивую в плане ответа на антиэстрогенную терапию. Учитывая имеющиеся в литературе сведения о взаимном регуляторном влиянии CD44 и рецепторных тирозинкиназ [317], а также данные собственных наблюдений, свидетельствующих о преобладании популяции клеток с коэкспрессией CD44 и IGF1R в тамоксифен-резистентных опухолях, можно рассматривать экспрессию CD44 в качестве одного из

потенциально важных элементов комплексной организации сигнальных путей, формирующих резистентный фенотип.

Степень активации PI3K/Akt/mTOR в опухолях с тройным негативным фенотипом может определяться в большей мере высокой EGFR/PI3K/Akt трансдукцией, как одного из превалирующих механизмов неэффективности предоперационного химиотерапевтического лечения. Однако не исключено вовлечение в механизмы химиорезистентности и других внутриклеточных сигнальных путей, неразрывно связанных между собой. Экспериментальные исследования продемонстрировали возможность CD24-опосредованной регуляции p38MAPK сигнального пути и TGF- $\beta$ 1-зависимой эпителиально-мезенхимальной трансформации через модуляцию активности адаптерных белков Src/FAK в опухолевых клетках линий рака молочной железы [160, 393]. Наличие высокоэкспрессируемой популяции CD24<sup>+</sup>/TGF- $\beta$ RI<sup>+</sup> в нашем исследовании у больных РМЖ косвенно может указывать на вероятность реализации таких механизмов в химиорезистентных опухолях, приводящих к промоции опухолевого роста. Стоит отметить, что TGF- $\beta$ 1-активированная программа EMT приводит к изменению активности/экспрессии тирозинкиназных рецепторов, в частности, EGFR, контролирующих, в том числе, p38MAPK сигнальный путь. Таким образом, видимо, достигается взаимный контроль пролиферативных сигналов, чрезвычайно выгодных опухолевой клетке.

Регуляторные взаимоотношения рецепторных тирозинкиназ и PI3K/Akt/mTOR во многом могут определять чувствительность опухолевых клеток к цитостатикам, однако при условии ингибирования активности VEGF/PI3K/Akt, а также вероятно снижения коэкспрессии VEGF и тимидинфосфорилазы. Известно, что тимидинфосфорилаза, как ангиогенный фермент, может активно контролировать экспрессию генов эпителиально-мезенхимального перехода, в том числе и VEGF, посредством активации PI3K/Akt/mTOR сигналинга [234]. Полагают, что чувствительность к 5-фторсодержащим схемам химиотерапии значительно возрастает при наличии в опухоли высоко активного фермента, обеспечивающего конверсию 5'-DFUR-5-FU

[76, 153]. В своем исследовании мы показали изначально высокое содержание в опухоли VEGFR2-позитивных клеток, которое значительно снижается в процессе НАХТ, что приводит к эффективному противоопухолевому ответу. Вероятно, экспрессия тимидинфосфорилазы в процессе лечения также будет снижаться, что обеспечит ингибирование VEGF/VEGFR2 активности, и как следствие ослабление механизмов VEGF/PI3K/Akt-опосредованной передачи сигнала. Усиление активности негативного регулятора каскада PTEN будет синергично способствовать этому процессу.

Таким образом, разработан новый методологический подход, основанный на совокупном анализе индивидуальных генетических особенностей, экспрессии мРНК и белковой экспрессии основных компонентов интегрального для опухолевых клеток PI3K/Akt/mTOR сигнального пути, что позволило выявить информативные прогностические и предсказательные маркеры эффективности терапии для разных молекулярных типов РМЖ. Данный комплексный системный подход дает возможность сформировать представления о чувствительных и резистентных фенотипах эстроген-зависимых и эстроген-независимых опухолей и потенциальных механизмах их реализации, что в целом определяет многоступенчатый молекулярный портрет опухоли. Использование предложенной методологии позволит оптимально и персонализировано подойти к обоснованию выбора терапевтических подходов для опухолей молочной железы с разным молекулярным портретом.

## ВЫВОДЫ

1. Выявлены особенности распределения частот встречаемости аллелей и генотипов исследуемых генов у больных РМЖ в зависимости от молекулярного подтипа. Мутантные варианты гена *FGFR2* rs1219648 ассоциированы с эстроген-зависимым РМЖ, варианты генотипы *TGF-βRI* rs334354 и *KDR* rs2071559 – с опухолями люминального А подтипа, точечные мутации гена *ESR1* rs2228480 – с опухолями люминального В подтипа. С эстроген-независимым РМЖ связаны мутантные генотипы *EGFR* rs1468727.
2. В опухолях люминального А типа высоко экспрессированы гены *EGFR* и *TGF-βRI* по отношению к опухолям люминального В варианта ( $p=0,038$  и  $p=0,050$ ; соответственно). Люминальный А и В подтипы РМЖ характеризуются высоким уровнем экспрессии белка TGF-βRI по сравнению с эстроген-негативным РМЖ ( $p=0,063$  и  $p=0,000$ ; соответственно). Для опухолей с тройным негативным фенотипом отмечено преобладание опухолевых клеток с высокой экспрессией EGFR и VEGFR2 по сравнению с люминальным А РМЖ ( $p=0,001$  и  $p=0,046$ ; соответственно).
3. Эстроген-зависимые опухоли содержат значительное количество клеток, экспрессирующих фосфорилированную форму Akt1 – Akt(pS473), а также высокий процент клеток с фенотипами, позитивными по экспрессии Akt1 и негативными по экспрессии рецепторов факторов роста ( $VEGFR2^-/Akt(pS473)^+/IGF1R^-/Akt(pS473)^+$ ). Тройные негативные опухоли характеризуются высоким количеством PTEN-позитивных клеток и высоким процентом клеток, позитивных по экспрессии рецептора сосудистого эндотелиального фактора роста 2-го типа и негативных – по Akt1 ( $VEGFR2^+/Akt(pS473)^-$ ).
4. Эстроген-зависимый (люминальный А и В) РМЖ ассоциирован с высоким уровнем экспрессии маркера CD24 в комплексе с рецептором трансформирующего фактора роста β I типа ( $CD24^+/TGF-βRI^+$ ); эстроген-

независимый РМЖ связан с высоким процентом клеточных фенотипов трижды позитивных по экспрессии гликопротеинов CD44/CD24 и фосфатазы PTEN (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup>/PTEN<sup>+</sup>).

5. Молекулярными маркерами, ассоциированными с резистентностью к тамоксифену у больных эстроген-зависимым РМЖ являются высокий уровень экспрессии фосфорилированного белка Akt1, высокий процент клеток, коэкспрессирующих гликопротеин CD44 в комбинации с рецептором инсулиноподобного фактора роста 1-го типа (CD44<sup>+</sup>/IGF1R<sup>+</sup>) и гетерогенное распределение ER $\alpha$  в опухоли. Неэффективность ответа на тамоксифен у больных люминальным А подтипом связана с наличием мутантного аллеля G гена *IGFR1* rs2016347, высоким уровнем экспрессии EGFR и клеток с фенотипом стволовых CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-low</sup>. Носительство мутантных генотипов гена *ESR1* rs2228480 определяет резистентность к тамоксифену у больных люминальным В РМЖ.
6. Чувствительность опухолевых клеток к тамоксифену независимо от молекулярного подтипа РМЖ ассоциирована с наличием мутантных аллелей гена *KDR* rs2305948, высоким уровнем генной и белковой экспрессии TGF- $\beta$ RI, высоким процентом клеток с отсутствием коэкспрессии гликопротеина CD44 и рецептора инсулиноподобного фактора роста 1-го типа (CD44<sup>-</sup>/IGF1R<sup>-</sup>) и гомогенным распределением ER $\alpha$  в опухоли.
7. Отсутствие эффективного ответа на предоперационную химиотерапию связано с носительством мутантных генотипов *EGFR* локуса rs1468727 у больных тройным негативным РМЖ. Среди пациентов, несущих мутантный вариант гена *EGFRCC* чаще встречаются опухоли с высокой экспрессией EGFR по сравнению с больными, имеющими дикий вариант *EGFRTT* (p=0,047). Взаимосвязь с резистентностью к НАХТ с включением капецитабина показана для мутантного варианта гена *KDR* rs2071559. Показатели экспрессии белков EGFR/VEGFR2 значимо снижаются в процессе лечения, причем высокий уровень VEGFR2-позитивных клеток до

предоперационной терапии и низкий уровень экспрессии EGFR/VEGFR2 после НАХТ связаны с объективным клиническим и полным патоморфологическим ответом опухоли.

8. Генетические маркеры (мутации *ESR1* rs2228480), белковые маркеры (высокое содержание EGFR- и AktpS473-позитивных клеток), гетерогенный характер распределения ER $\alpha$  в опухоли и сочетание двух маркеров одновременно (гетерогенное распределение ER $\alpha$ /мутации гена *ESR1* rs2228480, гетерогенное распределение ER $\alpha$ /позитивный уровень экспрессии EGFR) ассоциированы с низкими показателями безметастатической выживаемости больных эстроген-зависимым РМЖ.
9. Высокие показатели безметастатической выживаемости ассоциированы с наличием VEGFR2-позитивных клеток в опухоли до предоперационной терапии у больных тройным негативным РМЖ. Низкий уровень экспрессии EGFR в опухоли после применения FAC схемы НАХТ значительно увеличивает время до прогрессирования у больных эстроген-независимым РМЖ.
10. Математическая модель прогнозирования риска прогрессирования РМЖ на фоне адьювантной терапии тамоксифеном для эстроген-позитивных опухолей включает полиморфизм гена *ESR1* в локусе rs2228480 и характер распределения ER $\alpha$  в опухоли (чувствительность модели 98%, специфичность 30%). Независимыми факторами прогноза, составляющими модель для опухолей люминального А типа, являются три маркера – наличие/отсутствие метастазов в лимфоузлы, характер распределения ER $\alpha$  и уровень экспрессии EGFR (чувствительность модели 80%, специфичность 76%). Для люминального В РМЖ адекватной модели не получено.
11. Факторами, предсказывающими ожидаемую эффективность неоадьювантной химиотерапии у больных тройным негативным РМЖ в математической модели с чувствительностью 90% и специфичностью 65%, являются возраст

пациенток и статус белковой экспрессии VEGFR2 до предоперационного лечения.

12. Формирование тамоксифен-чувствительного фенотипа опухоли у больных эстроген-зависимым РМЖ сопряжено с отсутствием активации PI3K/Akt/mTOR, при непосредственном участии белков семейства трансформирующего и сосудистого эндотелиального факторов роста и функционально полноценном *ESR1*. Активация PI3K/Akt/mTOR каскада посредством тирозинкиназ IGF1R и EGFR, а также наличие транскрипционно неактивного *ESR1* определяет тамоксифен-резистентный фенотип опухоли. Чувствительность опухолей с тройным негативным фенотипом к НАХТ связана с ингибированием активности VEGF/PI3K/Akt сигнального пути. Преимущественным механизмом неэффективного ответа на НАХТ в эстроген-независимых опухолях является активация EGFR/PI3K/Akt трансдукции.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При оценке риска прогрессирования РМЖ на фоне адъювантной терапии тамоксифеном для эстроген-позитивных опухолей показано использование математической модели, включающей полиморфизм гена *ESR1* в локусе rs2228480 и характер распределения ER $\alpha$  в опухоли. Для прогнозирования неэффективности адъювантной терапии тамоксифеном в опухолях люминального А подтипа РМЖ целесообразно учитывать состояние регионарных лимфатических узлов, характер распределения ER $\alpha$  и уровень экспрессии EGFR в опухоли.
2. Оценка непосредственной эффективности неадъювантной химиотерапии у больных тройным негативным РМЖ должна проводиться с использованием математической модели, включающей возраст пациенток на момент постановки диагноза и уровня белковой экспрессии VEGFR2 до предоперационного лечения.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лушников, Е.Ф. Лучевой патоморфоз опухолей человека / Е.Ф. Лушников. – Москва: Медицина, 1977 –53с.
2. Новый подход к преодолению резистентности к гормонотерапии рака молочной железы / Т. Ю. Семиглазова, В. В. Семиглазов, Л. В. Филатова и др. // Фарматека. – 2012. – № 18. – С. 50-55.
3. Общие рекомендации по лечению раннего рака молочной железы St. Gallen-2015, адаптированные экспертами Российского общества онкоммаммологов / В. Ф. Семиглазов, Р. М. Палтуев, В. В. Семиглазов и др. // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2015. – №3. – С. 43-60. doi: <http://dx.doi.org/10.17650/1994-4098-2015-11-3-43-60>.
4. Особенности различных форм опухолевой прогрессии при мультицентрическом/мультифокусном росте рака молочной железы / С. В. Вторушин, В. М. Перельмутер, Е. М. Слонимская, М.В. Завьялова // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2011. – Т. 102. № 3. – С. 70-72.
5. Пат. 2300111 Рос. Федерация, МПК51 G1N33/74, G1N33/50. Способ прогнозирования течения заболевания раком молочной железы / С. В. Вторушин, В. М. Перельмутер. – № 2005118627/15; Заявлено 15.06.05; Оpubл. 27.05.07, Бюл. № 15. – 2 с.
6. Стенина, М. Б. Рак молочной железы: наиболее важные научные события и выводы последних лет /М. Б. Стенина, М. А. Фролова // Практическая онкология. – 2011. – № 12. – С. 6-11.
7. 20-Year risks of breast-cancer recurrence after stopping endocrine therapy at 5 years / Н. Pan, R. Gray, J. Braybrooke et al. // N Engl J Med. – 2017. – Vol. 377, N 19. – P. 1836-1846. doi: 10.1056/NEJMoa1701830.
8. A CD44- /CD24+ phenotype is a poor prognostic marker in early invasive breast cancer / М. А. Ahmed, М. А. Aleskandarany, Е. А. Rakha et al. // Breast Cancer Res Treat. – 2012. –Vol. 133, N 3. – P. 979-995. doi: 10.1007/s10549-011-1865-8.

9. A core SMRT corepressor complex containing HDAC3 and TBL1, a WD40-repeat protein linked to deafness / M. G. Guenther, W. S. Lane, W. Fischle et al. // *Genes Dev.* – 2000. – Vol. 14, N 9. – P. 1048-1057.

10. A dual prognostic role for the TGF $\beta$  receptors in human breast cancer / I. Y. Hachim, M. Y. Hachim, V. M. López-Ozuna et al. // *Hum Pathol.* – 2016. – Vol. 57. – P. 140-151. doi: 10.1016/j.humpath.2016.07.002.

11. A headlight on liquid biopsies: a challenging tool for breast cancer management / D. Massihnia, A. Perez, V. Bazan et al. // *Tumour Biol.* – 2016. – Vol. 37, N 4. – P. 4263-4273. doi: 10.1007/s13277-016-4856-x.

12. A hypersensitive estrogen receptor-alpha mutation in premalignant breast lesions / A. Fuqua, C. Wiltschke, Q. X. Zhang et al. // *Cancer Res.* – 2000. – Vol. 60, N 15. – P. 4026-4029.

13. A model of acquired autoresistance to a potent ErbB2 tyrosine kinase inhibitor and a therapeutic strategy to prevent its onset in breast cancer / W. Xia, S. Bacus, P. Hegde et al. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2006. – Vol. 103, N 20. – P. 7795-7800.

14. A phase II placebo-controlled trial of neoadjuvant anastrozole alone or with gefitinib in early breast cancer / I. E. Smith, G. Walsh, A. Skene et al. // *J Clin Oncol.* – 2007. – Vol. 25, N 25. – P. 3816-3822.

15. A phase II study of combined fulvestrant and everolimus in patients with metastatic estrogen receptor (ER)-positive breast cancer after aromatase inhibitor (AI) / failure / S. Massarweh, E. Romond, E. Black et al. // *Breast Cancer Res Treat.* – 2014. – Vol. 143, N 2. – P. 325- 332. doi: 10.1007/s10549-013-2810-9.

16. A prognostic model based on nodal status and Ki-67 predicts the risk of recurrence and death in breast cancer patients with residual disease after preoperative chemotherapy / V. Guarneri, F. Piacentini, G. Ficarra et al. // *Ann Oncol.* – 2009. – Vol. 20, N 7. – P. 1193-1198. doi: 10.1093/annonc/mdn761.

17. A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study of AMG 479 with exemestane (E) or fulvestrant (F) in postmenopausal women with hormone-receptor positive (HR) metastatic (M) or locally advanced (LA) breast cancer (BC) / P.

A. Kaufman, J. M. Ferrero, H. Bourgeois et al. // *Cancer Res.* – 2010. – Vol. 70, N 24. – P. S1-4. doi: 10.1158/0008-5472.

18. A candidate molecular signature associated with tamoxifen failure in primary breast cancer / J. A. Vendrell, K. E. Robertson, P. Ravel et al. // *Breast Cancer Res.* – 2008. – Vol. 10, N 5. – P. R88. doi: 10.1186/bcr2158.

19. Acquired resistance to tamoxifen is associated with loss of the type I insulin-like growth factor receptor: implications for breast cancer treatment / D. H. Fagan, R. R. Uselman, D. Sachdev, D. Yee // *Cancer Res.* – 2012. – Vol. 72, N 13. – P. 3372-3380. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0684.

20. Activated PI3K/AKT and MAPK pathways are potential good prognostic markers in node-positive, triple-negative breast cancer / K. Hashimoto, H. Tsuda, F. Koizumi et al. // *Ann Oncol.* – 2014. – Vol. 25, N 10. – P. 1973-1979. doi: 10.1093/annonc/mdu247.

21. Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer / D. R. Robinson, Y. M. Wu, P. Vats et al. // *Nat Genet.* – 2013. – Vol. 45, N 12. – P. 1446-1451. doi: 10.1038/ng.2823.

22. Activation of Akt, mTOR, and the estrogen receptor as a signature to predict tamoxifen treatment benefit / J. Bostner, E. Karlsson, M. J. Pandiyan et al. // *Breast Cancer Res Treat.* – 2013. – Vol. 137, N 2. – P. 397-406. doi: 10.1007/s10549-012-2376-y.

23. Activation of estrogen receptor-mediated gene transcription by IGF-I in human breast cancer cells / A. V. Lee, C. N. Weng, J. G. Jackson, D. Yee // *J Endocrinol.* – 1997. – Vol. 152, N 1. – P. 39-47.

24. Adaptively randomized trial of neoadjuvant chemotherapy with or without the Akt inhibitor MK-2206 / D. Tripathy, A. J. Chien, N. Hylton et al. // *Journal of Clinical Oncology.* – 2015. – Vol. 33, N 15. – P. 524. doi: 10.1200/jco.2015.33.15.

25. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer / S. L. Anzick, J. Kononen, R. L. Walker et al. // *Science.* – 1997. – Vol. 277, N 5328. – P. 965-968.

26. Akt activation predicts outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen / T. Kirkegaard, C. J. Witton, L. M. McGlynn et al. // *J Pathol.* – 2005. – Vol. 207, N 2. – P. 139-146.
27. Akt-induced tamoxifen resistance is associated with altered FKHR regulation / J. Silva, D. A. Cavazos, E. Donzis et al. // *Cancer Invest.* – 2007. – Vol. 25, N 7. – P. 569-573.
28. Alluri, P. G. Estrogen receptor mutations and their role in breast cancer progression / P. G. Alluri, C. Speers, A. M. Chinnaiyan // *Breast Cancer Research.* – 2014. – Vol. 16, N 6. – P. 494. doi: 10.1186/s13058-014-0494-7.
29. Almstedt, K. Targeted therapies overcoming endocrine resistance in hormone receptor-positive breast cancer / K. Almstedt, M. Schmidt // *Breast Care (Basel).* – 2015. – Vol. 10, N 3. – P.168-172. doi: 10.1159/000405017.
30. Amé, J. C. The PARP superfamily / J. C. Amé, C. Spenlehauer, G. de Murcia // *Bioessays.* – 2004. – Vol. 26, N 8. – P. 882-893.
31. Amplified in breast cancer 1 in human epidermal growth factor receptor - positive tumors of tamoxifen-treated breast cancer patients / T. Kirkegaard, L. M. McGlynn, F. M. Campbell et al. // *Clin Cancer Res.* – 2007. – Vol. 13, N 5. – P. 1405-1411.
32. An estrogen receptor mutant with strong hormone-independent activity from a metastatic breast cancer / Q. X. Zhang, A. Borg, D. M. Wolf et al. // *Cancer Res.* – 1997. – Vol. 57, N 7. – P. 1244-1249.
33. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer / K. Stemke-Hale, A. M. Gonzalez-Angulo, A. Lluch et al. // *Cancer Res.* – 2008. – Vol. 68, N 15. – P. 6084-6091. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6854.
34. An update on PARP inhibitors-moving to the adjuvant setting / A. Sonnenblick, E. de Azambuja, H. A. Jr. Azim, M. Piccart // *Nat Rev Clin Oncol.* – 2015. – Vol. 12, N 1. – P. 27-41. doi: 10.1038/nrclinonc.2014.163.

35. Analysis of estrogen receptor polymorphism in codon 325 by PCR-SSCP in breast cancer: association with lymph node metastasis / A. Vasconcelos, R. Medeiros, I. Veiga et al. // *Breast J.* – 2002. – Vol. 8, N 4. – P. 226–229.
36. Androgen receptor expression predicts decreased survival in early stage triple-negative breast cancer / J. E. Choi, S. H. Kang, S. J. Lee, Y. K. Bae // *Ann Surg Oncol.* – 2015. – Vol. 22, N 1. – P. 82-89. doi: 10.1245/s10434-014-3984-z.
37. Androgen receptor, EGFR, and BRCA1 as biomarkers in triple-negative breast cancer: a meta-analysis / L. Zhang, C. Fang, X. Xu et al. // *Biomed Res Int.* – 2015. – Vol. 2015. – P.357485. doi: 10.1155/2015/357482015.
38. Ascenzi, P. Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: Impact on human health / P. Ascenzi, A. Bocedi, M. Marino // *Mol Aspects Med.* – 2006. – Vol. 27, N 4. – P. 299-402.
39. Association between the oestrogen receptor alpha A908G mutation and outcomes in invasive breast cancer / M. H. Herynk, I. Parra, Y. Cui et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2007. – Vol. 13, N 11. – P. 235-243.
40. Association of genetic polymorphisms of EGFR with glioma in a Chinese population / X. Wang, H. Zhang, D. Wang, X. Li // *Genet Test Mol Biomarkers.* – 2015. – Vol. 9, N 1. – P. 59-62. doi:10.1089/gtmb.2014.0228.
41. Backer, J.M. The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34 / J. M. Backer // *Biochem J.* – 2008. – Vol. 410, N 1. – P. 1-17. doi: 10.1042/BJ20071427.
42. Baldassarre, G. Molecular biology of breast tumors and prognosis / G. Baldassarre, B. Belletti // *F1000Res.* – 2016. – Vol. 5. – P. 711. doi: 10.12688/f1000research.8158.1.
43. Basal cytokeratin and epidermal growth factor receptor expression are not predictive of brca1 mutation status in women with triple negative breast cancers / L. C. Collins, A. Martyniak, M. J. Kandel et al. // *Am J Surg Pathol.* – 2009. – Vol. 33, N 7. – P. 1093-1097. doi:10.1097/PAS.0b013e31819c1c93.
44. Berry, M. Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in cell-type and promotor-context dependent agonistic activity of the antioestrogen 4-

hydroxytamoxifen / M. Berry, D. Metzger, P. Chambon // *EMBO J.* – 1990. – Vol. 9, N 9. – P. 2811-2818.

45. Biochemical control of CARM1 enzymatic activity by phosphorylation / Q. Feng, B. He, S.-Y. Jung et al. // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284, N 52. – P. 36167-36174.

46. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework // *Clin Pharmacol Ther.* – 2001. – Vol. 69, N 3. – P. 89-95. doi: 10.1067/mcp.2001.113989.

47. Body size, physical activity, and risk of triple-negative and estrogen receptor-positive breast cancer / P. I. Phipps, R. T. Chlebowski, R. Prentice et al. // *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* – 2011. – Vol. 20, N 3. – P. 454-463. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0974.

48. Brazil, D. P. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts / D. P. Brazil, Z. Z. Yang, B. A. Hemmings // *Trends Biochem Sci.* – 2004. – Vol. 29, N 5. – P. 233-242.

49. Breast cancer intra-tumour heterogeneity: current status and clinical implications / C. Joseph, A. Papadaki, M. Althobiti et al. // *Histopathology.* – 2018. – May 2. doi:10.1111/his.13642.

50. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype / S. Ricardo, A. F. Vieira, R. Gerhard et al. // *J Clin Pathol.* – 2011. – Vol. 64, N 11. – P. 937-946. doi: 10.1136/jcp.2011.090456.

51. Bulyanko, Y. A. Nuclear receptor coactivators: structural and functional biochemistry / Y. A. Bulyanko, B. W. O'Malley // *Biochemistry.* – 2011. – Vol. 50, N 3. – P. 313-328.

52. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours // *Nature.* – 2012. – Vol. 490, N 7418. – P. 61-70. doi: 10.1038/nature11412.

53. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes / X. Dai, L. Xiang, T. Li, Z. Bai // *J Cancer.* – 2016. – Vol. 7, N 10. – P. 1281-1294. doi: 10.7150/jca.13141.

54. Cancer stem cell markers are associated with adverse biomarker profiles and molecular subtypes of breast cancer / J. Y. Tsang, Y. H. Huang, M. H. Luo et al. // *Breast Cancer Res Treat.* – 2012. – Vol. 136, N 2. – P. 407-417. doi: 10.1007/s10549-012-2271-6.

55. CD24 Expression and differential resistance to chemotherapy in triple-negative breast cancer / X. Deng, S. Apple, H. Zhao et al. // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8, N 24. – P. 38294-38308. doi: 10.18632/oncotarget.16203.

56. CD24 expression in ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of breast: an immunohistochemistry-based pilot study / S. Bircan, N. Kapucuoglu, S. Baspinar et al. // *Pathol. Res. Pract.* – 2006. – Vol. 202. – P. 569-576.

57. CD24 mediates rolling of breast carcinoma cells on P-selectin / S. Aigner, C.L. Ramos, A. Hafezi-Moghadam et al. // *FASEB J.* – 1998. – Vol. 12. – P. 1241–1251.

58. CD44 integrates signaling in normal stem cell, cancer stem cell and (pre)metastatic niches / K. Williams, K. Motiani, P. V. Giridhar, S. Kasper // *Exp Biol Med* (Maywood). – 2013. – Vol. 238, N 3. – P. 324-338. doi: 10.1177/1535370213480714.

59. CD44 promotes Kras-dependent lung adenocarcinoma / P. Zhao, M. S. Damerow, P. Stern et al. // *Oncogene.* – 2013. – Vol. 32, N 43. – P. 5186-5190. doi: 10.1038/onc.2012.542.

60. CD44 splice isoform switching in human and mouse epithelium is essential for epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression / R. L. Brown, L. M. Reinke, M. S. Damerow et al. // *J Clin Invest.* – 2011. – Vol. 121, N 3. – P. 1064-1074. doi: 10.1172/JCI44540.

61. CD44 standard isoform is involved in maintenance of cancer stem cells of a hepatocellular carcinoma cell line / R. Asai, H. Tsuchiya, M. Amisaki // *Cancer Med.* – 2019. – Vol. 8, N 2. – P. 773-782. doi: 10.1002/cam4.1968.

62. CD44(+)/CD24(-) cells are transit progenitors and do not determine the molecular subtypes and clinical parameters in breast carcinomas / X. Lü, K. Xu, H. Lü et al. // *Ultrastruct Pathol.* – 2011. – Vol. 35, N 2. – P. 72-78. doi: 10.3109/01913123.2010.544843.

63. CD44(+)/CD24(-/low) cancer stem/progenitor cells are more abundant in triple-negative invasive breast carcinoma phenotype and are associated with poor outcome / M. O. Idowu, M. Kmiecziak, C. Dumur // *Hum Pathol.* – 2012. – Vol. 43, N 3. – P. 364-73. doi: 10.1016/j.humpath.2011.05.005.

64. CD44(high)CD24(low) molecular signature determines the Cancer Stem Cell and EMT phenotype in Oral Squamous Cell Carcinoma / S. Ghuwalewala, D. Ghatak, P. Das // *Stem Cell Res.* – 2016. – Vol. 16, N 2. – P. 405-417. doi: 10.1016/j.scr.2016.02.028.

65. CD44/CD24 and aldehyde dehydrogenase 1 in estrogen receptor-positive early breast cancer treated with tamoxifen: CD24 positivity is a poor prognosticator / Y. W. Moon, H-J. An, J. S. Koo et al. // *Oncotarget.* – 2018. – Vol. 9. – P.2622-2630. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23519>.

66. CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis / C. Sheridan, H. Kishimoto, R. K. Fuchs et al. // *Breast Cancer Res.* – 2006. – Vol. 8, N 5. – P. R59.

67. CD44+/CD24- markers of cancer stem cells in patients with breast cancer of different molecular subtypes / S.V. Chekhun, T.V. Zadvorny, Y.O. Tymovska et al. // *Exp Oncol.* – 2015. – Vol. 37, N 1. – P.58–63.

68. CD44s signals the acquisition of the mesenchymal phenotype required for anchorage-independent cell survival in hepatocellular carcinoma / H. Okabe, T. Ishimoto, K. Mima et al. // *Br J Cancer.* – 2014. – Vol. 110, N 4. – P. 958-966. doi: 10.1038/bjc.2013.759.

69. Cell type-restricted activity of hnRNPM promotes breast cancer metastasis via regulating alternative splicing / Y. Xu, X. D. Gao, J. H. Lee et al. // *Genes Dev.* – 2014. – Vol. 28, N 11. – P. 1191-1203. doi: 10.1101/gad.241968.114.

70. Characteristic genes in luminal subtype breast tumors with CD44+CD24-/low gene expression signature / Y. Tsunoda, M. Sakamoto, T. Sawada et al. // *Oncology.* – 2011. – Vol. 81, N 5-6. – P. 36-44. doi: 10.1159/000334690.

71. Cimino-Mathews, A. Immune targeting in breast cancer / A. Cimino-Mathews, J. B. Foote, L. A. Emens // *Oncology.* – 2015. – Vol. 29, N 5. – P.375-385.

72. Ciruelos Gil, E. M. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in estrogen receptor-positive breast cancer / E. M. Ciruelos Gil // *Cancer Treat Rev.* – 2014. – Vol. 40, N 7. – P.862-871. doi:10.1016/j.ctrv.2014.03.004.

73. Cisplatin with or without rucaparib after preoperative chemotherapy in patients with triple-negative breast cancer (TNBC): Hoosier Oncology Group BRE09-146 / S. Dwadasi, Y. Tong, T. Walsh et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2014. – Vol. 32, N 15. – P. 1019. doi: 10.1200/jco.2014.32.15.

74. Clark, A. R. Signalling specificity in the Akt pathway in breast cancer / A. R. Clark, A. Toker // *Biochem Soc Trans.* – 2014. – Vol. 42, N 5. – P.1349-1355. doi: 10.1042/BST20140160.

75. Clinical and biologic features of triple-negative breast cancers in a large cohort of patients with long-term follow-up / L. Malorni, P. B. Shetty, C. De Angelis et al. // *Breast Cancer Res Treat.* – 2012. – Vol. 136, N 3. – P. 795-804. doi: 10.1007/s10549-012-2315-y.

76. Clinical efficacy of doxifluridine and correlation to in vitro sensitivity of anticancer drugs in patients with colorectal cancer / H. Yamaue, H. Tanimura, N. Kono et al. // *Anticancer Res.* – 2003. – Vol. 23. – P. 2559-2564.

77. Clinical implications of the non-luminal intrinsic subtypes in hormone receptor-positive breast cancer / J. M. Cejalvo, T. Pascual, A. Fernández-Martínez et al. // *Cancer Treat Rev.* – 2018. – Vol. 67. – P. 63-70. doi: 10.1016/j.ctrv.2018.04.015.

78. Clinical and translational results of a phase II, randomized trial of an anti-IGF-1R (cixutumumab) in women with breast cancer that progressed on endocrine therapy / W. J. Gradishar, D. A. Yardley, R. Layman et al. // *Clin Cancer Res.* – 2016. – Vol. 22, N 2. – P. 301-309. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0588.

79. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer / A. Prat, E. Pineda, B. Adamo et al. // *Breast.* – 2015. – Vol. 24, Suppl 2. – P. S26-35. doi: 10.1016/j.breast.2015.07.008.

80. Clinicopathologic analysis of breast cancers with PIK3CA mutations in Japanese women / N. Maruyama, Y. Miyoshi, T. Taguchi et al. // *Clin Cancer Res.* – 2007. – Vol. 13, N 2. – P. 408-414.

81. Clinicopathologic and molecular significance of phosphor-Akt expression in early invasive breast cancer / M. A. Aleskandarany, E. A. Rakha, M. A. Ahmed et al. // *Breast Cancer Res Treat.* – 2011. – Vol. 127, N 2. – P.407-416. doi: 10.1007/s10549-010-1012-y.

82. Combination of Cancer Stem Cell Markers CD44 and CD24 Is Superior to ALDH1 as a Prognostic Indicator in Breast Cancer Patients with Distant Metastases / Y. Horimoto, A. Arakawa, N. Sasahara et al. // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 11, N 10. – P. e0165253. doi: 10.1371/journal.pone.0165253.

83. Combination therapy enhances the inhibition of tumor growth with the fully human anti-type 1 insulin-like growth factor receptor monoclonal antibody CP-751,871 / B. D. Cohen, D. A. Baker, C. Soderstrom C et al. // *Clin Cancer Res.* – 2005. – Vol. 11, N 5. – P. 2063-2073.

84. Combinatorial TGF- $\beta$  attenuation with paclitaxel inhibits the epithelial-to-mesenchymal transition and breast cancer stem-like cells / S.Y. Park, M. J. Kim, S.A. Park et al. // *Oncotarget.* – 2015. – Vol. 6, N 35. – P. 37526-37543. doi: 10.18632/oncotarget.6063.

85. Combined neoadjuvant chemotherapy with bevacizumab improves pathologic complete response in patients with hormone receptor negative operable or locally advanced breast cancer / I. Makhoul, V. S. Klimberg, S. Korourian et al. // *Am J Clin Oncol.* – 2015. – Vol. 38, N 1. – P. 74-79. doi: 10.1097/COC.0b013e31828940c3.

86. Combined targeting of mTOR and AKT is an effective strategy for basal-like breast cancer in patient derived xenograft models / S. Xu, S. Li, Z. Guo et al. // *Mol Cancer Ther.* – 2013. – Vol. 12, N 8. – P. 1665-1675. doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-0159.

87. Common estrogen receptor polymorphism augments effects of hormone replacement therapy on E-selectin but not C-reactive protein / D. M. Herrington, T. D. Howard, K. B. Brosnihan et al. // *Circulation.* – 2002. – Vol. 105, N 16. – P. 1879–1882.

88. Comprehensive analysis of PTEN status in breast carcinomas / N. Jones, F. Bonnet, S. Sfar et al. // *Int J Cancer*. – 2013. – Vol. 133, N 2. – P. 323-334. doi: 10.1002/ijc.28021.

89. Constitutively active human estrogen receptors containing amino acid substitutions for tyrosine 537 in the receptor protein / K. E. Weis, K. Ekena, J. A. Thomas et al. // *Mol Endocrinol*. – 1996. – Vol. 10, N 11. – P. 1388-1398. doi:10.1210/mend.10.11.8923465.

90. Coole, M. P. A new anti-oestrogenic agent in late breast cancer: An early clinical appraisal of ICI 146474 / M. P. Coole, C. T. Jones, I. D. Todd // *Br J Cancer*. – 1971. – Vol. 25, N 2. – P. 270-275.

91. Correlation between p53 and epidermal growth factor receptor expression in breast cancer classification / X. Z. Wang, Q. Liu, J.J. Sun et al. // *Genet Mol Res*. – 2015. – Vol. 14, N 2. – P. 4282-4290. doi: 10.4238/2015.April.28.10.

92. Costa, R. L. B. Triple-negative breast cancer: current practice and future directions / R. L. B. Costa, W. J. Gradishar // *J Oncol Pract*. – 2017. – Vol. 13, N 5. – P. 301-303. doi: 10.1200/JOP.2017.023333.

93. Costa, R. L. B. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in triple negative breast cancer: a review / R. L. B. Costa, H. S. Han, W. J. Gradishar // *Breast Cancer Res Treat*. – 2018. – Vol. 169, N 3. – P. 397-406. doi: 10.1007/s10549-018-4697-y.

94. Courtney, K. D. The PI3K pathway as drug target in human cancer / K. D. Courtney, R. B. Corcoran, J. A. Engelman // *J Clin Oncol*. – 2010. – Vol. 28, N 6. – P. 1075-1083. doi: 10.1200/JCO.2009.25.3641.

95. Crosstalk between the estrogen receptor and the HER tyrosine kinase receptor family: molecular mechanism and clinical implications for endocrine therapy resistance / G. Arpino, L. Wiechmann, C. K. Osborne, R. Schiff // *Endocr Rev*. – 2008. – Vol. 29, N 2. – P. 217-233. doi: 10.1210/er.2006-0045.

96. Current issues with luminal subtype classification in terms of prediction of benefit from endocrine therapy in early breast cancer / L. Alfarsi, S. Johnston, D. X. Liu et al. // *Histopathology*. – 2018. – Mar 30. doi: 10.1111/his.13523.

97. Davis, A. A. Metabolic syndrome and triple-negative breast cancer: a new paradigm / A. A. Davis, V. G. Kaklamani // *Int J Breast Cancer*. – 2012. – Vol. 2012. – P. 809291. doi: 10.1155/2012/809291.

98. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes / G. von Minckwitz, M. Untch, J. U. Blohmer et al. // *J Clin Oncol*. – 2012. – Vol. 30, N 15. – P. 1796-1804. doi: 10.1200/JCO.2011.38.8595.

99. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival / T. R. Peterson, M. Laplante, C. C. Thoreen et al. // *Cell*. – 2009. – Vol. 137, N 5. – P. 873-886. doi: 10.1016/j.cell.2009.03.046.

100. Dey, N. PI3K-mTOR in cancer and cancer therapy / N. Dey, P. De, B. Leyland-Jones. – AG Switzerland: Springer International Publishing, 2016. – 294 p.

101. Dey, N. PI3K-AKT-mTOR inhibitors in breast cancers: From tumor cell signaling to clinical trials / N. Dey, P. De, B. Leyland-Jones // *Pharmacol Ther*. – 2017. – Vol. 175. – P. 91-106. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.037.

102. Diagnostic utility and sensitivities of GATA3 antibodies in triple-negative breast cancer / G. Krings, M. Nystrom, I. Mehdi et al. // *Hum Pathol*. – 2014. – Vol. 45, N 11. – P. 2225-2232. doi:10.1016/j.humpath.2014.06.022.

103. Different prognostic significance of CD24 and CD44 expression in breast cancer according to hormone receptor status / H. J. Kim, M. J. Kim, S. H. Ahn et al. // *Breast*. – 2011. – Vol. 20, N1. – P.78-85. doi: 10.1016/j.breast.2010.08.001.

104. Differential effect of EGFR inhibitors on tamoxifen-resistant breast cancer cells / S. Kim, J. Lee, S. J. Oh et al. // *Oncol Rep*. – 2015. – Vol. 34, N 3. – P. 1613-1619. doi:10.3892/or.2015.4116.

105. Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes / H. Masuda, K. A. Baggerly, Y. Wang et al. // *Clin Cancer Res*. – 2013. – Vol. 19, N 19. – P. 5533-5540. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0799.

106. Differential expression of VEGFR2 protein in HER2 positive primary human breast cancer: potential relevance to anti-angiogenic therapies / A. Nasir, T. R.

Holzer, M. Chen et al. // *Cancer Cell Int.* – 2017. – Vol. 17. – P. 56. doi: 10.1186/s12935-017-0427-5.

107. Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial mesenchymal transition / H. Y. Irie, R. V. Pearline, D. Grueneberg et al. // *J Cell Biol.* – 2005. – Vol. 171, N 6. – P.1023-1034.

108. Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes / R. M. Lavinsky, K. Jepsen, T. Heinzel et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1998. – Vol. 95, N 6. – P. 2920-2925.

109. Dizdar, O. Advances in PARP inhibitors for the treatment of breast cancer / O. Dizdar, C. Arslan, K. Altundag // *Expert Opin Pharmacother.* – 2015. – Vol. 16, N 18. – P. 2751-2758. doi: 10.1517/14656566.2015.1100168.

110. Down-regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT/molecular target of rapamycin metabolic pathway by primary letrozole-based therapy in human breast cancer / D. Generali, S. B. Fox, M. P. Brizzi et al. // *Clin Cancer Res.* – 2008. – Vol. 14, N 9. – P. 2673-2680. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1046.

111. Dysregulated PTEN–PKB and negative receptor status in human breast cancer / W. Shi, X. Zhang, M. Pintilie et al. // *Int J Cancer.* – 2003. – Vol. 104, N 2. – P. 195-203.

112. Effect of epidermal growth factor receptor gene polymorphisms on prognosis in glioma patients / B. Li, W., Zhao, J. Li et al. // *Oncotarget.* – 2016. – Vol. 7, N 39. – P. 63054-63064. doi: 10.18632/oncotarget.10666.

113. Efficacy and safety of trastuzumab combined with chemotherapy for first-line treatment and beyond progression of HER2-overexpressing advanced breast cancer / H. Li, B. Shao, Y. Yan et al. // *Chin J Cancer Res.* – 2016. – Vol. 28, N 3. – P. 330-338. doi: 10.21147/j.issn.1000-9604.2016.03.07.

114. Efficacy of adjuvant chemotherapy with carboplatin for early triple negative breast cancer: a single center experience / M. Vetter, S. Fokas, E. Biskup et al. // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8, N 43. – P. 75617-75626. doi: 10.18632/oncotarget.18118.

115. EGFR as paradoxical predictor of chemosensitivity and outcome among triple-negative breast cancer / H. Nogi, T. Kobayashi, M. Suzuki et al. // *Oncol Rep.* – 2009. – Vol. 21, N 2. – P. 413-417.
116. EGFR expression and gene copy number in triple-negative breast carcinoma / B. Gumuskaya, M. Alper, S. Hucumenoglu et al. // *Cancer Genet Cytogenet.* – 2010. – Vol. 203, N 2. – P. 222-229. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2010.07.118.
117. Elevated insulin-like growth factor 1 receptor signaling induces antiestrogen resistance through the MAPK/ERK and PI3K/Akt signaling routes / Y. Zhang, M. Moerkens, S. Ramaiahgari et al. // *Breast Cancer Res.* – 2011. – Vol. 13, N 3. – P. R52. doi: 10.1186/bcr2883.
118. Elevated levels of epidermal growth factor receptor/c-erbB2 heterodimers mediate an autocrine growth regulatory pathway in tamoxifen-resistant MCF-7 cells. / J. M. Knowlden, I. R. Hutcheson, H. E. Jones et al. // *Endocrinology.* – 2003. – Vol. 144, N 3. – P. 1032-1044.
119. Ellis, M. J. The genomic landscape of breast cancer as a therapeutic roadmap / M. J. Ellis, C. M. Perou // *Cancer Discov.* – 2013. – Vol. 3, N 1. – P. 27- 34. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0462.
120. Emergence of constitutively active estrogen receptor-alpha mutations in pretreated advanced oestrogen receptor-positive breast cancer / R. Jeselsohn, R. Yelensky, G. Buchwalter et al. // *Clin Cancer Res.* – 2014. – Vol. 20, N 7. – P. 1757-1767. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2332.
121. Endocrine-therapy-resistant *ESR1* variants revealed by genomic characterization of breast-cancer-derived xenografts / S. Li, D. Shen, J. Shao et al. // *Cell Rep.* – 2013. – Vol. 4, N 6. – P. 1116-30. doi: 10.1016/j.celrep.2013.08.022.
122. Endothelial PI3K-C2alpha, a class II PI3K, has an essential role in angiogenesis and vascular barrier function / K. Yoshioka, K. Yoshida, H. Cui et al. // *Nat Med.* – 2012. – Vol. 18, N 10. – P. 1560-1569. doi: 10.1038/nm.2928.

123. Engelman, J. A. Targeting PI3K signaling in cancer: opportunities, challenges and limitations / J. A. Engelman // *Nat Rev Cancer*. – 2009. – Vol. 9, N 8. – P. 550-562. doi: 10.1038/nrc2664.
124. Engelman, J. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism / J. Engelman, J. Luo, L. Cantley // *Nat Rev Genet*. – 2006. – Vol. 7, N 8. – P. 606-619.
125. Enhanced SLC34A2 in breast cancer stem cell-like cells induces chemotherapeutic resistance to doxorubicin via SLC34A2-Bmi1-ABCC5 signaling / G. Ge, C. Zhou, Y. Ren et al. // *Tumour Biol*. – 2016. – Vol. 37, N 4. – P. 5049-5062. doi: 10.1007/s13277-015-4226-0.
126. Epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor 2 are specific biomarkers in triple-negative breast cancer. Results from a controlled randomized trial with long-term follow-up / L. Rydén, K. Jirstrom, M. Haglund et al. // *Breast Cancer Res Treat*. – 2010. – Vol. 120, N 2. – P.491-498. doi: 10.1007/s10549-010-0758-6.
127. Epidermal growth factor receptor as a potential therapeutic target in triple-negative breast cancer / B. Corkery, J. Crown, M. Clynes, N. O'Donovan // *Ann Oncol*. – 2009. – Vol. 20, N 5. – P. 862-867. doi: 10.1093/annonc/mdn710.
128. Epidermal growth factor receptor expression correlates with poor survival in patients who have breast carcinoma treated with doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy / T. A. Buchholz, X. Tu, K. K. Ang et al. // *Cancer*. – 2005. – Vol. 104, N 4. – P. 676-681.
129. Epidermal growth factor receptor expression in breast cancer association with biologic phenotype and clinical outcomes / M. F. Rimawi, P. B. Shetty, H.L. Weiss et al. // *Cancer*. – 2010. – Vol. 116, N 5. – P.1234-1242. doi: 10.1002/cncr.24816.
130. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance / K. R. Fischer, A. Durrans, S. Lee et al. // *Nature*. – 2015. – Vol. 527, N. 7579. – P. 472-476. doi: 10.1038/nature15748.

131. ESR1 and EGF genetic variation in relation to breast cancer risk and survival / K. Einarsdottir, H. Darabi, Y. Li et al. // *Breast Cancer Res.* – 2008. – Vol. 10, N 1. – P. 15-24. doi: 10.1186/bcr1861.
132. ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer / W. Toy, Y. Shen, H. Won et al // *Nat Genet.* – 2013. – Vol. 45, N 12. – P. 439-445. doi: 10.1038/ng.2822.
133. ESR1 mutations - a mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer / R. Jeselsohn, G. Buchwalter, C. De Angelis et al. // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2015. – Vol. 12, N 10. – P. 573-583. doi: 10.1038/nrclinonc.2015.117.
134. Estrogen and progesterone receptor gene polymorphisms and sporadic breast cancer risk: a Spanish case-control study / L. P. Fernandez, R. L. Milne, E. Barroso et al. // *Int. J. Cancer.* – 2006. – Vol. 119, N 2. – P. 467-471.
135. Estrogen receptor alpha (ERS1) SNPs c454-397T>C (PvuII) and c454-351A>G (XbaI) are risk biomarkers for breast cancer development / K. P. Madeira, R. D. Daltoé, G. M. Sirtoli et al. // *Mol Biol Rep.* – 2014. – Vol. 41, N 8. – P. 5459-5466. doi: 10.1007/s11033-014-3419-8.
136. Estrogen receptor alpha gene ESR1 amplification may predict endocrine therapy responsiveness in breast cancer patients / S. Tomita, Z. Zhang, M. Nakano et al. // *Cancer Sci.* – 2009. – Vol. 100, N 6. – P. 1012-1017. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01145.x.
137. Estrogen receptor alpha polymorphisms and the risk of malignancies / A. Anghel, D. Narita, E. Seclaman et al. // *Pathol Oncol Res.* – 2010. – Vol. 16, N 4. – P. 485-496. doi: 10.1007/s12253-010-9263-9.
138. Estrogen receptor alpha polymorphisms: correlation with clinicopathological parameters in breast cancer / A. Anghel, M. Raica, D. Narita et al. // *Neoplasma.* – 2010. – Vol. 57, N 4. – P. 306-315.
139. Estrogen receptor alpha somatic mutations Y537S and D538G confer breast cancer endocrine resistance by stabilizing the activating function-2 binding conformation / S. W. Fanning, C. G. Mayne, V. Dharmarajan et al. // *Elife.* – 2016. – Vol. 5. – P. e12792. doi: 10.7554/eLife.12792.

140. Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer / F. Holst, P. R. Stah, C. Ruiz et al. // *Nat Genet.* – 2007. – Vol. 39, N 5. – P. 655-660.
141. Estrogen receptor gene analysis in estrogen receptor-positive and receptor-negative primary breast cancer / N. Roodi, L. R. Bailey, W. Y. Kao et al. // *J Natl Cancer Inst.* – 1995. – Vol. 87. – P. 446-451. doi:10.1093/jnci/87.6.446.
142. Estrogen receptor genotypes and haplotypes associated with breast cancer risk / B. Gold, F. Kalush, J. Bergeron et al. // *Cancer Res.* – 2004. – Vol. 64, N 24. – P. 8891-8900.
143. Estrogen receptor polymorphism at codon 325 and risk of breast cancer in women before age forty / M. C. Southey, L. E. Batten M. R. McCreddie et al. // *J Nat Cancer Inst.* – 1998. – Vol. 90, N 7. – P. 532–536.
144. Estrogen receptor: current understanding of its activation and modulation / C. K. Osborne, R. Schiff, S. A. Fuqua, J. Shou // *Clin Cancer Res.* – 2001. – Vol. 7, N 12. – P. 4338s–4342s.
145. Estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and defects in uterine receptivity in women / B. A. Lessey, W. A. Palomino, K. B. Apparao et al. // *Reprod Biol Endocrinol.* – 2006. – Vol. 4, N 1. – P. S9.
146. Estrogen receptor-alpha polymorphism in a Taiwanese clinical breast cancer population: a case-control study / W. C. Hsiao, K. C. Young, S. L. Lin, P. W. Lin // *Breast Cancer Res.* – 2004. – Vol. 6, N 3. – P. 180-186.
147. Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: a HuGE review / L. Gennari, D. Merlotti, V. De Paola et al. // *Am J Epidemiol.* – 2005. – Vol. 161, N 4. – P. 307-320.
148. Evaluation of the prognostic significance of HER family mRNA expression in high-risk early breast cancer: a Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG) validation study / A. Koutras, K. T. Kalogeras, R. M. Wirtz et al. // *J Transl Med.* – 2015. – Vol. 13. – P. 171. doi: 10.1186/s12967-015-0530-0.
149. Everolimus plus exemestane for hormone-receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer: overall survival

results from BOLERO-2 / M. Piccart, G. N. Hortobagyi, M. Campone et al. // *Ann Oncol.* – 2014. – Vol. 25, N 12. – P. 2357-2362. doi: 10.1093/annonc/mdu456.

150. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery / B. T. Hennessy, D. L. Smith, P. T. Ram et al. // *Nat Rev Drug Discov.* – 2005. – Vol. 4, N 12. – P. 988-1004.

151. Expression of constitutively active Akt-3 in MCF-7 breast cancer cells reverses the estrogen and tamoxifen responsivity of these cells in vivo / J. Faridi, L. Wang, G. Endemann, R. A. Roth // *Clin. Cancer Res.* – 2003. – Vol. 9, N 8. – P. 2933-2939.

152. Expression of miR-21 and its targets (PTEN, PDCD4, TMI) in flat epithelial atypia of the breast in relation to ductal carcinoma in situ and unvasive carcinoma / L. Qi, J. Bart, L. P. Tan et al. // *BMC Cancer.* – 2009. – Vol. 9. – P. 163. doi: 10.1186/1471-2407-9-163.

153. Expression of thymidylate synthase and thymidine phosphorylase in human breast carcinoma: implication for method to detect expression of these molecules in clinic / O. Ogura, A. Kanzaki, H. Bando et al. // *Cancer Lett.* – 2003. – Vol.190. – P. 97-104.

154. Expression of PTEN, p53 and EGFR in the molecular subtypes of breast carcinoma and the correlation among them / X. Li, Q. Wang, L. et al. // *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* – 2015. – Vol. 40, N 9. – P. 973-978. doi: 10.11817/j.issn.1672-7347.2015.09.005.

155. Fagan, D. H. Crosstalk between IGF1R and estrogen receptor signaling in breast cancer / D. H. Fagan, D. Yee // *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* – 2008. – Vol. 13, N 4. – P. 423-429. doi: 10.1007/s10911-008-9098-0.

156. Falasca, M. Regulation and cellular functions of class II phosphoinositide 3-kinases / M. Falasca, T. Maffucci // *Biochem J.* – 2012. – Vol. 443, N 3. – P. 587-601. doi: 10.1042/BJ20120008.

157. Farabaugh, S. M. Role of IGF1R in breast cancer subtypes, stemness, and lineage differentiation / S. M. Farabaugh, D. N. Boone, A. V. Lee // *Front Endocrinol (Lausanne).* – 2015. – Vol. 6. – P. 59. doi: 10.3389/fendo.2015.00059.

158. FASTSNP: an always up-to-date and extendable service for SNP function analysis and prioritization / H. Y. Yuan, J. J. Chiou, W. H. Tseng et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2006. – Vol. 34 (Web Server issue). – P. 635–641.
159. First-line trastuzumab plus an aromatase inhibitor, with or without pertuzumab, in human epidermal growth factor receptor 2-positive and hormone receptor-positive metastatic or locally advanced breast cancer (PERTAIN): a randomized, open-label phase II trial / M. Rimawi, J. M. Ferrero, J. de la Haba-Rodriguez et al. // *J Clin Oncol.* – 2018. – JCO2017767863. doi: 10.1200/JCO.2017.76.7863.
160. Focal adhesion kinase mediates TGF-beta1 induced renal tubular epithelial-to-mesenchymal transition in vitro / B. Deng, X. Yang, J. Liu et al. // *Mol Cell Biochem.* – 2010. – Vol. 340, N (1-2). – P. 21-29. doi: 10.1007/s11010-010-0396-7.
161. Form and function in protein dephosphorylation / J. M. Denu, J. A. Stuckey, M. A. Saper, J. E. Dixon // *Cell.* – 1996. – Vol. 87, N 3. – P. 361-364.
162. Franchet, C. Molecular taxonomy of luminal breast cancer in 2015 / C. Franchet, R. Duprez-Paumier, M. Lacroix-Triki // *Bull Cancer.* – 2015. – Vol. 102, N 6 (1). – P. 34-46. doi: 10.1016/S0007-4551(15)31216-9.
163. Gao, J. J. Luminal A breast cancer and molecular assays: a review / J. J. Gao, S. M. Swain // *Oncologist.* – 2018. – Vol. 23, N 5. – P. 556-565. doi: 10.1634/theoncologist.2017-0535.
164. Gefitinib or placebo in combination with tamoxifen in patients with hormone receptor-positive metastatic breast cancer: a randomized phase II study / C. K. Osborne, P. Neven, L. Y. Dirix et al. // *Clin Cancer Res.* – 2011. – Vol. 17, N 5. – P. 1147-1159. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1869.
165. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications / T. Sorlie, C.M. Perou, R. Tibshirani et al. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2003. – Vol. 98. – P. 10869-10874.
166. Gene expression profiling identifies activated growth factor signaling in poor prognosis (Luminal-B) estrogen receptor positive breast cancer / S. Loi, C.

Sotiriou, B. Haibe-Kains et al. // *BMC Med Genomics*. – 2009. – Vol. 2. – P. 37. doi: 10.1186/1755-8794-2-37.

167. Genetic polymorphisms in the EGFR (R521K) and estrogen receptor (T594T) genes, EGFR and ErbB-2 protein expression, and breast cancer risk in Tunisia / I. Kallel, M. Rebai, A. Khabir et al. // *J Biomed Biotechnol*. – 2009. – Vol. 2009. P. 753683. doi: 10.1155/2009/753683.

168. Genomic amplification of 9p24.1 targeting JAK2, PD-L1, and PD-L2 is enriched in high-risk triple negative breast cancer / M. T. Barrett, K. S. Anderson, E. Lenkiewicz et al. // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 6, N 28. – P. 26483-26493. doi: 10.18632/oncotarget.4494.

169. Gnant, M. St. Gallen 2011: Summary of the Consensus Discussion / M. Gnant, N. Harbeck, C. Thomssen // *Breast Care*. – 2011. – Vol. 6, N 2. – P. 136-141.

170. Gonzalez-Angulo, A. M. Defining biomarkers to predict sensitivity to PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors in breast cancer / A. M. Gonzalez-Angulo, G.R. Jr Blumenschein // *Cancer Treat Rev*. – 2013. – Vol. 39, N 4. – P. 313-320. doi: 10.1016/j.ctrv.2012.11.002.

171. Goodson, M. Corepressors: custom tailoring and alterations while you wait / M. Goodson, B. A. Jonas, M. A. Privalsky // *Nucl Recept Signal*. – 2005. – Vol. 3. – P. e003.

172. Gosden, J. Localization of the human oestrogen receptor gene to chromosome 6q24--q27 by in situ hybridization / J. Gosden, P. Middleton, D. Rout // *Cytogenetics and cell genetics*. – 1986. – Vol. 43. – P. 218-220.

173. Growth factor-induced resistance to tamoxifen is associated with a mutation of oestrogen receptor alpha and its phosphorylation at serine 305 / C. Giordano, Y. Cui, I. Barone et al. // *Breast Cancer Res. Treat*. – 2010. – Vol. 119, N 1. – P. 71–85. doi: 10.1007/s10549-009-0334-0.

174. Hay, N. Upstream and downstream of mTOR / N. Hay, N. Sonenberg // *Genes Dev*. – 2004. – Vol. 18, N 16. – P. 1926-1945.

175. Henry, N. L. Cancer biomarkers / N. L. Henry, D. F. Hayes // *Mol Oncol*. – 2012. – Vol. 6, N 2. – P. 140-146. doi: 10.1016/j.molonc.2012.01.010.

176. Henttu, P. M. AF-2 activity and recruitment of steroid receptor coactivator 1 to the estrogen receptor depend on a lysine residue conserved in nuclear receptors/ P. M. Henttu, E. Kalkhoven, M. G. Parker // *Mol. Cell. Biol.* – 1997. – Vol. 17, N 4. – P. 1832-1839.
177. HER2-positive metastatic breast cancer: a changing scenario / G. Mustacchi, L. Biganzoli, P. Pronzato et al. // *Crit Rev Oncol Hematol.* – 2015. – Vol. 95, N 1. – P. 78-87. doi: 10.1016/j.critrevonc.2015.02.002.
178. High expression of piwi-like RNA-mediated gene silencing 1 is associated with poor prognosis via regulating transforming growth factor- $\beta$  receptors and cyclin-dependent kinases in breast cancer / J. Cao, G. Xu, J. Lan et al. // *Mol Med Rep.* – 2016. – Vol. 13, N 3. – P. 2829-2835. doi: 10.3892/mmr.2016.4842.
179. High-circulating Tie2 is associated with pathologic complete response to chemotherapy and antiangiogenic therapy in breast cancer / I. Makhoul, R. J. Griffin, E. Siegel et al. // *Am J Clin Oncol.* – 2016. – Vol. 39, N 3. – P. 248-254. doi: 10.1097/COC.000000000000046.
180. Higher population-based incidence rates of triple-negative breast cancer among young African-American women / K. C. Amirikia, P. Mills, J. Bush, L. A. Newman // *Cancer.* – 2011. – Vol. 117, N 12. – P. 2747-2753. doi: 10.1002/cncr.25862.
181. How do we increase uptake of tamoxifen and other anti-estrogens for breast cancer prevention? / K.D. Crew, K. S. Albain, D.L. Hershman et al. // *NPJ Breast Cancer.* – 2017. – Vol. 19, N 3. – P. 20. doi: 10.1038/s41523-017-0021-y.
182. Hurvitz, S. Triple-negative breast cancer: advancements in characterization and treatment approach / S. Hurvitz, M. Mead // *Curr Opin Obstet Gynecol.* – 2016. – Vol. 28, N 1. – P.59-69. doi: 10.1097/GCO.0000000000000239.
183. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies / B. D. Lehmann, J. A. Bauer, X. Chen et al. // *J Clin Invest.* – 2011. – Vol. 121, N 7. – P. 2750-2767. doi: 10.1172/JCI45014.
184. Identification of novel ER-alpha target genes in breast cancer cells: gene- and cell-selective co-regulator recruitment at target promoters determines the response

to 17beta-estradiol and tamoxifen / A. Romano, M. Adriaens, S. Kuenen et al. // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2010. – Vol. 314, N1. – P. 90-100. doi: 10.1016/j.mce.2009.08.008.

185. Immunohistochemical Phenotype of Breast Cancer during 25-Year Follow-up of the Royal Marsden Tamoxifen Prevention Trial / S.I. Detre, S. Ashley, K. Mohammed et al. // *Cancer Prev Res (Phila).* – 2017. – Vol. 10, N 3. – P.171-176. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-16-0247-T.

186. Impact of the addition of carboplatin and/or bevacizumab to neoadjuvant once-per-week paclitaxel followed by dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide on pathologic complete response rates in stage II to III triple-negative breast cancer: Calgb 40603 (Alliance) / W. Sikov, D. Berry, C. Perou et al. // *J Clin Oncol.* – 2015. – Vol. 33, N 1. – P. 13-21. doi: 10.1200/JCO.2014.57.0572.

187. In situ identification of putative cancer stem cells by multiplexing ALDH1, CD44, and cytokeratin identifies breast cancer patients with poor prognosis / V. Neumeister, S. Agarwal, J. Bordeaux et al. // *Am J Pathol.* – 2010. – Vol. 176, N 5. – P. 2131-2138. doi: 10.2353/ajpath.2010.090712.

188. Increased constitutive activity of PKB/Akt in tamoxifen resistant breast cancer MCF-7 cells / N. J. Jordan, J. M. Gee, D. Barrow et al. // *Breast Cancer Res Treat.* – 2004. – Vol. 87, N 2. – P. 167-180.

189. Inhibition of mTOR activity restores tamoxifen response in breast cancer cells with aberrant Akt Activity / L. A. deGraffenried, W. E. Friedrichs, D. H. Russell et al. // *Clin Cancer Res.* – 2004. – Vol. 10, N 23. – P.8059-8067.

190. Inhibition of PD-L1 by MPDL3280A leads to clinical activity in patients with metastatic triple-negative breast cancer (TNBC) / L. A. Emens, F. S. Braiteh, P. Cassier P, et al. // *Cancer Res.* – 2015. – Vol. 75, N 15. – P. 2859. doi: 10.1158/1538-7445.

191. Inositol polyphosphate 4-phosphatase II regulates PI3K/Akt signaling and is lost in human basal-like breast cancers / C. G. Fedele, L. M. Ooms, M. Ho et al. // *PNAS.* – 2010. – Vol. 107, N 51. – P. 22231-22236.

192. INPP4B: the new kid on the PI3K block / I. U. Agoulnik, M. C. Hodgson, W. A. Bowden, M. M. Ittmann // *Oncotarget.* – 2011. – Vol. 2, N 4. – P. 321-328.

193. Insulin growth factor receptor-1 expression and loss of PTEN protein predict early recurrence in triple-negative breast cancer / J. Iqbal, A. A. Thike, P. Y. Cheok et al. // *Histopathology*. – 2012. – Vol. 61, N 14. – P. 652-659. doi: 10.1111/j.1365-2559.2012.04255.x.
194. Insulin-like growth factor and epidermal growth factor signaling in breast cancer cell growth: focus on endocrine resistant disease / K. Voudouri, A. Berdiaki, M. Tzardi et al. // *Anal Cell Pathol (Amst)*. – 2015. – Vol. 2015. – P. 975495. doi: 10.1155/2015/975495.
195. Insulin-like growth factor receptor polymorphism defines clinical outcome in estrogen receptor-positive breast cancer patients treated with tamoxifen / T. Winder, G. Giamas, P. M. Wilson et al. // *Pharmacogenomics J*. – 2014. – Vol. 14, N 1. – P. 28-34. doi: 10.1038/tpj.2013.8.
196. Insulin-like growth factor-I receptor signaling in tamoxifen-resistant breast cancer: a supporting role to the epidermal growth factor receptor / J. M. Knowlden, I. R. Hutcheson, D. Barrow et al. // *Endocrinology*. – 2005. – Vol. 146, N 11. – P. 4609-4618.
197. Int7G24A variant of transforming growth factor-beta receptor type I is associated with invasive breast cancer / T. Chen, C. R. Jackson, A. Link et al. // *Clin Cancer Res*. – 2006. – Vol. 12, N 2. – P. 392-397.
198. Integrated molecular pathway analysis informs a synergistic combination therapy targeting PTEN/PI3K and EGFR pathways for basal-like breast cancer / Q. B. She, S. K. Gruvberger-Saal, M. Maurer et al. // *BMC Cancer*. – 2016. – Vol. 16. – P. 587. doi: 10.1186/s12885-016-2609-2.
199. Integrative analysis of response to tamoxifen treatment in ER-positive breast cancer using GWAS information and transcription profiling / C. Hicks, R. Kumar, A. Pannuti, L. Miele L. // *Breast Cancer (Auckl)*. – 2012. – Vol. 6. – P. 47-66.
200. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase / T. Simoncini, A. Hafezi-Moghadam, D. P. Brazil et al. // *Nature*. – 2000. – Vol. 407, 6803. – P. 538-541.

201. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties / D. Ponti, A. Costa, N. Zaffaroni et al. // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65, N 13. – P. 5506-5511.
202. Isolation of CD24(high) and CD24(low/-)cells from MCF-7: CD24 expression is positively related with proliferation, adhesion and invasion in MCF-7 / H.J. Kim, J.B. Kim, K.M. Lee et al. // *Cancer Lett.* – 2007. – Vol. 258. – P. 98-108.
203. Jhan, J.R. Triple-negative breast cancer and the potential for targeted therapy / J. R. Jhan, E. R. Andrechek // *Pharmacogenomics.* – 2017. – Vol. 18, N 17. – P. 1595-1609. doi: 10.2217/pgs-2017-0117.
204. Johnson, A.B. Steroid receptor coactivators 1, 2, and 3: critical regulators of nuclear receptor activity and steroid receptor modulator (SRM)-based cancer therapy / A. B. Johnson, B. W. O'Malley // *Mol Cell Endocrinol.* – 2012. – Vol. 348, N 2. – P. 430-439. doi: 10.1016/j.mce.2011.04.021.
205. Keeton, E. K. Cell cycle progression stimulated by tamoxifen-bound estrogen receptor-alpha and promoter-specific effects in breast cancer cells deficient in N-CoR and SMRT / E. K. Keeton, M. Brown // *Mol Endocrinol.* – 2005. – Vol. 19, N 6. – P. 1543-1554.
206. Khan, D. The immune system is a natural target for estrogen action: opposing effects of estrogen in two prototypical autoimmune diseases / D. Khan, S. Ansar Ahmed // *Front Immunol.* – 2016. – Vol. 6. – P. 635. doi: 10.3389/fimmu.2015.00635.
207. Knockin of mutant PIK3CA activates multiple oncogenic pathways / J. P. Gustin, B. Karakas, M. B. Weiss et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2009. – Vol. 106, N 8. – P. 2835-2840. doi: 10.1073/pnas.0813351106.
208. Krishnamurti, U. HER2 in breast cancer: a review and update / U. Krishnamurti, J. F. Silverman // *Adv Anat Pathol.* – 2014. – Vol. 21, N 2. – P. 100-107. doi: 10.1097/PAP.0000000000000015.
209. Lapatinib combined with letrozole versus letrozole and placebo as first-line therapy for postmenopausal hormone receptor-positive metastatic breast cancer / S.

Johnston, J. Phippen, X. Pivot et al. // *J Clin Oncol.* – 2009. – Vol. 27, N 33. – P. 5538-5546. doi: 10.1200/JCO.2009.23.3734.

210. Légraré, S. Minireview: The link Between ER $\alpha$  corepressors and histone deacetylases in tamoxifen resistance in breast cancer / S. Légraré, M. Basik // *Mol Endocrinol.* – 2016. – Vol. 30, N 9. – P. 965-976. doi: 10.1210/me.2016-1072.

211. Letrozole is superior to anastrozole in suppressing breast cancer tissue and plasma estrogen levels / J. Geisler, H. Helle, D. Ekse et al. // *Clin Cancer Res.* – 2008. – Vol. 14, N 19. – P. 6330-6335. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-5221.

212. Ligand independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor / A. J. Horlein, A. M. Naar, T. Heinzl et al. // *Nature.* – 1995. – Vol. 377, N 6548. – P. 397-404.

213. Liu, S. Akt signaling is sustained by a CD44 splice isoform-mediated positive feedback loop / S. Liu, C. Cheng // *Cancer Res.* – 2017. – Vol. 77, N 14. – P. 3791-3801. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2545.

214. Liu, S. Alternative RNA splicing and cancer / S. Liu, C. Cheng // *Wiley Interdiscip Rev RNA.* – 2013. – Vol. 4, N 5. – P. 547-566. doi: 10.1002/wrna.1178.

215. Livak, K. J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) / K. J. Livak, T. D. Schmittgen // *Method.* – 2001. – Vol. 25, N 4. – P. 402-408.

216. Loibl, S. Primary systemic therapy for clinicians: medical and research perspectives / S. Loibl // *Breast.* – 2015. – Vol. 24, N (Suppl 1). – P 13-14.

217. LoRusso, P. M. Mammalian target of rapamycin as a rational therapeutic target for breast cancer treatment / P. M. LoRusso // *Oncology.* – 2013. – Vol. 84, N 1. – P. 43-56. doi: 10.1159/000343063.

218. Loss of PTEN expression is associated with aggressive behavior and poor prognosis in Middle Eastern triple-negative breast cancer / S. Beg, A. K. Siraj, S. Prabhakaran et al. // *Breast Cancer Res Treat.* – 2015. – Vol. 151, N 3. – P. 541-553. doi: 10.1007/s10549-015-3430-3.

219. Loss of TGF $\beta$  receptor type 2 expression impairs estrogen response and confers tamoxifen resistance / S. Busch, A. H. Sims, O. Stål et al. // *Cancer Res.* – 2015. – Vol. 75, N 7. – P. 1457-1469. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1583.
220. Loss of PTEN expression in breast cancer: association with clinicopathological characteristics and prognosis / S. Li, Y. Shen, M. Wang et al. // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8, N 19. – P. 32043.
221. Louderbough, J. M. Understanding the dual nature of CD44 in breast cancer progression / J. M. Louderbough, J. A. Schroeder // *Mol Cancer Res.* – 2011. – Vol. 9, N 12. – P. 1573-1586. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0156.
222. Luminal B breast cancer: molecular characterization, clinical management, and future perspectives / F. Ades, D. Zardavas, I. Bozovic-Spasojevic et al. // *J Clin Oncol.* – 2014. – Vol. 32, N 25. – P. 2794-2803. doi: 10.1200/JCO.2013.54.1870.
223. Ma, C. X. Importance of PI3-kinase pathway in response/resistance to aromatase inhibitors / C. X. Ma, R. J. Crowder, M. J. Ellis // *Steroids.* – 2011. – Vol. 76, N 8. – P. 750-752. doi: 10.1016/j.steroids.2011.02.023.
224. Ma, X. M. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control / X. M. Ma, J. Blenis // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2009. – Vol. 10, N 5. – P. 307-318. doi: 10.1038/nrm2672.
225. Manning, B. D. AKT/PKB signaling: navigating the network / B. D. Manning, A. Toker // *Cell.* – 2017. – Vol. 169, N 3. – P. 381-405. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.001.
226. Mayer, I. A. The PI3K/AKT pathway as a target for cancer treatment // I. A. Mayer, C. L. Arteaga // *Annu Rev Med.* – 2016. – Vol. 67. – P. 11- 28. doi: 10.1146/annurev-med-062913-051343.
227. McKenna, N.J. Minireview: nuclear receptor coactivators--an update / N. J. McKenna, B. W. O'Malley // *Endocrinology.* – 2002. – Vol. 143, N 7. – P. 2461-2455.
228. Measuring IGF-1, ER- $\alpha$  and EGFR expression can predict tamoxifen-resistance in ER-positive breast cancer / K. Chong, A. Subramanian, A. Sharma, K. Mokbel // *Anticancer Res.* – 2011. – Vol. 31, N 1. – P. 23-32.

229. Mechanism of Akt1 inhibition of breast cancer cell invasion reveals a protumorigenic role for TSC2 / H. Liu, D. C. Radisky, C. M. Nelson et al. // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2006. – Vol. 103, N 11. – P. 4134-4139.

230. Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer / J. Shou, S. Massarweh, C. K. Osborne et al. // *J Natl Cancer Inst*. – 2004. – Vol. 96, N 12. – P. 926-935.

231. Metabolic syndrome, insulin resistance, and mammographic density in pre- and postmenopausal women / B. K. Kim, Y. Chang, J. Ahn et al. // *Breast Cancer Res Treat*. – 2015. – Vol. 153, N 2. – P. 425-434. doi: 10.1007/s10549-015-3544-7.

232. Miller, T. W. Phosphatidylinositol 3-kinase and antiestrogen resistance in breast cancer / T. W. Miller, J. M. Balko, C. L. Arteaga // *J Clin Oncol*. – 2011. – Vol. 29, N 33. – P. 4452-4461. doi: 10.1200/JCO.2010.34.4879.

233. Mills, J. N. Mechanisms of resistance in estrogen receptor positive breast cancer: overcoming resistance to tamoxifen/aromatase inhibitors / J. N. Mills, A. C. Rutkovsky, A. Giordano // *Curr Opin Pharmacol*. – 2018. – Vol. 41. – P. 59-65. doi: 10.1016/j.coph.2018.04.009.

234. Molecular basis for the involvement of thymidine phosphorylase in cancer invasion / T. Gotanda, M. Haraguchi, T. Tachiwada et al. // *Int J Mol Med*. – 2006. – Vol. 17, N 6. – P. 1085-1091.

235. Molecular characterization of EGFR and EGFR-downstream pathways in triple negative breast carcinomas with basal like features / V. Martin, F. Botta, E. Zanellato et al. // *Histol Histopathol*. – 2012. – Vol. 27, N 6. – P. 785-792. doi: 10.14670/HH-27.785.

236. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? / J. D. Brenton, L. A. Carey, A. A. Ahmed, C. Caldas // *J Clin Oncol*. – 2005. – Vol. 23, N 29. – P. 7350-7360.

237. Molecular classification of estrogen receptor-positive/luminal breast cancers / F. C. Geyer, D. N. Rodrigues, B. Weigelt, J. S. Reis-Filho // *Adv Anat Pathol*. – 2012. – Vol. 19, N 1. – P. 39-53. doi: 10.1097/PAP.0b013e31823fafa0.

238. Molecular portraits of human breast tumours / C. M. Perou, T. Sorlie, M. B. Eisen et al. // *Nature*. – 2000. – Vol. 406, N 6797, – P. 747-752.
239. mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s / M. A. Frias, C.C. Thoreen, J. D. Jaffe et al. // *Curr Biol*. – 2006. – Vol. 16, N 18. – P. 1865-1870.
240. mTOR Kinase Inhibition Causes Feedback-Dependent Biphasic Regulation of AKT Signaling / V.S. Rodrik-Outmezguine, S. Chandarlapaty, N.C.Pagano et al. // *Cancer Discov*. – 2011. – Vol. 1, N 3. – P.248-259.doi: 10.1158/2159-8290.CD-11-0085.
241. Multivariate analysis of oestrogen receptor alpha, pS2, metallothionein and CD24 expression in invasive breast cancers / P. Surowiak, V. Materna, B. Gyorffy et al. // *Br. J. Cancer*. – 2006. – Vol. 95. – P. 339-346.
242. Murphy, C. G. Endocrine resistance in hormone-responsive breast cancer: mechanisms and therapeutic strategies / C. G. Murphy, M. N. Dickler // *Endocr Relat Cancer*. – 2016. – Vol. 23, N 8. – P.R337-352. doi: 10.1530/ERC-16-0121.
243. Mutational analysis of PI3K/AKT signaling pathway in tamoxifen exemestane adjuvant multinational pathology study / V. S. Sabine, C. Crozier, C. L. Brookes et al. // *J Clin Oncol*. – 2014. – Vol. 32, N 27. – P. 2951–2958.
244. Mutational characterization of individual breast tumors: TP53 and PI3K pathway genes are frequently and distinctively mutated in different subtypes / S. Boyault, Y. Drouet, C. Navarro et al. // *Breast Cancer Res Treat*. – 2012. – Vol. 132. – P. 29-39. doi: 10.1007/s10549-011-1518-y.
245. Mutations in the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role in tumor progression and therapeutic implications in breast cancer / T. W. Miller, B. N. Rexer, J. T. Garrett, C. L. Arteaga // *Breast Cancer Res*. – 2011. – Vol. 13, N 6. – P. 224. doi: 10.1186/bcr3039.
246. National Human Genome Research Institute, Genotype-Tissue Expression Project // *GTEX Portal Version*. – 2017. – Vol. 10. – P.6.
247. Neoadjuvant bevacizumab and anthracycline-taxane-based chemotherapy in 678 triple-negative primary breast cancers; results from the geparquinto study (GBG

44). / B. Gerber, S. Loibl, H. Eidtmann et al. // *Ann Oncol.* – 2013. – Vol. 24, N 12. – P. 2978-2984. doi: 10.1093/annonc/mdt361.

248. Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab in HER2-positive breast cancer: pathologic complete response rate, predictive and prognostic factors / I. P. C. Buzatto, A. Ribeiro-Silva, J. M. Andrade et al. // *Braz J Med Biol Res.* – 2017. – Vol. 50, N 2. – P. e5674. doi: 10.1590/1414-431X20165674.

249. Network analysis of SRC-1 reveals a novel transcription factor hub which regulates endocrine resistant breast cancer / A. L. Browne, S. Charmsaz, D. Varešlija et al. // *Oncogene.* – 2018. – Vol. 37, N 15. – P. 2008-2021. doi: 10.1038/s41388-017-0042-x.

250. Nicholson, R. I. Steroid hormone receptors and their clinical significance in cancer / R. I. Nicholson, R. A. McClelland, J. M. Gee // *J Clin Pathol.* – 1995. – Vol. 48, N 10. – P. 890-895.

251. No association between genetic variants in angiogenesis and inflammation pathway genes and breast cancer survival among Chinese women / T. Dorjgochoo, Y. Zheng, Y. T. Gao et al. // *Cancer Epidemiol.* – 2013. – Vol. 37, N 5. – P. 619-624. doi: 10.1016/j.canep.2013.06.005.

252. Nonendocrine pathways and endocrine resistance observations with antiestrogens and signal transduction inhibitors in combination / R. Nicholson, I. R. Hutcheson, J. M. Knowlden et al. // *Clin Cancer Res.* – 2004. – Vol. 10. – P. 346s–354s.

253. Novel therapeutic strategies in the treatment of triple-negative breast cancer / K. Oualla, H. M. El-Zawahry, B. Arun et al. // *Ther Adv Med Oncol.* – 2017. – Vol. 9, N 7. – P. 493-511. doi: 10.1177/1758834017711380.

254. Nuclear estrogen receptors co-activation mechanisms / M. Skrzypczak, L. Kapka-Skrzypczak, M. Cyranka et al. // *Curr Med Chem.* – 2013. – Vol. 20, N 27. – P. 3317-3338.

255. Oestrogen receptor co-activator AIB1 is a marker of tamoxifen benefit in postmenopausal breast cancer / M. Weiner, L. Skoog, T. Fornander et al. // *Ann Oncol.* – 2013. – Vol. 24, N 8. – P. 1994-1999. doi: 10.1093/annonc/mdt159.

256. Okuma, H. S. BRCA Gene mutations and poly(ADP-Ribose) polymerase inhibitors in triple-negative breast cancer / H. S. Okuma, K. Yonemori // *Adv Exp Med Biol.* – 2017. – Vol. 1026. – P. 271-286. doi: 10.1007/978-981-10-6020-5\_13.
257. Olaparib for the treatment of breast cancer / M. Robert, J. S. Frenel, C. Gourmelon // *Expert Opin Investig Drugs.* – 2017. – Vol. 26, N 6. – P. 751-759. doi: 10.1080/13543784.2017.1318847.
258. Olaparib. U.S [Электронный ресурс] / Food and Drug Administration. – Электрон. дан. – Режим доступа: <http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm427598.htm>.
259. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial / M. W. Audeh, J. Carmichael, R. T. Penson et al. // *Lancet.* – 2010. – Vol. 376, N 9737. – P. 245-251. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60893-8.
260. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial / A. Tutt, M. Robson, J. E. Garber et al. // *Lancet.* – 2010. – Vol. 376, N 9737. – P. 235-244. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60892-6.
261. Osborne, C. K. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer / C. K. Osborne, R. Schiff // *Annu Rev Med.* – 2011. – Vol. 62. – P. 233-247.
262. Overcoming acquired resistance to letrozole by targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer cell clones / A. Cavazzoni, M. A. Bonelli, C. Fumarola et al. // *Cancer Lett.* – 2012. – Vol. 323, N 1. – P. 77-87. doi: 10.1016/j.canlet.2012.03.034.
263. Overexpression of CD44 accompanies acquired tamoxifen resistance in MCF7 cells and augments their sensitivity to the stromal factors, heregulin and hyaluronan / S. Hiscox, B. Baruah, C. Smith et al. // *BMC Cancer.* – 2012. – Vol. 12, N 1. – P. 458. doi: 10.1186/1471-2407-12-458.
264. Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy / D. M. Pardoll // *Nat Rev Cancer.* – 2012. – Vol. 12, N 4. – P. 252-264. doi: 10.1038/nrc3239.

265. Pathologic complete response to neoadjuvant cisplatin in BRCA 1-positive breast cancer patients / T. Byrski, T. Huzarski, R. Dent et al. // *Breast Cancer Res Treat.* – 2014. – Vol. 147, N 2. – P. 401-405. doi: 10.1007/s10549-014-3100-x.
266. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis / P. Cortazar, L. Zhang, M. Untch et al. // *Lancet.* – 2014. – Vol. 384, N 9938. – P. 164-172. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62422-8.
267. Pattern of linkage disequilibrium and haplotype distribution in disease candidate genes / J. R. Long, L. J. Zhao, P. Y. Liu et al. // *BMC Genetics.* – 2004. – Vol.11. – P. 11. doi: 10.1186/1471-2156-5-11.
268. Patterns of recurrence and outcomes in patients with luminal breast cancer: a retrospective study / Z. H. Li, J. P. Xiong, P. H. Hu, J. H. Tu // *Eur J Gynaecol Oncol.* – 2017. – Vol. 38, N 1. – P. 14-19.
269. Pharmacogenetics of toxicity of 5-fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer patients / K. Tecza, J. Pamula-Pilat, J. Lanuszewska et al. // *Oncotarget.* – 2018. – Vol. 9, N 10. – P. 9114-9136. doi: 10.18632/oncotarget.24148.
270. Phase I, dose-escalation study of BKM120, an oral pan-Class I PI3K inhibitor, in patients with advanced solid tumors / J. C. Bendell, J. Rodon, H. A. Burris et al. // *J Clin Oncol.* – 2012. – Vol. 30, N 3. – P. 282-290. doi: 10.1200/JCO.2011.36.1360.
271. Phase II randomized study of neoadjuvant everolimus plus letrozole compared with placebo plus letrozole in patients with estrogen receptor-positive breast cancer / J. Baselga, V. Semiglazov, P. van Dam et al. // *J Clin Oncol.* – 2009. – Vol. 27, N 16. – P. 2630-2637. doi: 10.1200/JCO.2008.18.8391.
272. Phase II trial of bicalutamide in patients with androgen receptor-positive, estrogen receptor-negative metastatic breast cancer / A. Gucalp, S. Tolaney, S. J. Isakoff // *Clin. Cancer Res.* – 2013. – Vol. 19, N 19. – P. 5505–5512. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3327.
273. Phase II, randomized trial to compare anastrozole combined with gefitinib or placebo in postmenopausal women with hormone receptor-positive metastatic breast

cancer / M. Cristofanilli, V. Valero, A. Mangalik et al. // *Clin Cancer Res.* – 2010. – Vol. 16, N 6. – P. 1904-1914. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2282.

274. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor  $\alpha$ : a new model for anti-estrogen resistance / R. A. Campbell, P. Bhat-Nakshatri, N. M. Patel et al. // *J Biol Chem.* – 2001. – Vol. 276, N 13. – P. 9817-9824.

275. Phosphatidyl-inositol-3-kinase alpha catalytic subunit mutation and response to neoadjuvant endocrine therapy for estrogen receptor positive breast cancer / M. J. Ellis, L. Lin, R. Crowder et al. // *Breast Cancer Res Treat.* – 2010. – Vol. 119, N 2. – P. 379-390. doi: 10.1007/s10549-009-0575-y.

276. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex / D. D. Sarbassov, D. A. Guertin, S. M. Ali, D. M. Sabatini // *Science.* – 2005. – Vol. 307, N 5712. – P. 1098-10101.

277. Phosphorylation of AKT pathway proteins is not predictive of benefit of taxane therapy in early breast cancer / J. M. Bartlett, R. A'hern, T. Piper et al. // *Breast Cancer Res Treat.* – 2013. – Vol. 138, N 3. – P. 773-781. doi: 10.1007/s10549-013-2489-y.

278. Phosphorylation of the mutant K303R oestrogen receptor alpha at serine 305 affects aromatase inhibitor sensitivity / I. Barone, D. Iacopetta, K. R. Covington et al. // *Oncogene.* – 2010. – Vol. 29, N 16. – P. 2404-2414. doi:10.1038/onc.2009.520.

279. PI3K pathway activation in breast cancer is associated with the basal-like phenotype and cancer-specific mortality / E. López-Knowles, S. A. O'Toole, C. M. McNeil et al. // *Int J Cancer.* – 2010. – Vol. 126, N 5. – P. 1121-11231. doi: 10.1002/ijc.24831.

280. PI3K/Akt signalling pathway and cancer / J. A. Fresno-Vara, E. Casado, J. DeCastro et al. // *Cancer Treat Rev.* – 2004. – Vol. 30, N 2. – P.193- 204.

281. PIK3CA mutation associates with improved outcome in breast cancer / K. Kalinsky, L. M. Jacks, A. Heguy et al. // *Clin Cancer Res.* – 2009. – Vol. 15, N 16. – P. 5049-5059. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0632.

282. PIK3CA mutations and PTEN loss correlate with similar prognostic factors and are not mutually exclusive in breast cancer / G. Pérez-Tenorio, L. Alkhori, B. Olsson et al. // *Clin Cancer Res.* – 2007. – Vol. 13, N 12. – P. 3577-84.

283. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma / L. H. Saal, K. Holm, M. Maurer et al. // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65, N 7. – P. 2554-2559.

284. PIK3CA mutations in androgen receptor-positive triple negative breast cancer confer sensitivity to the combination of PI3K and androgen receptor inhibitors / B. D. Lehmann, J. A. Bauer, J. M. Schafer et al. // *Breast Cancer Res.* – 2014. – Vol. 16, N 4. – P. 406. doi: 10.1186/s13058-014-0406-x.

285. PIK3CA mutations, phosphatase and tensin homolog, human epidermal growth factor receptor 2, and insulin-like growth factor 1 receptor and adjuvant tamoxifen resistance in postmenopausal breast cancer patients / K. Beelen, M. Opdam, T. M. Severson et al. // *Breast Cancer Res.* – 2014. – Vol. 16, N 1. – P. R13. doi: 10.1186/bcr3606.

286. PIK3CA mutation, reduced AKT serine 473 phosphorylation, and increased ER $\alpha$  serine 167 phosphorylation are positive prognostic indicators in postmenopausal estrogen receptor-positive early breast cancer / . Ishida, M. Baba, Y. Hatanaka et al. // *Oncotarget.* – 2018. – Vol. 9, N 25. – P. 17711-17724. doi: 10.18632/oncotarget.24845.

287. PKIB expression strongly correlated with phosphorylated Akt expression in breast cancers and also with triple-negative breast cancer subtype / K. Dabanaka, S. Chung, H. Nakagawa et al. // *Med Mol Morphol.* – 2012. – Vol. 45, N 4. – P. 229-233. doi: 10.1007/s00795-011-0565-0.

288. Planchon, S. M. The nuclear affairs of PTEN / S. M. Planchon, K. A. Waite, E. Charis // *J Cell Biol.* – 2008. – Vol. 121, N 3. – P. 249-253. doi: 10.1242/jcs.022459.

289. Polymorphisms of KDR gene are associated with coronary heart disease / Y. Wang, Y. Zheng, W. Zhang et al. // *J Am Coll Cardiol.* – 2007. – Vol. 50, N 8. – P. 760-767.

290. Predictive biomarkers for triple negative breast cancer treated with platinum-based chemotherapy / J. Jin, W. Zhang, W. Ji et al. // *Cancer Biol Ther.* – 2017. – Vol. 18, N 6. – P. 369-378. doi: 10.1080/15384047.2017.1323582.

291. Predictive value of CD44 and CD24 for prognosis and chemotherapy response in invasive breast ductal carcinoma / Y. Chen, J. Song, Y. Jiang et al. // *Int J Clin Exp Pathol.* – 2015. – Vol. 8, N 9. – P. 11287-11295. eCollection 2015.

292. Preoperative gefitinib versus gefitinib and anastrozole in postmenopausal patients with oestrogen-receptor positive and epidermal-growth-factor-receptor-positive primary breast cancer: a double-blind placebo-controlled phase II randomised trial. / A. Polychronis, H. D. Sinnett, D. Hadjiminis et al. // *Lancet Oncol.* – 2005. – Vol. 6, N 6. – P. 383-391.

293. Preoperative window of opportunity study of the PI3K inhibitor pictilisib (GDC-0941) plus anastrozole vs anastrozole alone in patients with ER+, HER2-negative operable breast cancer (OPPORTUNE study) / P. Schmid, S. E. Pinder, D. Wheatley et al. // *Cancer Res.* – 2015. – Vol. 75, N 9. – P. S2-03. doi: 10.1158/1538-7445.SABCS14-S2-03.

294. Prevalence and predictors of androgen receptor (AR) and programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in BRCA1-associated and sporadic triple-negative breast cancer (TNBC). / N. Tung, J. Garber, V. Torous et al. // *NPJ Breast Cancer.* – 2016. – Vol. 24, N 2. – P. 16002. doi: 10.1038/npjbcancer.2016.2.

295. Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis / B. K. Abraham, P. Fritz, M. McClellan et al. // *Clin Cancer Res.* – 2005. – Vol. 11, N 3. – P. 1154-1159.

296. Prognosis of breast cancer molecular subtypes in routine clinical care: a large prospective cohort study / A. Hennigs, F. Riedel, A. Gondos et al. // *BMC Cancer.* – 2016. – Vol. 16, N 1. – P. 734. doi: 10.1186/s12885-016-2766-3.

297. Prognostic and predictive value of p-Akt, EGFR, and p-mTOR in early breast cancer / G. Lazaridis, S. Lambaki, G. Karayannopoulou et al. // *Strahlenther Onkol.* – 2014. – Vol. 190, N 7. – P. 636-638.

298. Prognostic and predictive values of EGFR overexpression and EGFR copy number alteration in HER2-positive breast cancer / H. J. Lee, A. N. Seo, E. J. Kim et al. // *Br J Cancer*. – 2015. – Vol. 112, N 1. – P. 103-111. doi: 10.1038/bjc.2014.556.
299. Prognostic role of PIK3CA mutations and their association with hormone receptor expression in breast cancer: a meta-analysis / B. Pang, S. Cheng, S. P. Sun et al. // *Sci Rep*. – 2014. – Vol. 4. – P. 6255. doi: 10.1038/srep06255.
300. Prognostic significance of ESR1 amplification and ESR1 PvuII, CYP2C19\*2, UGT2B15\*2 polymorphisms in breast cancer patients / A. Markiewicz, M. Wełnicka-Jaśkiewicz, J. Skokowski et al. // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, N 8. – P.72219. doi: 10.1371/journal.pone.0072219.
301. Prognostic significance of pAKT plus estrogen receptor status in adjuvant cytotoxic treatment of breast cancer / S. X. Yang, K. Kidwell, J. C. Costantino et al. // *Eur J Cancer (Suppl.)*. – 2012. – Vol. 48. – P. 148.
302. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer from two phase III randomized breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199 / S. Adams, R. J. Gray, S. Demaria et al. // *J Clin Oncol*. – 2014. – Vol. 32, N 27. – P. 2959-2966.
303. Prognostic Evaluation of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Genotype and Phenotype Parameters in Triple-negative Breast Cancers / S. Levva, V. Kotoula, I. Kostopoulos et al. // *Cancer Genomics Proteomics*. – 2017. – Vol. 14, N 3. – P.181-195.
304. Promise of rapalogues versus mTOR kinase inhibitors in subset specific breast cancer: old targets new hope / P. De, K. Miskimins, N. Dey, B. Leyland-Jones // *Cancer Treatment Reviews*. – 2013. – Vol. 39, N 5. – P. 403-412. doi: 10.1016/j.ctrv.2012.12.002.
305. Proteomic and transcriptomic profiling reveals a link between the PI3K pathway and lower estrogen-receptor (ER) levels and activity in ER+ breast cancer / C. J. Creighton, X. Fu, B. T. Hennessy et al. // *Breast Cancer Res*. – 2010. – Vol. 12, N 3. – P. R40. doi: 10.1186/bcr2594.

306. PTEN expression as a predictor for the response to trastuzumab-based therapy in Her-2 overexpressing metastatic breast cancer / D. Gschwantler-Kaulich, Y. Y. Tan, E. M. Fuchs et al. // *PLoS One*. – 2017. – Vol. 12, N 3. – P. e0172911. doi: 10.1371/journal.pone.0172911.
307. PTEN/PI3K/AKT protein expression is related to clinicopathological features and prognosis in breast cancer with axillary lymph node metastases / L. L. Wang, S. Hao, S. Zhang et al. // *Hum Pathol*. – 2017. – Vol. 61. – P. 49-57. doi: 10.1016/j.humpath.2016.07.040.
308. Randomized phase II trial of everolimus in combination with tamoxifen in patients with hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer with prior exposure to aromatase inhibitors: a GINECO study / T. Bachelot, C. Bourcier, C. Cropet et al. // *J Clin Oncol*. – 2012. – Vol. 30, N 22. – P. 2718-2724. doi: 10.1200/JCO.2011.39.0708.
309. Reduced PTEN expression predicts relapse in patients with breast carcinoma treated by tamoxifen / N. Shoman, S. Klassen, A. McFadden et al. // *Mod Pathol*. – 2005. – Vol. 18, N 2. – P. 250-259.
310. Regulation of cell migration by the C2 domain of the tumor suppressor PTEN / M. Raftopoulou, S. Etienne-Manneville, A. Self et al. // *Science*. – 2004. – Vol. 303, N 5661. – P. 1179-1181.
311. Regulation of ERBB2 by oestrogen receptor-PAX2 determines response to tamoxifen / A. Hurtado, K. A. Holmes, T. R. Geistlinger et al. // *Nature*. – 2008. – Vol. 456, N 7222. – P. 663-666. doi: 10.1038/nature07483.
312. Regulation of PTEN phosphorylation and stability by a tumor suppressor candidate protein / F. Okahara, H. Ikawa, Y. Kanaho, T. Maehama et al. // *J Biol Chem*. – 2004. – Vol. 279, N 44. – P. 45300-45303.
313. Reproductive history and oral contraceptive use in relation to risk of triple-negative breast cancer / A. I. Phipps, R. T. Chlebowski, R. Prentice et al. // *J Natl Cancer Inst*. – 2011. – Vol. 103, N 6. – P. 470-477. doi: 10.1093/jnci/djr030.

314. Resistance to endocrine therapy: are breast cancer stem cells the culprits? / C. S. O'Brien, S. J. Howell, G. Farnie, R. B. Clarke // *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. – 2009. – Vol.14, N 1. – P. 45–54. doi: 10.1007/s10911-009-9115-y.
315. Resistance to taxanes in triple-negative breast cancer associates with the dynamics of a CD49f+ tumor-initiating population / J. Gómez-Miragaya, M. Palafox, L. Paré et al. // *Stem Cell Reports*. – 2017. – Vol. 8, N 5. – P. 1392-1407. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.03.026.
316. Results from a phase 2 study of enzalutamide (ENZA), an androgen receptor (AR) inhibitor, in advanced AR+ triple-negative breast cancer (TNBC) / T. A. Traina, K. Miller, D. A. Yardley et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2015. – Vol. 33, N 15. – P. 1003.
317. RHAMM/ERK interaction induces proliferative activities of cementifying fibroma cells through a mechanism based on the CD44- EGFR / H. Hatano, H. Shigeishi, Y. Kudo et al. // *Lab Invest*. – 2011. – Vol. 91, N 3. – P.:379-391. doi: 10.1038/labinvest.2010.176.
318. Ring, A. Mechanisms of tamoxifen resistance / A. Ring, M. Dowsett // *Endocr Relat Cancer*. – 2004. – Vol. 11, N 4. – P.643-658.
319. Rohira, A. D. Steroid receptor coactivators present a unique opportunity for drug development in hormone-dependent cancers / A. D. Rohira, D. M. Lonard // *Biochem Pharmacol*. – 2017. – Vol. 15, N 140. – P. 1-7. doi:10.1016/j.bcp.2017.04.005.
320. Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer / C. K. Osborne, V. Bardou, T. A. Hopp et al. // *J Natl Cancer Inst*. – 2003. – Vol. 95, N 5. – P. 353-361.
321. S6 kinase 1 regulates estrogen receptor alpha in control of breast cancer cell proliferation. / R. L. Yamnik, A. Digilova, D. C. Davis et al. // *J Biol Chem*. – 2009. – Vol. 284, N 10. – P. 6361-6369. doi: 10.1074/jbc.M807532200.
322. Safety and clinical activity of atezolizumab (anti-PDL1) in combination with nab-paclitaxel in patients with metastatic triple-negative breast cancer / S. Adams, J. Diamond, E. Hamilton et al. // *Cancer Res*. – 2016. – Vol. 76, N 4. – P. 2-11-06. doi: 10.1158/1538-7445.

323. Sambrook, J. Rapid isolation of yeast DNA / J. Sambrook, D. W. Russel // *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* // 3rd ed. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. – P. 632.
324. Sansal, I. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway / I. Sansal, W. R. Sellers // *Clin Oncol.* – 2004. – Vol. 22, N 14. – P. 2954-63.
325. Selective phosphorylations of the SRC-3/AIB1 coactivator integrate genomic reponses to multiple cellular signaling pathways / R. C. Wu, J. Qin, P. Yi et al. // *Mol Cell.* – 2004. – Vol. 15, N 6. – P. 937-949.
326. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily / S. A. Oñate, S. Y. Tsai, M. J. Tsai, B. W. O'Malley // *Science.* – 1995. – Vol. 270, N 5240. – P. 1354-1357.
327. Sestak, I. Markers for the identification of late breast cancer recurrence / I. Sestak, J. Cuzick // *Breast Cancer Research.* – 2015. – Vol. 17. – P. 10. doi: 10.1186/s13058-015-0516-0.
328. Sharma, P. Biology and management of patients with triple-negative breast cancer / P. Sharma // *Oncologist.* – 2016. – Vol. 21, N 9. – P. 1050-1062. doi: 10.1634/theoncologist.2016-0067.
329. Sharma, P. Update on the treatment of early-stage triple-negative breast cancer / P. Sharma // *Curr Treat Options Oncol.* – 2018. – Vol. 19, N 5. – P. 22. doi: 10.1007/s11864-018-0539-8.
330. Shaw, R. J. Ras, PI(3)K and mTOR signaling controls tumor cell growth / R. J. Shaw, L. C. Cantley // *Nature.* – 2006. – Vol. 441, N 7092. – P. 424-430.
331. Sheri, A. Targeting endocrine resistance: is there a role for mTOR inhibition? / A. Sheri, L. A. Martin, S. Johnston // *Clin Breast Cancer.* – 2010. – Vol. 10, N 3. – P. S79-85. doi: 10.3816/CBC.2010.s.016.
332. SIAH and EGFR, Two RAS Pathway Biomarkers, are Highly Prognostic in Locally Advanced and Metastatic Breast Cancer / L. L. S. van Reesema, V. Zheleva, J.S. Winston et al. // *EBioMedicine.* – 2016. – Vol. 11. P. 183-198. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.08.014.

333. Significantly higher levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and shorter survival times for patients with primary operable triple-negative breast cancer / B. K. Linderholm, H. Hellborg, U. Johansson et al. // *Ann Oncol.* – 2009. – Vol. 20, N 10. – P. 1639-1646. doi: 10.1093/annonc/mdp062.

334. Singh, P. Insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor receptor 1 (IGF-1R) signaling systems: novel treatment strategies for cancer / P. Singh, J. M. Alex, F. Bast // *Med Oncol.* – 2014. – Vol. 31, N 1. – P. 805. doi: 10.1007/s12032-013-0805-3.

335. Stand Up to Cancer phase Ib study of pan-phosphoinositide-3-kinase inhibitor buparlisib with letrozole in estrogen receptor-positive/ human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer / I. A. Mayer, V. G. Abramson, S. J. Isakoff et al. // *J Clin Oncol.* – 2014. – Vol. 32, N 12. – P. 1202-1209. doi: 10.1200/JCO.2013.54.0518.

336. STAT3 mediates resistance of CD44+CD24-/low breast cancer stem cells to tamoxifen in vitro / X. Wang, G. Wang, Yi. Zhao et al. // *J Biomed Res.* – 2012. – Vol. 26, N 5. – P.325–335. doi: 10.7555/JBR.26.20110050.

337. Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase / T. E. Spencer, G. Jenster, M. M. Burcin et al. // *Nature.* – 1997. – Vol. 389, N 6647. – P. 194-198.

338. Study on correlation between PKIB and pAkt expression in breast cancer tissues / J. B. Zhang, W. Song, Y. Y. Wang et al. // *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* – 2017. – Vol. 21, N 6. – P. 1264-1269.

339. Subcellular localization of activated AKT in estrogen receptor and progesterone receptor-expressing breast cancers: potential clinical implications / S. Badve, N. R. Collins, P. Bhat-Nakshatri et al. // *Am J Pathol.* – 2010. – Vol. 176, N 5. – P. 2139-2149. doi: 10.2353/ajpath.2010.090477.

340. Tailoring therapies-improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015 / A. S. Coates, E. P. Winer, A. Goldhirsch et al. // *Ann Oncol.* – 2015. – Vol. 26, N 8. – P. 1533-1546. doi: 10.1093/annonc/mdv221.

341. Tamoxifen resistance in breast tumors is driven by growth factor receptor signaling with repression of classic estrogen receptor genomic function. / S. Massarweh, C. K. Osborne, C. J. Creighton et al. // *Cancer Res.* – 2008. – Vol. 68, N 3. – P. 826-833. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2707.
342. Tamoxifen resistance: EGFR expression in hormone receptor-positive and HER2 negative breast cancer [abstract] / S.Y. Bae, S.J Nam, S.K. Lee et al. // In: *Proceedings of the 2016 San Antonio Breast Cancer Symposium. Cancer Res.* – 2017. – Vol. 77, N 4. – P. 6-09-36.
343. Targeted agents to reverse resistance to endocrine therapy in metastatic breast cancer: where are we now and where are we going? / P. Fedele, N. Calvani, A. Marino et al. // *Crit Rev Oncol Hematol.* – 2012. – Vol. 84, N 2. – P. 243-251. doi: 10.1016/j.critrevonc.2012.03.004.
344. Targeted Therapies for Triple-Negative Breast Cancer: Combating a Stubborn Disease / M. Kalimutho, K. Parsons, D. Mittal et al. // *Trends Pharmacol Sci.* – 2015. – Vol. 36, N 12. – P. 822-846. doi: 10.1016/j.tips.2015.08.009.
345. Targeting Akt3 signaling in triple-negative breast cancer / Y. R. Chin, T. Yoshida, A. Marusyk et al. // *Cancer Res.* – 2014. – Vol. 74, N 3. – P. 964-973. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2175.
346. Targeting multiple pathways in breast cancer: Androgen receptor, HER2, and mTOR / M. Gordon, N. D'Amato, H. Gu et al. // *Cancer Res.* – 2014. – Vol. 75. – P. 6-03-07.
347. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy / H. Farmer, N. McCabe, C. J. Lord et al. // *Nature.* – 2005. – Vol. 434, N 7035. – P. 917-921.
348. TBCRC 001: randomized phase II study of cetuximab in combination with carboplatin in stage IV triple-negative breast cancer / L. A. Carey, H. S. Rugo, P.K. Marcom et al. // *J Clin Oncol.* – 2012. – Vol. 30, N 21. – P. 2615-2623. doi: 10.1200/JCO.2010.34.5579.

349. TGF $\beta$  isoforms and receptors mRNA expression in breast tumours: prognostic value and clinical implications / C. Chen, K. N. Zhao, P. P. Masci et al. // *BMC Cancer*. – 2015. – Vol. 15. – P. 1010. doi: 10.1186/s12885-015-1993-3.
350. The association between Akt activation and resistance to hormone therapy in metastatic breast cancer / E. Tokunaga, A. Kataoka, Y. Kimura et al. // *Eur J Cancer*. – 2006. – Vol. 42, N 5. – P. 629-635.
351. The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors / G. Honeth, P. O. Bendahl, M. Ringnér et al. // *Breast Cancer Res*. – 2008. – Vol. 10, N 3. – P 53. doi: 10.1186/bcr2108.
352. The CD44+/CD24- phenotype relates to ‘triple-negative’ state and unfavorable prognosis in breast cancer patients / A. Giatromanolaki, E. Sivridis, A. Fiska, M. I. Koukourakis // *Med Oncol*. – 2011. – Vol. 28, N 3. – P.745-752. doi: 10.1007/s12032-010-9530-3.
353. The clinicopathologic and prognostic significance of CD44+/ CD24(-/low) and CD44-/CD24+ tumor cells in invasive breast carcinomas / E. Mylona, I. Giannopoulou, E. Fasomytakis et al. // *Hum Pathol*. – 2008. – Vol. 39. – P. 1096-1102. doi: 10.1016/j.humpath.2007.12.003.
354. The crossroads of breast cancer progression: insights into the modulation of major signaling pathways / F. J. Velloso, A. F. Bianco, J. O. Farias et al. // *Onco Targets Ther*. – 2017. – Vol. 10. – P. 5491-5524. doi: 10.2147/OTT.S142154.
355. The estrogen receptor alpha gene and breast cancer risk (The Netherlands) / N. C. Onland-Moret, C. P. van Gils, M. Roest et al. // *Cancer Causes Control*. – 2005. – Vol. 16, N 10. – P. 1195–1202.
356. The F-domain of estrogen receptor-alpha inhibits ligand induced receptor dimerization / J. Yang, D. W. Singleton, E. A. Shaughnessy, S. A. Khan // *Mol Cell Endocrinol*. – 2008. – Vol. 295, N 1-2. – P. 94-100. doi: 10.1016/j.mce.2008.08.001.
357. The function of steroid receptor coactivator-1 in normal tissues and cancer / C. A. Walsh, L. Qin, J. C. Tien et al. // *Int J Biol Sci*. – 2012. – Vol. 8, N 4. – P. 470-485. doi: 10.7150/ijbs.4125.

358. The IGF pathway regulates ER $\alpha$  through a S6K1-dependent mechanism in breast cancer cells / M. A. Becker, Y. H. Ibrahim, X. Cui et al. // *Mol Endocrinol.* – 2011. – Vol. 25, N 3. – P. 516-528. doi: 10.1210/me.2010-0373.
359. The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling / R. J. Shaw, N. Bardeesy, B. D. Manning et al. // *Cancer Cell.* – 2004. – Vol. 6, N 1. – P. 91-99. doi:10.1016/j.ccr.2004.06.007.
360. The lymphovascular embolus of inflammatory breast cancer expresses a stem cell-like phenotype / Y. Xiao, Y. Ye, K. Yearsley et al. // *Am J Pathol.* – 2008. – Vol. 173, N 2. – P. 561-574. doi: 10.2353/ajpath.2008.071214.
361. The p110beta isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110gamma / J. Guillermet-Guibert, K. Bjorklof, A. Salpekar et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2008. – Vol. 105, N 24. – P. 8292-8297. doi: 10.1073/pnas.0707761105.
362. The role of insulin receptors and IGF-I receptors in cancer and other diseases / F. Frasca, G. Pandini, L. Sciacca et al. // *Arch Physiol Biochem.* – 2008. – Vol. 114, N 1. – P. 23-37. doi: 10.1080/13813450801969715.
363. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen / A. K. Shiau, D. Barstad, P. M. Loria et al. // *Cell.* – 1998. – Vol. 95, N 7. – P. 927-937.
364. The TNT trial: A randomized phase III trial of carboplatin (C) compared with docetaxel (D) for patients with metastatic or recurrent locally advanced triple negative or BRCA1/2 breast cancer (CRUK/07/012) / A. Tutt, P. Ellis, L. S. Kilburn et al. // *Cancer Res.* – 2014. – Vol. 75, N 9. – P. S3-01. doi.org/10.1158/1538-7445.SABCS14-S3-01.
365. The changing role of ER in endocrine resistance / A. Nardone, C. De Angelis, M.V. Trivedi // *Breast.* – 2015. – Vol. 24, N 2. – P. S60-66. doi: 10.1016/j.breast.2015.07.015.
366. The clinicopathological and prognostic significance of CD24, CD44, CD133, ALDH1 expressions in invasive ductal carcinoma of the breast: CD44/CD24 expressio

n in breast cancer / N. Kapucuoğlu, K. K. Bozkurt, Ş. Başpınar et al. // *Pathol Res Pract.* – 2015. – Vol. 211, N 10. – P. 740-747. doi: 10.1016/j.prp.2015.05.011.

367. The expression and significance of insulin-like growth factor-1 receptor and its pathway on breast cancer stem/progenitors / W.W. Chang, R. J. Lin, J. Yu et al. // *Breast Cancer Res.* – 2013. – Vol. 15, N 3. – P. R39. doi: 10.1186/bcr3423.

368. The impact of IGF-1R expression on the outcomes of patients with breast cancer: a meta-analysis / S. Yan, X. Jiao, K. Li et al. // *Onco Targets Ther.* – 2015. – Vol. 8. – P. 279-287. doi:10.2147/OTT.S74774.

369. The role of CD44+/CD24/low biomarker for screening, diagnosis and monitoring of breast cancer / R. Camerlingo, G. A. Ferraro, F. De Francesco et al. *Oncol Rep.* – 2014. – Vol. 31, N 3. – P. 1127-1132. doi:10.3892/or.2013.2943.

370. TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors / J. J. Voegel, M. J. Heine, C. Zechel et al. // *EMBO J.* – 1996. – Vol. 15, N 14. – P. 3667-3675.

371. Traditional breast cancer risk factors in relation to molecular subtypes of breast cancer / R. M. Tamimi, G. A. Colditz, A. Hazra et al. // *Breast Cancer Res Treat.* – 2012. – Vol. 131, N 1. – P. 159-167. doi: 10.1007/s10549-011-1702-0.

372. Transforming growth factor beta receptor type III is a tumor promoter in mesenchymal-stem like triple negative breast cancer / B. Jovanović, J. S. Beeler, M. W. Pickup et al. // *Breast Cancer Res.* – 2014. – Vol. 16, N 4. – P. R69. doi: 10.1186/bcr3684.

373. Trastuzumab plus anastrozole versus anastrozole alone for the treatment of postmenopausal women with human epidermal growth factor receptor 2-positive, hormone receptor-positive metastatic breast cancer: results from the randomized phase III TAnDEM study / B. Kaufman, J. R. Mackey, M. R. Clemens et al. // *J Clin Oncol.* – 2009. – Vol. 27, N 33. – P. 5529-5537. doi:10.1200/JCO.2008.20.6847.

374. Trastuzumab in the treatment of breast cancer / S. Maximiano, P. Magalhães, M. P. Guerreiro, M. Morgado // *BioDrugs.* – 2016. – Vol. 30, N 2. – P. 75-86. doi: 10.1007/s40259-016-0162-9.

375. Treatment of advanced HER2-positive breast cancer: 2018 and beyond / N. Pondé, M. Brandão, G. El-Hachem et al. // *Cancer Treat Rev.* – 2018. – Vol. 67. – P. 10-20. doi: 10.1016/j.ctrv.2018.04.016.
376. Triple negative breast tumors in African-American and Hispanic/Latina women are high in CD44+, low in CD24+, and have loss of PTEN / Y. Wu, M. Sarkissyan, Y. Elshimali, J. V. Vadgama // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, N 10. – P.78259 doi: 10.1371/journal.pone.0078259.
377. Triple-negative breast cancer in Hispanic patients / F. Lara-Medina, V. Pérez-Sánchez, D. Saavedra-Pérez et al. // *Cancer.* – 2011. – Vol. 117, N 16. – P. 3658-3669. doi: 10.1002/cncr.25961.
378. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease / G. Bianchini, J. M. Balko, I. A. Mayer et al. // *Nat Rev Clin Oncol.* – 2016. – Vol. 13, N 11. – P. 674-690. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.66.
379. Triple-negative breast cancers: systematic review of the literature on molecular and clinical features with a focus on treatment with innovative drugs / A. Diana, E. Franzese, S. Centonze et al. // *Curr Oncol Rep.* – 2018. – Vol. 20, N 10. – P.76. doi: 10.1007/s11912-018-0726-6.
380. Tsai, M. J. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members / M. J. Tsai, B. W. O'Malley // *Annu Rev Biochem.* – 1994. – Vol. 63. – P. 451-86.
381. Tti1 and Tel2 are critical factors in mammalian target of rapamycin complex assembly / T. Kaizuka, T. Hara, N. Oshiro et al. // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285, N 26. – P. 20109-20116. doi: 10.1074/jbc.M110.121699.
382. Tumor suppressor PTEN in breast cancer: heterozygosity, mutations and protein expression / P. Kechagioglou, R. M. Papi, X. Provatopoulou et al. // *Anticancer Res.* – 2014. – Vol. 34, N 3. – P. 1387-1400.
383. Tumor PIK3CA genotype and prognosis in early-stage breast cancer: a pooled analysis of individual patient data / D. Zardavas, L. Te Marvelde, R. L. Milne et al. // *J Clin Oncol.* – 2018. – Vol. 36, N 10. – P. 981-990. doi: 10.1200/JCO.2017.74.8301.

384. Tumor-associated macrophages are correlated with tamoxifen resistance in the postmenopausal breast cancer patients / Q. J. Xuan, J. X. Wang, A. Nanding et al. // *Pathol Oncol Res.* – 2014. – Vol. 20, N 3. – P. 619-624. doi: 10.1007/s12253-013-9740-z.
385. Uscanga-Perales, G. I. Triple negative breast cancer: deciphering the biology and heterogeneity / G. I. Uscanga-Perales, S. K. Santuario-Faciob, R. Ortiz-Lypeza // *Medicina Universitaria.* – 2016. – Vol. 18, N 71. – P. 105-114. doi: org/10.1016/j.rmu.2016.05.007.
386. Veliparib/carboplatin plus standard neoadjuvant therapy for high-risk breast cancer: first efficacy results from the I-SPY 2 trial / H. Rugo, O. Olopade, A. DeMichele et al. // *Cancer Res.* – 2013. – Vol. 73. – P. S5–S2. doi:10.1158/0008-5472.SABCS13-S5-02.
387. von Minckwitz, G. Selecting the neoadjuvant treatment by molecular subtype: how to maximize the benefit? / G. von Minckwitz, C. Fontanella // *Breast.* – 2013. – Vol. 22, N 2. – P. 149-151. doi: 10.1016/j.breast.2013.07.028.
388. Wahba, H. A. Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer / H. A. Wahba, H. A. El-Hadaad // *Cancer Biol Med.* – 2015. – Vol. 12, N 2. – P. 106- 116. doi: 10.7497/j.issn.2095-3941.2015.0030.
389. Wakeling, A. E. Similarities and distinctions in the mode of action of different classes of antioestrogens / A. E. Wakeling // *Endocrine-Related Cancer.* – 2000. – Vol. 7, N 1. – P. 17-28.
390. Wang, Z. ErbB Receptors and Cancer / Z. Wang // *Methods Mol Biol.* – 2017. – Vol. 1652. – P. 3-35. doi: 10.1007/978-1-4939-7219-7\_1.
391. Wang, L. The role of steroid receptor coactivators in hormone dependent cancers and their potential as therapeutic targets / L. Wang, D. M. Lonard, B. W. O'Malley // *Horm Cancer.* – 2016. – Vol. 7, N 4. – P. 229-235. doi: 10.1007/s12672-016-0261-6.
392. Wee, P. Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways / Wee, Z. Wang // *Cancers (Basel).* – 2017. – Vol. 9, N 5. – P. E52. doi: 10.3390/cancers9050052.

393. Wendt, M. K. Therapeutic targeting of the focal adhesion complex prevents oncogenic TGF-beta signaling and metastasis / M. K. Wendt, W. P. Schiemann // *Breast Cancer Res.* – 2009. – Vol.1, N 5. – P. R68. doi: 10.1186/bcr2360.
394. Xu, J. Normal and cancer-related functions of the p160 steroid receptor co-activator (SRC) family / J. Xu, R-C. Wu, B. W. O'Malley // *Nat. Rev. Cancer.* 2009. – Vol. 9, N 9. – P. 615-630. doi: 10.1038/nrc2695.
395. Xu, W. A new role for the PI3K/Akt signaling pathway in the epithelial-mesenchymal transition / W. Xu, Z. Yang, N. Lu // *Cell Adh Migr.* – 2015. – Vol. 9, N 4. – P. 17-24. doi: 10.1080/19336918.2015.1016686.
396. Xu, W. Nuclear receptor coactivators: the key to unlock chromatin / W. Xu // *Biochem. Cell Biol.* – 2005. – Vol. 83, N 4. – P. 418-428.
397. Yang, G. Prognostic value of different amounts of cancer stem cells in different subtypes of breast cancer / G. Yang, F. Xue, X. Chen // *Gland Surg.* – 2012. – Vol.1, N 1. – P. 20-24. doi:10.3978/j.issn.2227-684X.2012.04.02.
398. Yang, S. X. New insights on PI3K/AKT pathway alterations and clinical outcomes in breast cancer / S. X. Yang, E. Polley, S. Lipkowitz // *Cancer Treat Rev.* – 2016. – Vol. 45. – P. 87-96. doi:10.1016/j.ctrv.2016.03.004.
399. Yarden, Y. Untangling the ErbB signalling network / Y. Yarden, M.X. Sliwkowsky // *Nat. Rev. Cell. Mol. Biol.* – 2002. – Vol. 2, N 2. – P. 127-137.
400. Yenigun, V. B. Response of CD44+/CD24-/low breast cancer stem/progenitor cells to tamoxifen and doxorubicin induced autophagy / V. B. Yenigun, B. Ozpolat, G. T. Kose // *Int J Mol Med.* – 2013. – Vol. 31, N 6. – P. 1477-1483. doi: 10.3892/ijmm.2013.1342.
401. Yoeli-Lerner, M. Akt/PKB signaling in cancer: a function in cell motility and invasion / M. Yoeli-Lerner, A. Toker // *Cell Cycle.* – 2006. – Vol. 5, N 6. – P. 603-605.
402. Zeichner, S. B. A review of systemic treatment in metastatic triple-negative breast cancer / S. B. Zeichner, H. Terawaki, K. Gogineni // *Breast Cancer (Auckl).* – 2016. – Vol. 10. – P. 25–36. doi: 10.4137/BCBCR.S32783.

403. Zhang, L. Signaling interplay between transforming growth factor- $\beta$  receptor and PI3K/AKT pathways in cancer / L. Zhang, F. Zhou, P. ten Dijke // Trends Biochem Sci. – 2013. – Vol. 38, N 12. – P. 612-620. doi:10.1016/j.tibs.2013.10.001.
404. Zhao, M. Mechanisms and therapeutic advances in the management of endocrine-resistant breast cancer / M. Zhao, B. Ramaswamy // World J Clin Oncol. – 2014. – Vol. 5, N 3. – P. 248-262. doi:10.5306/wjco.v5.i3.248.
405. Zhu, X. The emerging regulation of VEGFR-2 in triple-negative breast cancer / X. Zhu, W. Zhou // Front Endocrinol (Lausanne). – 2015. – Vol. 6. – P.159. doi: 10.3389/fendo.2015.00159.