

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
дополнительного профессионального образования
«Российская медицинская академия непрерывного
профессионального образования»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

на правах рукописи

НЕНАХОВА ЮЛИЯ НИКОЛАЕВНА

**ПРЕДИКТОРЫ РАННЕГО ОТВЕТА НА НЕОАДЪЮВАНТНУЮ
ХИМИОТЕРАПИЮ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ II-III СТАДИИ**

14.01.12 – Онкология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный консультант:

академик РАН, д.м.н., профессор

Поддубная Ирина Владимировна

Москва – 2019

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА..1. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ПРОГНОЗИРОВАНИЮ ОТВЕТА НА НЕОАДЬЮВАНТНУЮ ХИМИОТЕРАПИЮ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Показания к неoadьювантной химиотерапии при раке молочной железы	11
1.2. Стандартные методы оценки эффективности неoadьювантной химиотерапии рака молочной железы	12
1.2.1. Физикальный осмотр	12
1.2.2. УЗИ молочных желез и регионарных зон лимфооттока	12
1.2.3. Маммография	13
1.2.4. Лекарственный патоморфоз	14
1.3. Магнитно-резонансная томография с динамическим контрастированием в оценке эффективности НПХТ.....	16
1.3.1. МР-спектроскопия	18
1.3.2. Диффузионно-взвешенная МРТ	19
1.4. Другие методы оценки эффективности НПХТ.....	21
1.4.1. Радионуклидные методы	21
1.5. Оценка эффективности неoadьювантной химиотерапии с помощью биологических опухолевых маркеров.....	23
1.5.1. Циркулирующие опухолевые клетки	23
1.5.2. Основные методики идентификации ЦОК	25
1.5.3. ЦОК в оценке эффективности неoadьювантной химиотерапии рака молочной железы	27
1.6. Аномальное метилирование ДНК в оценке НПХТ при раке молочной железы	31
1.7. Заключение	34
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	36

2.1. Общая характеристика пациенток.....	36
2.2. Протокол исследования.....	40
2.3. Стандартные методы оценки эффективности неoadьювантной химиотерапии	46
2.3.1. Физикальный осмотр	46
2.3.2. Маммография	47
2.3.3. Ультразвуковое исследование	47
2.4. МРТ с динамическим контрастированием.....	48
2.4.1. МР-спектроскопия	50
2.4.2. МР-диффузия	52
2.5. Биологические маркеры в оценке эффективности НПХТ	53
2.5.1. Циркулирующие опухолевые клетки	53
2.5.2. Аномальное метилирование ДНК	55
2.6. Статистический анализ.....	59
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. КЛИНИКО-РЕНТГЕНОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.....	62
3.1. Влияние клиничко-морфологических характеристик опухоли на частоту достижения полного патоморфологического регресса	62
3.2. Клиничко-морфологические особенности опухолей у больных с выраженным и слабым ответом на лечение.....	66
3.2. Стандартные методы обследования в оценке эффективности предоперационной химиотерапии.....	69
3.2.1. Физикальный осмотр	69
3.2.2. Маммография в оценке эффективности НПХТ	73
3.2.3. УЗИ молочных желез в оценке эффективности НПХТ	76
3.3. Магнитно-резонансная томография в оценке эффективности неoadьювантной химиотерапии	79

<i>3.3.1. Возможности использования МР-диффузии в оценке эффективности предоперационной химиотерапии</i>	84
<i>3.3.2. Возможности использования МР-спектроскопии в оценке эффективности предоперационной химиотерапии</i>	98
ГЛАВА 4. РОЛЬ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ В ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ НЕОАДЪЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	112
4.1. Циркулирующие опухолевые клетки в оценке эффективности НПХТ	112
4.2. Аномальное метилирование ДНК в оценке эффективности НПХТ	122
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	130
Выводы	142
Практические рекомендации	144
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	145
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	147

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Рак молочной железы (РМЖ) устойчиво занимает 1 место в структуре онкологической заболеваемости у женщин, являясь социальной и клинически значимой проблемой [141]. В нашей стране у 29,6 % впервые заболевших женщин диагностируется III или IV стадия заболевания [1]. Даже при наличии данных о факторах прогноза, предсказать с уверенностью течение заболевания затруднительно. По данным литературы, приблизительно у 25% пациенток с относительно благоприятным прогнозом (первично локализованным РМЖ) после успешно проведенного лечения отмечается прогрессирование заболевания. В то же время, приблизительно у трети больных с неблагоприятным прогнозом (метастазами в подмышечные лимфатические узлы) после окончания лечения отмечается длительный безрецидивный период [2; 3]. В связи с этим поиск индивидуальных факторов прогноза течения заболевания представляется актуальной задачей. Раннее определение ответа опухоли на лекарственное лечение помогло бы в нужное время изменить лечебную тактику, избавить женщину от высокотоксичной и неэффективной для неё химиотерапии, вовремя и в нужном объёме провести хирургическое лечение, тем самым, улучшить прогноз заболевания [129; 130; 131].

Степень разработанности темы исследования

Не менее 30% всех заболевших раком молочной железы женщин получают на первом этапе лечения предоперационную (неoadьювантную) химиотерапию (НПХТ). Важным критерием благоприятного прогноза для жизни таких пациенток является выраженность ответа на неoadьювантную полихимиотерапию. Ответ опухоли на лечение в значительной мере зависит от подтипа рака молочной железы [4; 130; 131; 140]. Наиболее часто полный клинический и патоморфологический ответы наблюдаются в группе больных с высокоагрессивными опухолями. Полный патоморфологический ответ в такой группе больных является одним из предикторов повышения общей и

безрецидивной выживаемости [5; 130; 131; 140]. В то же время, на сегодняшний день, не существует надежных предикторных факторов, позволяющих в процессе химиотерапии прогнозировать степень последующего патоморфологического ответа. Решение подобной задачи позволило бы у целого ряда пациенток своевременно изменить лечебную тактику: поменять схему химиотерапии либо провести оперативное вмешательство, не подвергая больных рискам токсичного и недостаточно эффективного лечения.

Наряду со стандартными методами обследования, используемыми в процессе лечения, в клиническую практику постепенно внедряются дополнительные методики - лучевые и лабораторные, позволяющие контролировать динамику опухолевого ответа в процессе лечения. Среди лучевых методов необходимо отметить магнитно-резонансную томографию молочных желез (МРТ) с внутривенным контрастированием, рекомендованную в 2015 г. на конференции в Санкт-Галлене в качестве метода выбора при оценке эффективности НПХТ [6]. Большое внимание в настоящее время уделяется магнитно-резонансной спектроскопии (МР-спектроскопии) и магнитно-резонансной томографии с использованием диффузионно-взвешенных последовательностей (МР-диффузии), повышающих чувствительность МРТ и позволяющих на ранних этапах лечения выявлять функциональные изменения в опухолевой ткани. К перспективным лабораторным методам оценки ответа опухоли на лечение относится определение биологических маркеров, например, таких как циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК), диагностика эпигенетических изменений - аномальное метилирование ДНК.

Таким образом, на сегодняшний день существует целый ряд радиологических и серологических тестов, имеющих потенциал для раннего прогнозирования эффективности предоперационной химиотерапии у больных раком молочной железы. В то же время, возможность сочетанного применения нескольких методов для повышения точности такого прогноза остается малоизученным вопросом и представляется нам актуальной областью для исследований.

Цель исследования

Оценка роли рентгенологических методов и серологических маркеров как предикторов раннего ответа на предоперационную химиотерапию при II-III стадиях рака молочной железы.

Задачи исследования

1) Изучить возможности использования МРТ молочных желез с динамическим контрастированием в оценке эффективности предоперационной химиотерапии у больных со II-III стадиями рака молочной железы.

2) Изучить возможности применения МР-диффузии у больных со II-III стадиями рака молочной железы в процессе неoadьювантной химиотерапии. Оценить динамику измеряемого коэффициента диффузии (ИКД) и возможность использования данного маркера в качестве предиктора раннего ответа на предоперационную лекарственную терапию.

3) Изучить возможности применения МР-спектроскопии у больных со II-III стадиями рака молочной железы в процессе НПХТ. Оценить динамику пика холина и возможность использования маркера в качестве предиктора раннего ответа на предоперационную лекарственную терапию.

4) Изучить возможности применения ЦОК в качестве предиктора ответа на неoadьювантную химиотерапию у больных со II-III стадиями рака молочной железы.

5) Изучить возможности применения аномального метилирования ДНК в оценке эффективности предоперационной химиотерапии у больных со II-III стадиями рака молочной железы.

Научная новизна работы

Изучены возможности МР-спектроскопии и МР-диффузии в оценке степени ответа опухолей молочных желез на химиотерапию. По данным регрессионного анализа выявлена высокая прогностическая значимость ранней динамики пика холина (после 2-х курсов НПХТ) в общей группе больных, что говорит о возможности использования данного маркера в качестве предиктора раннего ответа на предоперационное лекарственное лечение. Повышение ИКД в процессе

лечения явилось предиктором хорошего патоморфологического ответа в общей группе больных.

В результате работы оценена динамика уровня циркулирующих опухолевых клеток с помощью методики ISET в процессе неoadьювантной химиотерапии.

Проанализирована возможность использования аномального метилирования генов в оценке эффективности НПХТ. По результатам генетического исследования выявлена выраженная положительная корреляция между метилированием гена KCNQ2 в биоптате и клиническим ответом у больных с тройным негативным раком молочной железы.

Теоретическая и практическая значимость

В ходе работы изучены прогностические возможности использования перспективных рентгенологических и серологических методов неинвазивной оценки эффективности неoadьювантной химиотерапии (МР-спектроскопия, МР-диффузия, ЦОК, аномального метилирования ДНК). Проведено сравнение возможностей МРТ молочных желез с динамическим контрастированием с используемыми в рутинной практике осмотром, УЗИ молочных желез и рентгеновской маммографией.

Методология и методы исследования

В качестве методологической базы использовалась группа больных (N=85) II-III стадиями рака молочной железы, получивших лечение на базах кафедры онкологии РМАНПО (ФГБУ «ЛРЦ» Минздрава России, Клинической больнице № 1 «МЕДСИ» в Отрадном). Статистическая обработка материала и расчеты показателей проведены с использованием компьютерной программы электронных таблиц Microsoft Excel, PASW Statistics 22.

Положения, выносимые на защиту

1) Включение МРТ молочных желез с динамическим контрастированием в классический алгоритм диагностики (осмотр, маммография, УЗИ молочных желез и регионарных лимфатических узлов), проводимой в процессе предоперационного лекарственного лечения РМЖ, позволяет увеличить точность в предсказании полного патоморфологического ответа опухоли на

лечение. Вероятностный коэффициент достижения полного патоморфологического ответа (сCR/ pCR) для МРТ составил 0,90 (по данным осмотра – 0,64, УЗИ молочных желез – 0,50, маммографии – 0,81).

2) МРТ молочных желез с динамическим контрастированием - наиболее точным метод визуализации отсевов в ткани молочной железы и их динамики в процессе НПХТ ($p=0,003$), обладает самой высокой информативностью в оценке статуса регионарных лимфатических узлов в процессе НПХТ (точность МРТ 85,7%, УЗИ -72,4%).

3) Увеличение ИКД определяемое при МР-диффузии в процессе НПХТ у больных со II-III стадиями рака молочной железы может являться предиктором выраженного ответа опухоли на лекарственное лечение ($p=0,001$). Метод обладает высокой прогностической значимостью в предсказании полного ответа на НПХТ, коэффициент сCR/ pCR = 0,75.

4) Уменьшение пика холина в процессе НПХТ по данным МР-спектроскопии у больных со II-III стадиями рака молочной железы может являться ранним предиктором выраженного ответа опухоли на лекарственное лечение ($p=0,001$), маркер способен предсказать ответ опухоли после 2-х курсов химиотерапии с критическим уровнем выше 0,0001635 (95% ДИ 0,514-0,835). Вероятностный коэффициент сCR/pCR по данным МР-спектроскопии составил 0,87, был выше рассчитанных коэффициентов для других методов обследования и приближался по своему значению к коэффициенту сCR/pCR рассчитанному для МРТ молочных желез с динамическим контрастированием (0,90).

5) Циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК), определяемые с помощью ISET методики, не показали своей значимости в прогнозировании ответа на неoadьювантную химиотерапию, методика требует дальнейшего изучения.

6) Метилирование ДНК - прогностический и предиктивный маркер нового поколения, изучение которого является перспективным направлением. Аномальное метилирование гена KCNQ2 может являться предиктором хорошего клинического ответа на предоперационную химиотерапию у больных

тройным негативным раком молочной железы II-III стадий заболевания и требует дальнейшего изучения.

Реализация результатов работы

Результаты работы внедрены и используются в практической и научно-исследовательской работе на базе кафедры онкологии РМАНПО в Клинической больнице №1 «МЕДСИ» в Отрадном.

Степень достоверности и апробация результатов

Представленные в диссертационной работе теоретические положения, выводы и методологические подходы являются результатом глубокой и тщательной проработки самостоятельного научного исследования. Объем материала (85 пациенток), достаточный период наблюдения (29 месяцев), применение современных методов исследования и статистического анализа свидетельствуют о достоверности полученных результатов, сформулированных выводов. Достоверность представленных данных подтверждается также актами проверки первичного материала от 22.10.2018 и 02.11.2018.

Материалы диссертации доложены на научно-практической конференции «Современный взгляд на комплексное лечение рака молочной железы»

(Москва, 2 декабря 2016г); ежегодной научно-практической конференции молодых ученых – медиков с международным участием «Горизонты медицинской науки» (Москва, 19–20 апреля 2017г); научно-практической конференции «Инновации в онкологии – жителям Подмосковья» (Москва, 16 мая 2017г.).

По теме диссертации автором опубликовано 3 работы в научных рецензируемых изданиях, рекомендуемых ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ПРОГНОЗИРОВАНИЮ ОТВЕТА НА НЕОАДЬЮВАНТНУЮ ХИМИОТЕРАПИЮ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Показания к неoadьювантной химиотерапии при раке молочной железы

Ежегодно возрастает количество женщин, получающих химиотерапию на первом этапе лечения рака молочной железы. Это связано как с усовершенствованием методов диагностики, так и с расширением показаний для данного вида лечения [131; 140]. Согласно рекомендациям RUSSCO (Российского общества клинической онкологии) [139], показаниями для проведения неoadьювантной (предоперационной) полихимиотерапии (НПХТ) у больных раком молочной железы являются местно-распространенный рак либо необходимость уменьшения размеров опухоли для проведения последующего органосохранного лечения при первично-операбельном раке. Также проведение НПХТ показано пациенткам с наличием факторов, свидетельствующих о высокой вероятности достижения полного патоморфологического ответа: тройной негативный фенотип, высокий уровень показателя Ki-67, положительный HER2-статус, отсутствие рецепторов эстрогена (РЭ) и рецепторов прогестерона (РП), высокая степень злокачественности [129; 130; 131; 139].

Полный патоморфологический регресс опухоли (pCR – pathologic Complete Response) у больных с люминальным В, тройным негативным, HER2-положительным подтипами опухолей коррелирует с высокими показателями 5-летней общей и безрецидивной выживаемости [7; 8; 10; 129; 130; 131; 140]. В группе больных с люминальным А и люминальным В HER2-положительным раком не обнаружено корреляции между частотой достижения pCR и прогнозом заболевания [7]. В то же время, частота благоприятного ответа на проводимое лечение широко варьирует не только в зависимости от подтипа опухоли, но и от ряда других, не всегда в полной мере изученных факторов [4; 9; 10; 130; 131]. В

этой связи представляется актуальным изучение точности методов оценки и прогнозирования эффективности НПХТ при раке молочной железы II-III ст.

1.2. Стандартные методы оценки эффективности неoadъювантной химиотерапии рака молочной железы

Оценка местного статуса опухоли обычно проводится до начала химиотерапии, между курсами и по окончании лечения. Традиционно оно включает в себя физикальный осмотр, рентгеновскую маммографию, УЗИ молочных желез.

1.2.1. Физикальный осмотр

Физикальный осмотр – метод субъективной визуализации, который не всегда достоверно отражает местный статус. У молодых пациенток с плотной тканью молочных желез, у женщин с выраженным фиброаденоматозом и большим объёмом молочных желез такая оценка нередко бывает затруднена, а после проведенного системного лечения зачастую невозможна [12].

Более точными методиками оценки динамики опухолевого процесса являются широко используемые в клинической практике УЗИ и маммография. Точность диагностики во многом зависит от индивидуальных особенностей пациентки (возраст, менопаузальный статус, соотношение жирового и железистого компонентов ткани железы, наличие сопутствующей патологии молочной железы) и морфологического типа опухоли [12; 13].

1.2.2. УЗИ молочных желез и регионарных зон лимфооттока

Метод ультразвукового исследования незаменим при оценке патологического очага у больных молодого возраста (до 35 лет) с рентгенологически плотной структурой молочной железы. Дополнительным преимуществом УЗИ является возможность оценки аксиллярных, над- и подключичных областей, а также ретромаммарного пространства, которые не визуализируются при рентгеновской маммографии [127]. Чувствительность и специфичность УЗИ в диагностике рака молочной железы колеблются в широких

пределах, составляя, по данным ряда авторов, от 57% до 99% в зависимости от строения ткани желез и опухоли [13; 14; 126]. Значительно повысить чувствительность и специфичность метода позволяет использование дополнительных методик, таких как цифровое доплеровское картирование (ЦДК) кровотока, энергетическая доплерография, соноэластография, автоматическая сонотомография [15; 16].

1.2.3. Маммография

К важным преимуществам рентгеновской маммографии в выявлении злокачественных опухолей относится возможность визуализации непальпируемых образований молочных желез, особенно на фоне жировой инволюции, что чаще наблюдается в менопаузальном периоде [17]. В целом, точность рентгеновской маммографии в диагностике рака молочной железы и оценке ответа на системное лечение колеблется, по данным разных авторов, в пределах 75–95% [18; 19]. Специфичность метода – 95-97% [63; 64].

Использование УЗИ молочных желез и маммографии сопряжено с рядом трудностей и в некоторых ситуациях не способно предоставить полную информацию об истинном объёме поражения молочной железы (мультицентричность, мультифокальность, наличие отсевов, микрокальцинатов, поражение регионарных лимфатических узлов). Точность данных методов повышается при использовании их сочетания, но не всегда достигает достаточно высоких значений [20].

По данным ретроспективного многоцентрового исследования, проведенного группой венгерских учёных под руководством R.G. Stein, при прогнозировании размера опухоли на основе данных УЗИ и маммографии необходимо учитывать биологический подтип опухоли. В исследовании проводилось сравнение размеров опухоли по данным УЗИ, маммографии и планового гистологического исследования. Была проанализирована точность диагностических методов в зависимости от подтипа опухоли у 6543 больных. Так, у пациенток с HER2-положительным раком размер опухоли в большей мере коррелировал с

результатами УЗИ молочных желез, в то время как рентгеновская маммография позволяла точнее определить размеры образования в группе женщин с HER2-отрицательными подтипами рака молочных желез [21]. По данным Jochelson M.S. и соавт. наиболее точным в предсказании полного патоморфологического ответа опухоли на лечение является совместное использования маммографии с МРТ молочных желез. Сочетание данных методик высокоинформативно в отборе больных для органосохраняющего лечения после НПХТ [145].

1.2.4. Лекарственный патоморфоз

Наиболее объективным из существующих на сегодняшний день методом оценки эффективности предоперационной химиотерапии является плановое патоморфологическое исследование послеоперационного материала с определением степени лекарственного патоморфоза. Патоморфологический ответ опухоли на лечение - это изменения опухоли в результате воздействия лекарственной или лучевой терапии, проявляющиеся дистрофией и апоптозом клеток, формированием полей некроза, развитием очагов фиброза и склероза [22].

Для определения степени морфологического регресса опухоли были разработаны различные системы, среди которых классификация Г.А. Лавниковой (1972), Е.Ф. Лушниковой (1977), I.D. Miller и S. Payne (1999), В. Chevallier (1993) и D.M. Sataloff (1995) [23]. В 2007 г. W. Symmans и соавторами был предложен критерий RCB (Residual Cancer Burden — ложе остаточной опухоли), в основу которого легло измерение размеров остаточной опухоли (двухмерные показатели с учетом возможной асимметрии опухоли), измерение клеточности опухоли (по классификации Miller–Payne), наличия рака *in situ*, а также числа и размера пораженных лимфатических узлов.

Расчет данного критерия позволяет прогнозировать безрецидивную выживаемость и производится по формуле с помощью калькулятора (Residual Burden Calculator) на сайте онкологического центра M.D. Anderson (<http://www3.mdanderson.org/app/medcalc/index.cfm?pagename=jsonconvert3>).

Полученный результат относят к одной из 3 групп (RCB I, II, III), каждая из

которых соответствует низкому, промежуточному или высокому риску развития отдаленных метастазов. В настоящее время систему RCB рекомендуют использовать для многоцентровых клинических исследований [24; 25].

В классификации ответа опухоли на лекарственное лечение I.D. Miller и S. Raupе выделено 5 степеней патоморфоза. Преимуществом классификации является то, что в ней учитываются изменения клеточности опухоли в сравнении с материалом, полученным при выполнении толстоигольной биопсии (core-биопсии) до начала лечения. Это позволяет более точно подойти к оценке степени выраженности лечебного патоморфоза. Отсутствие после проведенного лечения опухолевых клеток в месте расположения первичной опухоли и в регионарных лимфатических узлах является критерием полного патоморфологического ответа (pCR) [26].

В нашей стране широко используется определение ответа опухоли на лечение по системе Г.А. Лавниковой, которая базируется на оценке повреждений первичной опухоли и включает 4 степени лечебного патоморфоза. К IV степени повреждения относят полное исчезновение элементов опухоли. В этом случае в препаратах могут определяться лишь «следы» бывшей опухоли, например, очаги некроза, лишенные клеточных элементов. При III степени лечебного патоморфоза структура опухоли резко нарушена за счет фиброзного замещения, обширного некроза или круглоклеточной инфильтрации; на этом фоне определяют остатки опухоли в виде разрозненных групп паренхиматозных клеток, обычно с резкими дистрофическими изменениями. При II степени патоморфоза, несмотря на сохранение основной массы опухолевой ткани, отчетливо видны очаги регрессивных изменений различного характера, выраженных дистрофических изменений в клетках. При I степени не отмечается заметных изменений в общей структуре опухоли, имеются лишь несвойственные данному новообразованию полиморфизм и дистрофия клеток, а также подавление митозов [27].

На сегодняшний день изучена связь лечебного патоморфоза с отдаленными результатами лечения [4; 5; 28] . Показано, что более высокий уровень выживаемости отмечается в группе тех пациенток, у которых pCR был оценен как

полное отсутствие опухолевых клеток в первичном очаге и лимфатических узлах [29].

1.3. Магнитно-резонансная томография с динамическим контрастированием в оценке эффективности НПХТ

Магнитно-резонансная томография (МРТ) - широко используемый, благодаря своей безопасности и эффективности, неинвазивный метод диагностики рака молочной железы. Чувствительность МР-маммографии с динамическим внутривенным контрастированием для диагностики инвазивных опухолевых образований колеблется от 83 до 100%, а специфичность — от 29 до 97% [30]. МР-исследование позволяет оценить размер и количество патологических образований, наличие лимфогенного распространения (симптом «крючка»), отсевов, протокового распространения, тип накопления контраста (быстрое, медленное, с выходом на плато), наличие доминирующего питающего сосуда, перипухолевый и префекторальный отёк.

Применение МРТ наиболее показано у больных молодого возраста, в т.ч. при наличии мутаций генов BRCA 1 и 2, при мультифокальном и мультицентричном процессе, наличии внутрипротокового роста, эндопротезов, дольковом раке молочной железы, при наличии расхождений между обычными методами визуализации и данными физикального обследования. В мета-анализе по изучению диагностической точности МРТ и маммографии, проведенном группой учёных под руководством Y. Zhang [31], показано, что чувствительность и специфичность МРТ молочных желез превышает показатели рентгеновской маммографии.

В настоящее время возрастает роль МР-маммографии как метода оценки эффективности неоадьювантного лечения. В частности, в 2015 г. в ходе консенсусной конференции в г. Санкт-Галлен МР-маммография была рекомендована как метод выбора для оценки эффективности химиотерапии при раке молочной железы [6]. Это, в первую очередь, связано с тем, что МРТ молочных желез наиболее точно в сравнении с маммографией, УЗИ и объективным осмотром отражает истинные границы как первичной, так и

остаточной после лечения опухоли, является воспроизводимым и оператор-независимым методом. Размеры опухоли, определяемые с помощью МРТ, чаще совпадают с патоморфологическими измерениями, что крайне важно при планировании объема хирургического вмешательства, в особенности органосохраняющей операции [34; 35]. В связи с этим МР-маммографию рекомендуют проводить вместе с другими методами лучевой диагностики до начала НПХТ [38].

В процессе лекарственного лечения РМЖ изменяются размеры опухоли, регистрируется изменение характера, распределения и интенсивности накопления контрастного вещества, уменьшается перипухолевый и префекторальный отёк, исчезает доминирующий питающий сосуд и снижается кровоснабжение опухоли. В качестве предикторов ответа на НПХТ различные исследователи отмечали изменения функционального объёма опухоли, индекса патологической васкуляризации [32; 33].

В то же время, некоторые исследователи считают, что наличие полного клинического ответа на проведенную НПХТ по данным МРТ молочных желез не позволяет с достаточной точностью прогнозировать полный патоморфологический регресс опухоли, а само исследование не способно заменить послеоперационное гистологическое исследование [36]. По данным исследования NEONAB, точность МРТ молочных желез как предиктора pCR варьирует в зависимости от подтипа опухоли. Так, у пациенток с HER2-положительным подтипом РМЖ чувствительность метода составляла 58%, а специфичность 100%. Авторы отмечают более высокую точность метода в предсказании pCR при уровне индекса пролиферации Ki-67 более 15% [37]. По мнению других авторов, МРТ наиболее точно прогнозирует полный лекарственный патоморфоз при тройном негативном и HER2-позитивном подтипах РМЖ [132].

МР-маммография позволяет выявить макроструктурные изменения ткани опухоли, в то время как сдвиги на клеточном и биохимическом уровне оказываются нераспознанными [39]. Поэтому в настоящее время исследуются

возможности таких вариантов применения МРТ как МР-диффузия и МР-спектроскопия. При МР-спектроскопии и диффузионно-взвешенной МРТ получают функциональные изображения, которые, в отличие от стандартных анатомических изображений учитывают патофизиологические особенности тканей. Это принципиально важно, так как метаболические изменения в тканях развиваются до изменения объема и плотности образования [38, 39]. В этой связи в настоящее время широко изучаются возможности применения МР-спектроскопии и МР-диффузии в качестве методов ранней оценки неoadьювантного лекарственного лечения при раке молочной железы [38; 41].

1.3.1. МР-спектроскопия

МР-спектроскопия на сегодняшний день является одним из способов, позволяющих неинвазивно провести исследование обмена веществ в обычных и патологически измененных тканях. По данным мета-анализа Sardanelli F. и соавт., чувствительность МР-спектроскопии в диагностике рака молочной железы составляет от 71 до 74% [41].

Основными метаболитами, пики которых определяются «*in vivo*» в протонном МР-спектре, являются холин, фосфохолин, глицерофосфохолин, миоинозитол и другие. Значения пиков этих метаболитов почти неразличимы, поэтому их совокупность называется общий холин или просто холин (total Choline - tCho). В настоящее время считается, что высокий уровень холина является показателем мембранного обмена, который активно используется при оценке опухолей головного мозга и предстательной железы. В отношении опухолей молочных желез изменения этого показателя активно изучаются. В частности, показано, что уменьшение пика холина может являться одним из ранних маркеров ответа опухоли на НПХТ [42; 43; 44; 45].

В исследовании M. Cheng и соавт. отмечено, что снижение уровня tCho может являться ранним неинвазивным маркером выраженности ответа на неoadьювантную химиотерапию с включением доцетаксела [46]. H. Baek и соавт. в 2009 году определили, что изменение уровня общего холина (total Choline, tCho)

было связано с большей частотой pCR [47]. N. Cho и соавт. в 2016 г. предложили использовать МР-спектроскопию в качестве альтернативы ПЭТ – КТ при оценке эффективности НПХТ[48]. М. Сао и соавт. оценивали возможности МР-метаболического профилирования в прогнозировании общей и безрецидивной выживаемости. Общая и безрецидивная выживаемость, по результатам их исследования, была выше среди пациентов, опухоли которых характеризовались более высокими уровнями tCho и более низкими уровнями лактата [49].

В то же время, для МР-спектроскопии характерны существенные методологические ограничения, в том числе высокая продолжительность исследования, нестабильное качество получаемых спектров, трудности при стандартизации и проведении количественной оценки концентрации tCho в ткани.

1.3.2. Диффузионно-взвешенная МРТ

Диффузионно-взвешенная магнитно-резонансная томография (МР-диффузия) - метод магнитно-резонансной томографии, позволяющий получить изображения биологических тканей *in vivo*, взвешенные по диффузии молекул воды на микроструктурном уровне. Интенсивность сигнала на диффузионно-взвешенном изображении (ДВИ, англ. DWI – diffusion weight imaging) отражает диффузионную способность молекул воды в вокселе (трехмерный пиксель) исследуемого объекта [28].

Различная степень ограничения свободной диффузии молекул воды является потенциальным источником контрастности изображения. Патологические процессы, приводящие к повышению клеточности и уменьшению мембранных пространств, вызывают также изменение диффузии молекул воды, что может быть выявлено на ДВИ и измерено при вычислении измеряемого коэффициента диффузии (ИКД, англ. Apparent Diffusion Coefficient – ADC). Диффузно-взвешенные магнитно-резонансные изображения обеспечивают контрастность изображения, зависящей от случайного микроскопического движения протонов воды, которая может быть существенно изменена различными патологическими процессами. Важным преимуществом ДВ-МРТ является то, что

данный режим в большинстве центров интегрирован в стандартные протоколы МР-маммографии.

Для нормальной ткани МЖ характерны высокие значения ИКД ($2,09 \pm 0,27 \times 10^3$ мм²/с), поскольку вода проходит через нее относительно свободно. В большинстве видов солидных злокачественных образований ИКД снижен, так как опухолевые клетки более плотно расположены, а межклеточные пространства практически отсутствуют, что снижает скорость диффузии молекул воды. Критерием злокачественного процесса является пороговое значение ИКД $1,20 \times 10^3$ мм²/с [51; 52; 40]. По данным мета-анализа F. Sardanelli и соавт. чувствительность МР-диффузии в диагностике рака молочной железы превышает показатели МР-спектроскопии и составляет 84-91%, специфичность 75-84% [40].

По мере прогрессирования заболевания центральные отделы опухоли могут подвергаться распаду вследствие ишемии, интенсивность сигнала от участков некроза на ДВИ снижается, а значения ИКД растут, превышая значения ИКД в неизменной ткани. Схожим образом, эффективное лекарственное лечение приводит к уменьшению клеточности, расширению межклеточных пространств и изменению диффузии, что позволяет применять ДВ-МРТ для динамической оценки эффективности лечения рака молочной железы. Кроме того, изменение диффузии молекул воды в опухоли на фоне проводимой химиотерапии вследствие динамики клеточной плотности, появления некроза и/или апоптоза происходит быстрее, чем изменение объема опухоли, что может служить ранним предиктором ответа на проводимую терапию [53; 54; 55]. В работе E. Vufi и соавт. показано, что коэффициент диффузии, определяемый при ДВИ, не позволяет прогнозировать развитие pCR в общей популяции пациенток в процессе НПХТ, однако эффективен в группе больных с тройным негативным и HER2-положительным РМЖ [56].

В исследовании H.J. Shin и соавт. были изучены возможности использования МР-спектроскопии и МР-диффузии в оценке эффективности НПХТ у больных раком молочной железы, а именно в прогнозировании pCR.

Было показано, что изменение ИКД после НПХТ было наиболее точным предиктором pCR [57].

В целом, необходимо отметить, что возможность применения таких современных вариантов МРТ, как МР-спектроскопия и МР-диффузии, для ранней оценки и прогнозирования эффективности НПХТ при раке молочной железы остается спорным и недостаточно изученным вопросом.

1.4. Другие методы оценки эффективности НПХТ.

1.4.1. Радионуклидные методы

Для оценки эффективности неoadъювантной химиотерапии при РМЖ успешно применяется сцинтимаммография (СМГ) с ^{99m}Tc -технетрилом и его аналогами (^{99m}Tc -tetrafosmin, ^{99m}Tc -Q-12, ^{99m}Tc – ^{99m}Tc -MIBI). Чувствительность СМГ с ^{99m}Tc -технетрилом зависит от стадии процесса и размера опухоли. При T1 (размеры опухоли до 2,0 см) этот показатель составляет 81%, при T2-T4 (размеры более 2,0 см) - 96,7%. Специфичность метода составляет 82,5% и 96,4%, соответственно [128; 75].

Более низкая чувствительность метода в выявлении злокачественных новообразований малых размеров связана с невысоким пространственным разрешением гамма-камер, которое даже в современных приборах не превышает 1 см. Для выявления метастатического поражения регионарных лимфоузлов при раке молочной железы чувствительность сцинтиграфического метода составляет 62,1%, специфичность - 85,4% [58]. Расчет индекса накопления радиофармпрепарата (РФП) в очаге позволяет количественно оценить метаболические изменения в тканях молочной железы в процессе лечения. Скорость выведения РФП из опухолевой клетки прямо пропорциональна содержанию в ней Р-гликопротеина, уровень которого обуславливает лекарственную резистентность опухоли. В связи с этим хороший ответ на химиотерапию отмечается в опухолях с высоким уровнем накопления ^{99m}Tc -технетрила. Эффективность лечения оценивается по снижению первоначальных

показателей индекса очаг/миокард, очаг/фон, а также по уменьшению объема опухолевого узла [58].

Для оценки диагностических возможностей СМГ при оценке ответа опухоли на проводимую НПХТ группой исследователей под руководством П.В. Криворотько проведено сравнение результатов сцинтиграфии с гистологическими данными о лечебном патоморфозе опухоли. Наиболее информативным было проведение СМГ после 2-3 курсов НПХТ. Чувствительность составила 88,8%, специфичность – 81%, диагностическая точность – 81,9%. Авторы указывают на высокую диагностическую ценность СМГ в качестве метода, позволяющего в динамике получать информацию об ответе на проводимое лечение [59]. Сцинтимаммография (SMG) с Tc-99m (Tc-MIBI) является надежным методом прогнозирования ответа опухоли на лечение. Методика позволяет определить пациентов с низкой, промежуточной и высокой вероятностью полного ответа на НПХТ после двух-трех циклов НПХТ [60; 61].

Позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) с 18-фтор-дезоксиглюкозой (18-ФДГ) даёт возможность на молекулярном уровне изучить происходящие в организме биохимические процессы. 18-ФДГ, попадая в клетки опухоли, участвует только в начальных этапах гликолиза и не распадается, за счет чего происходит ее накопление (феномен «метаболической ловушки»). При наличии положительного ответа опухоли на лечение наблюдается быстрое снижение метаболизма глюкозы в опухоли, опережающее морфологические изменения в очаге. Проведен ряд исследований, доказывающих эффективность применения ПЭТ с 18-ФДГ для оценки опухолевого ответа на системную терапию. Однако стоит отметить, что специфичность метода недостаточно высока за счёт активного накопления ФДГ в очагах воспаления и некроза (химиоиндуцированные эффекты), что увеличивает количество ложноположительных результатов [62].

1.4.2. Томосинтез молочных желез.

Томосинтез (ТС) молочных желез - модификация цифровой маммографии, при которой с использованием вращающейся по дуге трубки и рентгеновских

лучей получают срезы молочной железы, преобразуемые впоследствии в объемное изображение, обрабатываемое компьютерной программой. Методика зарекомендовала себя при рентгенологически плотном фоне молочных желез (III и IV тип плотности ткани молочных желез по классификации Wolfe, 1987г.), в комплексной диагностике непальпируемых узловых образований [143]. Томосинтез для оценки эффективности НПХТ в России не применяется. J. Park и соавт. сравнили точность томосинтеза, МРТ молочных желез (без динамического контрастирования), маммографией и автоматического ультразвукового исследования молочных желез в предсказании полного патоморфологического ответа в группе женщин (N=51), получавших НПХТ при РМЖ. По их данным, томосинтез и МРТ молочных желез позволяют наиболее точно оценить размеры остаточной опухоли и являются наиболее информативными методами в предсказании pCR, по сравнению с маммографией и автоматическим ультразвуковым исследованием молочных желез [144].

1.5. Оценка эффективности неоадьювантной химиотерапии с помощью биологических опухолевых маркеров

1.5.1. Циркулирующие опухолевые клетки

Одним из предикторов метастатического поражения и неблагоприятного отдаленного прогноза является наличие у пациента циркулирующих в кровотоке опухолевых клеток (ЦОК). В связи с недостаточной точностью разработанных диагностических систем и гетерогенностью популяций ЦОК их применение в рутинной клинической практике затруднено [65]. Поэтому представляется актуальным изучение количественного и качественного состава опухолевых клеток, циркулирующих в крови больных раком молочной железы, а также отработка методологии их выявления [66].

Впервые инвазию опухолевыми клетками вен и лимфатических сосудов у больного базально-клеточным раком кожи обнаружил К. Tirsch в 1865 г., а в 1869 г. Т. R. Ashworth сообщил о наличии опухолевых клеток в сосудах пациента, умершего от метастатического рака [67]. На сегодняшний день считается, что

ЦОК являются ключом к пониманию биологии процесса метастазирования и биомаркером нового поколения, позволяющим неинвазивно изучать эволюцию опухоли в процессе лечения.

ЦОК представляют собой гетерогенную популяцию клеток опухоли, попавших в кровеносное русло. Это эпителиальные опухолевые клетки, мезенхимальные опухолевые клетки, клетки с гибридным эпителиально-мезенхимальным фенотипом, стволовые клетки и опухолевые микроэмболы [68].

Экспериментально установлено, что ежедневно из 1 г опухолевой ткани в кровотоки может поступать до 4 миллионов опухолевых клеток. При этом не более 0,01% из этих клеток способны развиться в макроскопически определяемый метастаз [68]. Однако имеются данные о том, что некоторые опухолевые клетки способны циркулировать в кровотоке в течение длительного времени [71].

Более 85% эпителиальных клеток погибают в кровотоке, превращаясь в апоптотические тельца. Этому способствуют гемодинамический стресс и взаимодействие с клетками иммунной системы. Для выживания опухолевых клеток в кровотоке необходимо наличие мезенхимальных свойств, позволяющих клетке проникать через базальную мембрану и активировать антиапоптотическую программу.

Феномен эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) опухолевых клеток был описан в ходе исследований на куриных эмбрионах Е. Нау и соавт. в 1995 г. [69]. Это необходимый этап процесса метастазирования, во время которого происходят морфологические трансформации клеток: возникают изменения размера и формы, развиваются плеоморфизм клеток и ядер, гиперхромазия, гиперплоидность, изменяется их митотическая активность [70]. В процессе ЭМП клетка постепенно теряет набор эпителиальных антигенов (панцитокератины) и приобретает мезенхимальные признаки (экспрессия виментина, гладкомышечного актина, фибронектина). Тем самым феномен ЭМП оказывает влияние на формирование гетерогенности ЦОК [68].

1.5.2. Основные методики идентификации ЦОК

Выделение и идентификация в кровотоке ЦОК затруднены ввиду их малого количества и гетерогенности [71; 72]. В настоящее время известно, что ЦОК в большинстве случаев несколько больше по размеру, чем обычные клетки крови [73], а также экспрессируют на своей поверхности эпителиальные молекулы клеточной адгезии (ЕpCAM). Также в качестве маркеров ЦОК в крови могут применяться цитокератин 19, эпителиальный муцин (MUC1 и MUC2), маммоглобин и другие маркеры [73].

На сегодняшний день разработано множество способов и технологий для выделения и обогащения ЦОК, большинство из которых высокочувствительны, однако недостаточно специфичны и не позволяют изучать морфологические особенности ЦОК [66]. Наиболее часто применяют иммуномагнитные, фильтрационные методы, технологии, в которых используются портативные чипы и фильтрующие микроустройства. Среди систем обнаружения ЦОК заметную роль играют методики, подразумевающие прямую визуализацию клеток, например, иммуноцитохимические методы, иммуномагнитная сепарация (система CellSearsh®), автоматическая цифровая микроскопия (FAST+ADM) и лазерная сканирующая цитометрия (MAINTRAC).

Наиболее распространенные в клинической практике иммуномагнитные методы основаны на взаимодействии эпителиальных маркеров опухолевых клеток (ЕpCAM) с магнитными частицами, нагруженными соответствующими антителами. В частности, работающая по данной схеме технология CellSearsh® позволяет полуавтоматизированным способом выявить циркулирующие ЕpCAM(+), CD45 (-) клетки и может применяться для диагностики ЦОК у пациентов с метастазами рака молочной железы, простаты, толстой кишки [74].

Схожий принцип использован в перспективной технологии CTC-chip. Данная микропроточная система позволяет с высокой специфичностью количественно определить наличие ЦОК в образце крови при помощи связывания клеток с антителами против ЕpCAM, которыми покрыты ячейки чипа [74].

Для обнаружения жизнеспособных эпителиальных ЦОК используется функциональный тест EPISPOT (Epithelial ImmunoSPOT). Данная технология оценивает присутствие ЦОК на основе выделяемых ими белков в процессе культивирования в течение 1-2 суток [76].

Довольно широко используются фильтрационные методики. В последние годы в мире внедряется основанная на вакуумной фильтрации технология выделения ЦОК по размеру (ISET). Для нее наряду с высокой чувствительностью характерна достаточная для оценки морфологии клеток специфичность. Методика основана на фильтрации крови через мембрану с калиброванными порами (ISET – Isolation by Size of Tumor cells) [66, 77].

Впервые методика выделения, а также дальнейшей иммуноморфологической и молекулярно-генетической характеристики ЦОК ISET была описана коллективом авторов под руководством профессора P.Paterlini-Bréchet в 2007г. Для анализа используется кровь пациентов в количестве от 1 до 10 мл, которая фильтруется через поликарбонатную мембрану с калиброванными цилиндрическими порами диаметром 8 мкм. После фильтрации мембрана высушивается, промывается и окрашивается. Окрашенные препараты анализируются врачом-цитологом с помощью светового микроскопа. Для установления злокачественной природы клетки требуется наличие не менее 4 из следующих 5 критериев: анизонуклеоз (отношение $>0,5$), размер ядра >16 мкм, нерегулярность ядерного контура, наличие клеточных комплексов, высокое нуклеарно-цитоплазматическое отношение. При отсутствии одного либо нескольких критериев клетка признается атипичной [66; 78].

Методика показала чувствительность, превосходящую показатели CellSearch, при изучении образцов крови пациентов с раком легкого, простаты, РМЖ. Так, ISET и CellSearch позволили выявить ЦОК у 17/20 и 15/20 пациенток с раком молочной железы, 20/20 и 18/20 пациентов с раком простаты, 20/20 и 9/20 больных с раком легкого. В большинстве случаев ISET позволял выявлять больше клеток, чем CellSearch [79; 80; 81]. С помощью данной технологии возможно не только изолировать содержащиеся в образце крови ЦОК, но и выполнить в

последующем иммуно-молекулярную характеристику, включая определение экспрессии эпителиальных и мезенхимальных маркеров, а также провести анализ мутаций в генах EGFR, KRAS, ALK и HER2 [66].

1.5.3. ЦОК в оценке эффективности неоадьювантной химиотерапии рака молочной железы

В 90-е годы XX века было показано, что ЦОК обнаруживаются в крови 30% больных ранним раком молочной железы, 36% больных местно-распространенным РМЖ и 70% с метастатическим раком. Выявление клеток в периферической крови не зависит от возраста, менструальной функции, стадии, гистологического типа опухоли, уровня экспрессии рецепторов прогестерона, c-erbB2, p53 и Ki67 [66].

Было показано, что содержание опухолевых клеток в крови изменяется в зависимости от эффективности лечения и может быть использовано для оценки ответа на проводимую терапию при применении схем CMF, FEC, доцетаксела, тамоксифена, анастрозола [82]. Обнаружение ЦОК в крови пациенток после окончания лечения увеличивает риск рецидива заболевания, а персистенция ЦОК коррелирует с более низкой медианой безрецидивной и общей выживаемости [68]. В исследовании N. Xenidis и соавт., обнаружение цитокератин-положительных ЦОК в процессе адьювантной гормонотерапии тамоксифеном являлось независимым прогностическим фактором плохого прогноза заболевания [84]. По данным другого исследования, у женщин с персистенцией ЦОК после окончания лечения, наблюдалась достоверно более длительная продолжительность интервала без прогрессирования по сравнению с больными, у которых в динамике отмечалось повышение уровня ЦОК, $p = 0,0126$ [83]. В работах J.J. Gafforio и соавт., выявление цитокератин-положительных ЦОК до начала НПХТ коррелировало с худшим прогнозом заболевания, $p = 0,003$ [85].

Важное исследование значения ЦОК у больных раком молочной железы было проведено в 2004 г. M. Cristofanilli и соавт. [86]. Был установлен прогностически значимый пороговый уровень ErCAM(+) ЦОК в крови больных

диссеминированным раком молочной железы. Пациентки с количеством ЦОК менее 5 на 7,5 мл крови имели большую общую продолжительность жизни (18 и 10,1 мес.) и более длительный безрецидивный интервал (7,0 и 2,7 мес.) по сравнению с теми, у кого число ЦОК было выше.

Большое количество исследований посвящено обнаружению ЦОК при метастатическом раке молочной железе и сравнению рецепторного статуса циркулирующих опухолевых клеток, первичной опухоли и метастатических очагов. По данным О.Б. Бжадуг, ЦОК выявляются у 41,3% больных диссеминированным РМЖ. Динамика содержания ЦОК в процессе химиотерапии в 71% случаев совпадает с клинической оценкой эффективности лечения. При нарастании количества ЦОК, отмечено прогрессирование заболевания в короткие сроки после окончания лечения. По мнению автора, динамика содержания ЦОК в процессе химиотерапии является дополнительным, объективным критерием эффективности лечения, количество ЦОК не зависит от локализации и количества метастазов [87].

С. Alix-Panabieres и соавт. в 2014 г. при исследовании ЦОК в крови 254 больных метастатическим раком молочной железы с помощью методики EPISPOT обнаружили опухолевые клетки у 59% женщин [88]. В другом исследовании проведено сравнение рецепторного статуса первичной опухоли, метастазов и циркулирующих клеток. Проанализированы образцы крови 96 женщин с прогрессированием рака молочной железы. Частота выявления ЦОК с использованием AdnaTest составила 43% (36/84 пациента), при этом у 50% женщин определялась гиперэкспрессия HER2-neu (18/36 пациентов), у 19% положительные РЭ (7/36 пациентов) и 8% РП (3 / 36 пациентов), соответственно. Частота совпадения рецепторного статуса первичной опухоли и ЦОК в крови больных при прогрессировании заболевания составила 59% ($p = 0,262$) для HER2-neu , 39% ($p = 0,51$) – для РЭ, и 44% ($p = 0,62$) - для РП. При этом частота совпадения рецепторного статуса метастатических очагов и ЦОК в крови больных при прогрессировании заболевания составляла 67% для HER2-положительных опухолей ($p = 0,04$), 43% для РЭ-положительных ($p = 0,16$) и 46% для РП-

положительных ($p = 0,6$). Авторы сделали вывод, что гиперэкспрессия HER2 в ЦОК является предиктором HER2-статуса метастазов. Оценка статуса РЭ и РП в ЦОК и образцах ткани требует дальнейшего изучения [89].

Показано, что при определении числа ЦОК с помощью методики CellSearch у больных с метастатическим РМЖ, уровень ≥ 5 клеток в 7,5 мл крови ассоциирован с уменьшением времени до прогрессирования и худшим прогнозом заболевания [90].

Большой интерес представляют работы по изучению ЦОК в крови на более ранних стадиях рака молочной железы. S. Apostolaki и соавт. в 2007 г. проанализировали клиническое значение ЦОК у 214 больных РМЖ I-II стадии на фоне адъювантной химиотерапии. Элиминация ЦОК после адъювантной химиотерапии наблюдалась только у 30,2% больных. Обнаружение опухолевых клеток после химиотерапии коррелировало с уменьшением безрецидивной выживаемости и служило независимым фактором неблагоприятного прогноза, $p=0,0005$ [91]. По данным F. Bidard наличие одной и более ЦОК в 7,5 мл крови (по методике CellSearch) являлось независимым фактором неблагоприятного прогноза в группе больных, страдающих ранним раком молочной железы. Авторы отметили, что наиболее значимую прогностическую роль играет определение ЦОК до проведения неoadъювантной химиотерапии [92]. По данным V. Mikulová и соавт. у больных ранним РМЖ ЦОК определялись в 31% случаев, у 7% из них клетки сохранялись после адъювантной терапии [94].

Под руководством Y.J. Lu проведен системный обзор и мета-анализ, посвященный изучению ЦОК у больных с метастатическим РМЖ. Данный мета-анализ включал 24 исследования (3701 пациентов), 13 проспективных и 11 ретроспективных. ЦОК чаще обнаруживались у женщин с HER2-положительным статусом ($RR = 0.73$, 95 % $CI = 0.63-0.84$). Кроме того, высокое количество клеток в процессе лечения указывало на худший ответ на терапию ($RR = 0,56$, 95% $CI = 0,40-0,79$) и коррелировало с более низкой общей выживаемостью ($RR = 0,69$, 95% $CI = 0,64-0,75$) в группе больных с тройным негативным РМЖ. Сделан вывод о

том, что ЦОК является неблагоприятным фактором прогноза заболевания в группе больных с тройным негативным раком молочной железы [93].

Проведен ряд крупных исследований, посвященных оценке значения ЦОК у пациенток операбельным раком молочной железы в процессе неoadьювантной химиотерапии. Наиболее крупными из них являются GEPARQUINTO, GeparQuattro, REMAGUS02, Gunma Hospital, BEVERLY01, NEOAVA, NEOZOTAC, NEOALLTO [95]. Так, в исследовании GeparQuattro (N=213) получены данные, свидетельствующие о том, что современные схемы химиотерапии не могут обеспечить полную элиминацию ЦОК у больных первично операбельным раком молочной железы. Было продемонстрировано, что частота определения ЦОК после проведения неoadьювантной химиотерапии снижается с 21,6% до 10,6%. В группе больных с наличием ЦОК до начала химиотерапии, у 15% клетки не определялись после завершения лечения. Среди пациенток, у которых клетки не определялись до начала лечения, к моменту завершения у 8,3% женщин ЦОК обнаруживались в периферической крови [96].

О. Самара и соавт. изучили динамику ЦОК в процессе НПХТ у 58 женщин. Все больные на 1-м этапе лечения получали агенты антрациклинового ряда, в дальнейшем таксаны, с включением или без трастузумаба. Регистрировалось изменение количества клеток. По результатам исследования, число ЦОК уменьшалось в 10 и более раз после окончания химиотерапии препаратами антрациклинового ряда у 65% женщин с HER2-отрицательным статусом опухоли и у 55% с HER2-положительным и сопровождалось хорошим ответом на лечение (по результатам планового патоморфологического исследования) [97].

I. Alpers и B. Brandt изучали прогностическое значение HER2-положительных ЦОК у больных РМЖ [98]. Наличие и количество HER2-положительных ЦОК коррелировали с достоверным снижением безрецидивной и общей выживаемости. Было доказано наличие HER2-положительных ЦОК у больных с HER2-отрицательной первичной опухолью. Высказано предположение о том, что большое число HER2-положительных ЦОК отражает высокую активность опухоли и может служить прогностическим фактором эффективности

трастузумаба. Наличие HER2-положительных ЦОК у больных РМЖ без метастазов может быть специфическим индикатором наличия отдаленных микрометастазов. Тот факт, что Her2-положительные ЦОК могут определяться у значительного процента больных с Her2-отрицательными первичными опухолями в процессе прогрессирования заболевания, подтверждает возможность появления генной амплификации в ходе развития заболевания [99; 100].

В целом, несмотря на большое число посвященных ЦОК при раке молочной железы исследований, возможность использования динамики ЦОК для ранней оценки и прогнозирования эффективности НПХТ остается недостаточно изученным вопросом.

1.6. Аномальное метилирование ДНК в оценке НПХТ при раке молочной железы

Эпигенетические изменения регуляции ряда генов вносят значимый вклад в канцерогенез, возникая при этом задолго до клинических проявлений заболевания [101; 102]. Изменение профиля метилирования ДНК генов - супрессоров опухолевого роста является одним из наиболее ранних и часто встречающихся эпигенетических событий, наблюдаемых, в том числе, при РМЖ [103].

Метилирование ДНК – обратимый процесс присоединения метильной группы (CH_3), который осуществляется при помощи различных подтипов ДНК-метилтрансферазы (DNMT1, DNMT2, DNMT3). Обратные процессы осуществляются с помощью диметилаз [104].

Основными мишенями метилирования в цепях ДНК являются CpG-динуклеотиды. Более половины генов, включая проонкогены и гены-супрессоры опухолевого роста, содержат CpG-островки - места локализации групп CpG-динуклеотидов [105]. В нормальных соматических клетках большинство CpG-островков не метилированы. Метилирование цитозина в составе CpG-островков активирует процесс деацетилирования гистонов, что приводит к изменению конфигурации хроматина и локальному подавлению транскрипции [112]. Переход CpG-островков в гиперметилированное состояние резко снижает экспрессию

генов-супрессоров и приводит к активации процессов канцерогенеза либо прогрессированию опухоли [113].

Метилирование может быть сниженным (гипометилирование) и повышенным (гиперметилирование), глобальным (тотальным) и локальным. Глобальное метилирование генома – одно из наиболее распространенных молекулярно-генетических изменений, приводящих к развитию онкозаболеваний [106; 107; 108].

Н. Cheung и соавт. показали, что локальное гиперметилирование приводит к инактивации генов-супрессоров опухолевого роста [109]. Кроме того, не исключено существование взаимосвязи между стадией заболевания, скоростью прогрессирования и степенью гипометилирования ДНК, что может позволить использовать данный феномен в качестве диагностического маркера и прогнозировать течение заболевания [110, 111].

Гиперметилирование при онкологических заболеваниях происходит чаще, чем гипометилирование. Статус метилирования CpG-островка играет важную роль в регуляции транскрипции генов. В обычных соматических клетках многие CpG-островки не метилированы, но метилированные CpG-островки обнаруживают практически при всех типах первичных опухолей.

Механизмы, активирующие такие разнонаправленные процессы, как гипер- и гипометилирование ДНК, а также механизмы, определяющие специфичность маркеров метилирования для разных типов опухолей, до сих пор недостаточно изучены [114]. Процессы метилирования могут происходить в различных генах, имеющих отношение к развитию опухоли и ее прогрессии. Как правило, при этом затрагивается сразу несколько, важных для развития опухолей генов [115]. Для обозначения совокупности генов, наиболее часто метилированных при определенном типе опухоли, используется термин «метилотип» [116].

Разработано большое количество методов, позволяющих оценивать метилирование ДНК. Наиболее часто используются два из них — методы, основанные на бисульфитной конвертации ДНК (метилспецифическая ПЦР, бисульфитное секвенирование, комбинированный бисульфитно-рестрикционный

анализ (COBRA)) и методы, основанные на расщеплении ДНК эндонуклеазами рестрикции (метилчувствительная ПЦР, метилсвязанная ПЦР). Каждый метод имеет ряд своих достоинств и недостатков, и выбор конкретного метода зависит от задач исследования. Одним из наиболее точных и эффективных методов определения метилирования всех CpG-динуклеотидов анализируемой области является бисульфитное секвенирование [120].

В настоящее время известно, что при РМЖ вследствие гиперметилирования может нарушаться экспрессия более чем 40 генов. Это могут быть гены клеточного цикла (*CDKN2A/p16 -INK4*, *CDKN2B/p15-INK4B*, *CCND2*, *RBI*, *p14/ARF*, циклины D1 и D2), апоптоза (*TMS1*, *TP73*, *CDKN1*, *HOX5*, *MDM2*, *DAPK1*, *TWIST1*, *YTMS1*, *FHIT*, *RASSF1A*, *HIC-1*, *HIN-1*), репарации ДНК (*MGMT*, *BRCA1*, *MLH1*), метастазирования (*CDH1*, *CDH13*, *PCDH10*, *CTNB*), детоксикации (*GSTP1*), RAS-(*RASSF1*) и Wnt-сигнального пути (*APC*, *DKK1*), гормон- и рецептор- опосредованного сигналинга (*ESR1*, *PR*, *ER*, *RAR*, *NORE1*), систем репарации ДНК (*BRCA1*, *BRCA2*, *MGMT*) и детоксикации ксенобиотиков (*GSTP1*) [117; 118; 119].

К настоящему времени обнаружено и идентифицировано большое количество метилированных генов, которые связаны с процессом канцерогенеза, ассоциированы с агрессивной формой опухолевого роста и прогрессированием РМЖ [102; 121]. Показано наличие взаимосвязи между метилированием генов и различными эффектами НПХТ при РМЖ. Так в работе Цыганова М.М. и Щербаковой А.Г. изучалось метилирование промоторов генов множественной лекарственной резистентности и эффект НПХТ в группе больных РМЖ (N=70). Выявлено, что частота метилирования гена *ABCВ1* ассоциирована с различными эффектами НПХТ. Гипометилирование *ABCВ1* в процессе химиотерапии коррелировало с худшим ответом на лечение, тогда как гиперметилирование сопровождалось стабилизацией опухолевого процесса и частичной регрессией [122].

Идентификация и характеристика особенностей метилирования некоторых геномных локусов, вовлеченных в канцерогенез при раке молочной железы, легла

в основу исследования В.О. Сигина и соавт., которые изучили особенности метилирования генов у больных люминальным В типом РМЖ в процессе НПХТ по схеме АС. Методом XmaI-RRBS проведён широкогеномный анализ 27 биопсийных образцов РМЖ, по результатам которого выбраны 10 генов, состояние метилирования промоторов которых наиболее эффективно маркирует эпигенетические подтипы опухолей с разным ответом на НПХТ. Состояние метилирования выбранных маркеров определяли методом МЧ-ПЦР с тремя пулами праймеров в выборке из 40 образцов ДНК биопсийных образцов РМЖ люминального В подтипа, взятых до лечения. По данным широкогеномного анализа метилирования ДНК в качестве наиболее информативных маркеров чувствительности РМЖ к НПХТ с применением антрациклинов определили участки генов SLC9A3, C1QL2, DPYS, IRF4, ADCY8, KCNQ2, TERT, SYNDIG1, SKOR2 и GRIK1. Для проведения локус-специфического тестирования состояния метилирования этих маркеров разработали систему многолокусной МЧ-ПЦР. В результате проведенного исследования сформирована панель из 10 маркеров метилирования ДНК, которая позволяет эффективно прогнозировать ответ опухоли на антрациклиновые схемы химиотерапии у больных люминальным В типом РМЖ. Определены диагностические свойства системы: чувствительность системы - 82% при специфичности 80%, точность - 82% [123; 124; 125; 138].

1.7. Заключение

Показания к применению неоадьювантной полихимиотерапии при РМЖ II-III стадий расширяются. Постоянно дополняется спектр лекарственных средств и их комбинаций, в т.ч. таргетных, которые могут применяться при РМЖ на предоперационном этапе лечения. В то же время, многочисленные неинвазивные способы оценки эффективности НПХТ существенно уступают по точности гистологическому исследованию операционного материала, особенно в ранние сроки после начала лечения.

Большое число исследований посвящено поиску более эффективных способов прогнозирования эффективности НПХТ при раке молочной железы.

Значительная часть из них посвящена использованию современных рентгенологических методов. Прежде всего, всесторонней оценке подвергаются возможности МРТ с динамическим внутривенным контрастированием, а также таких вариантов магнитно-резонансного исследования, как МР-спектроскопия и диффузионно-взвешенная МРТ.

Наряду с рентгенологическими методиками бурное развитие в последние десятилетия получили методы серологической оценки динамики опухолевого процесса. Показано, что число циркулирующих в кровотоке пациенток РМЖ опухолевых клеток зависит от проводимой терапии и может служить маркером ее эффективности. Однако возможность использования данного биомаркера для ранней оценки и прогнозирования эффективности НПХТ изучена недостаточно.

Наконец, одним из наиболее перспективных с клинической точки зрения молекулярно-генетических тестов представляется оценка эпигенетических изменений и, в частности, гиперметилирования ДНК в опухоли и циркулирующем в кровотоке генетическом материале.

Необходимо констатировать, что на сегодняшний день отсутствуют биологические маркеры, позволяющие в ранние сроки после начала НПХТ (1-2 цикла) с достаточной степенью надежности прогнозировать ее эффективность. В то же время, выявление таких маркеров или их наиболее прогностически значимого сочетания позволит повысить эффективность лечения у больных РМЖ II-III стадии и требует дальнейшего изучения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Общая характеристика пациенток

Исследование проведено на базах кафедры онкологии ФГБОУ ДПО РМАНПО: ФГАУ «ЛРЦ» Минздрава России, Клиническая больница № 1 «МЕДСИ» в Отрадном. В период с 2015 по 2018 г. в проспективное исследование было включено 85 женщин старше 18 лет с верифицированным раком молочной железы, II-III стадиями заболевания. В исследование были включены больные с операбельными и первично-неоперабельными (местно-распространенными) формами рака молочной железы (II и III стадии заболевания, T 1 – T 4, N1 – N 3, M0). Критериями исключения являлись отказ от участия в исследовании, наличие абсолютных противопоказаний к проведению магнитно-резонансной томографии (МРТ) молочных желез (установленный кардиостимулятор или кохлеарный имплантат), первичная отёчно-инфильтративная форма рака молочной железы.

Возраст больных на момент постановки диагноза варьировал в пределах от 30 лет до 81 года (медиана возраста 55 лет). Среди них 42 (49,4 %) женщины с сохранной функцией яичников, 43 (50,6 %) – в менопаузе. Оценка менопаузального статуса проводилась на основании заключения гинеколога и исследования уровня гормонов крови (ФСГ, ЛГ, эстрадиол). Критериями менопаузы считали (согласно рекомендациям Российского общества клинической онкологии (RUSSCO) 2016 г.) билатеральную овариэктомию, возраст 60 и более лет, при возрасте менее 60 лет аменорею в течение 12 и более месяцев в сочетании с постменопаузальными уровнями ФСГ и эстрадиола в отсутствии химиотерапии, терапии тамоксифеном, торемифеном [139].

Анализ крови на генетические мутации, чаще всего встречающиеся при РМЖ (BRCA1, BRCA2, CHEK2, tp53) был выполнен 48 (56,5%) женщинам в исследовании. Все эти пациентки входили в группу риска по выявлению наследственного РМЖ. При этом у 7 (14,6%) женщин были обнаружены генетические мутации: у 5 (10,4%) из них в гене BRCA1, у 2 (4,2%) – в гене

СНЕК2. Профилактическая мастэктомия контрлатеральной молочной железы была выполнена 3 (42,8%) из них.

Большая часть пациенток, включенных в протокол исследования, имели IIb и IIIb стадии заболевания – 33(38,8%) и 18 (21,2%) соответственно. Стадии IIa, IIIa и IIIc встречались примерно с одинаковой частотой – 15,3%, 12,9%, 11,8% соответственно (Рисунок 1).

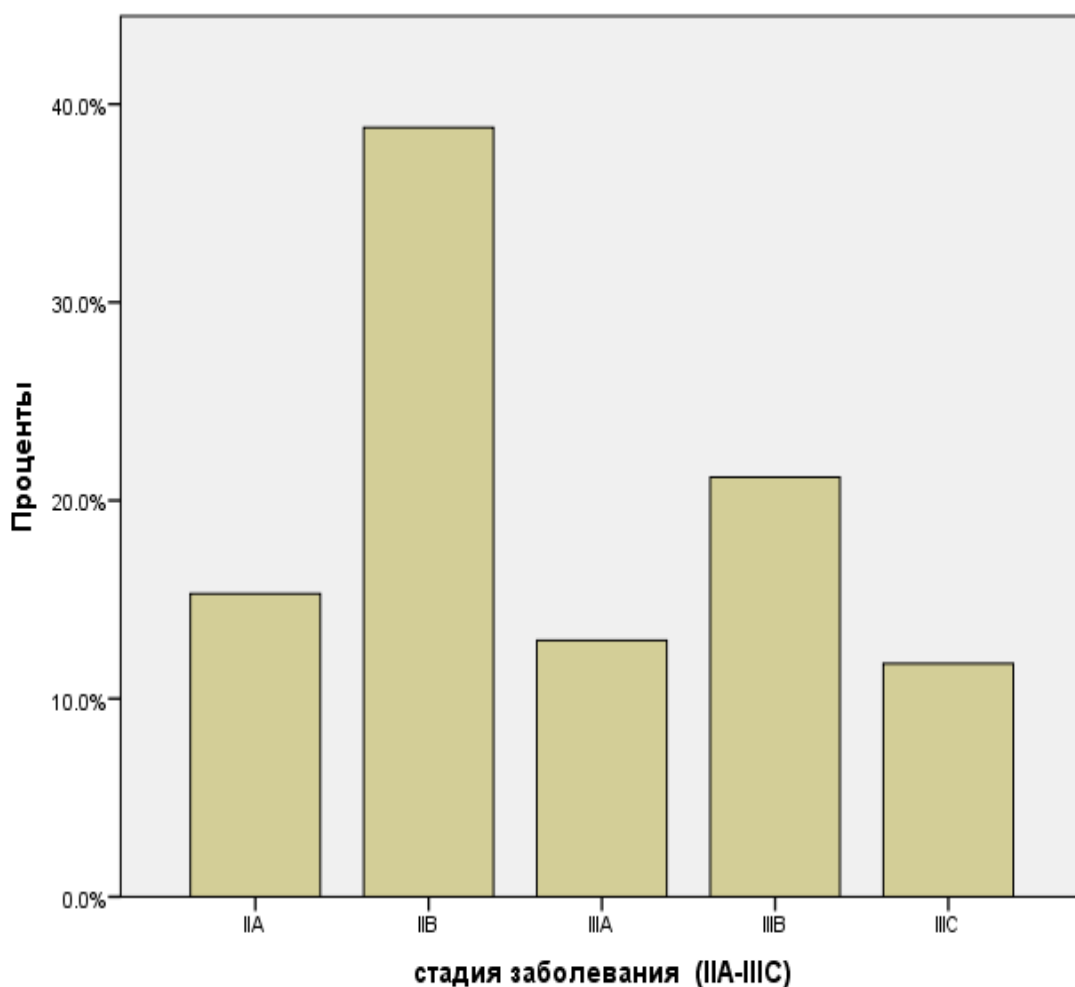


Рисунок 1 – Распределение пациенток по стадии заболевания, %

Распределение по локализации процесса: заболевание левой молочной железы встречалось – у 43 (50,6%) женщин, правой – у 42 (49,4%). Размер опухоли варьировал от 2,0 до 5,0 см в 57 (67,1%) случаях. Наличие пораженных лимфатических узлов до начала лечения, подтвержденное тонкоигольной аспирационной биопсией, а также по данным УЗИ молочных желез и МРТ желез с

контрастированием наблюдалось в 71 (83,5%) случае. Из них: N1 (метастаз(ы) в подвижный подмышечный лимфатический узел (узлы) I, II уровня, расположенный на той же стороне тела) – у 45 (52,9%) женщин, N2 (метастазы в расположенных на той же стороне тела подмышечных лимфоузлах I, II уровня, клинически определяющихся как конгломерат) - у 17 (20%), N3 (метастазы в подключичном и/или надключичном лимфатическом узле (узлах) расположенном на той же стороне тела) – у 9 (10,6%). По данным комплексного обследования, поражение внутригрудных лимфатических узлов у данной группы больных не встречалось.

На первом этапе лечения всем пациенткам проведено предоперационное лекарственное лечение, которое назначалось с учетом стадии заболевания и гистологического и биологического подтипов опухоли.

В нашем исследовании наиболее часто встречающимся гистологическим типом опухоли был инфильтративный протоковый рак, который наблюдался у 73 (85,8%) женщин. Инфильтративный дольковый рак встречался у 8 (9,4%) пациенток. Значительно реже встречались смешанные раки и другие гистологические варианты (папиллярный, тубулярный, медуллярный, слизистый и др.) – 4 (4,7%).

Равное количество больных в протоколе исследования имели люминальный В Her2-отрицательный и тройной негативный подтипы опухолей – по 27 (31,8%) женщин в каждой группе. Люминальный А и люминальный В Her2-положительный подтипы встречались примерно с одинаковой частотой – 12 (14,1%) и 11 (12,9%) соответственно. HER2-положительный подтип опухоли наблюдался у 8 (9,4%) женщин (Рисунок 2).

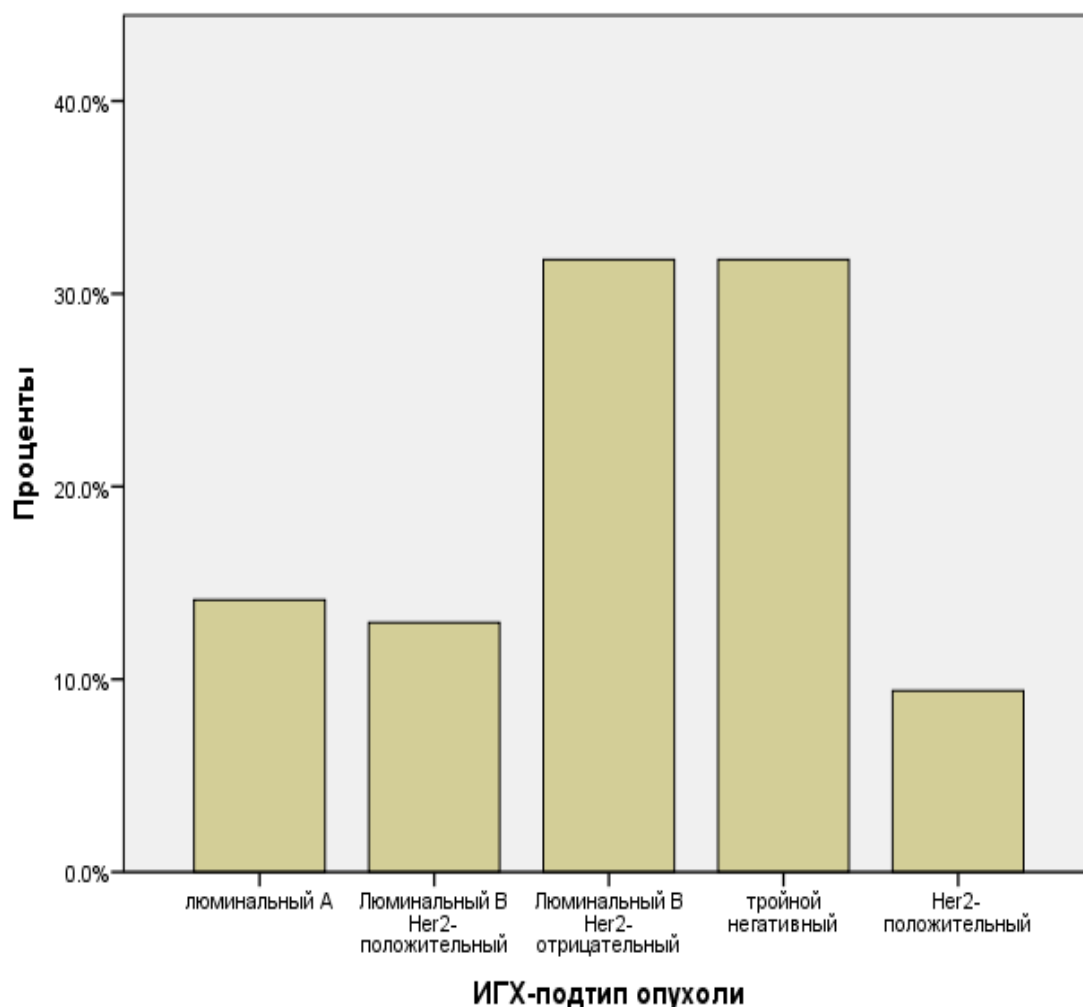


Рисунок 2 – Распределение пациенток по биологическому подтипу опухоли, %

Большая часть больных, включенных в протокол исследования, имели высокоагрессивные низкодифференцированные опухоли. Так степень дифференцировки опухоли G3 (grade3 –низкодифференцированная опухоль) встречалась у 49 (58,3%) женщин, G2 (grade2 – умеренно дифференцированная опухоль) – у 34 (40,5%).

Среднее значение индекса пролиферации Ki67 % – 37,5. Положительный рецепторный статус Her2-neu определялся у 20 (23,5%) женщин, рецепторов эстрогенов в опухоли - у 49 (57,6%), рецепторов прогестерона – у 43 (50,6%) больных.

2.2. Протокол исследования

Все больные перед началом химиотерапии (первый этап исследования) были обследованы согласно рекомендациям RUSSCO, которые включают сбор анамнеза и осмотр; общий анализ крови с подсчетом лейкоцитарной формулы и количества тромбоцитов; биохимический анализ крови, включая показатели функции печени (общий и прямой билирубин, АЛТ, АСТ, ЩФ); билатеральная маммография + УЗИ молочных желез и регионарных зон лимфооттока; по показаниям – МРТ молочных желез; рентгенография органов грудной клетки; по показаниям – компьютерная томография (КТ) органов грудной клетки; УЗИ органов брюшной полости и малого таза, по показаниям – КТ/МРТ органов брюшной полости и малого таза с контрастированием; радиоизотопное исследование скелета + рентгенография зон накопления радиофармпрепарата; биопсия опухоли с патоморфологическим исследованием опухолевой ткани с определением рецепторного статуса опухоли и уровня пролиферативной активности (Ki – 67), оценка функции яичников (определение уровня ФСГ, ЛГ, эстрадиола). Всем больным моложе 50 лет, а также женщинам с неблагоприятными биологическими подтипами опухолей (тройной негативный, HER2-позитивный РМЖ) рекомендовалось исследование крови на генетические мутации. Исследовались гены BRCA 1, BRCA2, CHEK, tp53. Сцинтиграфия скелета проведена всем пациенткам, начиная со II Б стадии. Больным с местнораспространенными и высокоагрессивными подтипами рака проводилась КТ органов грудной клетки и брюшной полости с внутривенным контрастированием.

Всем пациенткам было выполнено развернутое патоморфологическое исследование биопсийного материала: определен гистологический тип опухоли, степень злокачественности по Ellis Elston, экспрессия рецепторов стероидных гормонов, HER2, Ki – 67. Толстоигольная биопсия проводилась в условиях процедурного кабинета под местной анестезией с использованием игл для трепан-биопсии калибром 12G и 14G. В ходе каждой биопсии осуществлялся забор от 5 до 10 столбиков ткани (в среднем 7), 5 из которых шли на плановое гистологическое и иммуногистохимическое исследования, а 2 - для последующего

определения свободно-циркулирующих опухолевых ДНК. Количество образцов зависело от характера получаемой ткани. Материал для генетического исследования замораживался в пластиковом контейнере при температуре -18 С, без добавления нейтрального формалина.

Перед проведением биопсии, помимо стандартных методов обследования, проводили МРТ молочных желез с внутривенным контрастированием + МР-диффузия + МР-спектроскопия, а также забор крови для определения ЦОК по методике ISET, определение аномального метилирования ДНК в опухоли и плазме крови. Данный комплекс диагностических процедур выполнялся в том же объёме (за исключением core-биопсии) после двух курсов химиотерапии, а также по завершению лекарственной терапии, перед выполнением хирургического вмешательства (Рисунок 3).



Рисунок 3 – Протокол исследования

Всем пациенткам были выполнены стандартные методы обследования: осмотр, УЗИ молочных желез и регионарных узлов на всех этапах исследования. Маммография была выполнена 84 пациенткам на 1-м этапе работы и 83 на 2-м и 3-м этапах, в связи с отказом женщин от выполнения исследования. МРТ молочных желез с контрастированием и МР-диффузия были выполнены 84 пациенткам, МР-спектроскопия - 58 женщинам. ЦОК на всех этапах исследования были определены у 59 женщин. У 36 пациенток провели оценку аномального метилирования ДНК в core-биоптатах и периферической крови до начала и после окончания лечения (Таблица 1).

Таблица 1 – Объем исследований, проведенных пациентам на всех этапах лечения

Метод исследования/ количество больных	1 этап (до начала лечения)	2 этап (после 2-х курсов НПХТ)	3 этап (предоперационное обследование)
Осмотр	85 (100,0%)	85 (100,0%)	85 (100,0%)
УЗИ молочных желез	85 (100,0%)	85 (100,0%)	85 (100,0%)
Маммография	84 (98,8%)	83 (97,6%)	83 (97,6%)
МРТ молочных желез	84 (98,8%)	84 (98,8%)	84 (98,8%)
МР-спектроскопия	58 (68,2%)	56 (68,2%)	57 (68,2%)
МР-диффузия	82 (96,4%)	82 (96,4%)	82 (96,4%)
ЦОК	59 (69,4%)	59 (69,4%)	59 (69,4%)
Маркеры аномального метилирования ДНК	36 (42,3%)	36 (42,3%)	36 (42,3%)

На всех этапах лечения, больные обсуждались на онкологическом консилиуме, который включал химиотерапевта, хирурга-онколога, специалиста по лучевой терапии. В случае смены лечебной тактики решения также принимались коллегиально.

Учитывая факторы, влияющие на выбор химиотерапии (морфология опухоли, иммуногистохимический подтип, стадия заболевания, возраст пациентки, наличие сопутствующей патологии), назначалась соответствующая

схема химиотерапии. В лечении больных использовались стандартные режимы, с обязательным соблюдением доз препаратов и интервалов между курсами.

Наиболее часто использовали следующие схемы химиотерапии: AC (доксорубин, 60 мг/м² в/в, циклофосфамид, 600 мг/м² в/в), CAF (циклофосфамид 600 мг/м² в/в, доксорубин 60 мг/м² в/в, 5-фторурацил, 600 мг/м² в/в), паклитаксел 175 мг/м²+карбоплатин AUC 6, доцетаксел 75 мг/м², паклитаксел AUC 6. При HER2-положительных подтипах РМЖ предоперационная лекарственная терапия включала в себя таргетную терапию – ингибиторы рецепторов Her2 neu (трастузумаб, пертузумаб). Среди общего количества женщин, включенных в протокол, 20 (23,5%) имели HER2-положительный рецепторный статус опухоли, из них 10 (50,0%) в неoadьювантном режиме получили таргетную терапию герцептином, 3 (30,0%) - с добавлением пертузумаба.

Лечение с использованием препаратов антрациклинового проведено 32 (37,6%) женщинам, таксанового ряда и (или) препаратами платины – 25 (29,4%), их комбинацией - 28 (32,9%).

Большинство больных в исследовании получили 6 курсов химиотерапии - 47 (56,6%) женщин. Минимальное количество -2 курса химиотерапии получили 3 (3,6%) женщин, 4 курса НПХТ- 11 (13,3%), 8 курсов химиотерапии были проведены 20 (24,1%) женщин в протоколе (Рисунок 4).

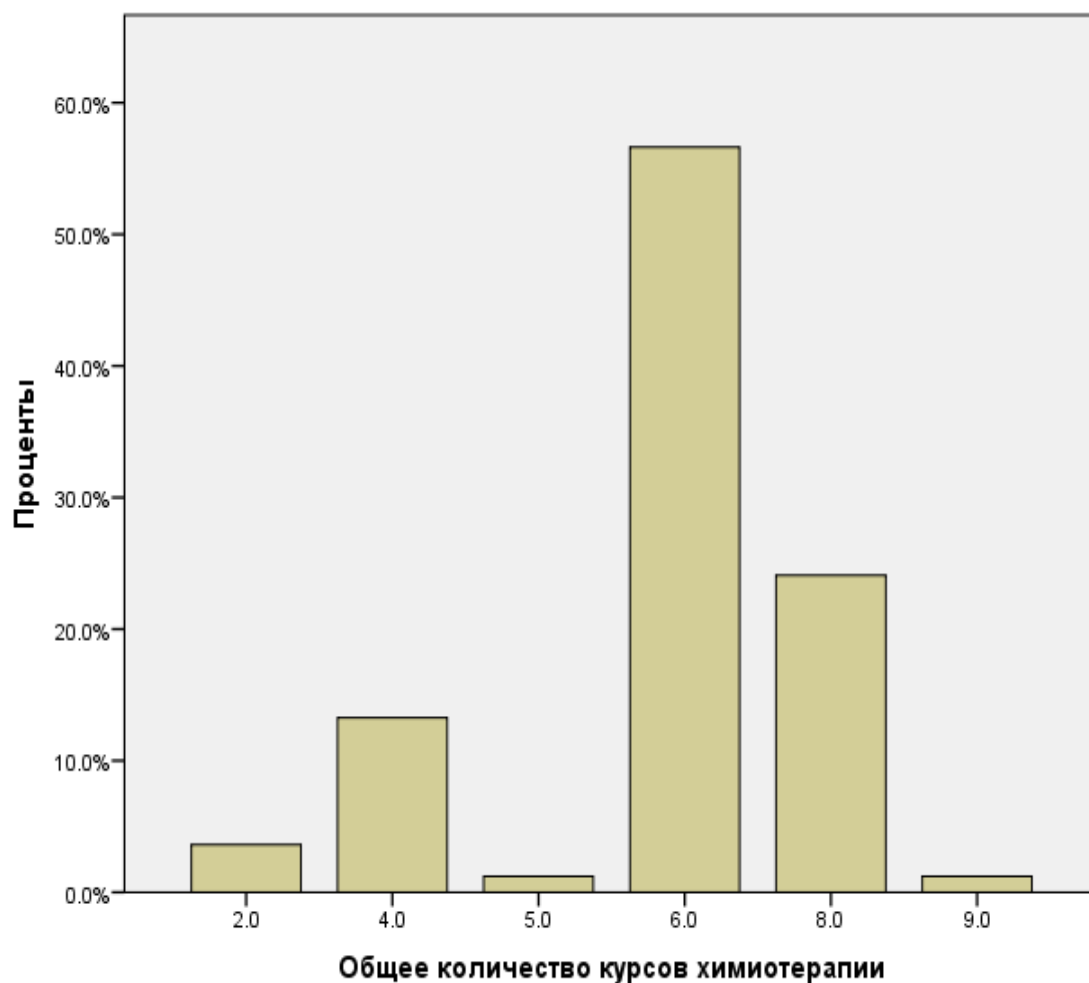


Рисунок 4 – Общее количество курсов химиотерапии

Для клинической оценки ответа опухоли на проводимую терапию и определения прогрессирования опухоли применялись радиологические критерии RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors), модифицированные в 2009 г. (RECIST 1.1) [11]. В настоящее время в рамках критериев RECIST 1.1 проводится оценка эффективности лечения по данным компьютерной и магнитно-резонансной терапии и, в некоторых случаях, традиционной рентгенографии.

Клиническая оценка эффекта неoadъювантной системной терапии проводилась согласно следующим критериям:

- полный регресс (clinical Complete Response, cCR) – полное исчезновение первичной опухоли в молочной железе и регионарных лимфатических узлах;
- частичный регресс (clinical Partial Response, cPR) – уменьшение размеров опухоли на 35% и более;

- стабилизация – критерии, недостаточные для констатации частичного регресса или прогрессирования заболевания;
- прогрессирование заболевания – увеличение размеров опухоли более, чем на 25%.

После окончания химиотерапии всем пациенткам было проведено хирургическое лечение. При возможности органосохранения проводили радикальную резекцию молочной железы, при её отсутствии – радикальную мастэктомию или подкожную (кожесохранную) мастэктомию с одномоментной реконструкцией эндопротезом.

Радикальная мастэктомия по Маддену была выполнена 44 (51,8%) женщинам. Радикальная резекция со срочным гистологическим исследованием краев резекции - 12 (14,1%) женщинам, из них 7(58,3%) – в онкопластическом варианте (методикой ротационного лоскута-5 (71,4%), резекции по типу «Т-инверс»-2 (28,6%)). Подкожная (кожесохранная) мастэктомия с одномоментной реконструкцией экспандером выполнена 24 (28,2%) женщинам. Подкожная мастэктомия с одномоментной реконструкцией имплантом и торако-дорсальным лоскутом (ТДЛ) выполнена 2 (2,4%) пациенткам. Подкожная мастэктомия с одномоментной реконструкцией экспандером (имплантом+ТДЛ) симультанно с профилактической мастэктомией здоровой железы выполнена 3 (42,8%) женщинам - носителям генетических мутаций от общего количества женщин с выявленными генетическими нарушениями (N=7(8,2%)).

Ответ опухоли на лечение по радиологическим критериям RECIST сравнивался со степенью патоморфологического ответа. Для патоморфологической оценки эффективности лекарственного лечения использовалась классификация Г.А. Лавниковой [27]. Она основана на учете изменений общей структуры опухоли на тканевом (соотношение стромы/паренхима, структурная атипия) и клеточном уровнях (степень дистрофии и полиморфизма клеток, митотическая активность). В рамках данной классификации выделяется 4 степени ответа:

- I степень — более 50% опухолевой паренхимы сохранено;
- II степень — сохранено 20–50% опухолевой паренхимы;
- III степень — до 20% паренхимы опухоли сохранилось в виде отдельных очагов;
- IV степень — полное отсутствие опухолевой паренхимы.

За относительно небольшой период наблюдения с сентября 2015 по сентябрь 2018г. (29 месяцев) прогрессирование заболевания наступило у 6 (7,1%) женщин, из них у 2(33,3) – метастатическое поражение легких и плевры, у 1(16,6%) – метастатическое поражение костей черепа, у 3(50,0%) – полиорганные метастазы.

2.3. Стандартные методы оценки эффективности неoadьювантной химиотерапии

2.3.1. Физикальный осмотр

Клиническое обследование молочных желёз проводили всем женщинам на трёх этапах исследования, в хорошо освещенном помещении. Начинали исследование с осмотра молочных желез и определения состояния кожных покровов, затем проводилась поверхностная пальпация от периферии к центру каждой молочной железы, что позволяло определять наличие уплотненных участков в тканях железы. Глубокая пальпация позволяла определить локализацию, консистенцию, размеры, форму, границы и смещаемость выявляемых при поверхностной пальпации участков.

Пальпаторно обследовали каждую железу по квадрантам, начиная с верхне-наружного. Отдельное внимание обращали на околососковую область и субмаммарную складку. При крупных размерах молочных желез пальпация осуществлялась двумя руками, одна из которых находилась под нижней поверхностью железы, а другая прощупывала железу спереди. В конце обследования, путем легкого сжатия области сосков, определялось наличие выделений.

При оценке эффективности предоперационной химиотерапии учитывалась динамика следующих показателей:

- 1) характеристики опухоли – локализация, размеры, контуры, плотность, связь с окружающими тканями;
- 2) состояние кожных покровов (симптом «лимонной корки», симптом «площадки»), подкожной клетчатки, ткани железы;
- 3) наличие и состояние регионарных лимфатических узлов: подмышечных, под-, надключичных.

2.3.2. Маммография

Маммографическое исследование выполнялось всем женщинам на аппарате «Senographe Essential GE» (США). Исследование проводилось в двух проекциях: в медиолатеральной и краниокаудальной, при необходимости выполнялись прицельные снимки образования. Описание маммограмм проводилось согласно рекомендациям системы BI-RADS (Breast Imaging Reporting and Data System – система интерпретации и протоколирования визуализации молочной железы) [63].

При анализе маммограмм оценивалась динамика следующих показателей:

- 1) характеристики опухоли – размеры, рентгенологическая плотность, наличие макро - и микрокальцинатов, связь с окружающими тканями;
- 2) состояние кожных покровов, подкожной клетчатки, ткани железы;
- 3) характеристики регионарных лимфатических узлов;

При оценке эффективности неoadьювантной системной терапии интерпретация маммологических снимков проводилась согласно критериям RECIST 1.1 (см. выше).

2.3.3. Ультразвуковое исследование

УЗИ молочных желез проводили на аппарате ESAOTE MyLab 50 X VISION с использованием линейного датчика частотой 13 МГц. Эхография выполнялась вдоль воображаемых радиарных линий, сходящихся к соску. При наличии

пальпируемого образования датчик ставился непосредственно над ним, после чего выполнялось сканирование.

При анализе эхографической картины изучались размеры и эхогенность опухоли, характер внутренних эхосигналов, контуры, форма, тип кровотока. Также оценивалось состояние премаммарной клетчатки, связок Купера, кожи и регионарных лимфатических узлов (подмышечных, под-, надключичных). Локализация опухоли описывалась согласно общепринятому делению молочной железы на квадранты. Все показатели изучались в динамике с целью оценки ответа на НПХТ.

2.4. МРТ с динамическим контрастированием

Магнитно-резонансная томография молочных желез осуществлялась на аппарате GE Signa Excite HD с напряженностью магнитного поля 1,5 Тл. Исследование проводилось в положении пациенток на животе. Противопоказаниями для проведения МР-томографии было наличие имплантируемых металлоконструкцией в организме (кардиостимулятор, кохлеарный имплантат), аллергических реакций на вводимые контрастные препараты, клаустрофобия. До укладки пациентки производилась катетеризация локтевой вены.

Для первичной оценки структуры молочных желез получали изображение T1 и T2-взвешенное изображение (ВИ) с подавлением МР-сигнала от жира. Далее внутривенно болюсно вводили парамагнитное контрастное вещество из расчета 0,1 ммоль/кг массы тела со скоростью 2 мл/с, с последующим введением 30 мл физиологического раствора. Внутривенное контрастирование проводили парамагнитными контрастными средствами с концентрацией гадолиния 0,5–1 ммоль/мл. Скорость увеличения МР-сигнала (накопление контрастного вещества) и его снижения (вымывание контрастного средства) на ВИ стандартизировались в виде кривых зависимостей интенсивности сигнала от времени. Все виды кривых были классифицированы на 3 типа по характеру их хода в среднюю и позднюю

фазы после введения парамагнитных контрастных веществ: I тип – кривая постоянного роста, II тип – кривая с формированием плато, III тип – кривая вымывания с выраженным максимумом и быстрым снижением амплитуды МР-сигнала (С.К. Kuhl и соавт. 2003г.) [142].

Во всех используемых программах в зону МР-сканирования включались обе молочные железы и аксиллярные области. Использование T1 - ВИ с подавлением сигнала от жировой ткани позволяло провести дифференциальную диагностику между доброкачественными и злокачественными изменениями, оценить васкуляризацию тканей молочных желез (Рисунок 5).

С помощью T2 ВИ с подавлением сигнала от жировой ткани оценивали объём и структуру железистой ткани, ее соотношение с жировой. Также данная последовательность помогала выявить ретромаммарные и аксиллярные лимфатические узлы, признаки нарушения их дифференцировки.

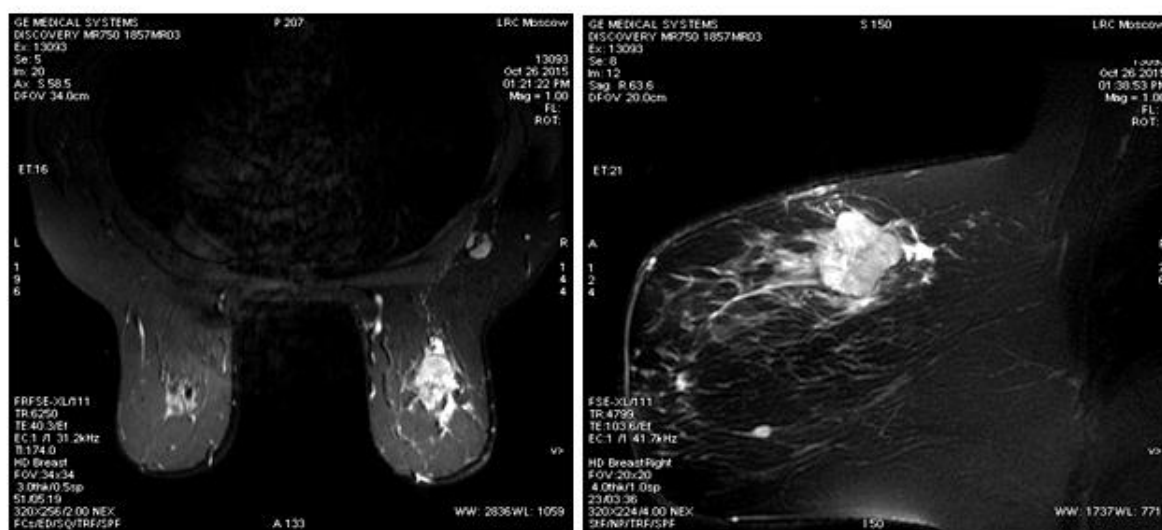


Рисунок 5 – МРТ с контрастным усилением (КУ), опухоль правой молочной железы (T1-ВИ, постконтрастное изображение с подавлением сигнала от жировой ткани, аксиальная и сагиттальная проекции)

Динамика образования правой молочной железы в процессе НПХТ представлена на рисунке 6.

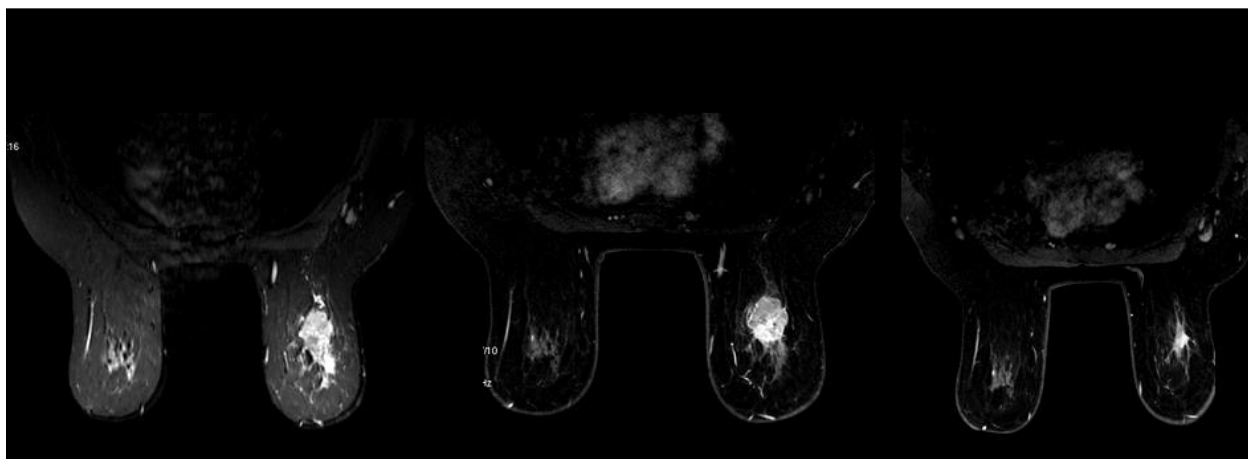


Рисунок 6 – МРТ с КУ, опухоль правой молочной железы до начала лечения, после 2 и 6 циклов НПХТ

2.4.1. МР-спектроскопия

МР-спектрограмма представляет собой график из пиков, соответствующих отдельным метаболитам. Условиями для обнаружения метаболитов в ^1H - спектре являются наличие в их составе протонов водорода; способность резонировать на определенной частоте (так называемое явление химического сдвига); эффективное подавление сигнала от воды. Конкретное положение сигнала от метаболита на горизонтальной оси является постоянной величиной, присущей данному метаболиту. Оно определяется его химическим сдвигом и характеризуется значением «частей на миллион» – parts per million (ppm).

В работе использовалась одновоксельная спектроскопия (single - voxel spectroscopy, SVS). При этом расчет спектров производился из кубического по форме участка опухоли (вокселя) размером $1 \times 1 \times 1 \text{ см}$ (1 см^3). Воксель устанавливался по центру опухоли, без захвата окружающих тканей. Главным недостатком одновоксельной спектроскопии является ограниченная зона исследования, поэтому правильное расположение вокселя и минимизация содержания в нем неизменных тканей молочной железы, особенно жировой, имеют чрезвычайно большое значение. При этом необходимо учитывать, что уменьшение размеров вокселя приводит к резкому падению качества получаемого

спектра. По этой причине изменялось количество повторений, что приводило к увеличению времени исследования.

Положение вокселя должно соответствовать наиболее жизнеспособным участкам опухоли, которые, в противоположность некрозу, накапливают контрастное вещество. В ходе работы нами измерялся метаболизм холина, для чего регистрировался пик на 3,22 ppm.

Холин (Cho) – компонент фосфолипидного метаболизма, маркер клеточных мембран, сопровождающий пролиферацию клеток. Повышение уровня холина отражает более активную пролиферацию клеток, т.е. свидетельствует об отрицательной динамике в процессе лечения. Снижение пика холина регистрируется при дегенеративно-некротических изменениях.

Учитывая то, что площадь под пиком пропорциональна концентрации метаболита, оценивалась количественная характеристика пика с помощью измерения площади под ним (интеграл). Для измерения площади под кривой использовалась программа IpSquare v5.0. Результат регистрировался в абсолютных значениях (Рисунок 7).

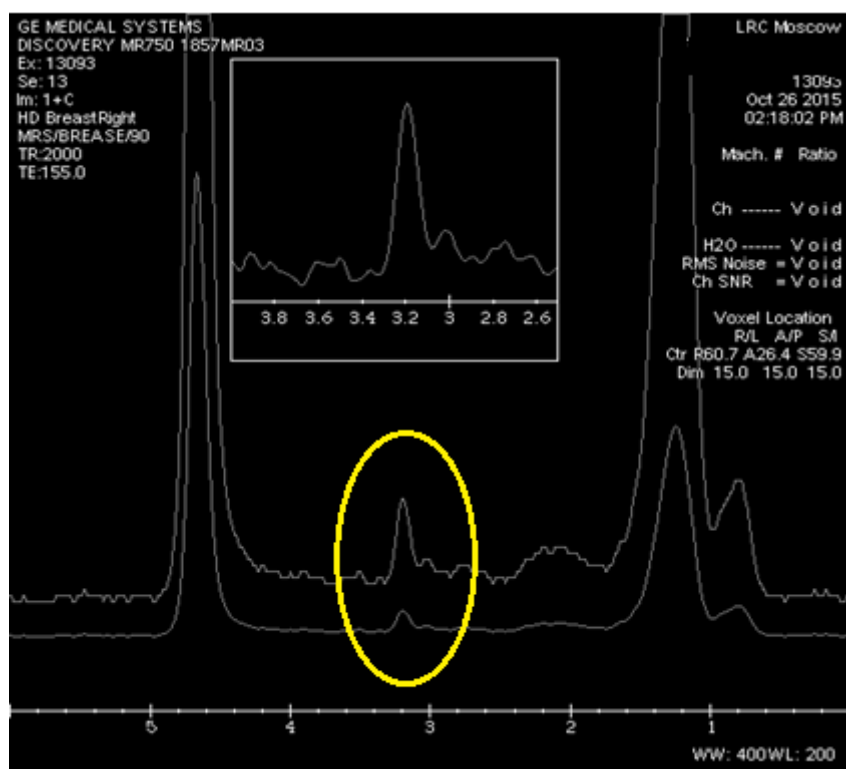


Рисунок 7 – Кривая пика холина

2.4.2. МР-диффузия

Для получения ДВИ использовалась методика одноимпульсной эхо-планарной томографии без подавления сигнала от свободной жидкости, но с подавлением сигнала от жировой ткани, которая обычно входит в стандартный протокол МР-исследования. Диффузионно-взвешенные изображения были выполнены со стандартными величинами значений коэффициентов диффузионного взвешивания (b) $b=0$ и $b=800$ с/мм². Результат регистрировался в абсолютных значениях.

Полученные изображения автоматически обсчитывались с построением карт измеряемого коэффициента диффузии (ИКД). Измерение коэффициента диффузии (ИКД) на параметрических картах выполняли на срезе с максимальной площадью опухолевого поражения. В зону интереса включались все компоненты визуализируемой опухоли, путем обведения ее по методике «свободной руки». Полученные результаты МР-диффузии во всех случаях были сопоставлены с данными послеоперационного гистологического исследования (Рисунок 8).

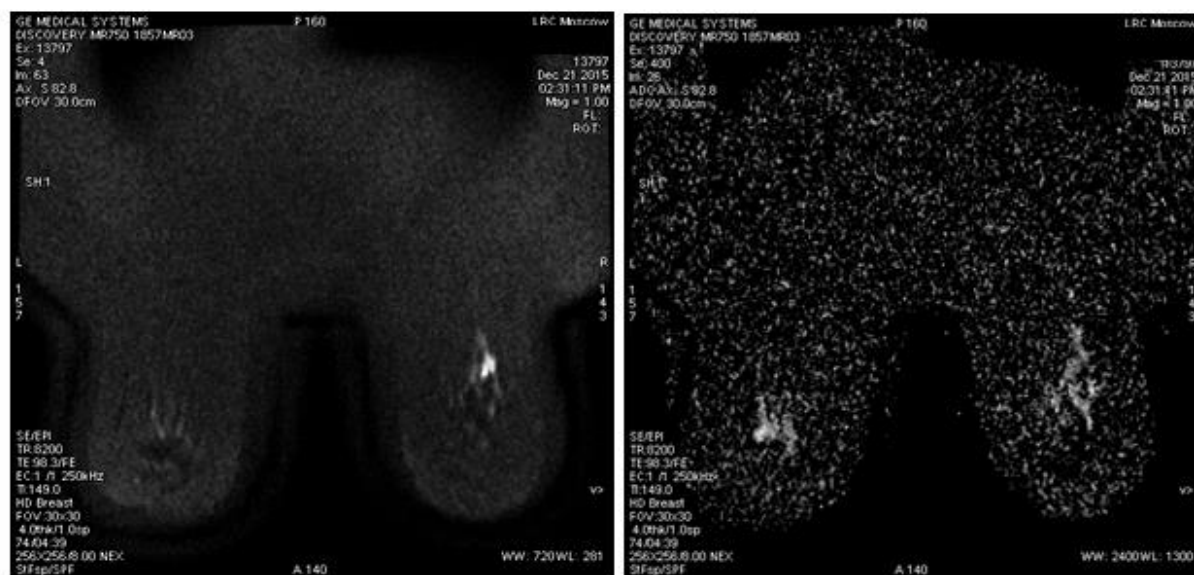


Рисунок 8 – МРТ, ДВИ, карта диффузии, аксиальная проекция, образование правой молочной железы.

2.5. Биологические маркеры в оценке эффективности НПХТ

2.5.1. Циркулирующие опухолевые клетки

Для выделения ЦОК всем женщинам производился забор венозной крови (по 10 мл). Кровь собиралась в пробирки с ЭДТА и в течение 30-60 минут доставлялась в лабораторию. Кровь в пробирках с ЭДТА разводилась патентованным буферным раствором в пропорции 1:9. В состав буферного раствора входили сапонин, параформальдегид, ЭДТА и бычий сывороточный альбумин, необходимый для лизиса эритроцитов. Разведенная буферным раствором кровь выдерживалась при комнатной температуре в течение 10 минут, после чего фильтровалась через одноразовый пластиковый фильтрационный модуль с помощью вакуумного насоса (Рисунок 9).

Фильтрационный модуль состоит из 5 отсеков объемом 10 мл и одного отсека объемом 50 мл, а также содержит поликарбонатную мембрану с калиброванными цилиндрическими порами диаметром 8 мкм. В отсеки разливалось по 10 мл (50 мл в большой отсек) разведенной крови, что соответствовало 1 мл (5 мл в большом отсеке) неразведенной крови. Данная схема позволяла осуществлять фильтрацию любого количества крови в диапазоне от 1 до 10 мл. Каждый отсек объемом 10 мл фильтровался через отдельный круглый участок мембраны диаметром 6 мм, отсек объемом 50 мл фильтровался через 5 аналогичных участков. Таким образом, кровь проходила не через всю поверхность мембраны, а через 10 отдельных участков («спотов»), что облегчало дальнейшую работу врача-цитолога.

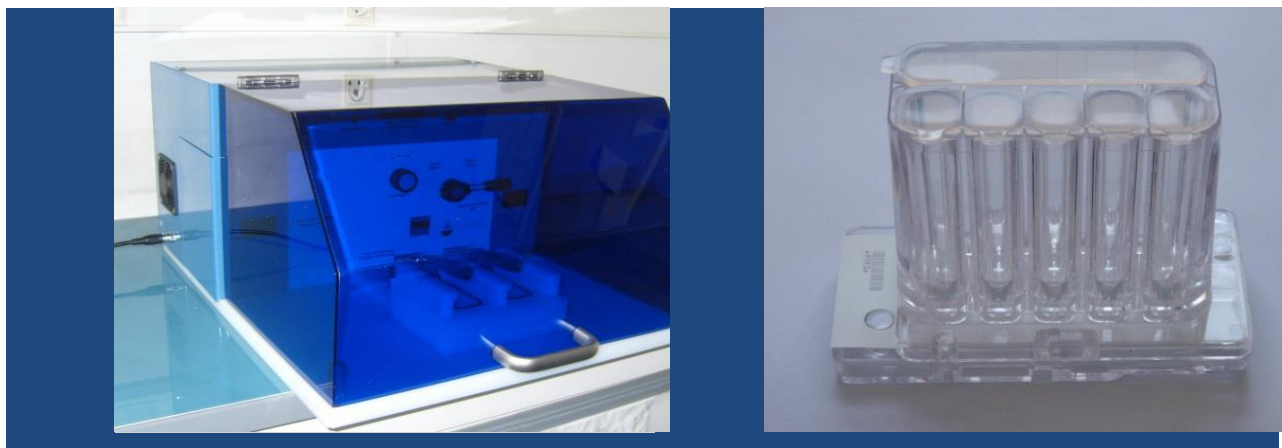


Рисунок 9 – Прибор для определения ЦОК по методике ISET:
вакуумный насос, фильтрационный модуль

После фильтрации мембрана извлекалась из фильтрационного модуля, высушивалась, промывалась фосфатно-буферным раствором и раствором Мэй-Грюнвальд, окрашивалась по Гимзе. Окрашенные препараты анализировались врачом-цитологом с помощью цифрового микроскопа в следующей последовательности: просмотр стекол при увеличении $\times 20$ для выявления подозрительных клеток, детальный цитопатологический анализ подозрительных клеток/клеточных микроэмболов на увеличении $\times 63$ с масляной иммерсией. Проводилась идентификация клеток и их подсчёт (Рисунок 10).

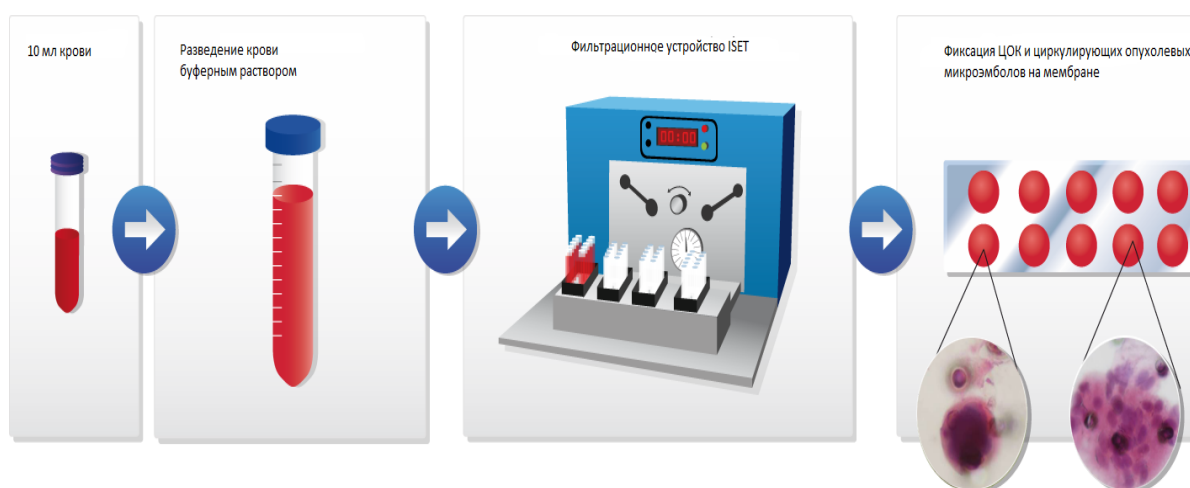


Рисунок 10 – Схематическое изображение этапов определения ЦОК по методике ISET

Для установления злокачественной природы клетки использовались следующие критерии: анизонуклеоз (отношение $>0,5$), размер ядра >16 мкм, нерегулярность ядерного контура, наличие клеточных комплексов, высокое

нуклеарно-цитоплазматическое отношение. При отсутствии более чем одного из критериев клетка признавалась атипичной.

С помощью методики ISET проводилось трёхкратное определение циркулирующих опухолевых клеток в крови больных: до начала лечения, после 2-х курсов химиотерапии и перед оперативным вмешательством.

2.5.2. Аномальное метилирование ДНК

Материалом для исследования послужили биопсийные образцы РМЖ (парафиновые блоки) от 36 пациенток. Для анализа маркеров метилирования ДНК был использован материал кор-биопсий опухоли до начала лечения. При каждой биопсии производился забор двух дополнительных столбиков ткани, которые замораживались в пластиковых контейнерах при температуре -18°C .

Гистологическую идентификацию тканей проводили в патологоанатомическом отделении ФГАУ «ЛРЦ» Минздрава России. В каждом образце было не менее 50% опухолевых клеток.

Выделение геномной ДНК из малых количеств биопсийного материала, фиксированного в формалине с последующей парафинизацией, проводили с помощью колонок с абсорбирующей мембраной по протоколам коммерческого набора «QIAamp DNA FFPE Tissue Kit» («QIAGEN», Германия).

Для выявления метилированных CpG-островков в промоторах исследуемых генов последовательно применяли рестрикционный анализ и метил-чувствительную полимеразную цепную реакцию (МЧ-ПЦР). Рестрикционный анализ проводили следующим образом: ДНК обрабатывали метил-чувствительной рестриктазой HpaII фирмы «Сибэнзим», РФ, по следующей схеме: к 1500 нг (8 мкл) геномной ДНК добавляли 3 е.а. (1 мкл) фермента и 2 мкл соответствующего 10-кратного буфера, доводили до 20 мкл дист. водой и инкубировали в течение 10-12 часов в термостате при температуре 37°C . Рестриктазу HpaII использовали для анализа метилирования промотора всех исследуемых генов.

Метод МЧ-ПЦР основан на способности метил-чувствительных рестриктаз гидролизовать ДНК, не содержащую модифицированных оснований, и оставлять негидролизованной участки, содержащие метилцитозин.

При проведении МЧ-ПЦР учитывалось наличие внутренних сайтов узнавания для используемой рестриктазы в амплифицируемом участке, который содержал не менее 3-4 сайтов узнавания для рестриктазы HpaII. В случае модификации цитозинов в метил-цитозин гидролиз ДНК не происходит и продукт ПЦР может быть выявлен в геле. При отсутствии метилирования ДНК полностью гидролизуется и продукт ПЦР не определяется. Для исключения возможной гомозиготной делеции исследуемых генов МЧ-ПЦР проводилась на парных образцах: гидролизованная и негидролизованная ДНК.

ПЦР проводили при помощи программируемого термоциклера «Терцик» фирмы «ДНК-технология», РФ, с использованием термофильной ДНК-полимеразы фирмы «СибЭнзим», РФ, по следующей схеме: к 0,1 мкг геномной ДНК добавляли 20-170 мкМ каждого олигопраймера, 200 мкМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата, 1-2 единицы термофильной ДНК-полимеразы, 5 мкл однократного буфера для ПЦР следующего состава: 50 мМ KCl, 10 мМ трис-HCl pH 8.4. Оптимальное содержание MgCl₂ в буфере подбирали экспериментальным путем для каждой пары используемых праймеров. Затем добавляли 40-60 мкл вазелинового масла, прогревали смесь при 94°C в течение 10 мин и проводили 35 циклов со следующими параметрами:

- - денатурация при 94°C – 40 с
- - отжиг при 66 - 70°C – 40 с
- - элонгация при 72°C – 30 с

Финальную инкубацию проводили при 72°C в течение 10 мин.

Нуклеотидные последовательности и условия работы праймеров указаны в Таблице 2.

Таблица 2 – Нуклеотидные последовательности праймеров для МЧ-ПЦР

Ген	Нуклеотидная последовательность	Температура отжига, °С	Размер продукта, п.н.
<i>TERT</i>	F: GCGGAGCTGGAAGGTGAAGGGGC	66	168
	R: GGAAGCGCGGCCAGACCC		
SYNDIG	F: CCGCTAGGGCCTCCCTGGTCTGG	68	152
	R: GAGCCGCTCCTCTTCGCTTGCCG		
SLC9A3	F: TTAGCGCGGCCAGAGTCGCTCCC	66	122
	R: CTGGGCCTGGGGGCTTCGTTGTG		
ADCY8	F: GCCGGCGTGGGAGAGGACCACTG	69	114
	R: AACAGCGGAGGAACCGGCTGGCG		
DPYS	CATCGTTGACCACGCGACCCCCG	70	154
	TCGGTGGGGACCTTGCAGGAGGG		
IRF4	F: GCCTCGTGGCTGAAGGGCAGCTC	70	145
	R: AGCTCACCGCGCTCATGCCGAAC		
Локус 6q21.32	F: GTCGGCTCAGGGTCGCTGCTTGG	68	195
	R: GCTCTAGGCCCGCTTTTCCCCGC		
KCNQ2	F:CCGGCGGCTGCAGAGATGGGAC	66	105
	R: AGCTGTCTGTCCTGCCCCCTCGG		
SNRK	F:CTGGAGGCCCTGCCCTTGCGG	66	95
	R: CGCCGCACTCGGCCCGCTCC		

В качестве внутреннего контроля ПЦР был выбран фрагмент ДНК локуса 6q21.32, не содержащий сайтов узнавания для используемой рестриктазы. Наличие метилирования промоторов оценивалось как наличие полосы на электрофореграмме в образце после рестрикции, соответствующей по длине исследуемому гену в образце без рестрикции (Рисунок 11).

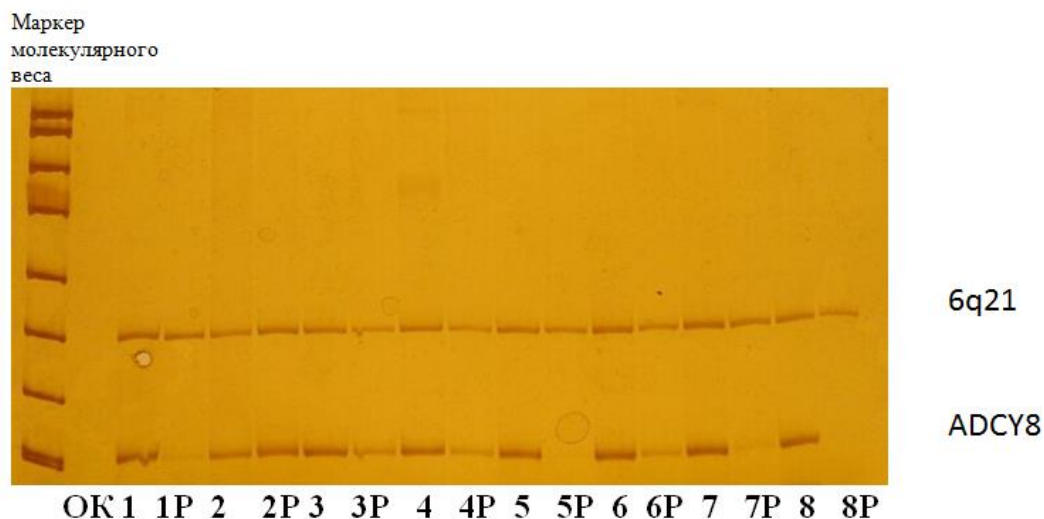


Рисунок 11 – Электрофореграмма МЧ-ПЦР гена ADCY8. ОК – отрицательный контроль; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 – нативная ДНК образцов; 1P, 2P, 3P, 4P, 5P, 6P, 7P, 8P – рестрикты ДНК образцов. Образцы 2, 3, 4, 6 метилированы по гену ADCY8

Электрофорез продуктов МЧ-ПЦР проводили в 8% полиакриламидном геле (ПААГ) при 20-25°C в течение 40- 60 минут и в 6% денатурирующем ПААГ в течении 2-4 часов.

Состав 8% ПААГ:

7,25 мл 40% раствора АА (39:1),
 1,7 мл 10х буфера ТВЕ,
 25,5 мл дистиллированной воды,
 685 мкл 10% аммония персульфата (APS),
 28 мкл ТЕМЕД.

Визуальный контроль пробега ампликонов проводили по смеси ксиленцианола и бромфенолового синего. Для сохранения результатов ПААГ проводили фотографирование гелей.

После электрофореза проводили ультратонкое окрашивание нитратом серебра. Гель помещали в раствор 0,011 М AgNO₃ и инкубировали в течение 7-15 минут, после чего дважды промывали в дистиллированной воде. Проявление

проводили в модифицированном растворе проявителя (увеличена концентрация HCHO) следующего состава: 0,75 М NaOH; 0,5 М HCHO; доводили до 1 л дистиллированной водой около 10-15 минут в зависимости от интенсивности проявления геля.

Компьютерный анализ ДНК проводился с использованием следующих программ:

1) поиск полноразмерной нуклеотидной последовательности генов – по базам данных UCSC database, PUB MED; Ensemble Genome Browser.

2) анализ ДНК на наличие сайтов ферментов рестрикции – при помощи программ Genebank Pustell, Genepro, WIN-SUN;

3) компьютерное конструирование олигонуклеотидных праймеров и подбор условий для проведения ПЦР – с использованием программы Primer Inrut (version 0.4.0) и Primer Design and Search Tool; MethPrimer;

На первом этапе проведено исследование выбранных генов в биоптатах ткани (N=36), полученной при core-биопсии образований до начала лечения. Далее производился поиск выбранных маркеров метилирования в крови этих пациенток до и после лечения. Результаты планового гистологического исследования сопоставлялись с данными анализа маркеров метилирования ДНК.

2.6. Статистический анализ

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы PASW Statistics 22. Описательная статистика представлялась в виде среднего и стандартного отклонения, медианы и 25-го и 75-го перцентилей, минимального и максимального значений в выборке для количественных переменных, а также частот встречаемости и долей в выборке для качественных переменных. Проверка распределения на нормальность проводилась с использованием теста Колмогорова-Смирнова. При наличии подгрупп с малыми выборками (N<30) проверка распределения на нормальность не проводилась (в работе использовались непараметрические критерии). Для сравнения количественных данных в двух несвязанных между собой выборках применялся

T-критерий Стьюдента для параметров, распределённых нормально, и U-критерий Манна-Уитни для параметров, распределение которых отличалось от нормального, а также для параметров, относящихся к порядковой шкале. Для сравнения номинальных переменных в двух несвязанных совокупностях использовался критерий Хи-квадрат, а при наличии ограничений для его использования – точный критерий Фишера. Для сравнения количественных данных в двух связанных совокупностях использовался непараметрический критерий Уилкоксона. Для сравнения качественных данных в двух связанных совокупностях использовался критерий Мак-Немара. Для множественных сравнений количественных данных в несвязанных выборках применялись параметрический T-критерий Стьюдента с поправкой Бонферони и непараметрический критерий Краскела-Уоллиса. Если после проведения множественного сравнения выявлялись достоверные различия, впоследствии проводились попарные групповые сравнения в зависимости от вида распределения соответствующих параметров: для несвязанных выборок с использованием T-критерия Стьюдента или U-критерия Манна-Уитни. Для множественных сравнений качественных данных использовался критерий Хи-квадрат. В последствии необходимые попарные сравнения проводились с использованием критериев Хи-квадрат или Фишера. Корреляционный анализ проводился с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Корреляционный анализ качественных данных проводился с использованием коэффициентов Фи и Крамера в зависимости от размеров таблиц сопряжённости. Уровень значимости (p) принимали равным 0,05 во всех вышеописанных сравнениях.

Для графического представления данных использовались диаграммы-боксплоты с обозначенными на них медианой, 25-м и 75-м перцентилями и 1,5-м межквартильным размахом и диаграммы среднего значения и стандартного отклонения (для параметров, удовлетворяющим условиям нормального распределения). Для качественных данных использовались кластеризованные

столбчатые диаграммы, на которых отображалось процентное распределение показателя в группах исследования.

Для определения прогностической значимости динамики изучаемых показателей в процессе терапии использовался метод логистической регрессии с пошаговым включением переменных по алгоритму Вальда. Критерий шагового отбора принимался равным от 0.05 до 0.10. Статистика согласия модели оценивалась с использованием универсальных критериев для коэффициентов модели (шаг-блок-модель) на каждом шаге. В качестве зависимой переменной использовалась принадлежность субъекта к группе полным или хорошим патоморфологическим ответом. В качестве независимых переменных использовались количественные переменные, отражающие абсолютное изменение показателей ИКД, пика холина и ЦОК на разных этапах исследования. Регрессионное уравнение имеет вид:

$$y = \exp(b_0 + b_1 * x_1 + \dots + b_n * x_n) / [1 + \exp(b_0 + b_1 * x_1 + \dots + b_n * x_n)],$$

где x_i - независимые переменные,

y – зависимая бинарная переменная,

b_i - регрессионные коэффициенты.

Таблица классификации была построена на начальном (нулевом) и на последнем шаге регрессионного алгоритма при фиксированном пороге классификации = 0.50.

Для нахождения оптимального порога классификации с учётом чувствительности и специфичности найденной прогностической модели была построена ROC-кривая, где в качестве проверяемой переменной использовалась вероятность предсказанных значений, в качестве переменной состояния – группы исследования.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. КЛИНИКО-РЕНТГЕНОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

3.1. Влияние клинико-морфологических характеристик опухоли на частоту достижения полного патоморфологического регресса

При анализе результатов у 22 (25,9%) больных, получавших НПХТ, наблюдался полный патоморфологический регресс (pCR) по данным гистологического исследования послеоперационного материала (4 степень по шкале Лавниковой). Лекарственный ответ 3 степени по шкале Лавниковой имели 20 (23,5%) женщин, 2-й степени - 35 (41,2%), 1-й степени – 6 (7,0%) пациенток. Отсутствие ответа опухоли на лечение (0 степень по шкале Лавниковой) зарегистрировано у 2 (2,3 %) женщины (Рисунок 12).

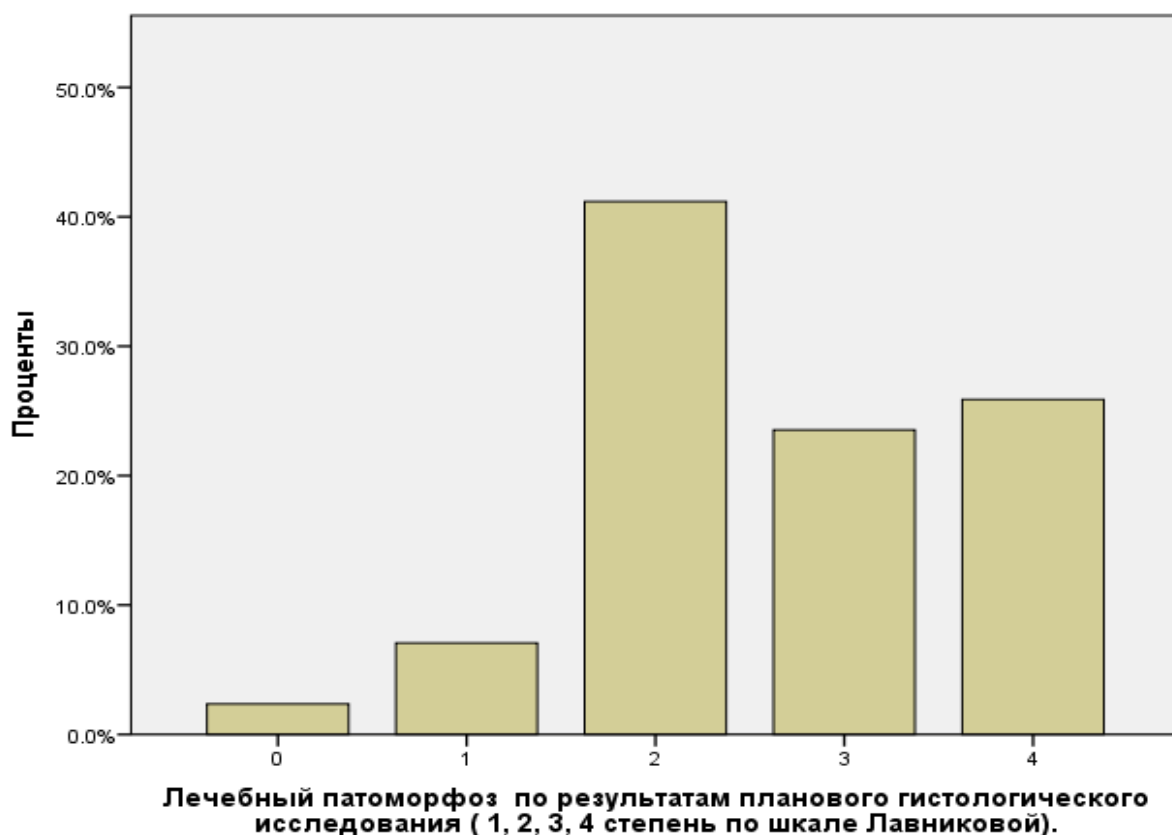


Рисунок 12 – Распределение больных в зависимости от степени лекарственного патоморфоза по результатам планового патоморфологического исследования послеоперационного материала

По результатам клинического обследования (по данным клинического осмотра, УЗИ молочных желез, маммографии, МРТ молочных желез с контрастом) после 2-х курсов НПХТ (2-й этап исследования) частичный регресс наблюдался у 42(50,0%) женщин, стабилизация заболевания – у 38(45,2%), полный регресс – у 1(1,2%), прогрессирование – у 3(3,6%) пациенток. После окончания лечения, стабилизация заболевания наблюдалась у 27(31,8%) женщин, частичный регресс – у 36(42,4%), полный регресс у 17(20,5%), прогрессирование заболевания – у 5(5,9%) пациенток (Таблица 3).

Таблица 3 – Клинический ответ после 2-х курсов химиотерапии (2-й этап исследования) и после окончания лечения (3-й этап исследования)

Динамика после 2-х курсов химиотерапии: клинический ответ (сR), N (%)	Стабилизация	38 (45.2%)
	частичный регресс	42 (50.0%)
	полный регресс	1 (1.2%)
	Прогрессирование	3 (3.6%)
Динамика после окончания лечения: клинический ответ (сR), N (%)	Стабилизация	27 (31.8%)
	частичный регресс	36 (42.4%)
	полный регресс	17 (20.0%)
	Прогрессирование	5 (5.9%)

По данным нашего исследования, частота достижения pCR не зависела от менопаузального статуса женщин и гистологического типа опухоли ($p=0,401$, $p=0,615$ соответственно).

В группе больных с полным лекарственным патоморфозом (4 степень ответа по шкале Лавниковой) 10 (45,5%) женщин имели тройной негативный фенотип опухоли, 8 (36,4%) – люминальный В Her2-положительный и Her2-положительный подтипы. Стоит отметить, что в нашем исследовании среди пациенток с люминальный А и люминальный В HER2 – негативными подтипами РМЖ, не встречалось больных достигших pCR.

Пациентки, достигшие полного лекарственного патоморфоза достоверно различались по ИГХ-подтипам опухоли ($p=0,034$). Однако, подробное попарное исследование всех подгрупп по ИГХ-подтипам РМЖ показало, что данные различия имелись в основном за счёт группы женщин с люминальным А подтипом рака, который не встречался у пациенток с pCR (0,0% vs.19,0%). В группе пациенток с полным лекарственным патоморфозом чаще встречался тройной негативный подтип (45,5% vs. 27,0%), Her2-положительный (13,6% vs. 7,9%), Люминальный В Her2-положительный (22,7% vs.9,5%). Напротив, люминальный В Her2-отрицательный подтип реже встречался у пациенток с полным лекарственным патоморфозом (18,2% vs. 36,5%) (Таблица 4).

Таблица 4 – Частота достижения полного патоморфологического регресса в зависимости от биологического подтипа опухоли

		Достижение полного лечебного патоморфоза (pCR) N (%)	
		Нет	Да
Биологический подтип опухоли	Люминальный А	12 (19.0%)	0 (0.0%)
	Люминальный В Her2-положительный	6 (9.5%)	5 (22.7%)
	Люминальный В Her2-отрицательный	23 (36.5%)	4 (18.2%)
	Тройной негативный	17 (27.0%)	10 (45.5%)
	Her2-положительный	5 (7.9%)	3 (13.6%)

В группе женщин с 3-й степенью лекарственного патоморфоза ($N=20(23,5\%)$), 12 (60,0%) пациенток также имели высокоагрессивные подтипы опухолей: тройной негативный, люминальный В Her2-положительный и Her2-положительный подтипы.

Среди женщин достигших pCR среднее значение индекса пролиферации Ki67 составило 51%, в то время как у женщин, не достигших pCR– 32,8%. Таким образом, женщины, достигшие полного лекарственного патоморфоза имели

достоверно более высокий индекс пролиферации клеток Ki67 по сравнению с другими пациентками ($51,0 \pm 25,7$ vs. $32,8 \pm 21,8$, $p=0,003$) (Рисунок 13).

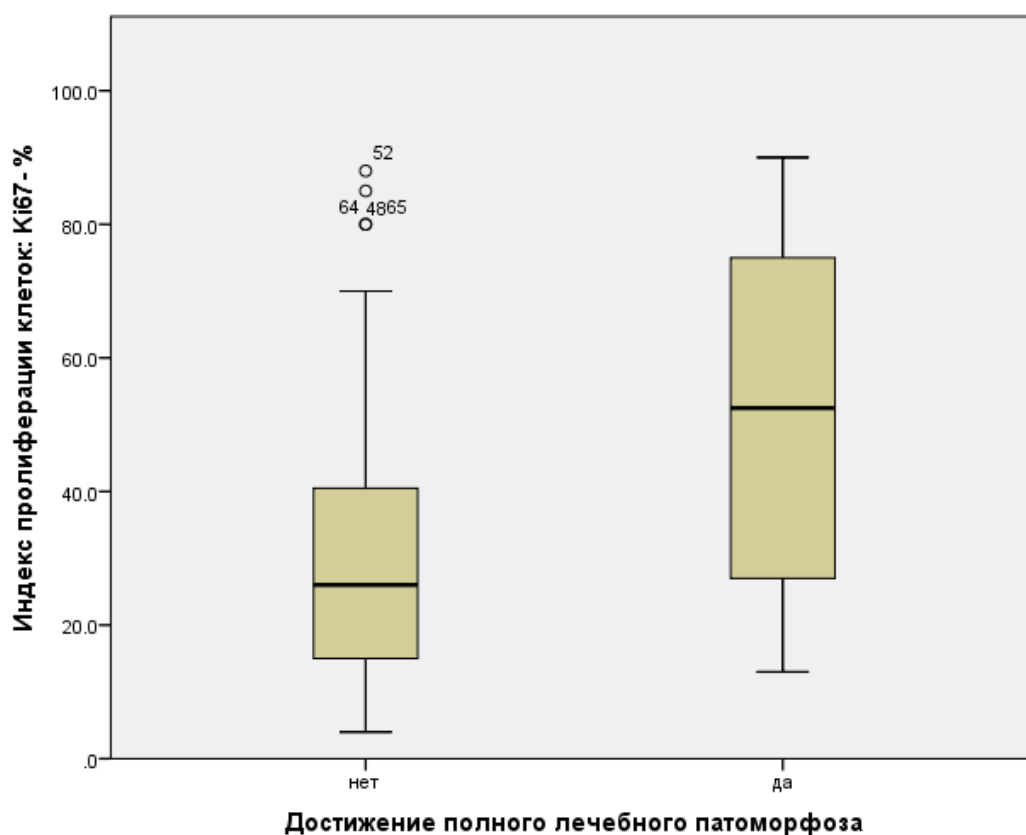


Рисунок 13 – Достижение pCR и среднее значение индекса пролиферации Ki67%

Проведен анализ влияния схемы химиотерапии и количества курсов лекарственного лечения на частоту достижения pCR. В группе женщин, получавших препараты антрациклинового ряда (АС) на всех этапах лечения ($N=32$ (37,6%)) pCR достигли 3 (13,6%) женщины. Среди пациенток, получавших химиотерапию препаратами таксанового ряда с включением или без препаратов платины ($N=25$ (29,4%)), частота достижения pCR была выше и составила 31,8% (7). В группе женщин, получавших лечение комбинацией препаратов антрациклинового и таксанового рядов с включением или без препаратов платины ($N=28$ (33,0%)) частота достижения pCR была самой высокой и составила 54,5% (12) ($p=0,003$).

Включение в протокол лечения таргетных препаратов повышало частоту достижения pCR. Так, HER2-положительный рецепторный статус опухоли имели 20 (23,5%) женщин, из них 10 (50,0%) в неoadьювантном режиме получили таргетную терапию герцептином, 3 (30,0%) - с добавлением пертузумаба. В группе женщин, получавших таргетную терапию в неoadьювантном режиме по поводу Her2-положительного статуса опухоли, частота достижения pCR была выше, чем в группе пациенток, не получавших таргетные препараты и составила 5 (50,0%) и 2 (20,0%) соответственно.

Корреляции между количеством курсов химиотерапии и частотой достижения pCR нами обнаружено не было ($p=0,713$).

Частота достижения pCR не зависела от возраста больных ($p=0,924$). Реже достигали pCR женщины с IIIС стадией заболевания – 1 (4,5%). Частота достижения полного патоморфологического регресса в группе женщин с IIа, IIIа, IIIб была примерно одинаковой и составила – 5 (22,7%), 4 (18,2%), 5 (22,7%) соответственно. В группе больных с IIб стадией она была выше – 7 (31,8%), что вероятно связано с наибольшим числом пациенток с данной стадией заболевания ($p=0,404$).

3.2. Клинико-морфологические особенности опухолей у больных с выраженным и слабым ответом на лечение

Для более детального анализа выполнено разделение больных по подгруппам: 1) с выраженным ответом на лечение (3-4 степень лекарственного патоморфоза по шкале Лавниковой), 2) слабым (1-2 степень) и 3) отсутствием ответа на лечение (0 степень), выявлены следующие закономерности. Учитывая, небольшое количество женщин с отсутствием ответа на лечение – 2(2,3%), данная группа больных не включалась в анализ.

Среди пациенток с выраженным ответом на химиотерапию ($N=42(49,4\%)$), преобладали женщины с инфильтративным протоковым раком – 38 (90,5%). Однако, достоверно значимых корреляций в группах больных с различными гистологическими подтипами и частотой достижения выраженного патоморфологического ответа выявлено не было ($p=0,548$) (Таблица 5).

Пациентки с выраженным лекарственным патоморфозом различались по ИГХ-подтипам опухоли ($p=0,008$). Среди биологических подтипов, в группе больных с выраженным ответом на лечение преобладали женщины с тройным негативным раком молочной железы - 17(40,5%). Люминальный А достоверно реже встречался у пациенток в группе с хорошим лекарственным патоморфозом, чем у остальных пациенток, по сравнению с люминальным В Her2-положительным, тройным негативным и HER2-положительным подтипами рака.

В группе больных со слабым ответом на лечение (1-2 степень по Лавниковой) ($N=41$ (48,2 %)), люминальный А и люминальный В HER2 – негативный подтипы опухолей зарегистрированы у 27 (62,8%). В группе больных со 2 степенью лечебного патоморфоза (35(41,2%)) преобладали женщины с люминальным В HER2–негативным подтипом опухоли и люминальным А подтипами опухоли – 12 (34,3%) и 11 (31,4%) соответственно (Рисунок 14).

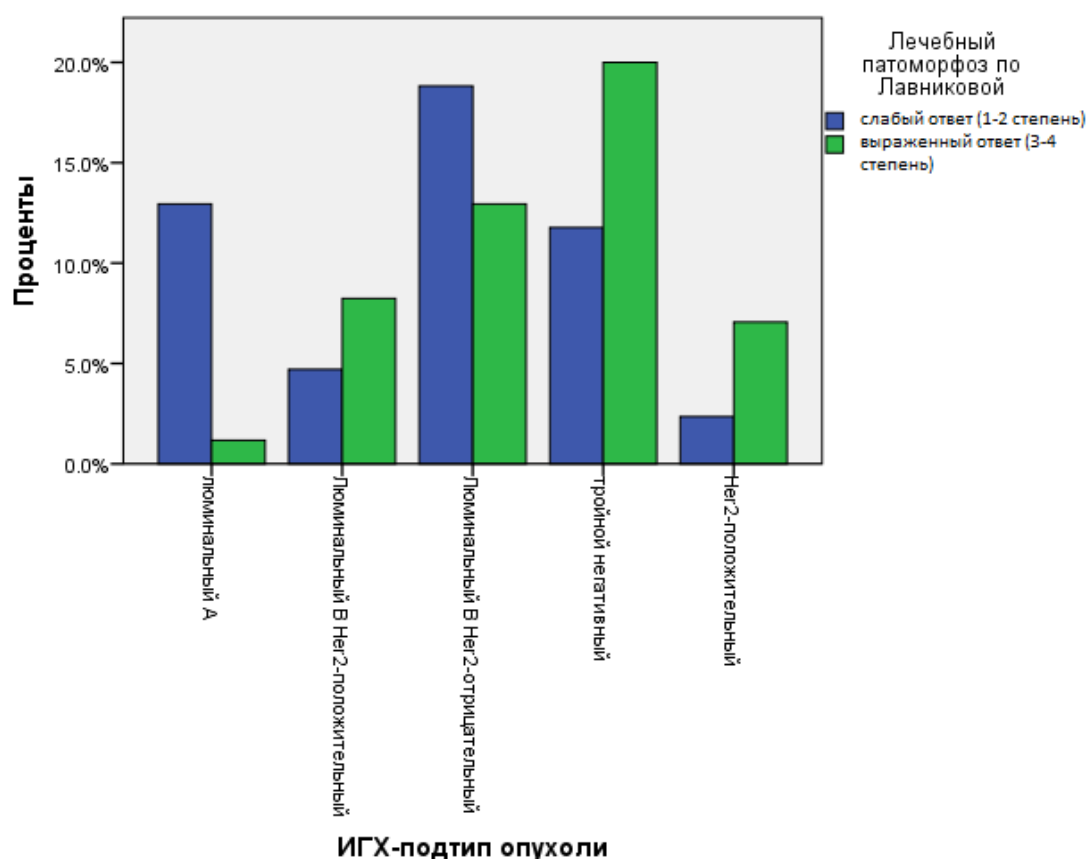


Рисунок 14 – Зависимость степени патоморфологического ответа опухоли на лечение от биологического подтипа рака

У женщин с люминальным А подтипом опухоли в 91,7% (11) случаев наблюдался слабый ответ на лекарственное лечение. В группе больных с люминальным В HER2-негативным подтипом 0-2 степень лечебного патоморфоза наблюдалась в 59,3% (16) случаев.

Более чувствительными к лечению оказались опухоли с высокой экспрессией Ki67 ($p=0,005$). В группе больных с 1-2 степенью лечебного патоморфоза среднее значение Ki67 составило 30,5%. В группе больных с 3-4 степенью лечебного патоморфоза 44,6% (Рисунок 15).

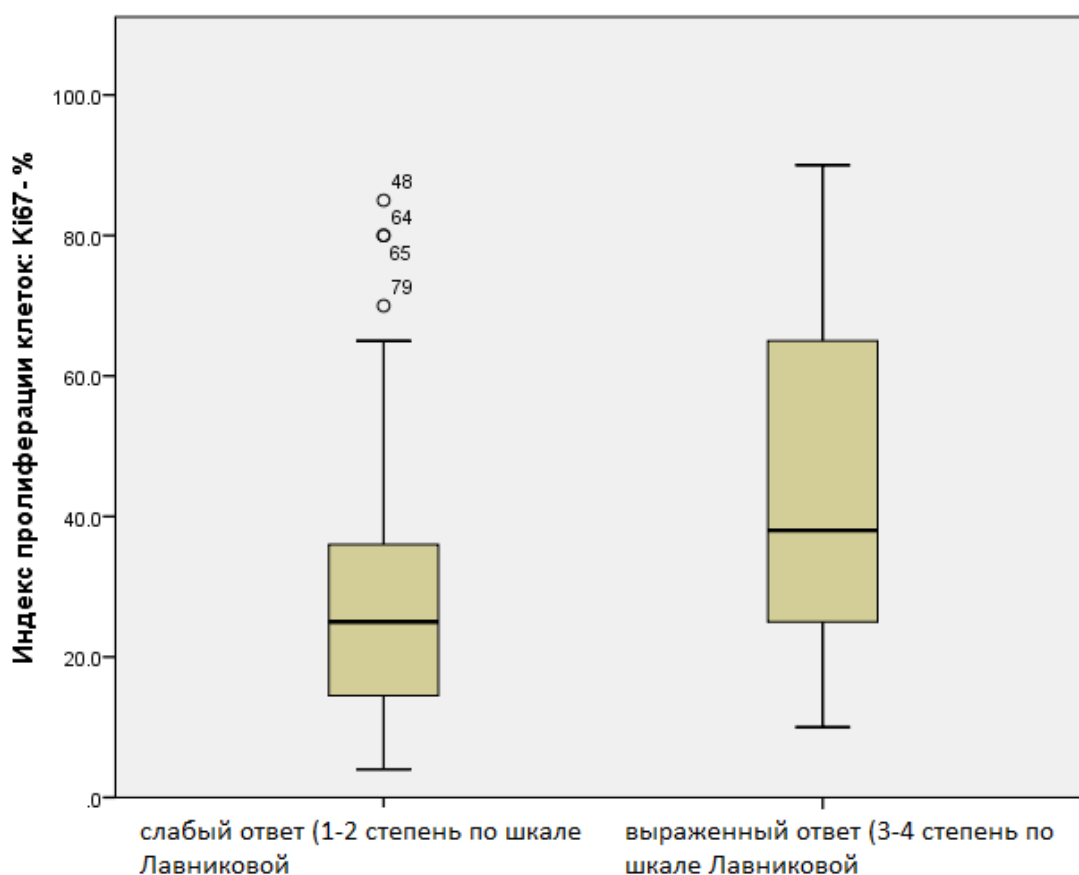


Рисунок 15 – Среднее значение индекса пролиферации Ki67% в группах больных с хорошим и плохим ответом опухоли на лечение

Женщины, получавшие химиотерапию только препаратами антрациклинового ряда (N=32 (37,6%)) чаще давали 1-2 степень лекарственного патоморфоза по шкале Лавниковой – 23 (71,9%) ($p=0,003$). Среди пациентов, получавших химиотерапию препаратами таксанового ряда с включением или без препаратов платины (N=25 (29,4%)), выраженный ответ на лечение был получен у

15 (60,0%) женщин. В группе женщин, получавших лечение комбинацией препаратов антрациклинового и таксанового рядов с включением или без препаратов платины (N=28 (33,0%)) выраженный патоморфологический ответ был достигнут у 18 (64,3%) больных ($p=0,003$).

По данным нашего исследования возраст больных ($p=0,817$), менопаузальный статус ($p=0,798$), стадия заболевания ($p=0,114$), гистологический тип опухоли ($p=0,548$) не повлияли на распределении больных по группам с выраженным и слабым ответом на лечение.

3.2. Стандартные методы обследования в оценке эффективности предоперационной химиотерапии

3.2.1. Физикальный осмотр

Осмотр и пальпаторное обследование молочных желез и регионарных лимфатических узлов выполнялись всем пациентам без исключения на всех этапах исследования. При этом оценивалось состояние кожных покровов, наличие отёка, кожных симптомов, размеры опухоли и состояние регионарных лимфатических узлов: аксиллярных, под - и надключичных. Была оценена точность клинического осмотра в зависимости от возраста больной, соотношения железистого и жирового компонентов в молочных железах, наличия фоновой патологии молочных желез. При первичном клиническом осмотре пальпируемая опухоль зарегистрирована у 84(98,8%) женщин, после окончания лечения – у 71 (83,5%). Исчезновение опухоли у 13 (15,3%) женщин было связано с эффектом неоадьювантной химиотерапии и во всех случаях подтверждалось результатами планового гистологического исследования (3 и 4 степень по шкале Лавниковой).

Среднее значение размеров опухолевого образования до начала лечения по результатам клинического осмотра составило 31,4 мм. Таким образом, размеры опухоли значительно различались по данным физикального осмотра до начала лечения и результатами планового гистологического исследования ($31,4\pm 12,2$ vs.

15.8±16.0, $p<0.001$), а уменьшение средних размеров образования в 1,9 раз свидетельствовало об эффекте лекарственного лечения.

Поражение регионарных лимфатических узлов по данным клинического осмотра до начала лечения отмечалось у 47 (55,3%) женщин – в виде пальпаторно определяемого плотного лимфатического узла (узлов, не спаянных в конгломерат), у 14 (16,5%) – конгломерат аксиллярных лимфатических узлов, у 6 (7,1%) пациенток – пальпаторно определяемые под- и надключичные лимфатические узлы.

На момент окончания лечения средний размер опухоли по данным физикального осмотра составлял 16,3 мм. Такие размеры опухоли значимо не различались с результатами планового гистологического исследования (16,3±11,5 vs. 15.8±16.0, $p=0.388$).

Несоответствие размеров происходило за счет сложностей связанных с невозможностью дифференцировать пальпаторно участок фиброза от остаточной опухолевой ткани. Сопутствующие высокая плотность тканей и различные проявления диффузной мастопатии также значительно затрудняли пальпаторное исследование. Так, по результатам обследования (по данным маммографии, УЗИ молочных желез) было выявлено, что у 80 (94,1 %) больных наблюдались проявления диффузной мастопатии различной степени выраженности. Все эти факторы стали причиной повышенной частоты ложных заключений, ассоциированных с принятием фиброзных изменений в тканях железы за остаточный опухолевый узел. Недооценка размера, как правило, была связана с сопутствующими фоновыми изменениями молочных желез.

В первую очередь при физикальном осмотре оценивалась динамика изменения кожных покровов: гиперемия, отек кожи и симптома «умбиликации», «площадки». На 1-м этапе исследования наличие кожной симптоматики было выявлено у 45 (52,9%) женщин. В большинстве случаев это был отёк кожи по типу «лимонной корки» - у 18 (40,0%) (Таблица 5).

Таблица 5 – Частота встречаемости кожных изменений до начала лечения (1-й этап исследования)

Отёк кожи, N (%)	Нет	67 (78.8%)
	Есть	18 (21.2%)
Гиперемия кожи, N (%)	Нет	73 (85.9%)
	Есть	12 (14.1%)
Симптом кожной площадки, умбиликации, N (%)	не определяются	70 (82.4%)
	симптом площадки	10 (11.8%)
	симптом умбиликации	5 (5.9%)

В 24,4 % (11) случаев отмечено сохранение кожной симптоматики (положительный симптом «лимонной корки», "умбиликации", "площадки"). Исчезновение данных симптомов говорило об эффективности химиотерапии, однако не всегда совпадало с изменением размера первичной опухоли. Так, у 2 женщин (4,4%) исчезновение кожной симптоматики (отёка) не сопровождалось уменьшением размеров опухолевого узла. У 4(8,8%) женщин в нашем исследовании сохранился незначительный отёк, позволявший выполнить радикальное хирургическое лечение, при этом опухолевый узел значительно уменьшился в размере.

Разница в размерах опухоли менее 5 мм по данным клинического осмотра на 3-м этапе исследования и планового патоморфологического заключения была отмечена в 53,6 % (45) случаев. Разница в размерах опухоли менее 10 мм выявлена в 72,6 % (61) случаев (Таблица 6).

Таблица 6 – Совпадение размеров остаточной опухоли с точностью до 5 мм и 10 мм по данным клинического осмотра на 3-м этапе исследования и результатами планового гистологического исследования

Разница размеров опухоли по данным осмотра (3-й этап исследования) и результатами гистологического исследования менее 5 мм	Нет	39 (46.4%)
	Да	45 (53.6%)

Разница размеров опухоли по данным осмотра (3-й этап исследования) и результатами гистологического менее 10 мм	Нет	23 (27.4%)
	Да	61 (72.6%)

Наиболее часто совпадение размеров остаточной опухоли по результатам клинического осмотра и планового патоморфологического исследования зарегистрированы в группах больных с люминальный В Her2-отрицательным и тройным негативными подтипами – в 40,0%(18) и 28,9%(13) соответственно (Таблица 7).

Таблица 7 – Зависимость частоты совпадения размеров остаточной опухоли по результатам клинического осмотра на 3-м этапе исследования и плановым патоморфологическим исследованием от биологического подтипа опухоли

		Разница размеров опухоли по данным осмотра (3-й этап) и гистологии менее 5 мм N (%)	
		Нет	Да
Биологический подтип опухоли	Люминальный А	6 (15.4%)	6 (13.3%)
	Люминальный В Her2-положительный	6 (15.4%)	4 (8.9%)
	Люминальный В Her2-отрицательный	9 (23.1%)	18 (40.0%)
	Тройной негативный	14 (35.9%)	13 (28.9%)
	Her2-положительный	4 (10.3%)	4 (8.9%)

Наиболее часто совпадение размеров остаточной опухоли по результатам клинического осмотра на 3-м этапе исследования и плановым патоморфологическим исследованием наблюдалось у женщин с размером образования от 2 до 5 см – в 43 (70,5%) случаях. Однако достоверно значимых корреляций при данном анализе выявлено не было ($p=0,704$).

Таким образом, наличие разницы размеров опухоли по данным осмотра после окончания лечения и результатами планового гистологического исследования не зависело от возраста пациенток, клинического размера опухоли, стадии заболевания, ИГХ-подтипа опухоли и менопаузального статуса.

Частота полных регрессов по данным клинического осмотра оказалось больше, чем по данным патоморфологического заключения, **коэффициент сCR/pCR составил 0,64**. В связи с чем, можно сделать вывод, что клинический осмотр и пальпаторное исследование, по данным нашего исследования являлись недостаточно информативными для динамической оценки эффекта неoadьювантной химиотерапии и предсказания достижения полного лечебного патоморфоза и нуждались в дополнении инструментальными методами диагностики.

3.2.2. Маммография в оценке эффективности НПХТ

На трёх этапах исследования маммография была выполнена 83 (97,6%) пациенткам. Проведена оценка точности маммографии в зависимости от возраста, менопаузального статуса и биологического подтипа опухоли.

Средний размер образования по результатам маммографии составил – 28,5мм на 1-м этапе исследования, 22,0 мм - на 2-м этапе и 16,8 мм на 3-м этапе. Размеры опухоли значительно различались по данным маммографии до начала лечения и результатами планового гистологического исследования ($28,5 \pm 13,7$ vs. $15,8 \pm 16,0$, $p < 0,001$) и маммографии после 2-х курсов ПХТ и результатами плановой гистологии ($22,0 \pm 12,0$ vs. $15,8 \pm 16,0$, $p < 0,001$). Размеры опухоли значительно не различались по данным маммографии после окончания лечения и результатами планового гистологического исследования ($16,8 \pm 14,6$ vs. $15,8 \pm 16,0$, $p = 0,304$). Таким образом, уменьшение средних размеров образования по данным маммографии в 1,7 раз в процессе лечения говорило об эффективности лечения и подтверждалось результатами планового патоморфологического исследования.

Разница в размерах опухоли менее 5 мм по данным маммографии на 3-м этапе исследования и результатами планового патоморфологического заключения была отмечена в 55,4 % (46) случаев. Разница в размерах опухоли менее 10 мм выявлена в 66,3 % (55) случаев (Таблица 8).

Таблица 8 – Совпадение размеров остаточной опухоли с точностью до 5 мм и 10 мм по данным маммографии на 3-м этапе исследования и результатами планового гистологического исследования

Разница размеров опухоли по данным маммографии (3-й этап) и гистологии менее 5 мм, N (%)	Нет	37 (44.6%)
	Да	46 (55.4%)
Разница размеров опухоли по данным маммографии (3-й этап) и гистологии менее 10 мм, N (%)	Нет	28 (33.7%)
	Да	55 (66.3%)

Признаки злокачественного образования по результатам маммографии на 3-м этапе исследования отсутствовали у 18 (26,5%) женщин, что было подтверждено результатами планового патоморфологического заключения (Таблица 9). Показатель $cCR/pCR = 0,81$, что говорит о высокой точности исследования в предсказании полного патоморфологического регресса опухоли по окончанию предоперационного лекарственного лечения.

Таблица 9 – Наличие образования по данным маммографии на 3-м этапе исследования и частота достижения pCR

Наличие опухоли по данным маммографии (3-й этап исследования), N (%)	Опухоль не определялась	18 (21,7%)
	Опухоль определялась	65 (78,3%)
Достижение полного лечебного патоморфоза, N (%)	Нет	63 (74,1%)
	Да	22 (25,9%)

Частота совпадений размеров остаточной опухоли по результатам маммографии и планового патоморфологического ответа зависела от размера образования. Так, в группе больных с размером образования от 2,0 до 5,0 см разница в размерах остаточной опухоли определяемой по результатам маммографии на 3-м этапе исследования и результатам планового

патоморфологического исследования до 5 мм наблюдалась у 34 (73,9%) женщин ($p=0,034$). Частота совпадения маммографического и планового патоморфологического размеров не зависела от менопаузального статуса женщин ($p=0,606$).

Микрокальцинаты по данным маммографии были выявлены у 8 пациенток (9,4%). При этом уменьшение площади распространения микрокальцинатов после окончания НПХТ зарегистрировано у 4 (50,0 %) больных и ассоциировано с хорошим ответом опухоли на лечение – частичный клинический регресс и 3 степень патоморфологического ответа по данным гистологического заключения. Исчезновение микрокальцинатов по окончании НПХТ, отмеченное у 2 (25,0%) пациенток, сопровождалось полным клиническим и патоморфологическим регрессом. Отсевы в ткань молочной железы по результатам маммографии были выявлены у 1 (1,2%) пациентки и подтверждены в последующем гистологическом исследованием.

При анализе результатов маммографии у больных с различными биологическими подтипами РМЖ, по данным нашего исследования отмечено, что изучаемый метод наиболее информативен в оценке эффективности НПХТ при тройном негативном и люминальном В HER2 – негативном подтипах РМЖ. Частота совпадения размеров определяемых по результатам маммографии у пациентов данных подтипов одинакова и составляет 32,6% (при принятии за несовпадение размеров, разницу в измерении, превышающую 5мм). Однако, достоверных корреляций выявлено не было ($p=0,184$) (Таблица 10).

Таблица 10 – Зависимость эффективности маммографии в оценке НПХТ от биологического подтипа опухоли

		Разница размеров опухоли по данным маммографии (3-й этап) и гистологии менее 5 мм, N (%)	
		Нет	Да
Биологический подтип опухоли	Люминальный А	7 (18.9%)	5 (10.9%)
	Люминальный В Her2-положительный	4 (10.8%)	6 (13.0%)

	Люминальный В Her2-отрицательный	11 (29.7%)	15 (32.6%)
	Тройной негативный	12 (32.4%)	15 (32.6%)
	Her2-положительный	3 (8.1%)	5 (10.9%)

Таким образом, по результатам нашего исследования, наличие разницы размеров опухоли по данным маммографии после окончания лечения и результатами планового гистологического исследования не зависело от возраста пациенток, клинического размера опухоли, стадии заболевания, индекса пролиферации клеток, ИГХ-подтипа опухоли и менопаузального статуса. А высокий индекс $cCR/pCR = 0,81$ говорил о значимой точности исследования в предсказании полного патоморфологического регресса опухоли по окончанию предоперационного лекарственного лечения.

3.2.3. УЗИ молочных желез в оценке эффективности НПХТ

С помощью УЗИ молочных желез проводилась оценка опухоли и регионарных лимфоузлов на всех этапах обследования всем женщинам, вошедшим в исследование. Оценена точность метода в зависимости от возраста, менопаузального статуса и биологического подтипа опухоли.

На 1-м этапе исследования опухолевый узел по данным УЗИ регистрировался в 100% (85) случаев, на 2-м в 98,8%(84), на 3-м этапе в 85,8% (73) случаев. Средний размер образования до начала лечения (на 1-м этапе исследования) составил 27,9мм, на 2-м этапе – 22,8мм, на 3-м – 17,7мм. Размеры опухоли значительно различались по данным УЗИ молочных желез до начала лечения и результатами планового гистологического исследования ($27,9 \pm 10,5$ vs. $15,8 \pm 16,0$, $p < 0.001$), после 2-х курсов ПХТ и результатами плановой гистологии ($22,8 \pm 10,7$ vs. $15,8 \pm 16,0$, $p < 0.001$). Средние размеры опухоли значительно не различались по данным УЗИ молочных желез после окончания лечения и результатами планового гистологического исследования ($17,7 \pm 12,4$ vs. $15,8 \pm 16,0$, $p = 0.186$). Уменьшение размеров опухоли в 1,57 раз в процессе лечения говорило об эффективности НПХТ.

Признаки злокачественного образования по результатам УЗИ молочных желез на 3-м этапе исследования отсутствовали у 12 (14,1%) женщин, что было подтверждено результатами планового патоморфологического заключения (Таблица 11). **Показатель cCR/pCR = 0,55.**

Таблица 11 – Наличие образования по данным УЗИ молочных желез на 3-м этапе исследования и достижение pCR

Наличие опухоли по данным УЗИ молочных желез (3-й этап исследования), N (%)	Опухоль не определялась	12 14.1%
	Опухоль определялась	73 85.9%
Достижение полного лечебного патоморфоза pCR, N (%)	Нет	63 74.1%
	Да	22 25.9%

Было выполнено сопоставление размеров опухолевого узла по данным предоперационного УЗИ молочных желез и результатам патоморфологического заключения. Высокая частота совпадения результатов отмечена при размере опухолевого узла от 2,0 см до 5,0 см и составила 68,9% (31) (за несовпадение размеров принималась разница более 5мм).

Разница в размерах опухоли менее 5 мм по данным УЗИ молочных желез на 3-м этапе исследования и результатам планового патоморфологического заключения была отмечена в 52,9 % (45) случаев. Разница в размерах опухоли менее 10 мм выявлена в 68,2 % (58) случаев (Таблица 12).

Таблица 12 – Совпадение размеров остаточной опухоли с точностью до 5 мм и 10 мм по данным УЗИ молочных желез на 3-м этапе исследования и результатами планового гистологического исследования

Разница размеров опухоли по данным УЗИ (3-й этап) и гистологии менее 5 мм, N (%)	Нет	40 (47.1%)
	Есть	45 (52.9%)
Разница размеров опухоли по данным УЗИ (3-й этап) и гистологии менее 10 мм, N (%)	Нет	27 (31.8%)
	Есть	58 (68.2%)

При анализе влияния биологического подтипа на точность оценки лечения при помощи УЗИ молочных желез отмечено, что метод обладает наименьшей информативностью в оценке HER2-позитивного и люминального А подтипов рака молочной железы. Наиболее высокой точностью по данным нашего исследования УЗИ молочных желез обладало при оценке люминального В Her2-негативного и тройного негативного подтипов рака молочной железы. Частота совпадения размеров остаточной опухоли по данным УЗИ молочных желез и результатам планового патоморфологического исследования у женщин с данными подтипами РМЖ была выше и составила 37,8% (17) и 26,7%(12) соответственно. Однако, достоверных корреляций обнаружено не было ($p=0,784$) (Таблица 13).

Таблица 13 – Зависимость точности определения размеров остаточной опухоли по данным УЗИ молочных желез в оценке НПХТ от биологического подтипа опухоли

		Разница размеров опухоли по данным УЗИ (3-й этап) и гистологии менее 5 мм, N (%)	
		Нет	Да
Биологический подтип опухоли	Люминальный А	7 (17.5%)	5 (11.1%)
	Люминальный В Her2-положительный	5 (12.5%)	6 (13.3%)
	Люминальный В Her2-отрицательный	10 (25.0%)	17 (37.8%)
	Тройной негативный	15 (37.5%)	12 (26.7%)
	Her2-положительный	3 (7.5%)	5 (11.1%)

Частота совпадения размеров опухоли по данным УЗИ молочных желез с результатами патоморфологического исследования не зависела от менопаузального статуса женщин, включенных в протокол исследования ($p=0,836$).

Кроме динамики изменения размера первичной опухоли при УЗИ оценивался статус регионарных лимфатических узлов на протяжении всего лечения. Поражение регионарных лимфатических узлов по данным УЗИ молочных желез и регионарных зон на 1-м этапе исследования было отмечено у

58 (68,2%) пациенток. При этом, у 37 (43,5%) женщин – в виде единичного лимфатического узла (узлов, не спаянных в конгломерат) с нарушенной дифференцировкой кор-синуса, у 16 (5,8%) – конгломерат аксиллярных лимфатических узлов, у 5 (5,8%) пациенток – измененные под- и надключичные лимфатические узлы.

У 42 из 58 (72,4 %) больных с предполагаемым по данным УЗИ молочных желез и регионарных зон метастатическим процессом в лимфоузлах, поражение лимфатических узлов подтверждено при плановом гистологическом исследовании.

Таким образом, наличие разницы размеров опухоли по данным УЗИ молочных желез после окончания лечения и результатами планового гистологического исследования не зависело от возраста пациенток, клинического размера опухоли, стадии заболевания, индекса пролиферации клеток, ИГХ-подтипа опухоли и менопаузального статуса женщин. Низкий индекс $cCR/pCR = 0,55$ говорил о недостаточности метода в оценке размеров образования в процессе НПХТ и предсказании патоморфологического регресса опухоли.

3.3. Магнитно-резонансная томография в оценке эффективности неoadьювантной химиотерапии

Для оценки эффективности неoadьювантного лечения 84(98,8%) больным было выполнено МРТ молочных желез с контрастным усилением на всех этапах исследования. На первом этапе по данным МРТ злокачественное новообразование в молочной железе было выявлено в 100% (84) случаев. После окончания химиотерапии остаточная опухоль по данным МРТ была обнаружена у 65(77,4%) женщин. С целью определения диагностических возможностей МРТ в оценке ответа опухоли на проводимое системное лечение выполнялось сравнение результатов МРТ с данными гистологического исследования, полученными после оперативного лечения.

Размеры опухоли значительно различались по данным МРТ молочных желез до начала лечения и результатами планового гистологического исследования

($35,9 \pm 16,6$ vs. $15,8 \pm 16,0$, $p < 0,001$), после 2-х курсов НПХТ и результатами плановой гистологии ($27,2 \pm 15,8$ vs. $15,8 \pm 16,0$, $p < 0,001$). Кроме того, размеры опухоли различались по данным МРТ молочных желез после окончания лечения и результатами планового гистологического исследования ($18,8 \pm 15,7$ vs. $15,8 \pm 16,0$, $p = 0,005$). Однако, коэффициент **cCR/ pCR равнялся 0,9**, что говорило о высокой точности данного метода в предсказании частоты достижения полного патоморфологического регресса.

На рисунке 16 представлена положительная динамика по данным МРТ молочных желез с динамическим КУ - полный клинический ответ, который в последующем подтверждён данными патоморфологического исследования: 4 степень лекарственного патоморфоза по шкале Лавниковой.

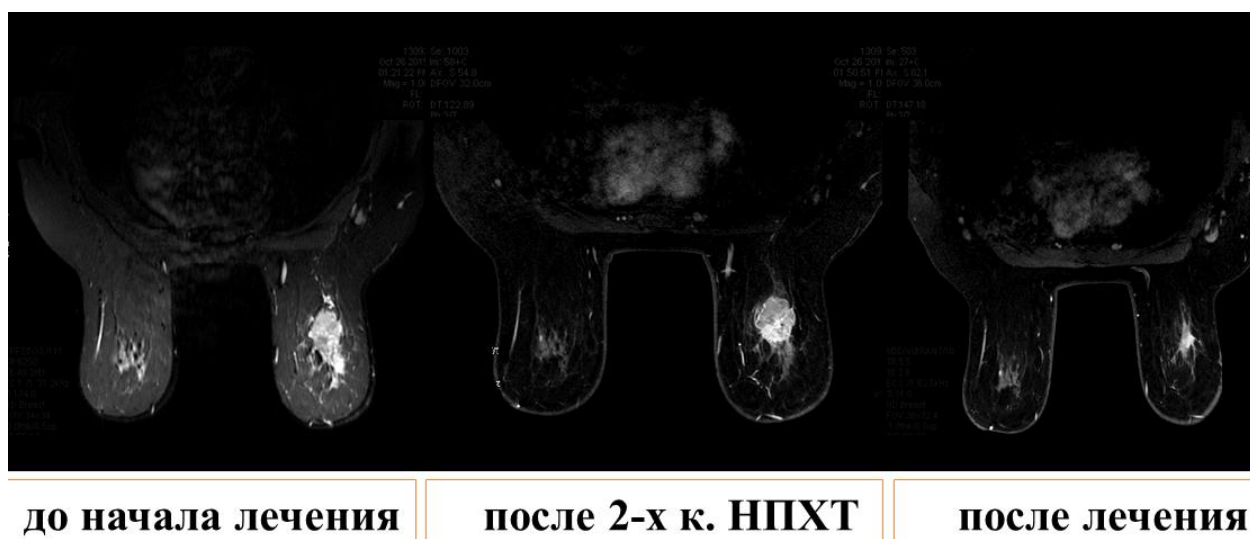


Рисунок 16 – Изменение размера опухолевого узла в процессе НПХТ по данным МРТ молочных желез с контрастированием (на 3-х этапах исследования: 1) до начала химиотерапии, 2- после 2-х курсов химиотерапии, 3-перед операцией). Положительная динамика

Больная О., 65 лет

Диагноз: рак правой молочной железы T2N1M0, тройной негативный подтип опухоли.

Лечение: 6 курсов химиотерапии по схеме AC, радикальная мастэктомия справа.

Результат: cCR, pCR.

На рисунке 17 представлена отрицательная динамика по данным МРТ молочных желез с динамическим КУ: увеличение размеров опухоли, появление очагов отсевов. Стоит отметить, что отсевы у данной больной регистрировались только по данным МРТ. По результатам УЗИ молочных желез и маммографии определялась стабилизация заболевания.

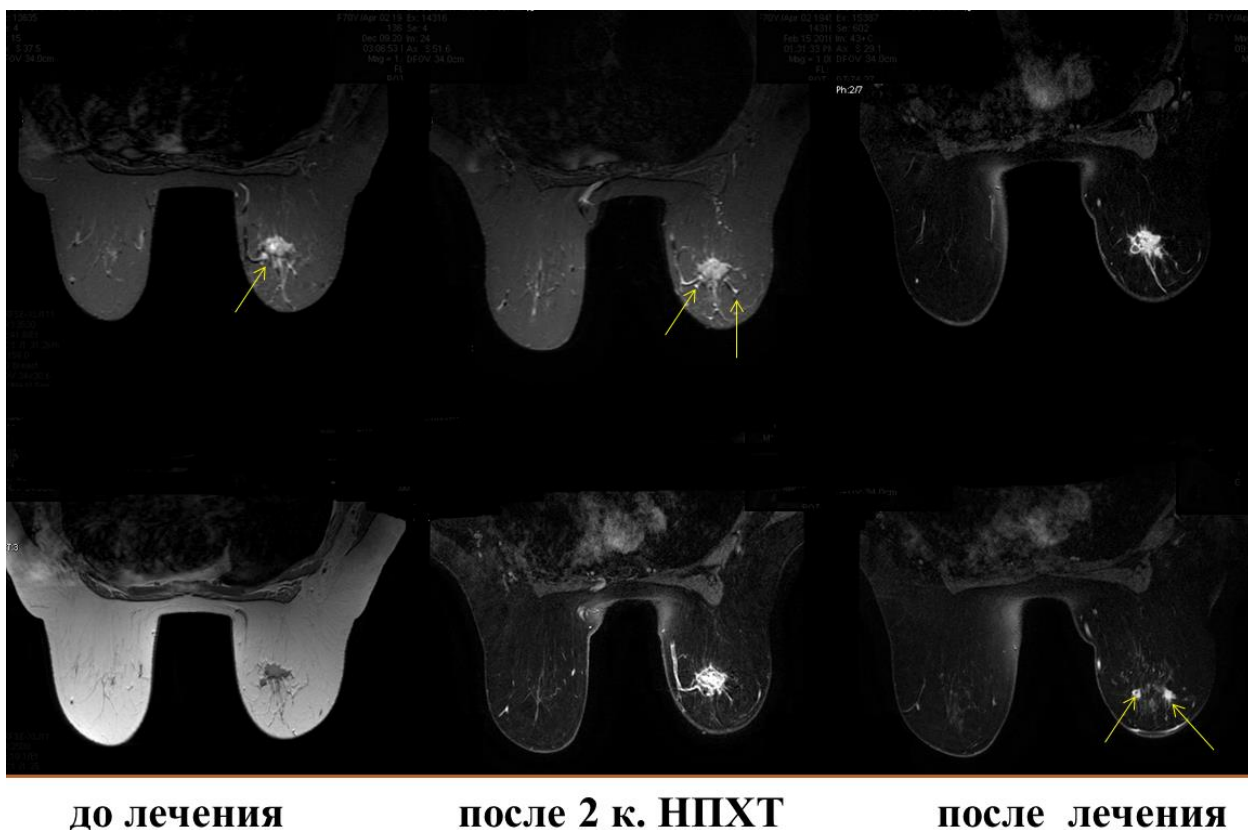


Рисунок 17 – Изменение размера опухолевого узла в процессе НПХТ по данным МРТ молочных желез с контрастированием (на 3-х этапах исследования: 1) до начала химиотерапии, 2- после 2-х курсов химиотерапии, 3-перед операцией).
Отрицательная динамика.

Больная П., 65 лет
 Диагноз: рак правой молочной железы T2N1M0, люминальный В Her2-негативный подтип опухоли.
 Лечение: 6 курсов химиотерапии по схеме АС, радикальная мастэктомия справа.
 Результат: прогрессирование заболевания: увеличение размеров опухоли, появление очагов отсевов, 2 степень лекарственного патоморфоза по шкале Лавниковой.

Стоит отметить, что МРТ молочных желез с контрастированием оказалась наиболее точным методом визуализации отсевов в ткани молочной железы и их динамики в процессе НПХТ ($p=0,003$). Так, по данным МРТ у 11 (13,0%) женщин

до начала лечения были обнаружены отсевы в ткани железы, у 7 (63,6%) из них отмечалось исчезновение отсевов в процессе химиотерапии, у 1 (9,9%) – увеличение количества отсевов. На 3-м этапе исследования отсевы по данным МРТ были выявлены у 4 (36,3%) пациенток. По данным планового патоморфологического исследования у 3 (75,0 %) из них обнаружены фокусы инвазивного рака, расцененные как очаги отсевов в ткани железы.

По результатам УЗИ молочных желез не было выявлено ни одной женщины с наличием отсевов в ткани железы, по результатам маммографии они были определены лишь у одной женщины. На основании чего, можно сделать вывод о том, что МРТ молочных желез с контрастированием является наиболее чувствительным методом в оценки отсевов в ткани молочной железы.

На основании данных послеоперационного исследования было проведено сопоставление результатов МРТ и патоморфологических размеров остаточной опухоли. Разница в размерах опухоли менее 5 мм по данным МРТ молочных желез на 3-м этапе исследования и результатам планового патоморфологического заключения была отмечена в 56,0 % (47) случаев. Разница в размерах опухоли менее 10 мм выявлена в 76,2 % (64) случаев (Таблица 14).

Таблица 14 – Совпадение размеров остаточной опухоли с точностью до 5 мм и 10 мм по данным МРТ молочных желез с контрастированием на 3-м этапе исследования и результатами планового гистологического исследования

Разница размеров опухоли по данным МРТ (3-й этап) и гистологии менее 5 мм, N (%)	Нет	37 (44.0%)
	Есть	47 (56.0%)
Разница размеров опухоли по данным МРТ (3-й этап) и гистологии менее 10 мм, N (%)	Нет	20 (23.8%)
	Есть	64 (76.2%)

Разница размеров опухоли по данным МРТ молочных желез после окончания лечения и размерами по результатам планового гистологического исследования менее 5 мм отмечалась в 56,0% случаев, менее 10 мм – в 76,2% (Таблица 15).

Таблица 15 – Наличие образования по данным МРТ молочных желез на 3-м этапе исследования и достижение pCR

Наличие опухоли по данным МРТ МЖ (3-й этап исследования), N (%)	Опухоль не определялась	20 (23.8%)
	Опухоль определялась	64 (76.2%)
Достижение полного лечебного патоморфоза, N (%)	Нет	63 (74.1%)
	Да	22 (25.9%)

Мы произвели оценку влияние возраста, менопаузального статуса и биологического подтипа опухоли на точность МРТ.

При анализе влияния биологического подтипа на точность оценки лечения при помощи МРТ молочных желез отмечено, что метод обладает наименьшей информативностью в оценке HER2 - позитивного и люминального А подтипов рака молочной железы. Высокой точностью метод обладает в оценке остаточного размера опухоли в группе больных с люминальным В Her2-отрицательным и тройным негативным подтипами РМЖ (если за несовпадение размеров принимать разницу более 5 мм). Частота совпадения размеров остаточной опухоли по данным МРТ молочных желез и результатам планового патоморфологического исследования у женщин с данными подтипами РМЖ была выше и составила 27,7% (13) и 29,8% (14) соответственно. Однако достоверных корреляций по проведенному нами анализу выявлено не было ($p=0,606$) (Таблица 16).

Таблица 16 – Зависимость точности определения размеров остаточной опухоли по данным МРТ молочных желез с контрастированием от биологического подтипа опухоли

		Разница размеров опухоли по данным МРТ (3-й этап) и гистологии менее 5 мм, N (%)	
		Нет	Да
Биологический подтип опухоли	Люминальный А	5 (13.5%)	6 (12.8%)
	Люминальный В Her2-положительный	2 (5.4%)	9 (19.1%)
	Люминальный В Her2-отрицательный	14 (37.8%)	13 (27.7%)
	Тройной негативный	13 (35.1%)	14 (29.8%)

	Her2-положительный	3 (8.1%)	5 (10.6%)
--	--------------------	----------	-----------

Частота совпадения размеров опухоли по данным МРТ молочных желез с результатами планового патоморфологического исследования не зависела от менопаузального статуса женщин ($p=0,304$).

Кроме динамики изменения размера первичной опухоли во время выполнения МРТ молочных желез оценивался статус регионарных лимфатических узлов на протяжении всего лечения. Поражение регионарных лимфатических узлов по данным МРТ молочных желез и регионарных зон на 1-м этапе исследования было отмечено у 49 (57,6%) пациенток. При этом, у 40 (81,6%) женщин – в виде контрастирования единичного лимфатического узла (узлов, не спаянных в конгломерат), у 7 (14,3%) – конгломерат аксиллярных лимфатических узлов, у 2 (4,1%) пациенток – измененные под- и надключичные лимфатические узлы.

У 42 из 49 (85,7 %) больных с предполагаемым по данным МРТ молочных желез и регионарных зон метастатическим процессом в лимфоузлах, поражение лимфатических узлов подтверждено при плановом гистологическом исследовании. Что говорит о высокой точности метода в оценке поражения регионарных лимфатических узлов.

3.3.1. Возможности использования МР-диффузии в оценке эффективности предоперационной химиотерапии

В процессе выполнения МРТ молочных желез с контрастом, ИКД был определен у 82 (96,5%) пациенток на всех этапах исследования. Среднее значение ИКД на 1-м этапе исследования составило - $0,001205 \text{ мм/с}^2$ ($1,2 \times 10^{-3} \text{ мм/с}^2$), на 2-м этапе исследования - $0,001103 \text{ мм/с}^2$ ($1,1 \times 10^{-3} \text{ мм/с}^2$), на 3-м этапе – $0,0013009 \text{ мм/с}^2$ ($1,1 \times 10^{-3} \text{ мм/с}^2$) (Таблица 17).

Таблица 17 – Значение ИКД ($\text{мм}/\text{с}^2$) на разных этапах исследования

МР-диффузия до начала лечения (1-й этап исследования): значение ИКД, $\text{мм}/\text{с}^2$	N	82
	Среднее значение	0.001205
	Стандартное отклонение	0.001496
	Минимум	0.000508
	Максимум	0.006940
МР-диффузия после 2-х курсов химиотерапии (2-й этап исследования): значение ИКД, $\text{мм}/\text{с}^2$	N	82
	Среднее значение	0.001103
	Стандартное отклонение	0.000340
	Минимум	0.000535
	Максимум	0.002430
МР-диффузия после окончания лечения (3-й этап исследования): значение ИКД, $\text{мм}/\text{с}^2$	N	82
	Среднее значение	0.00013009
	Стандартное отклонение	0.0003617
	Минимум	0.0006690
	Максимум	0.0021130
	Медиана	0.0013161

В зависимости от менопаузального статуса, гистологического и биологического подтипов рака значение и динамика ИКД на всех этапах лечения значимо не различались. Стоит отметить, что ИКД на 3-этапе исследования был достоверно ниже во всех группах больных, в том числе независимо от подтипа опухоли (Таблица 18).

Таблица 18 – Зависимость ИКД от биологического подтипа опухоли на разных этапах лечения

	Биологический подтип опухоли				
	Люминальный А	Люминальный В Her2-положительный	Люминальный В Her2-отрицательный	тройной негативный	Her2-положительный
N (количество больных)	11	11	26	26	8
МР-диффузия до начала лечения (1-й этап исследования): ИКД, $\text{мм}/\text{с}^2$, среднее значение	0.000837	0.001428	0.001066	0.001462	0.001016

МР-диффузия после 2-х курсов химиотерапии (2-й этап исследования): ИКД, мм/с ² , среднее значение	0.001066	0.001067	0.001088	0.001043	0.001446
МР-диффузия после окончания лечения (3-й этап исследования): ИКД, мм/с ² , среднее значение	0.0013794	0.0012485	0.0012675	0.0012310	0.0016014
Динамика ИКД после 2-х курсов НПХТ (2-й этап исследования)	0.0002	0.0004	0.0000	-0.0004	0.0004
Динамика ИКД после 2-х курсов НПХТ (2-й этап исследования)	0.0005	-0.0002	0.0002	-0.0002	0.0006

По результатам корреляционного анализа по методу Спирмена, измеряемый до начала лечения (на 1-м этапе исследования) ИКД слабо коррелировал с возрастом женщин, включенных в протокол. В возрастной группе старше 50 лет, среднее значение ИКД на 1-м этапе исследования было выше, чем среди пациенток других возрастных групп ($r=0,216$, $p=0.051$).

ИКД, определяемый до начала лечения (на 1-м этапе исследования), достоверно не различался в группах пациентов, достигших полного лечебного патоморфоза и нет ($r=-0.253$, $p=0.022$) (Рисунок 18).

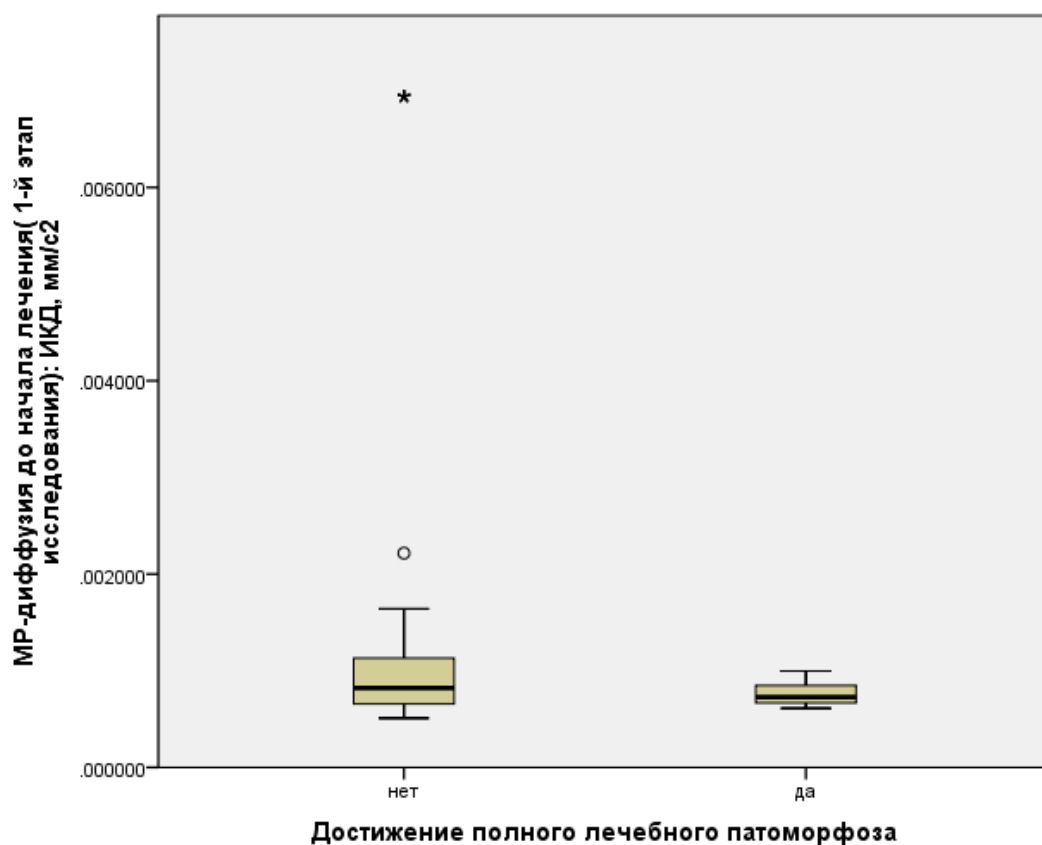


Рисунок 18 – Зависимость ИКД до начала лечения от частоты достижения pCR

ИКД после 2-х курсов химиотерапии (2-й этап исследования) был в среднем достоверно выше в группе пациентов с полным лекарственным патоморфозом: (0.001227 vs. 0.001058, $p=0,025$) (Рисунок 19).

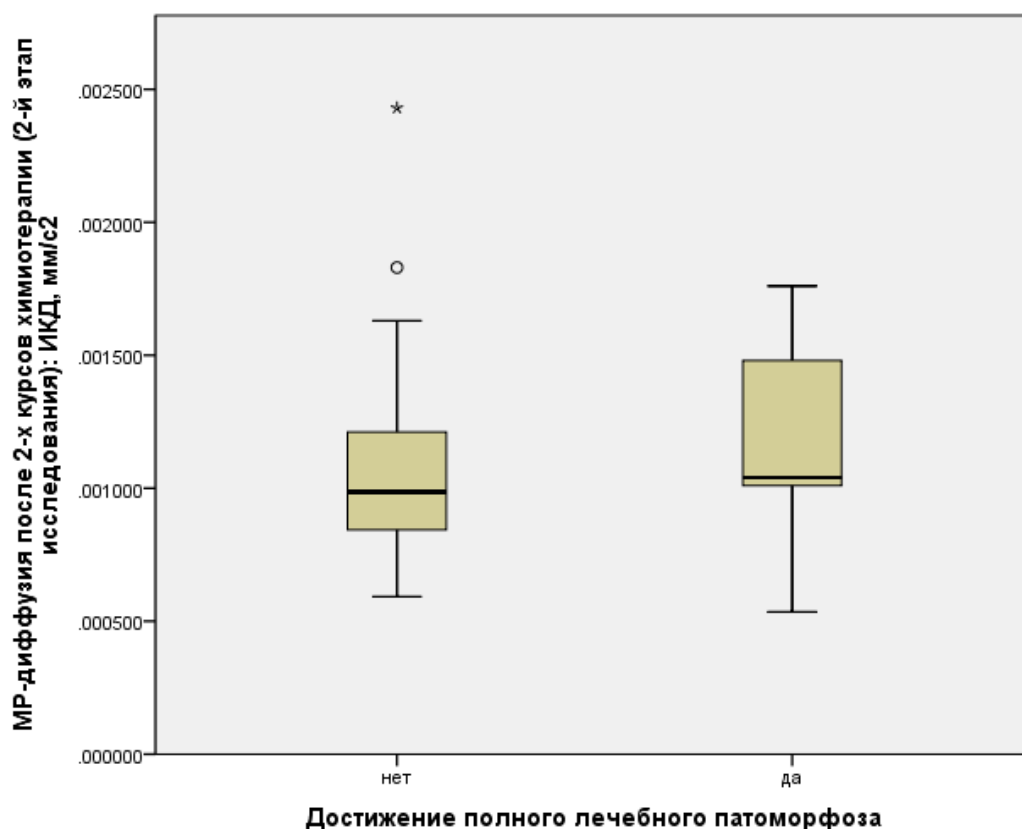


Рисунок 19 – Зависимость величины ИКД после 2-х курсов химиотерапии от частоты достижения pCR

Также было отмечено повышение ИКД после 2-х курсов НПХТ в группе женщин с уменьшением размера первичной опухоли по результатам клинического осмотра ($r=-0.230$, $p=0.039$) и УЗИ молочных желез ($r=-0.226$, $p=0.041$).

ИКД после окончания лечения (3-й этап исследования) был в среднем достоверно выше в группе женщин, достигших полного лечебного патоморфоза по результатам планового гистологического исследования (0.0015145 vs. 0.0012226, $p=0.001$) (Рисунок 20).

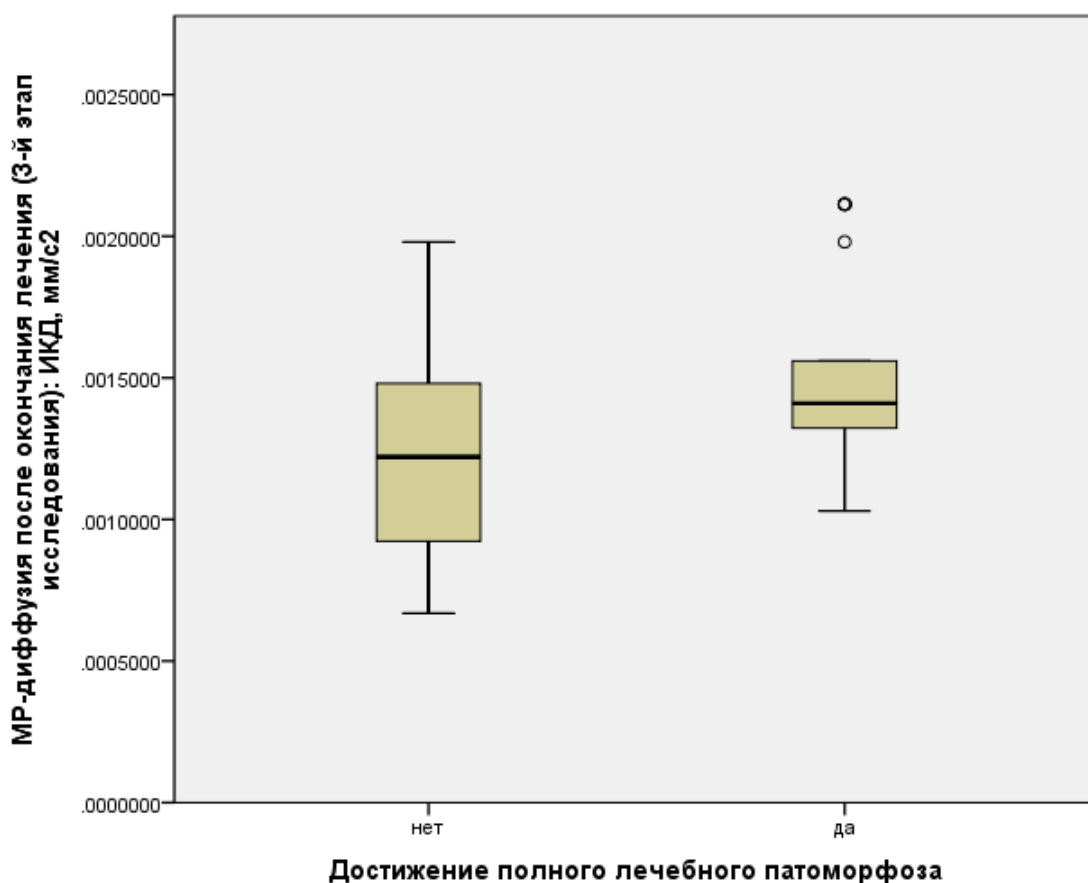


Рисунок 20 – Зависимость величины ИКД после окончания лечения (3-й этап исследования) от частоты достижения pCR

Изменение величины (динамика) ИКД на 2-м этапе исследования достоверно различалось в группах пациенток с полным лечебным патоморфозом и без него (0.0005 vs. -0.0003, $p=0.001$) (Рисунок 21).

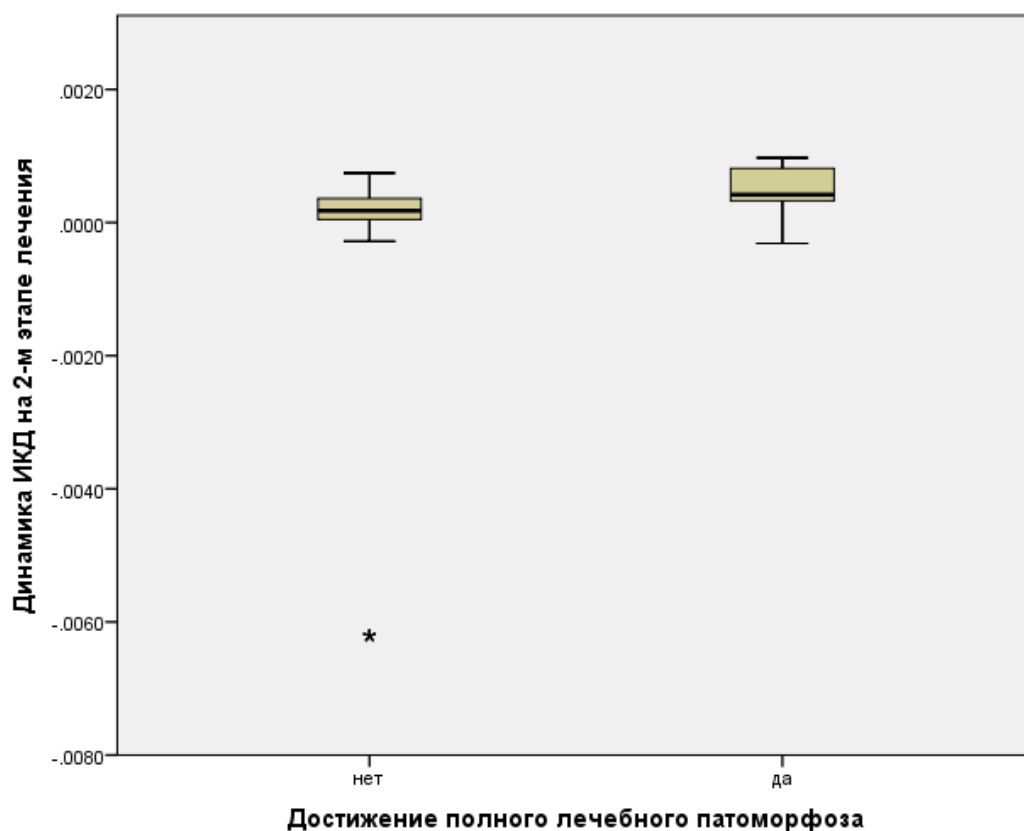


Рисунок 21 – Динамика ИКД на 2-м этапе исследования в зависимости от частоты достижения рСР

Динамика ИКД на 3-м этапе исследования достоверно различалась в группах пациенток с полным лечебным патоморфозом и без него и (0.0008 vs. -0.0001, $p < 0.001$) (Рисунок 22).

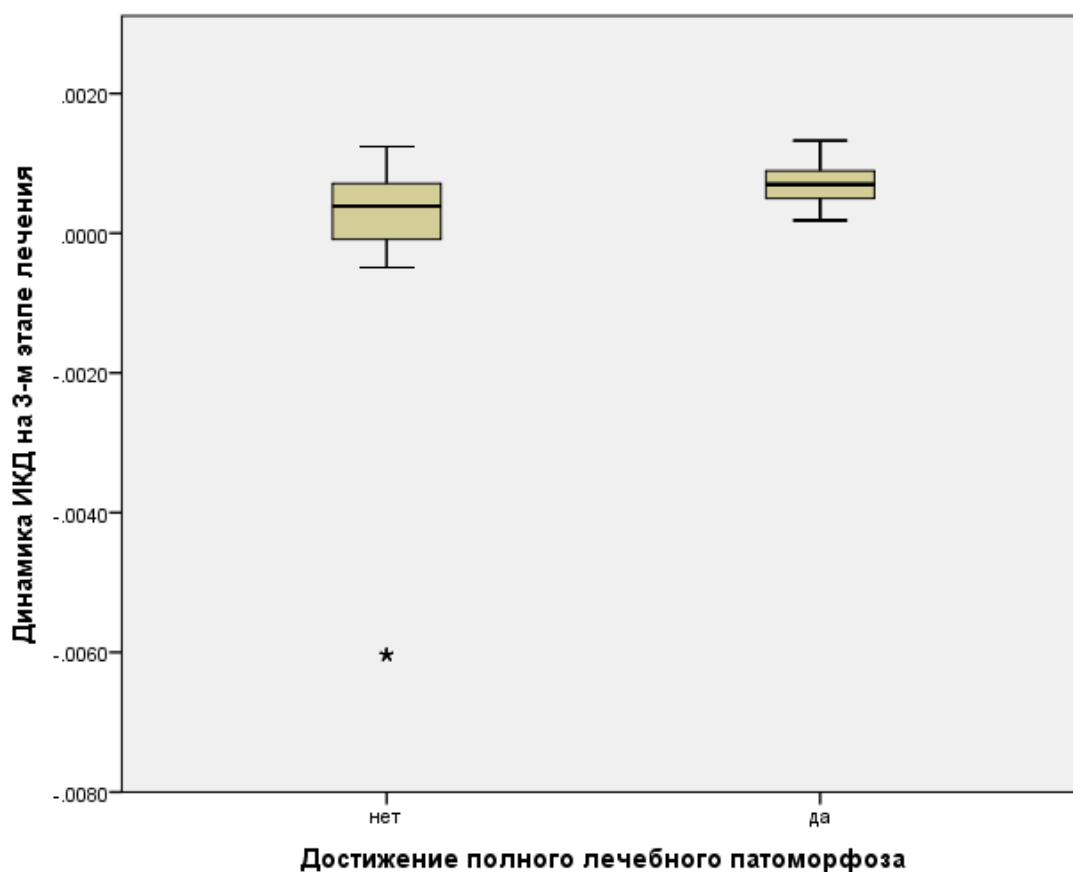
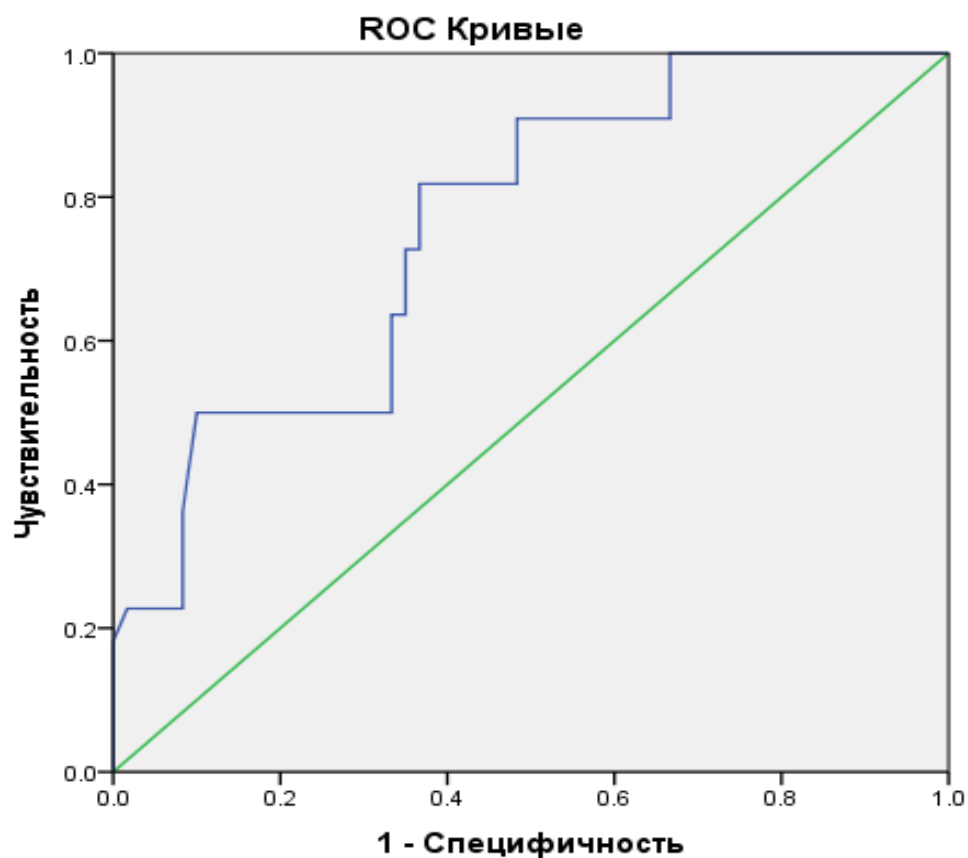


Рисунок 22 – Динамика ИКД на 3-м этапе исследования в зависимости от частоты достижения pCR

Таким образом, у пациенток с полным лечебным патоморфозом в процессе НПХТ регистрировалось увеличение ИКД, в то время как в группе больных, не достигших полного патоморфологического регресса показатель ИКД уменьшался в процессе лечения. Прогностическая значимость для определения полного лечебного патоморфоза с учетом регрессионного анализа была выше в группе больных с выраженной динамикой ИКД на 3-м этапе исследования ($B=2652.4$, $p=0.001$). Однако, не смотря на то, что общий процент верно предсказанных результатов по наступлению полного лечебного патоморфоза составил 75.6%, процент верно предсказанных положительных результатов составил всего 22.7% (Рисунок 23).



Диагональные сегменты, сгенерированные связями.

Рисунок 23 – Влияние динамики ИКД на прогноз полного патоморфологического ответа. Метод логистической регрессии. ROC-анализ

Определяемый по результатам МР-диффузии ИКД до начала лечения (на 1-м этапе исследования) (Рисунок 24) и после 2-х курсов химиотерапии (на 2-м этапе исследования) (Рисунок 25) достоверно не различалась в группах пациентов, достигших хорошего лечебного патоморфоза и без него.

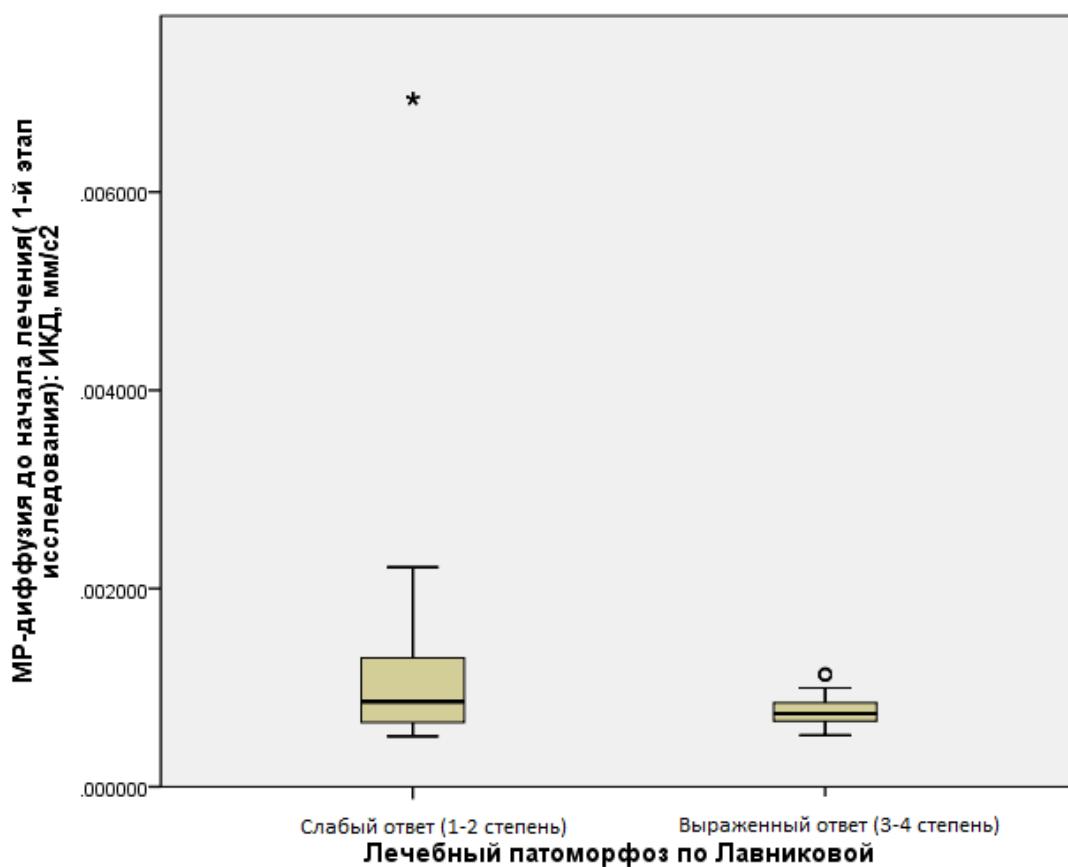


Рисунок 24 – Зависимость ИКД на 1-м этапе исследования от степени лекарственного патоморфоза

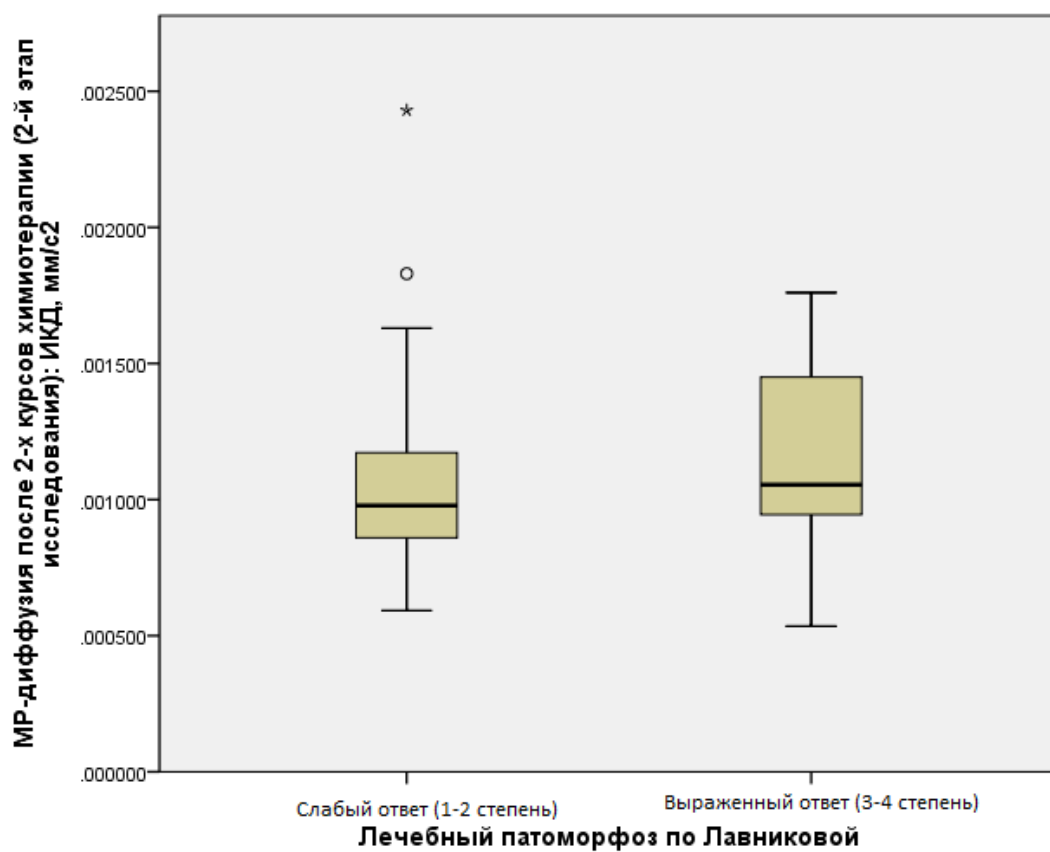


Рисунок 25 – Зависимость ИКД на 2-м этапе исследования от степени лекарственного патоморфоза

Значение ИКД после окончания лечения было в среднем достоверно выше в группе пациентов с хорошим лечебным патоморфозом (0.0014260 vs. 0.0011818, $p=0.001$) (Рисунок 26).

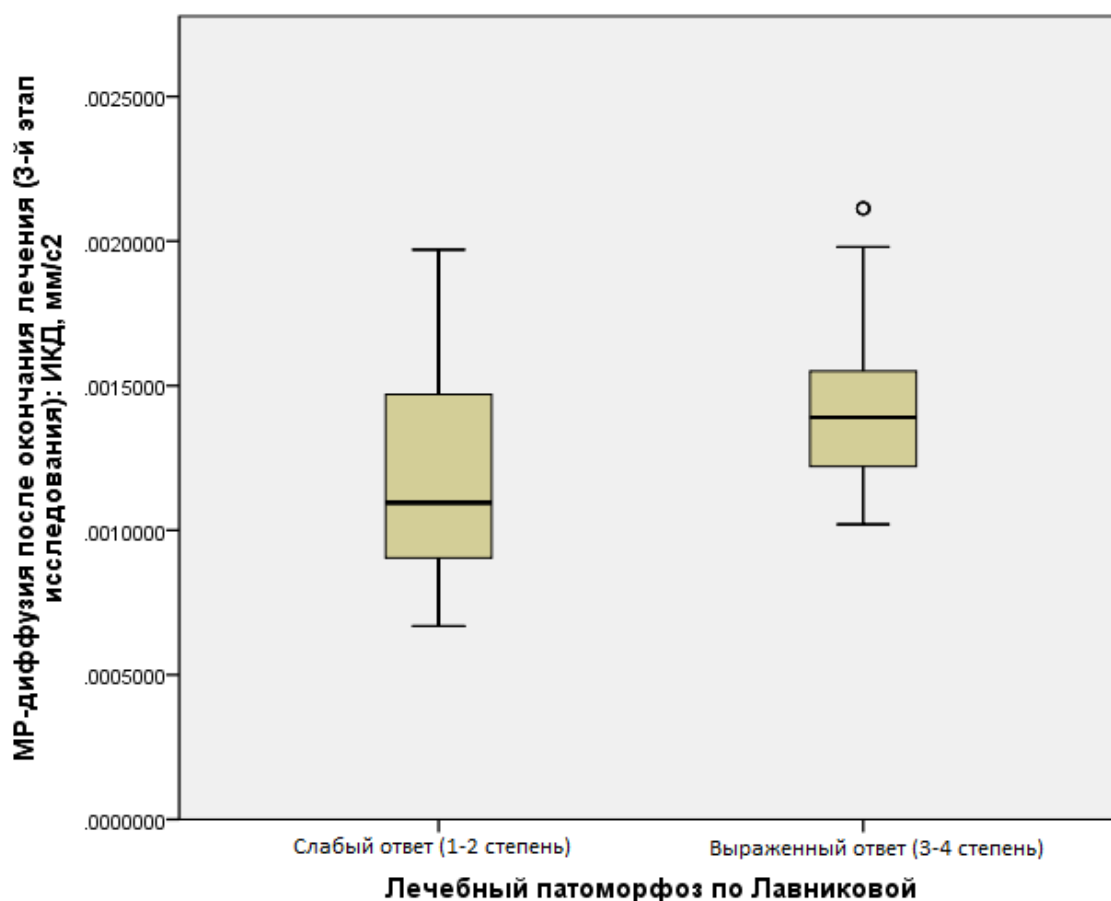


Рисунок 26 – Зависимость ИКД на 3-м этапе исследования от степени лекарственного патоморфоза

Изменение величины (динамика) ИКД на 2-м и на 3-м этапах исследования достоверно различалось в группах пациенток с хорошим лечебным патоморфозом (Рисунок 27) и без него (Рисунок 28): (0.0004 vs. -0.0005, $p=0.006$) и (0.0006 vs. -0.0004, $p<0.001$) соответственно.

У пациенток с выраженным лечебным патоморфозом значение ИКД в среднем увеличилось по сравнению с величиной ИКД до лечения, на 2-м и на 3-м

этапах лечения, у пациенток со слабым лечебным патоморфозом – в среднем уменьшилось.

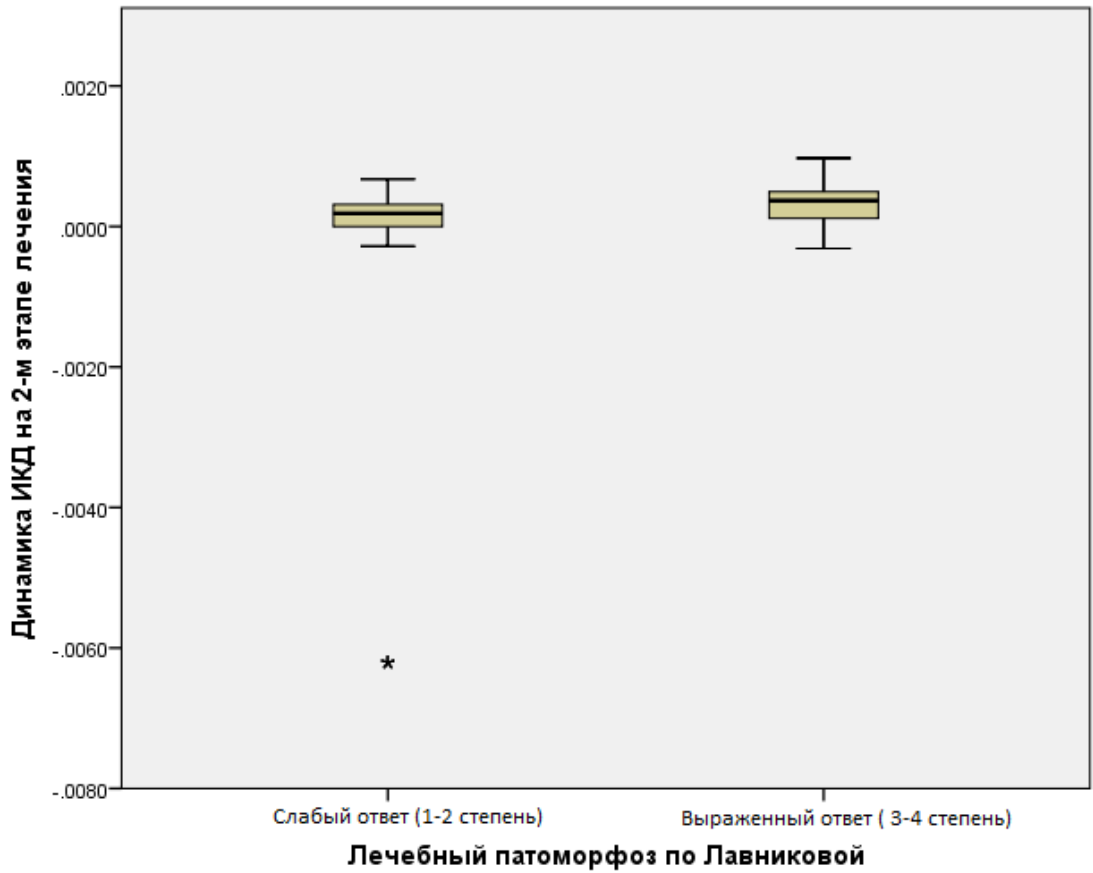


Рисунок 27 – Динамика ИКД после 2-х курсов НПХТ (на 2-м этапе исследования) в зависимости от степени патоморфологического ответа

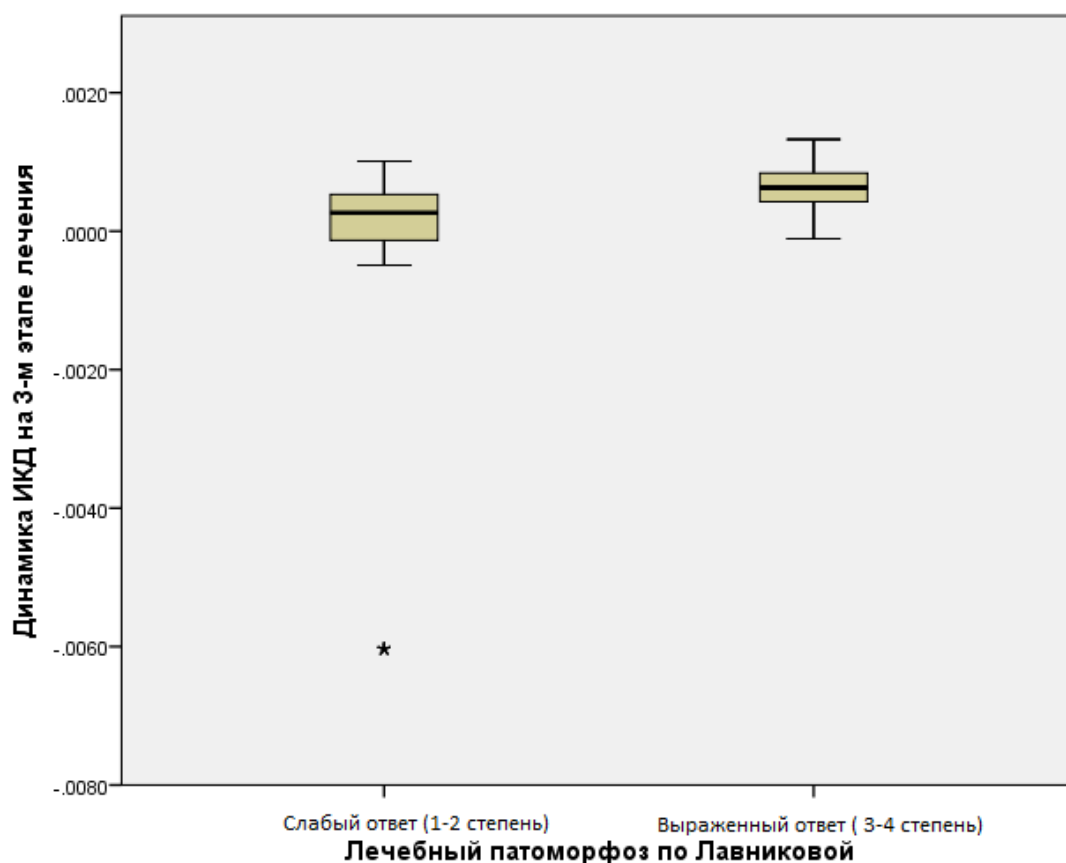
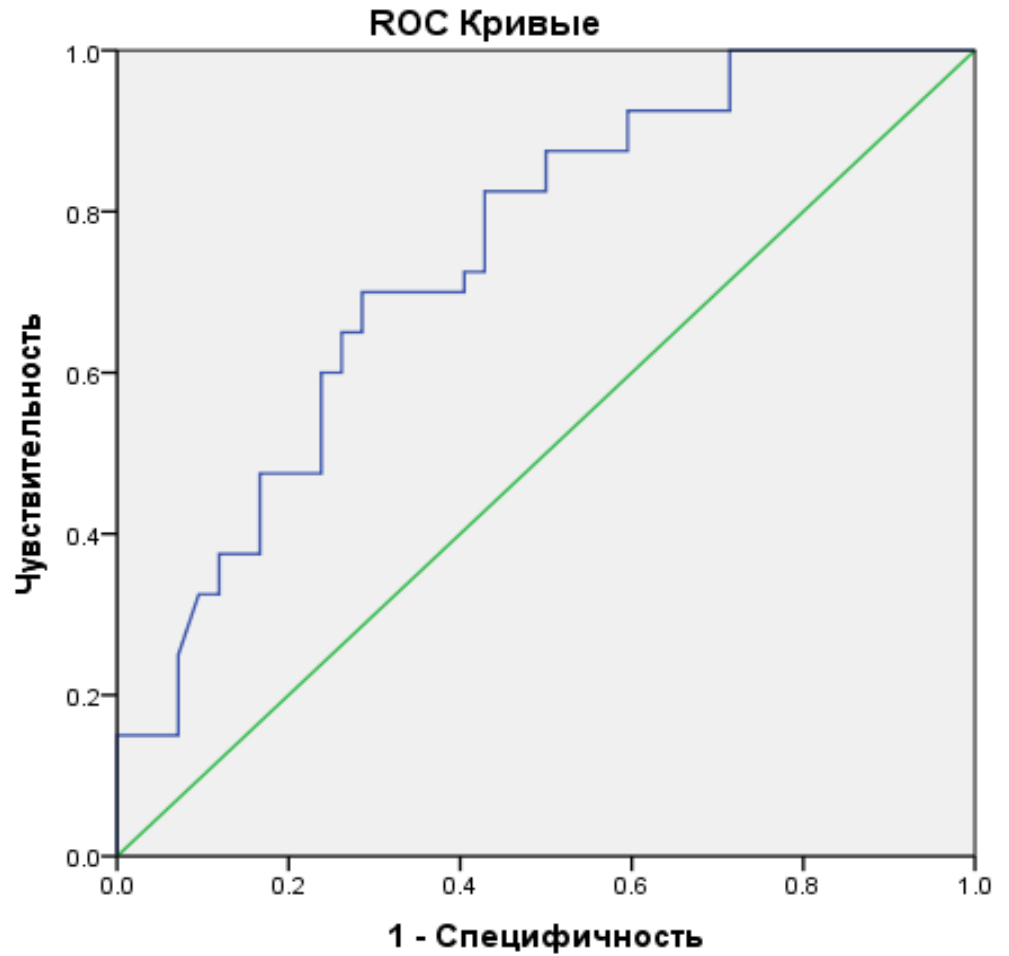


Рисунок 28 – Динамика ИКД после окончания лечения (на 3-м этапе исследования) в зависимости от степени патоморфологического ответа

Прогностическая значимость для определения выраженного лечебного патоморфоза с учетом регрессионного анализа была выше у динамики ИКД на 3-м этапе ($B=2158.6$, $p=0.002$). Общий процент верно предсказанных результатов по наступлению выраженного лечебного патоморфоза составил 64.6%, процент верно предсказанных положительных результатов составил 70.0%. Однако, процент верно предсказанных отрицательных результатов был довольно низким и составил 59,5% (Рисунок 29).



Диагональные сегменты, сгенерированные связями.

Рисунок 29 – Влияние динамики ИКД на прогноз хорошего (3-4 степень по Лавниковой) патоморфологического ответа. Метод логистической регрессии.
ROC-анализ

На рисунке 30 представлена динамика ИКД в процессе НПХТ у больной с хорошим ответом опухоли на лечение.

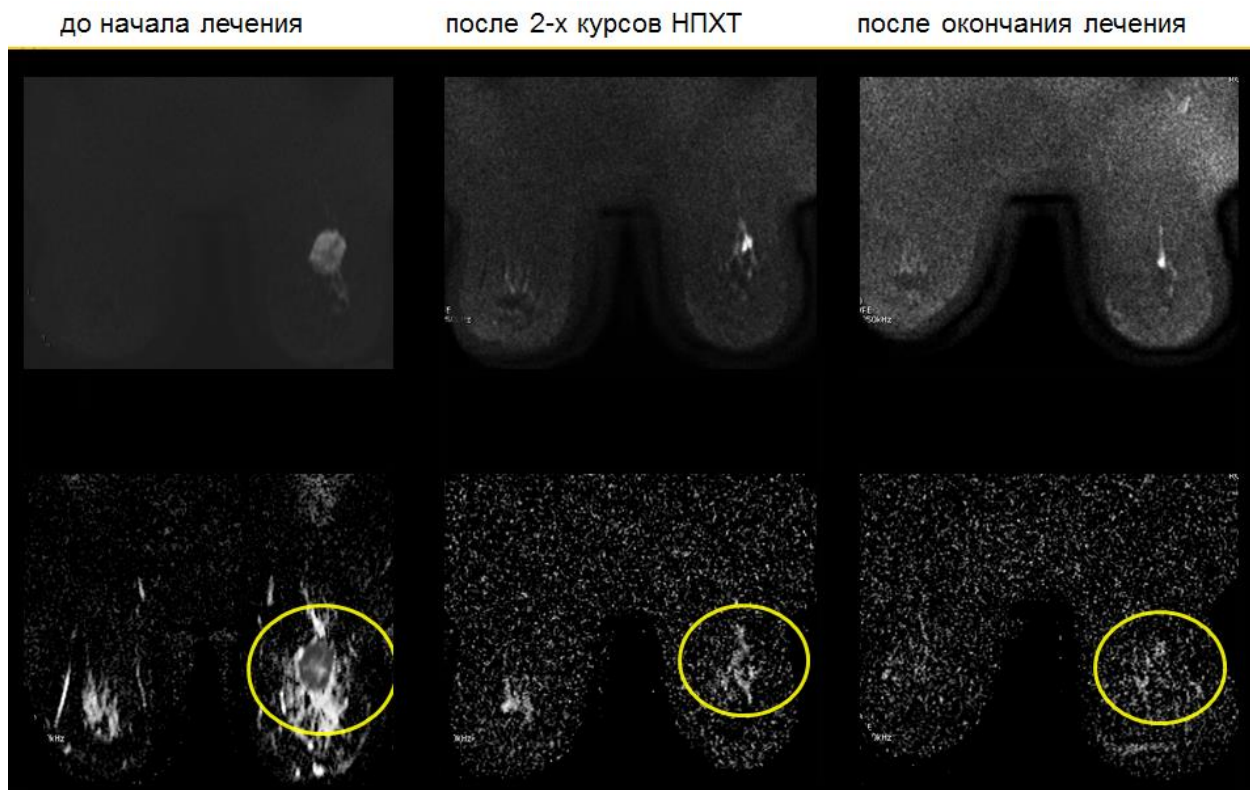


Рисунок 30 – Динамика диффузионно-взвешенных изображений в процессе НПХТ. Изменение размера опухолевого узла в процессе НПХТ по данным МРТ молочных желез с контрастированием и МР-диффузии (на 3-х этапах исследования: 1) до начала химиотерапии, 2- после 2-х курсов химиотерапии, 3- перед операцией). Положительная динамика.

Больная Ч., 32 лет

Диагноз: рак правой молочной железы T2N0M0, тройной негативный подтип опухоли.

Лечение: 4 курса химиотерапии по схеме АС, 4курса по схеме карбоплатин+паклитаксел, радикальная мастэктомия справа с одномоментной реконструкцией экспандером.

Результат: cCR, pCR.

Для сравнительной оценке эффективности МР-диффузии в предсказании полного патоморфологического регресса опухоли был выполнен расчет коэффициента cCR/pCR. Вероятностный коэффициент по данным МР-диффузии на 3-м этапе исследования составил 0,75, что говорит о значимости метода в предсказании полного патоморфологического регресса опухоли после НПХТ.

3.3.2. Возможности использования МР-спектроскопии в оценке эффективности предоперационной химиотерапии

На 1-м этапе исследования МР-спектроскопия была выполнена 58(68,2%) пациенткам, на 2-м – 56(65,8%), на 3-м этапе – 57(67,0%). За отсутствие пика

принималась площадь под кривой менее 30 мм². Среднее значение спектра холина (измеряемой площади под пиком холина) составило: 420,0 мм² - на 1-м этапе исследования, 234 мм² – на 2-м этапе исследования, 161 мм² - на 3-м этапе исследование. Уменьшение площади холина под пиком в процессе лекарственного лечения было ассоциировано с эффектом химиотерапии (Таблица 19).

Таблица 19 – Динамика площади под пиком холина в процессе НПХТ

МР-спектроскопия до начала лечения (1-й этап исследования): спектр холина: площадь под пиком холина, мм ²	N	58
	Среднее значение	420.0
	Минимум	0.0
	Максимум	1356.0
	Медиана	261.5
МР-спектроскопия после 2-х курсов химиотерапии (2-й этап исследования): спектр холина: площадь под пиком холина, мм ²	N	56
	Среднее значение	234.5
	Минимум	0.0
	Максимум	2200.0
	Медиана	41.0
МР-спектроскопия после окончания лечения (3-й этап исследования): спектр холина: площадь под пиком холина, мм ²	N	57
	Среднее значение	161.1
	Минимум	0.0
	Максимум	1305.0
	Медиана	0.0

Пик холина на 1-м этапе исследования определялся у 43 (74,1%) женщин, на 2-м этапе исследования – у 29 (51,8%), на 3-м этапе исследования – у 21(36,8%) пациенток (Таблица 20).

Таблица 20 – Частота определения пика холина на разных этапах исследования

Пик холина (1 этап исследования), N (%)	не определялся	15 (25.9%)
	определялся (>30 мм ²)	43 (74.1%)
Пик холина (2 этап исследования), N (%)	не определялся	27 (48.2%)
	определялся (>30 мм ²)	29 (51.8%)
Пик холина (3 этап исследования), N (%)	не определялся	36 (63.2%)
	определялся (>30 мм ²)	21 (36.8%)

У женщин с размером опухоли менее 20 мм исследование было затруднено (пик холина чаще не определялся), что было связано с особенностями методики.

С увеличением размера опухоли увеличивалась частота определения пика холина. Так в группе больных с размером опухоли (по данным общего осмотра) более 41 мм пик холина определялся в 91,6% случаев, в то время как при размере опухоли менее 20 мм лишь в 50,0% случаев ($r=0,305$, $p=0,021$). При этом в группе больных с размером опухоли более 20 мм площадь под кривой была выше, чем у больных с меньшим размером опухоли (Таблица 21).

Таблица 21 – Зависимость частоты определения пика холина на 1-м этапе исследования от размера опухоли (N=58)

Размер опухоли, мм (по данным МРТ молочных желез)	Количество больных (N)	Частота определения пика N (%)	Площадь под кривой, мм ²
До 20 мм	6	3 (50,0 %)	61 (0-98)
21-40 мм	30	18 (64,3%)	215 (20-753)
Более 40 мм	22	22 (91,6%)	443(237-919)

Частота определения пика холина в опухоли также коррелировала с размером образования по данным инструментальных методов исследования до начала лечения: маммографии ($r=0,332$, $p=0,012$), МРТ молочных желез ($r=0,395$, $p=0,002$), УЗИ молочных желез ($r=0,526$, $p<0,001$). С увеличением размера образования увеличивалась частота регистрации пика холина, площадь под пиком холина ($p=0,001$).

По результатам проведенного анализа выявлено, что величина площади под пиком холина до начала лечения имела средние прямые корреляции с индексом пролиферации клеток ($r=0,555$, $p<0,001$). Так, у женщин с индексом пролиферации Ki67 более 50,0%, средняя площадь под пиком холина была больше, чем в группе женщин с меньшим индексом пролиферации.

В группе больных с сохранной функцией яичников снижение площади под пиком холина в процессе НПХТ было наиболее выраженным. Средняя площадь под пиком к моменту окончания лечения уменьшилась в 6,4 раза (с 449,4 мм² до 69,9мм²). Однако достоверных корреляций при данном анализе обнаружено не было ($p=0,504$).

Максимальное снижение средней площади под пиком холина наблюдалось в группе больных с инвазивным дольковым раком - с 364,3мм² на 1-м этапе исследования до 86,0 мм² на 2-м этапе и 12,2мм² на 3-м этапе исследования. Однако достоверных корреляций выявлено не было (p=0,318)

При анализе зависимости определения пика холина от биологического подтипа опухоли выявлено, что наибольшая площадь под пиком на 1-м этапе исследования и наилучшая динамика после окончания лечения зарегистрированы в группе больных с наиболее агрессивными подтипами РМЖ (тройным негативным и Her2- позитивным). Так, в группе больных с тройным негативным раком молочной железы отмечалось наибольшее снижение площади под пиком холина в процессе НПХТ – в 4 раза. В то время как в группе больных с люминальным А типом – в 1,3 раза, что совпадало с преимущественно плохим ответом опухоли на лечение в данной группе больных. Однако достоверных корреляций при анализе частоты встречаемости пика холина на 1-м этапе исследования в зависимости от биологического подтипа РМЖ выявлено не было (p=0,404) (Таблица 22).

Таблица 22 – Зависимость определения пика холина на 1-м этапе исследования от биологического подтипа опухоли

	Биологический подтип опухоли				
	Люминальный А	Люминальный В Her2-положит.	Люминальный В Her2-отрицат.	Тройной негативный	Her2-положит.
N	11	6	19	18	4
МР-спектроскопия до начала лечения (1-й этап исследования): спектр холина: площадь под пиком холина, мм ² , среднее значение	175.5	232.5	424.3	598.1	552.0
N	10	6	18	18	4
МР-спектроскопия после 2-х курсов химиотерапии (2-й этап исследования): спектр холина: площадь под пиком холина, мм ² , среднее значение	207.7	321.7	233.4	240.8	147.5
N	10	6	18	19	4

МР-спектроскопия после окончания лечения (3-й этап исследования): спектр холина: площадь под пиком холина, мм ² , среднее значение	137.0	202.8	192.6	148.4	77.0
---	-------	-------	-------	-------	------

Наличие пика холина на первом, втором и третьем этапах лечения значительно не различалось в группах пациенток с полным лечебным патоморфозом и без него.

Динамика пика холина после окончания лечения (на 3-м этапе исследования) значительно различалась в группах пациенток, достигших в процессе лечения pCR и нет. Снижение пика холина в процессе НПХТ наблюдалось чаще и было более выраженным среди пациенток с полным лекарственным патоморфозом, чем без него ($-693,88 \pm 478,27$ vs. $-200,60 \pm 501,43$, $p=0,041$). Прогностическая значимость для определения полного лечебного патоморфоза с учетом регрессионного анализа была выше в группе больных, имевших положительную динамику (снижение площади под пиком холина, исчезновение пика) к 3-му этапу исследования (после окончания лечения) ($B=-0,002.6$, $p=0.019$). Общий процент верно предсказанных результатов по наступлению полного лечебного патоморфоза составил 87,5%, процент верно предсказанных отрицательных результатов составил 100.0%. Однако, процент верно предсказанных положительных результатов составил всего 12,5% (Рисунок 31).

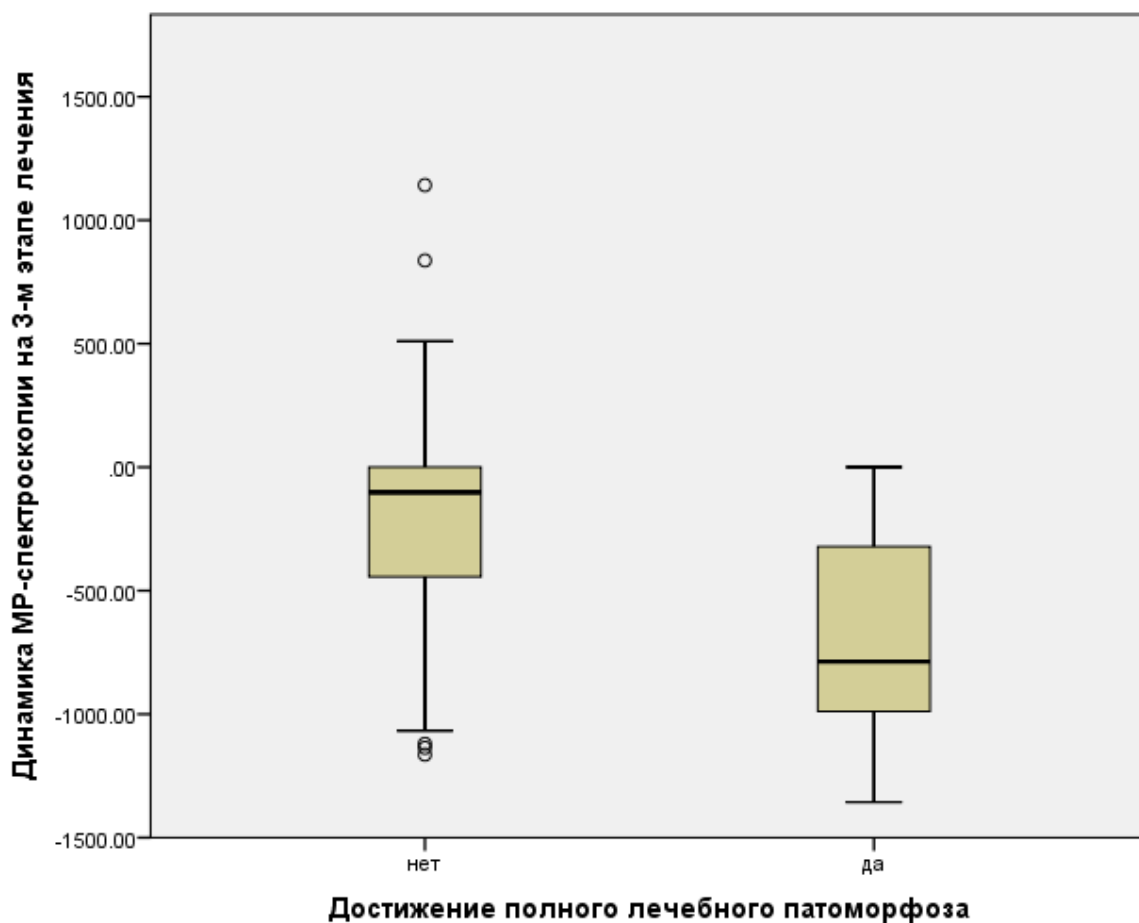


Рисунок 31 – Динамика пика холина на 3-м этапе исследования в зависимости от частоты достижения pCR

В группе больных достигших pCR (N=8), средняя площадь под пиком холина была выше на 1-м этапе исследования и составила 733,4 мм², в то время как в группе женщин не достигших pCR (N=50) – 269,9мм². В группе женщин, достигших pCR в процессе НПХТ отмечалось снижение средней площади под пиком холина 18,56 раз к моменту окончания лечения. В группе женщин без pCR, средняя площадь под пиком уменьшилась в процессе НПХТ в 2 раза.

Стоит отметить, что в группе женщин, достигших pCR, отмечалось раннее снижение пика холина после 2-х курсов химиотерапии в 2,4 раза, среди женщин, не достигших pCR – в 1,6 раз (Таблица 23).

Таблица 23 – Средняя площадь под пиком холина на разных этапах исследования в группе больных достигших pCR и без достижения pCR

	Достижение полного лечебного патоморфоза (pCR)	
	Нет	Да
N	50	8
МР-спектроскопия до начала лечения (1-й этап исследования): спектр холина: площадь под пиком холина, мм ² , среднее значение	369.9	733.4
N	48	8
МР-спектроскопия после 2-х курсов химиотерапии (2-й этап исследования): спектр холина: площадь под пиком холина, мм ² , среднее значение	223.8	298.8
N	49	8
МР-спектроскопия после окончания лечения (3-й этап исследования): спектр холина: площадь под пиком холина, мм ² , среднее значение	180.9	39.5

Уменьшение уровня холина, а также его исчезновение в процессе НПХТ - с большей частотой выявлялось в группе больных с pCR. Так, среди женщин, достигших pCR по результатам планового патоморфологического исследования, частота определения пика была ниже на 2-м и 3-м этапах исследования, чем в группе пациенток, не достигших pCR в процессе лечения.

По результатам проведенного корреляционного анализа, динамика пика холина после 2-х курсов НПХТ различалась в группах пациенток с полным лечебным патоморфозом и без него. Исчезновение пика холина после 2-х курсов лечения с высокой частотой наблюдалось в группе больных с pCR. По данным регрессионного анализа выявлена высокая прогностическая значимость ранней динамики пика холина (уменьшение площади под пиком после 2-х курсов НПХТ) в общей группе больных (95%, ДИ 0,514-0,835, AUC 0,674) с критическим уровнем выше 0,0001635. Это говорит о возможности использования данного маркера в качестве предиктора раннего ответа на НПХТ (Рисунок 32).

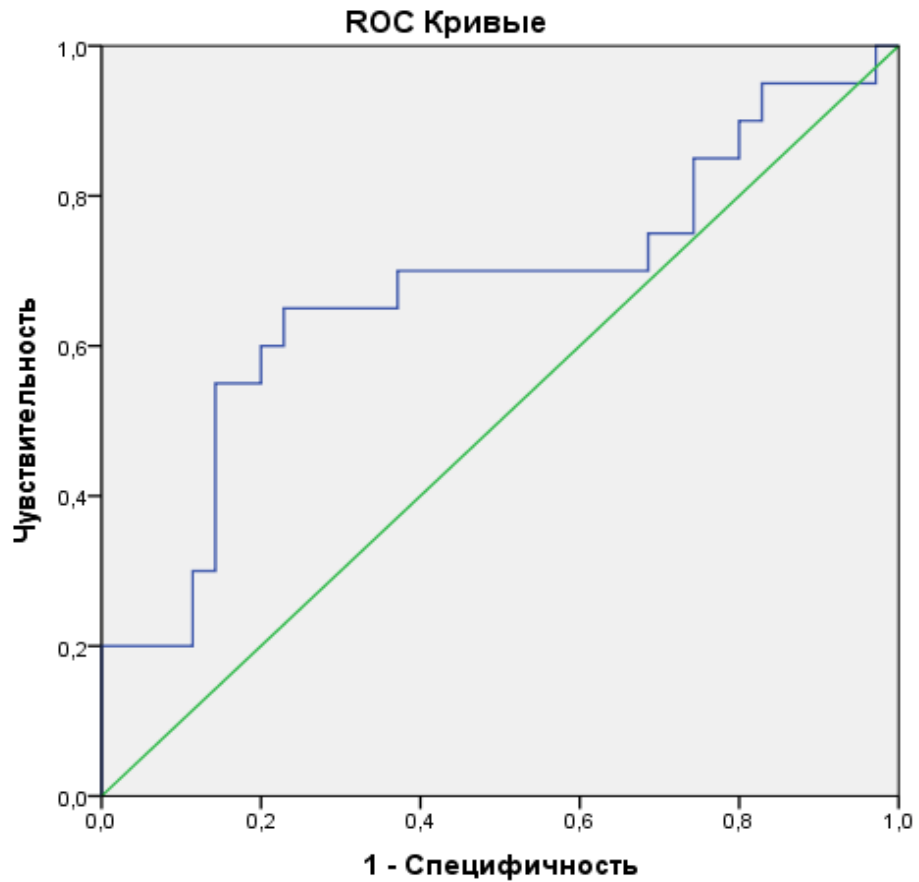


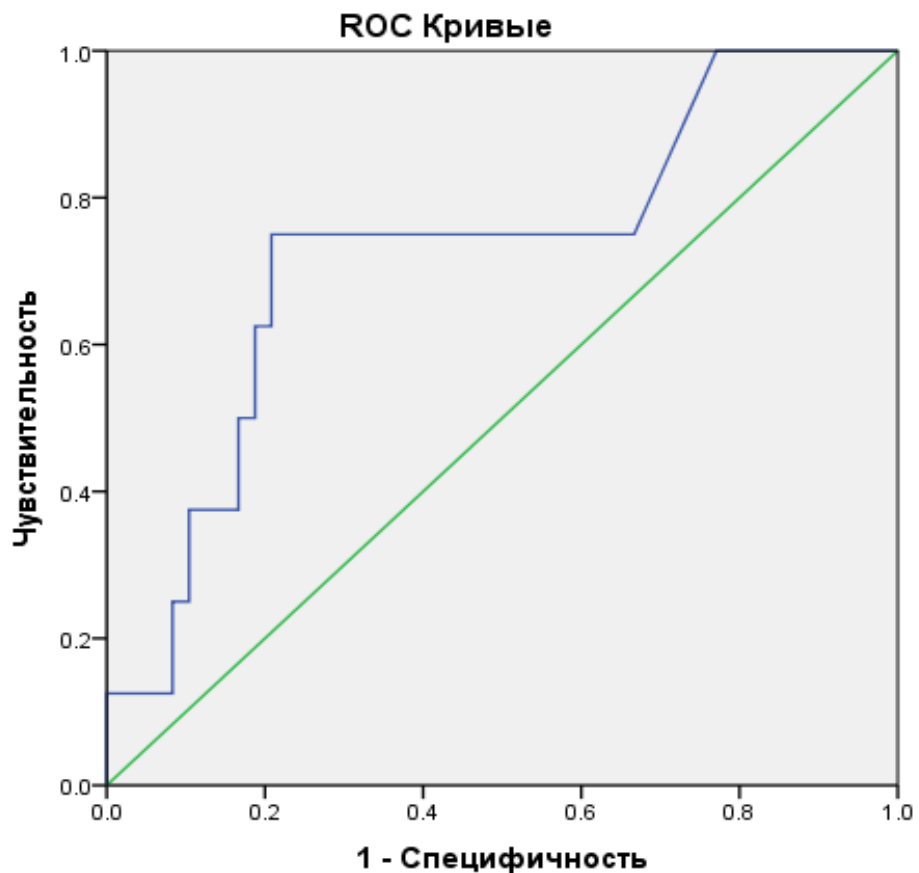
Рисунок 32 – ROC - кривая ранней динамики пика холина в общей группе больных

Пик холина не определялся у 7(87,5%) женщин с полным лечебным патоморфозом после окончания химиотерапии. Среди женщин, не достигших pCR, пик не определялся у 29(59,2%) пациенток ($p < 0,005$) (Таблица 24).

Таблица 24 – Частота определения пика холина на разных этапах исследования в группе больных достигших pCR и без достижения pCR

		Достижение полного лечебного патоморфоза, N (%)	
		Нет	Да
Пик холина (1 этап)	не определялся	13 (26.0%)	2 (25.0%)
	определялся (>30 мм ²)	37 (74.0%)	6 (75.0%)
Пик холина (2 этап)	не определялся	22 (45.8%)	5 (62.5%)
	определялся (>30 мм ²)	26 (54.2%)	3 (37.5%)
Пик холина (3 этап)	не определялся	29 (59.2%)	7 (87.5%)
	определялся (>30 мм ²)	20 (40.8%)	1 (12.5%)

Прогностическая значимость для определения полного лечебного патоморфоза с учетом регрессионного анализа была выше в группе женщин с уменьшением площади под пиком холина после окончания лечения ($B=-0,002.6$, $p=0.019$) (Рисунок 33).



Диагональные сегменты, сгенерированные связями.

Рисунок 33 – Динамика площади под пиком холина в процессе НПХТ. Метод логистической регрессии. ROC-анализ

В группе больных с выраженным ответом опухоли на химиотерапию среднее значение площади под пиком холина на 1-м этапе исследования было выше ($516,4 \text{ мм}^2$), чем среди женщин со слабым ответом на лечение ($365,3 \text{ мм}^2$). На 2-м этапе исследования отмечалось снижение площади под пиком холина в обеих группах больных. После окончания лечения (3-й этап исследования) среднее значение площади под пиком холина в группе женщин с выраженным

ответом на лечение была в 2,5 раза меньше, чем среди женщин со слабым ответом на лечение (83,5 vs. 206,3) (Таблица 25).

Таблица 25 – Среднее значение площади под пиком холина на разных этапах исследования

	Лечебный патоморфоз по Лавниковой	
	Слабый ответ (1-2 степень)	Выраженный ответ (3-4 степень)
N	37	21
МР-спектроскопия до начала лечения (1-й этап исследования): спектр холина: площадь под пиком холина, мм ² , среднее значение	365.3	516.4
N	36	20
МР-спектроскопия после 2-х курсов химиотерапии (2-й этап исследования): спектр холина: площадь под пиком холина, мм ² , среднее значение	232.8	237.6
N	36	21
МР-спектроскопия после окончания лечения (3-й этап исследования): спектр холина: площадь под пиком холина, мм ² , среднее значение	206.3	83.5

Частота определения пика холина на 3-м этапе исследования была в 2,5 раза ниже в группе женщин с выраженным ответом опухоли на лечение, чем среди женщин со слабым ответом на лечение и составила 6 (28,6%) и 15(41,7%) (Таблица 26).

Таблица 26 – Частота определения пика холина в группах женщин с выраженным и слабым ответом на лечение на разных этапах исследования

		Лечебный патоморфоз по Лавниковой	
		Слабый ответ, N (%)	Выраженный ответ, N (%)
Пик холина (1 этап исследования)	не определялся	8 (21.6%)	7 (33.3%)
	определялся (>30 мм ²)	29 (78.4%)	14 (66.7%)
Пик холина (2 этап исследования)	не определялся	17 (47.2%)	10 (50.0%)
	определялся (>30 мм ²)	19 (52.8%)	10 (50.0%)

Пик холина (3 этап исследования)	не определялся	21 (58.3%)	15 (71.4%)
	определялся (>30 мм ²)	15 (41.7%)	6 (28.6%)

Частота встречаемости пика холина до начала лечения, после 2-х курсов ПХТ и после окончания лечения, а также динамика пика холина на 2-м и 3-м этапах исследования значимо не различались в группах пациенток с выраженным и слабым ответом на лечение.

Таким образом, частота определения пика холина на 1-м этапе исследования, а также площадь под пиком коррелировали с размером образования по данным УЗИ молочных желез до начала лечения ($r=0,526$, $p<0,001$), размером наибольшего лимфатического узла по данным МРТ молочных желез ($r=0,405$, $p=0,002$), размером образования по данным общего осмотра до начала лечения ($r=0,305$, $p=0,021$), размером образования по данным маммографии до начала лечения ($r=0,332$, $p=0,012$), с размером образования по данным МРТ молочных желез до начала лечения ($r=0,395$, $p=0,002$). При увеличении размера опухоли, а также размера пораженных регионарных лимфатических узлов (по данным МРТ) увеличивалась частота определения пика холина и величина средней площади под пиком.

Частота определения пика холина и величина площади под пиком после 2-х курсов химиотерапии (2-й этап исследования) коррелировала со статусом регионарных лимфатических узлов ($r=0,338$, $p=0,011$), стадией заболевания ($r=0,311$, $p=0,020$), с размерами образования по данным МРТ молочных желез до начала лечения ($r=0,372$, $p=0,005$), с размерами наибольшего лимфатического узла по данным МРТ молочных желез до начала лечения ($r=0,270$, $p=0,044$), средние прямые корреляции с размерами образования по данным УЗИ молочных желез до начала лечения ($r=0,492$, $p<0,001$), с размерами образования по данным маммографии до начала лечения ($r=0,497$, $p<0,001$). Таким образом, пик холина определялся чаще, а площадь под пиком была больше у женщин с III стадией заболевания, большим размером образования по данным по данным инструментальных методов исследования.

Величина площади под пиком холина после окончания лечения имела слабую обратную корреляцию со степенью лечебного патоморфоза по шкале Лавниковой ($r=-0.289$, $p=0.029$).

Уменьшение площади под пиком холина, зарегистрированное на 2-м этапе исследования коррелировало с индексом пролиферации клеток и было наиболее значимым в группе больных со значением Ki67 более 50,0% ($r=-0.304$, $p=0.023$).

Уменьшение пика холина на 3-м этапе исследования коррелировало с индексом пролиферации клеток ($r=-0.359$, $p=0.007$), с размером образования по данным МРТ молочных желез ($r=-0.285$, $p=0.034$), с размерами наибольшего лимфатического узла по данным МРТ молочных желез до начала лечения ($r=-0,355$, $p=0,007$), со степенью лечебного патоморфоза по шкале Лавниковой ($r=-0.347$, $p=0.009$), размером образования по данным УЗИ молочных желез до начала лечения ($r=-0.409$, $p=0.002$). При индексе пролиферации более 50,0%, 4-й степени лекарственного патоморфоза по шкале Лавниковой, изначально больших размеров образования по данным инструментальных методов исследования динамика площади под пиком холина была наиболее значимой.

Площадь под пиком холина до начала лечения, после 2-х курсов ПХТ и после окончания лечения, а также динамика пика холина на 2-м и на 3-м этапах исследования не зависели от менопаузального статуса женщин, гистологического и биологического подтипов опухоли.

На рисунках 34-35 представлено графическое изображение динамики МР-спектроскопии у больной с полным клиническим ответом и прогрессированием заболевания по данным МРТ.

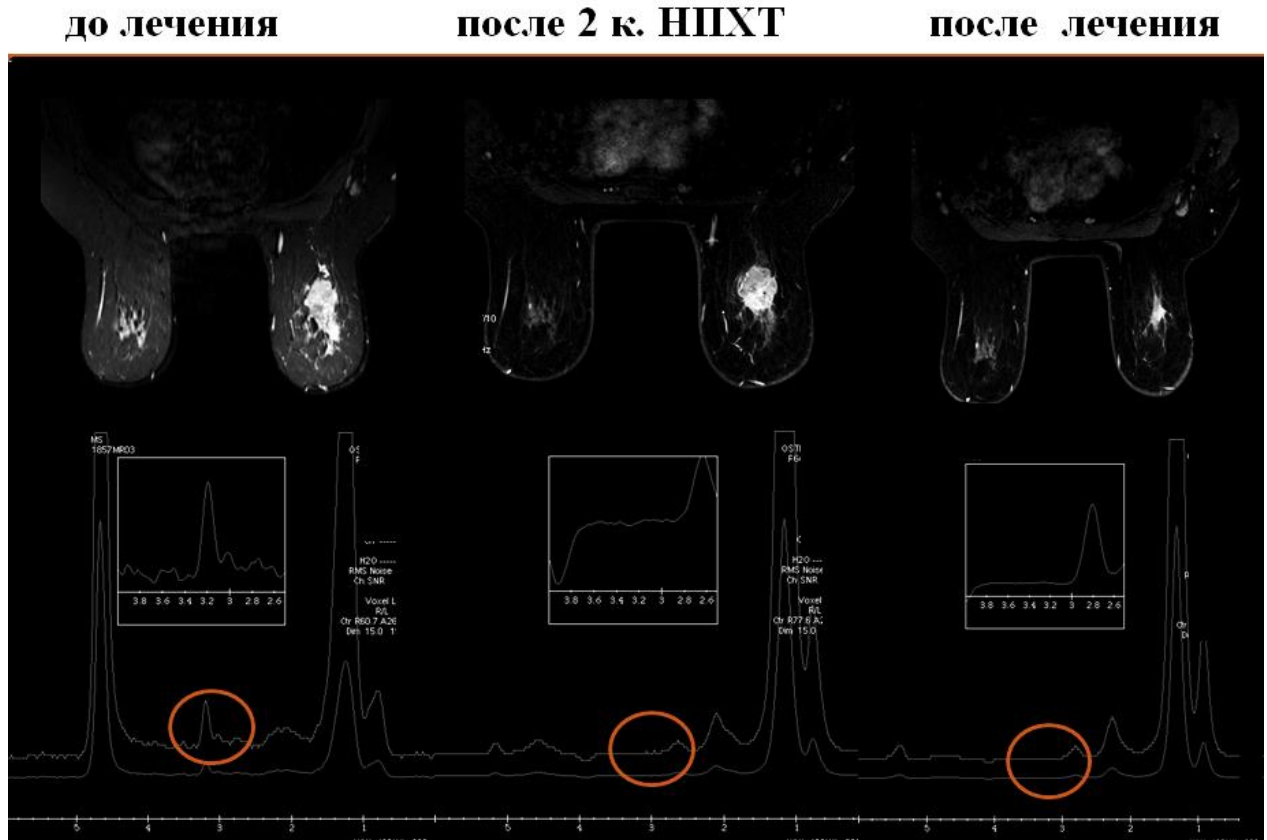


Рисунок 34 – Динамика пика холина в процессе НПХТ. Изменение размера опухолевого узла, уменьшение пика холина в процессе НПХТ по данным МРТ молочных желез, МР-спектроскопии (на 3-х этапах исследования): 1) до начала химиотерапии, 2) после 2-х курсов химиотерапии, 3) перед операцией).

Положительная динамика.

Больная О., 65 лет

Диагноз: рак правой молочной железы T2N1M0, тройной негативный подтип опухоли.

Лечение: 6 курсов химиотерапии по схеме AC, радикальная мастэктомия справа.

Результат: cCR, pCR.

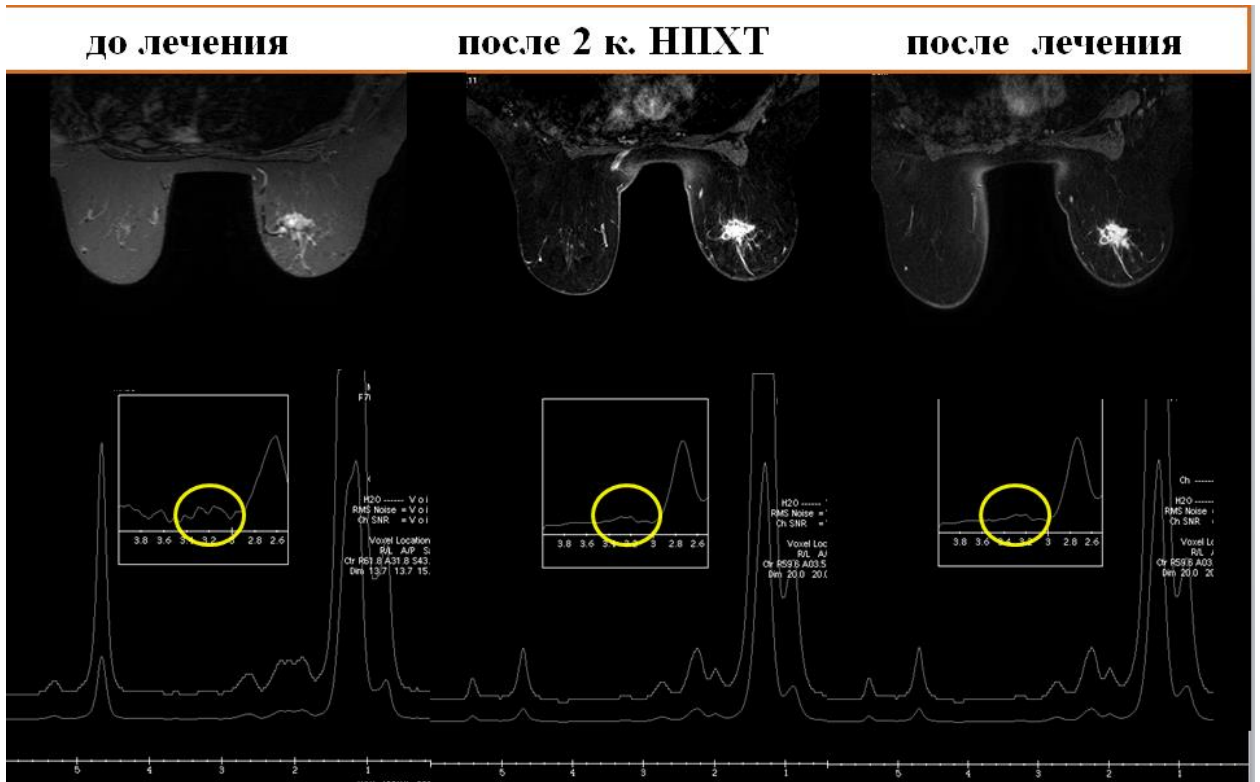


Рисунок 35 – Динамика пика холина в процессе НПХТ у больной с прогрессирующим заболеванием в процессе лечения.

Больная П., 65 лет

Диагноз: рак правой молочной железы T2N1M0, люминальный В Her2-негативный подтип опухоли.

Лечение: 6 курсов химиотерапии по схеме AC, радикальная мастэктомия справа.

Результат: прогрессирующее заболевание: увеличение размеров опухоли, появление очагов отсевов, 2 степень лекарственного патоморфоза по шкале Лавниковой.

Для сравнительной оценке эффективности МР-спектроскопии в предсказании полного патоморфологического регресса опухоли был выполнен расчет коэффициента сCR/pCR. Вероятностный коэффициент по данным МР-спектроскопии на 3-м этапе исследования составил 0,87, что говорит о высокой значимости метода в предсказании полного патоморфологического регресса опухоли после НПХТ.

ГЛАВА 4. РОЛЬ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ В ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

4.1. Циркулирующие опухолевые клетки в оценке эффективности НПХТ

Исследование ЦОК было выполнено 59 (69,4%) пациенткам на всех этапах работы. Цифровые изображения препаратов с наличием циркулирующих опухолевых клеток представлены на рисунке 36.

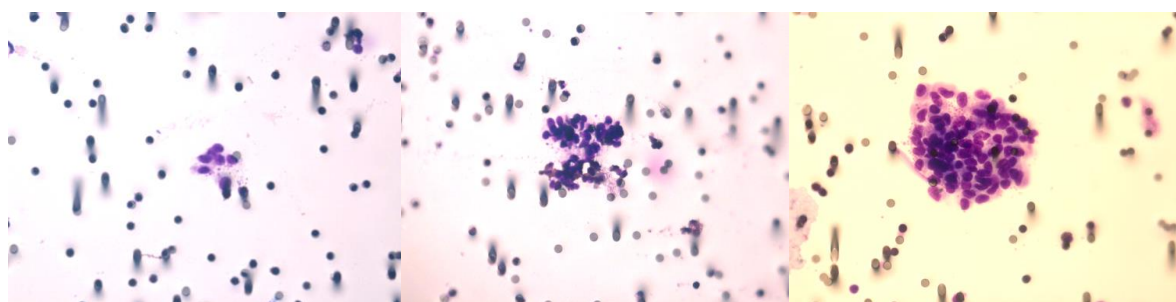


Рисунок 36 – Цифровые изображения готовых окрашенных препаратов, с выявленными опухолевыми клетками

У 22 (37,3 %) женщин клетки были обнаружены до начала лечения (1-й этап исследования). Среднее количество обнаруживаемых при подсчете цитологом клеток – 36,3. На 2-м этапе исследования клетки были обнаружены у 20 (33,9%) женщин. Среднее количество обнаруживаемых при подсчете цитологом клеток – 29,2. После окончания химиотерапии (3-й этап исследования) клетки обнаруживались у 21(35,6%) женщин. Среднее количество обнаруживаемых при подсчете цитологом клеток – 44,5(Таблица 27).

Таблица 27 – Частота обнаружения ЦОК и их количество на разных этапах

Наличие ЦОК в крови до начала лечения (1-й этап исследования): ЦОК 1	Не обнаружены	37 (62.7%)
	Обнаружены	22 (37.3%)
Количество ЦОК в крови до начала лечения (1-й этап исследования)	N	59
	Среднее значение	36.3
	Минимум	0.0
	Максимум	1316.0
Наличие ЦОК в крови после 2-х	Не обнаружены	39 (66.1%)

курсов химиотерапии (2-й этап исследования): ЦОК	Обнаружены	20 (33.9%)
Количество ЦОК в крови после 2-х курсов химиотерапии (2-й этап исследования)	N	59
	Среднее значение	29.2
	Минимум	0.0
	Максимум	933.0
Наличие ЦОК в крови после окончания лечения (3-й этап исследования): ЦОК	Не обнаружены	38 (64.4%)
	Обнаружены	21 (35.6%)
Количество ЦОК в крови после окончания лечения (3-й этап исследования)	N	59
	Среднее значение	44.5
	Минимум	0.0
	Максимум	886.0

У 37 (62,7 %) женщин клетки не определялись исходно до начала лечения, у 19 (32,2 %) из них они появились в процессе химиотерапии. В группе женщин с наличием ЦОК до начала лечения, у 17 (72,7 %) больных клетки исчезали на 1-м из этапов исследования. У 18 (30,5%) женщин ЦОК не определялись ни на одном из этапов лечения (Таблица 28).

Таблица 28 – Отсутствие/наличие ЦОК на разных этапах исследования

ЦОК определялись на всех этапах лечения	Да	5 (8.5%)
	Нет	54 (91.5%)
ЦОК не определялись ни на одном этапе лечения	Да	18 (30.5%)
	Нет	41 (69.5%)
ЦОК появились в процессе лечения (на любом этапе)	Да	19 (32.2%)
	Нет	40 (67.8%)
ЦОК стойко исчезли в процессе лечения	Да	11 (18.6%)
	Нет	48 (81.4%)
ЦОК стойко исчезли на одном из этапов лечения	Да	17 (28.8%)
	Нет	42 (71.2%)
ЦОК исчезли на 2-м этапе лечения	Да	12 (20.3%)
	Нет	47 (79.7%)
ЦОК исчезли на 3-м этапе лечения	Да	16 (27.1%)
	Нет	43 (72.9%)
ЦОК исчезли на 2-м, снова появились на 3-м этапе лечения	Да	1 (1.7%)
	Нет	58 (98.3%)

Частота обнаружения ЦОК в крови на 1-м и 2-м этапах исследования была примерно одинаковой в группах женщин с различным менопаузальным статусом.

На 3-м этапе исследования ЦОК чаще определялись у женщин в менопаузе – 14(51,9%) ($p=0,011$).

Частота обнаружения ЦОК у больных с различными гистологическими подтипами РМЖ на разных этапах исследования существенно не отличалась.

При анализе влияния биологического подтипа опухоли на частоту обнаружения ЦОК в крови больных отмечено, что наличие клеток до начала лечения не зависело от подтипа опухоли (Рисунок 37).

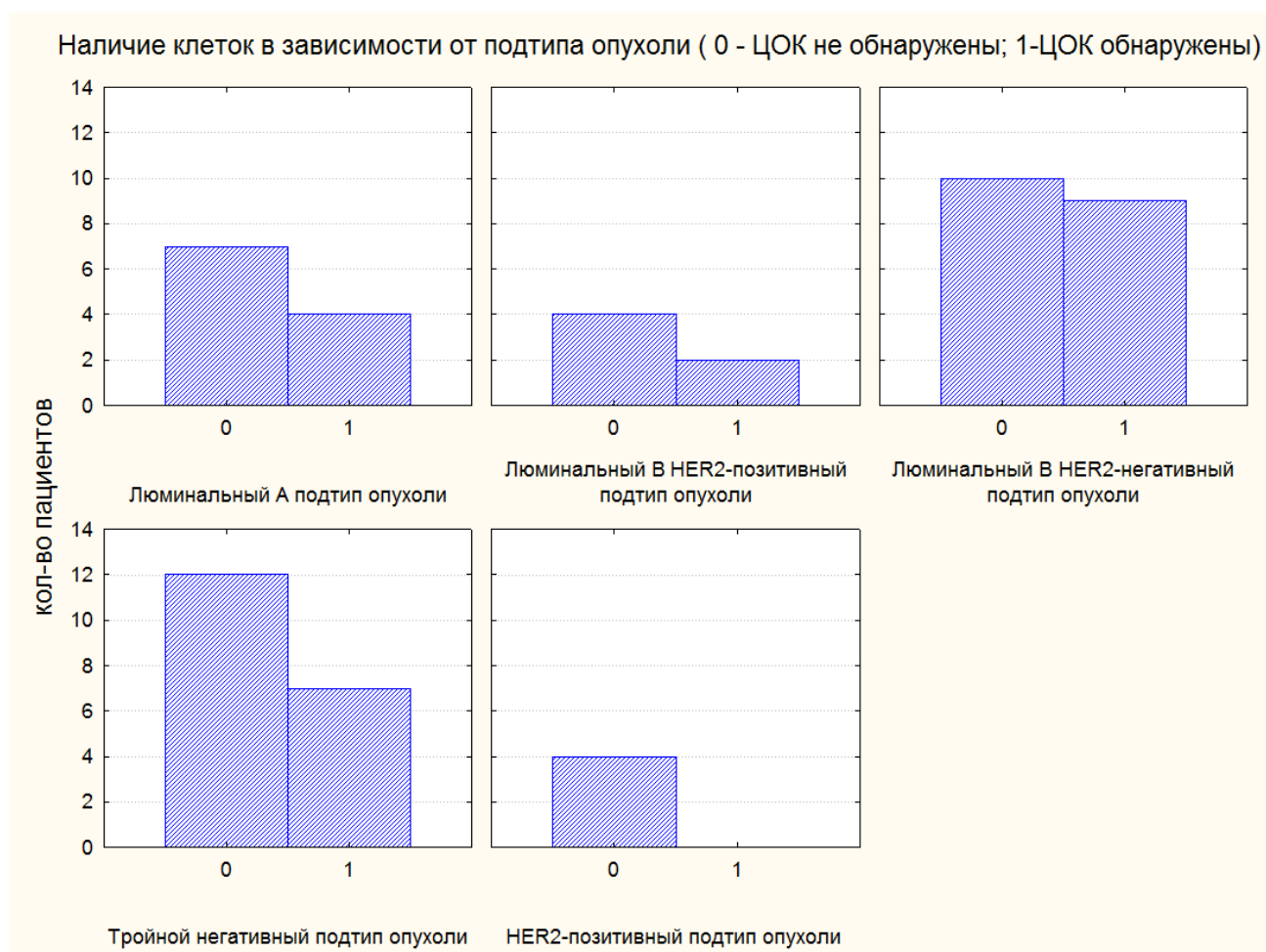


Рисунок 37 – Наличие ЦОК в зависимости от подтипа опухоли на 1-м этапе исследования

В группе больных, у которых клетки не определялись на всех этапах лечения, 18(66,7%) женщин имели люминальный В HER2-позитивный подтип рака. На 1-м этапе исследования ЦОК чаще всего определялись в группе больных с люминальным В Her2-отрицательным подтипом опухоли – у 9(47,4%) больных. Среднее количество ЦОК на 1-м этапе исследования было наибольшим в группе

больных с тройным негативным РМЖ - 76,4. Среднее количество ЦОК на 3-м этапе исследования было наименьшим в группе больных с люминальным В Her2-положительным подтипом рака - 1,3. На 2-м этапе исследования ЦОК чаще определялись в группе больных тройным негативным подтипом РМЖ – у 9(47,4%) женщин (Таблица 29).

Таблица 29 – Зависимость динамики ЦОК на разных этапах исследования от биологического подтипа опухоли

		ИГХ-подтип опухоли				
		Люминальный А	Люминальный В Her2-положительный	Люминальный В Her2-отрицательный	Тройной негативный	Her2-положительный
Наличие ЦОК в крови до начала лечения (1-й этап исследования)	Не обнаружены	7	4	10	12	4
		63.6%	66.7%	52.6%	63.2%	100.0%
	Обнаружены	4	2	9	7	0
		36.4%	33.3%	47.4%	36.8%	0.0%
Количество ЦОК в крови на 1-м этапе исследования	N	11	6	19	19	4
	Среднее значение	10.8	7.2	27.7	76.4	0
	Минимум	0	0	0	0	0
	Максимум	50.0	37.0	248.0	1316.0	0
Наличие ЦОК в крови после 2-х курсов химиотерапии (2-й этап исследования)	Не обнаружены	8	5	14	10	2
		72.7%	83.3%	73.7%	52.6%	50.0%
	Обнаружены	3	1	5	9	2
		27.3%	16.7%	26.3%	47.4%	50.0%
Количество ЦОК в крови на 2-м этап исследования	N	11	6	19	19	4
	Среднее значение	2.5	10.0	56.5	5.7	17.8
	Минимум	0	0	0	0	0
	Максимум	16.0	60.0	933.0	195.0	64.0
Наличие ЦОК в крови после окончания лечения (3-й этап исследования)	Не обнаружены	6	5	14	13	0
		54.5%	83.3%	73.7%	68.4%	0.0%
	Обнаружены	5	1	5	6	4
		45.5%	16.7%	26.3%	31.6%	100.0%
Количество ЦОК в крови на 3-м этап исследования	N	11	6	19	19	4
	Среднее значение	43.0	1.3	26.7	69.2	80.5
	Минимум	0	0	0	0	9.0
	Максимум	192.0	8.0	332.0	886.0	245.0

На 3-м этапе исследования клетки чаще всего определялись в группе женщин с люминальным А подтипом рака – у 5 (45,5) пациенток. Частота выявления ЦОК в группах больных люминальным В Her2-положительным и люминальным В Her2-отрицательными подтипами РМЖ была наименьшей и составила 16,7% (1) и 26,3% (5) соответственно (Рисунок 38).

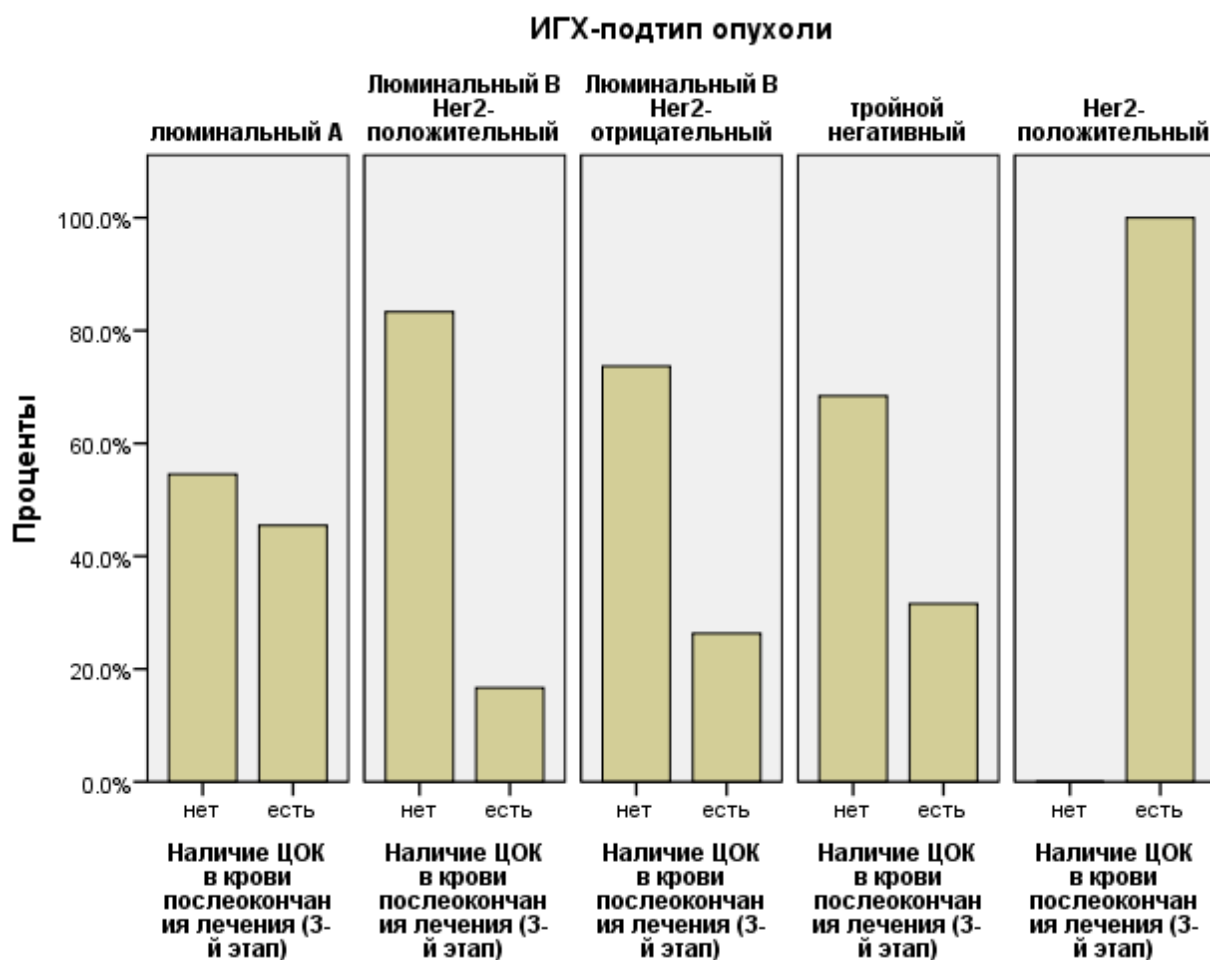
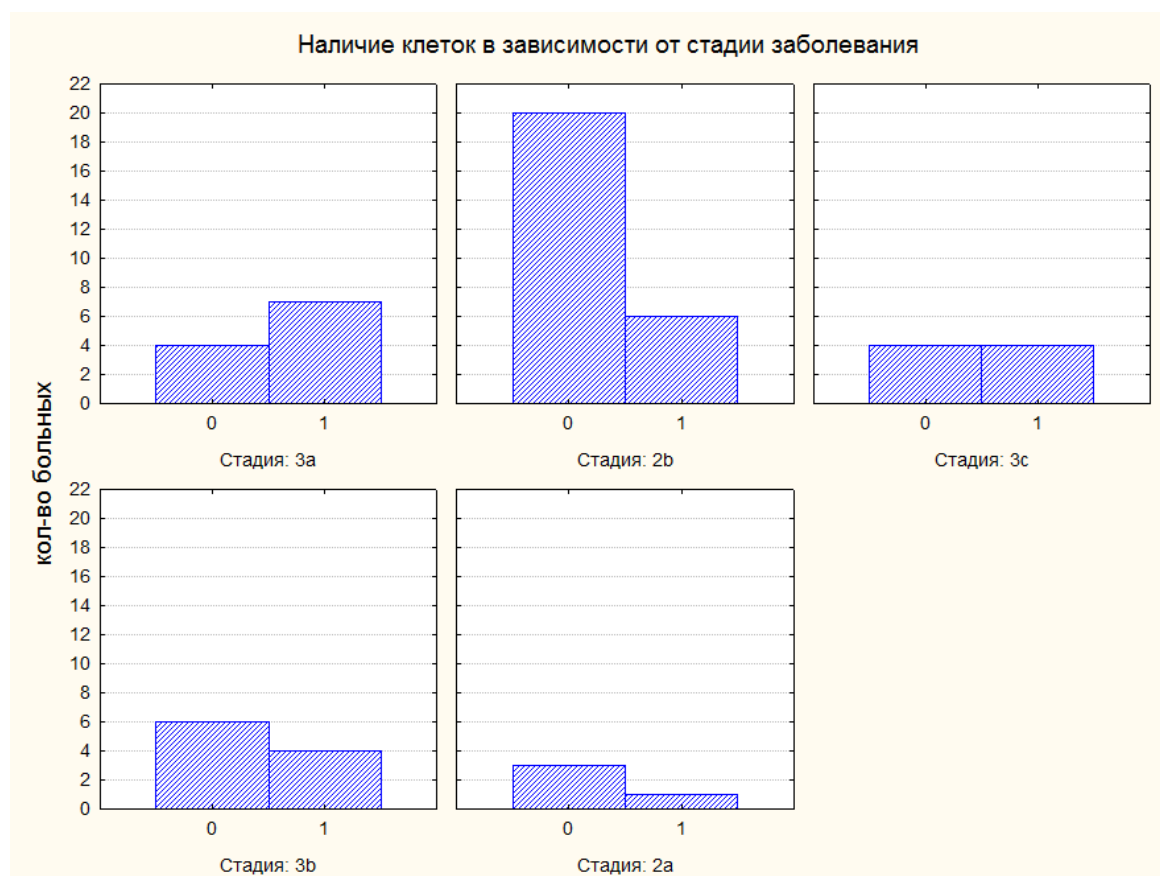


Рисунок 38 – Наличие ЦОК в зависимости от подтипа опухоли на 3-м этапе исследования

Таким образом, наличие ЦОК после окончания лечения различалось по ИГХ-подтипам опухолей ($p=0,050$). Однако, данное различие определялось за счёт групп с люминальным В Her2-положительным, люминальным В Her2-отрицательным, тройным негативным и Her2-положительный. ЦОК после

окончания лечения чаще определялись в группе женщин с Her2-положительным подтипом опухоли, чем с люминальным В Her2-положительным (100,0% vs. 16,7%, $p=0,048$). ЦОК после окончания лечения чаще определялись в группе с Her2-положительным подтипом опухоли, чем с люминальным В Her2-отрицательным (100,0% vs. 26,3%, $p=0,014$). ЦОК после окончания лечения чаще определялись в группе с Her2-положительным подтипом опухоли, чем с тройным негативным (100,0% vs. 31,6%, $p=0,024$)

У больных с III стадией заболевания до начала лечения клетки выявлялись чаще. Так, ЦОК были выявлены исходно у 15 (51,7%) пациенток с III стадией РМЖ и лишь у 7 (23,3%) больных со II стадией заболевания ($p=0,03$) (Рисунок 39).



Примечание: 0-ЦОК не обнаружены; 1-ЦОК обнаружены.

Рисунок 39 – Наличие ЦОК в зависимости от стадии заболевания

Была изучена зависимость частоты выявления клеток от размера опухолевого узла. При размерах опухоли более 2,5 см (по данным УЗИ молочных желез) частота обнаружения клеток была выше. У женщин с Т3 (размером

первичной опухоли более 5,0 см), ЦОК определялись чаще чем у женщин с Т2 (размером опухоли от 2,0 до 5,0 см). Была установлена корреляционная зависимость между исходным наличием ЦОК и максимальным размером опухолевого узла по данным УЗИ (пороговое значение – 2,5 см) ($p=0,009$) (Таблица 30).

Таблица 30 – Частота определения ЦОК до начала лечения в зависимости от размеров опухоли (по данным ультразвукового исследования молочных желез)

Размер опухоли по данным УЗИ молочных желез	ЦОК не обнаружены в крови, N (%)	ЦОК обнаружены в крови, N (%)
≤ 25 мм	19 (70,37%)	8 (29,63%)
> 25 мм	18 (56,25%)	14 (43,75%)
Всего	37	22

Наличие отёка кожи до начала лечения не влияло обнаружения клеток. Среди пациенток, у которых клетки появлялись в процессе лечения, 46,6% женщин имели отёк кожи. (Рисунок 40).

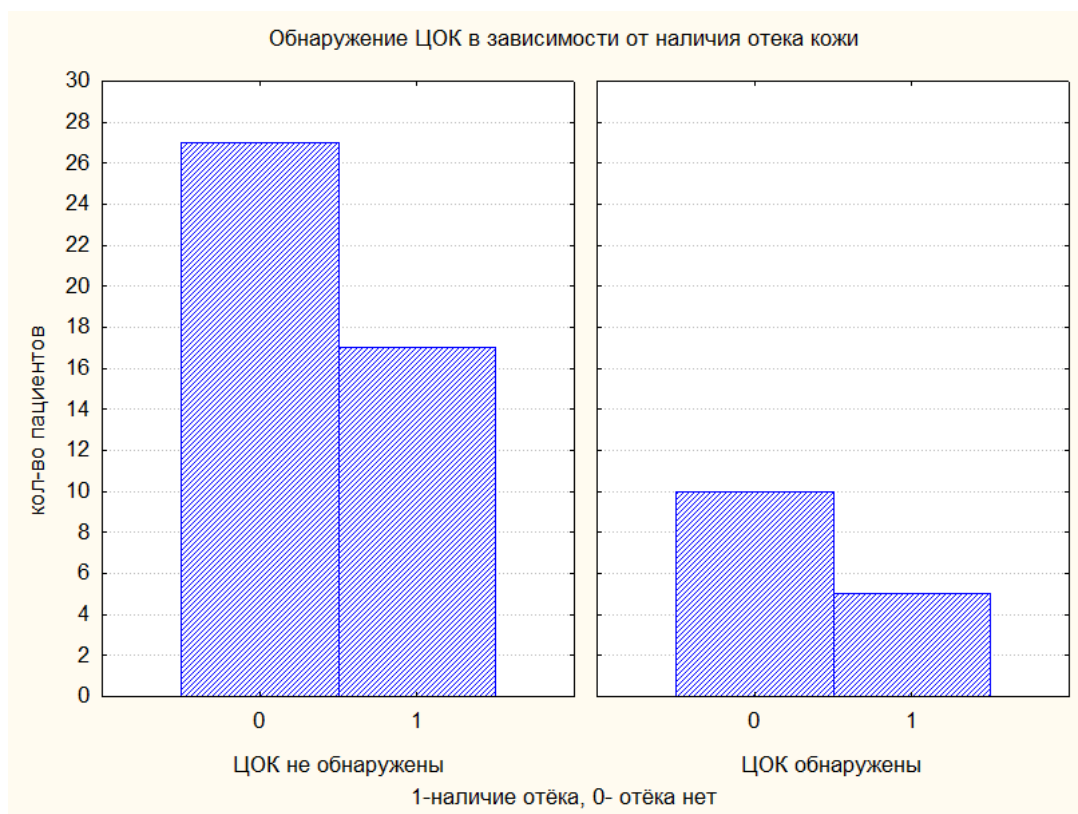


Рисунок 40 – Зависимость обнаружения ЦОК от отёка кожи

При исследовании зависимости частоты встречаемости и количества ЦОК на разных этапах лечения от статуса регионарных лимфатических узлов выявлены следующие корреляции. Количество ЦОК в крови до начала лечения коррелировало со статусом регионарных лимфатических узлов (N+) ($r=0.289$, $p=0,026$), размером регионарных лимфоузлов до начала лечения по данным УЗИ ($r=0.293$, $p=0,024$). Количество ЦОК в крови после 2-х курсов ПХТ имело среднюю прямую корреляцию с размером регионарных лимфоузлов до начала лечения по данным УЗИ ($r=0.473$, $p<0,001$). Так, частота встречаемости и количество ЦОК было выше в группе женщин с наличием пораженных лимфатических узлов и коррелировало с размером наибольшего лимфатического узла (по данным УЗИ регионарных лимфатических узлов).

Количество обнаруживаемых цитологом клеток было максимальным в группе больных, не достигавших pCR на всех этапах лечения. По окончании лечения, а также после 2-х курсов химиотерапии, ЦОК чаще отсутствовали в группе женщин с pCR- в 75,0% случаев. Однако, по результатам корреляционного анализа, наличие и количество ЦОК в крови до начала лечения, после 2-х курсов ПХТ, а также динамика ЦОК на 2-м и на 3-м этапах исследования значимо не различались у пациенток с полным лекарственным патоморфозом и без него. Прогностическая значимость для определения полного лечебного патоморфоза с учетом регрессионного анализа на основе динамики ЦОК на различных этапах лечения с удовлетворительной сходимостью построить нельзя (Таблица 31).

Таблица 31 – Динамика ЦОК на разных этапах исследования в зависимости от частоты достижения pCR

		Достижение pCR	
		Нет, N=51	Да, N=8
Наличие ЦОК в крови до начала лечения (1-й этап исследования)	Не обнаружены	33	4
		64.7%	50.0%
	Обнаружены	18	4
		35.3%	50.0%

Количество ЦОК в крови на 1-м этапе исследования	N	51	8
	Среднее значение	39.9	13.0
	Минимум	.0	.0
	Максимум	1316.0	44.0
Наличие ЦОК в крови после 2-х курсов химиотерапии (2-й этап исследования)	Не обнаружены	33	6
		64.7%	75.0%
	Обнаружены	18	2
		35.3%	25.0%
Количество ЦОК в крови на 2-м этапе исследования	N	51	8
	Среднее значение	32.5	7.9
	Минимум	.0	.0
	Максимум	933.0	60.0
Наличие ЦОК в крови после окончания лечения (3-й этап исследования)	Не обнаружены	32	6
		62.7%	75.0%
	Обнаружены	19	2
		37.3%	25.0%
Количество ЦОК в крови на 3-м этапе исследования	N	51	8
	Среднее значение	44.4	45.4
	Минимум	.0	.0
	Максимум	886.0	245.0

По результатам корреляционного анализа, количество циркулирующих опухолевых клетки в крови до начала лечения, после 2-х курсов НПХТ, после окончания лечения, динамика ЦОК на 2-м и 3-м этапах исследования не зависело от гистологического типа опухоли и биологических подтипов опухоли.

У больных с выраженным ответом на лечение (3 и 4 степень лекарственного патоморфоза по шкале Лавниковой) частота обнаружения клеток на 1-м этапе исследования составила 31,82%. В группе женщин со слабым ответом опухоли на лечение (1-2 степень по шкале Лавниковой) – 40,54%.

Среднее количество клеток было наименьшим на 3-м этапе исследования в группе больных с выраженным ответом опухоли на лечение, по сравнению с женщинами со слабым лекарственным ответом (29,8 vs. 53,3). Частота обнаружения клеток после окончания лечения была ниже в группе женщин,

достигших выраженного патоморфологического ответа – 27,3% (6). В то время как в группе женщин со слабым ответом на химиотерапию частота обнаружения ЦОК была выше – 40,5% (15).

Наличие и количество ЦОК в крови до начала лечения, после 2-х курсов НПХТ, а также динамика ЦОК на 2-м и на 3-м этапах исследования значимо не различались у пациенток с выраженным лекарственным патоморфозом и без него. Прогностическая значимость для определения хорошего лечебного патоморфоза с учетом регрессионного анализа на основе динамики ЦОК на различных этапах лечения с удовлетворительной сходимостью построить нельзя (Таблица 32).

Таблица 32 – Наличие ЦОК на разных этапах исследования в зависимости от степени патоморфологического ответа

		Лечебный патоморфоз по Лавниковой	
		Слабый ответ (1-2 степень)	Выраженный ответ (3-4 степень)
Наличие ЦОК в крови до начала лечения (1-й этап исследования)	Не обнаружены	22	15
		59.5%	68.2%
	Обнаружены	15	7
		40.5%	31.8%
Количество ЦОК в крови на 1-м этапе исследования	N	37	22
	Среднее значение	17.4	68.0
	Минимум	0	0
	Максимум	248.0	1316.0
Наличие ЦОК в крови после 2-х курсов химиотерапии (2-й этап исследования)	Не обнаружены	23	16
		62.2%	72.7%
	Обнаружены	14	6
		37.8%	27.3%
Количество ЦОК в крови на 2-м этапе исследования	N	37	22
	Среднее значение	40.7	9.7
	Минимум	0	0
	Максимум	933.0	101.0
Наличие ЦОК в крови после окончания лечения (3-й этап исследования)	Не обнаружены	22	16
		59.5%	72.7%
	Обнаружены	15	6
		40.5%	27.3%

Количество ЦОК в крови на 3-м этапе исследования	N	37	22
	Среднее значение	53.3	29.8
	Минимум	0	0
	Максимум	886.0	245.0

4.2. Аномальное метилирование ДНК в оценке эффективности НПХТ

В ходе работы были выбраны 8 генов, состояние метилирования промоторов которых наиболее эффективно маркирует эпигенетические подтипы опухолей с разным ответом на НПХТ: TERT, SYNDIG, SKOR, SLC9A3, ADCY8, DPYS, IRF4, KCNQ2 (Таблица 33).

Таблица 33 – Краткая характеристика исследуемых генов

Ген	Краткая характеристика
TERT	Ген обратной транскриптазы (telomerase reverse transcriptase), препятствующей укорочению теломер в процессе деления. Является онкогеном, отвечает за экспрессию фермента теломеразы.
SYNDIG	Ген кодирует белок, принадлежащий к трансмембранному семейству белков, индуцированных интерфероном (Synapse Differentiation Inducing). Может регулировать содержание рецепторов AMPA (ионотропный рецептор глутамата) на возникающих синапсах и играть роль в постсинаптическом развитии и созревании.
SKOR	Действует как транскрипционный корецептор LBX1 (регулятор скелетно-мышечного когенеза). Действует как антагонист TGF-бета в нервной системе (трансформирующий ростовой фактор бета— белок, который контролирует пролиферацию, клеточную дифференцировку и другие функции в большинстве клеток).
SLC9A3	Кодирует белок, отвечающий за натрий-водородный обмен, поддержание баланса натрия, косвенно связан с буферизацией pH крови.
ADCY8	Ген, кодирующий аденилатциклазу 8 - фермент, связанный с мембраной, который катализирует образование циклического АМР из АТФ.
DPYS	Ген, кодирующий фермент дигидропиримидиназу, который катализирует превращение 5,6-дигидроурацила в 3-уреидопропионат в метаболизме пиримидина.
IRF4	Ген кодирует белок интерферон - регуляторный фактор 4, который является транскрипционным фактором и регулирует дифференцировку плазматических клеток.

KCNQ2	Ген кодирует белки, формирующие трансмембранные потенциал-зависимые Ca ²⁺ каналы, отвечающие за нервную возбудимость. Генетический дефицит ассоциирован с избыточной возбудимостью нейронов.
-------	---

Далее производился поиск этих маркеров в крови пациенток до начала лечения (1-й этап исследования) и после окончания лечения (3-й этап исследования). Наиболее часто в исследованных биоптатах ткани молочной железы встречалось метилирование гена ADCY8- у 15(41,7%) больных, из них у 6 (16,7%)- метилирование этого же гена встречалось в образцах крови до лечения и у 10(27,8%) после лечения.

Метилирование гена SLC9A3 в биоптатах встречалось у 10 (27,8%) больных, в образцах крови, взятых до лечения у этих же больных аномальное метилирование данных генов обнаружено не было. В образцах крови после лечения метилирование гена SLC9A3 было обнаружено у 2(5,6%) женщин.

Метилирование гена KCNQ2 обнаружено в биоптатах 10 больных (27,8%), в образцах крови этих же больных аномальное метилирование данных генов после окончания лечения обнаружено не было. Метилирование данного гена обнаружено в крови до начала лечения у 1-й женщины.

Метилирование гена TERT встречалось в биоптатах 3 (8,3%) больных, гена SYNDIG в биоптатах 6 (16,7%) женщин, гена SKOR – в 2 (5,6%) биоптатах первичных опухолей, гена DPYS – в 3 (8,3%), гена IRF4 – в 8 (22,9%) биоптатах.

Метилирование генов TERT, SYNDIG, SKOR, DPYS, IRF4 в крови до начала и после окончания лечения обнаружено не было (Таблица 34).

Таблица 34 – Частота встречаемости метилирования генов в биоптатах, крови до начала лечения (1-й этап исследования) и после окончания лечения (3-й этап исследования)

Метилирование генов	N (Количество больных)	%
TERT в биоптате	3	8,3%
SYNDIG в биоптате	6	16,7%

SKOR в биоптате	2	5,6%
SLC9A3 в биоптате	10	27,8%
SLC9A3 в крови до лечения	0	0,0%
SLC9A3 в крови после лечения	2	5,6%
ADCY8 в биоптате	15	41,7%
ADCY8 в крови до лечения	6	16,7%
ADCY8 в крови после лечения	10	27,8%
DPYS в биоптате	3	8,3%
IRF4 в биоптате	8	22,9%
KCNQ2 в биоптате	10	27,8%
KCNQ2 в крови до лечения	1	2,8%
KCNQ2 в крови после лечения	0	0,0%

Метилирование генов SYNDIG, SLC9A3, ADCY8, IRF4, DPYS в биоптатах опухолей встречалось преимущественно в группе больных с люминальным В- Her2-отрицательным подтипом РМЖ – 4 (66,6%), 5 (50,0%), 6 (40,0%), 4 (50,0%), 2 (75,0%) соответственно. Метилирование гена ADCY8 встречалось в биоптатах (N=4) и в крови женщин до начала (N=2) и после окончания лечения (N=3) в группе больных тройным негативным раком. Метилирование гена KCNQ2 – в биоптатах (N=3) и крови до начала лечения (N=1) у женщин с тройным негативным РМЖ (Таблица 35).

Таблица 35 – Частота выявления метилирования генов в биоптатах первичной опухоли, крови до начала лечения и после окончания лечения в зависимости от биологического подтипа рака молочной железы

	Биологический подтип опухоли				
	Люм. А	Люм. В Her2 «-»	Люм. В Her2 «+»	Тройной негативный	Her2 «+»
TERT в биоптате N	1	0	1	1	0
SYNDIG в биоптате N	1	4	1	0	0
SKOR в биоптате N	0	1	0	0	1
SLC9A3 в биоптате N	2	5	3	0	0
SLC9A3 в крови до лечения N	0	0	0	0	0
SLC9A3 в крови после лечения N	0	1	0	1	0
ADCY8 в биоптате N	1	6	3	4	1
ADCY8 в крови до лечения N	1	2	0	2	1
ADCY8 в крови после лечения N	2	4	1	3	0
DPYS в биоптате N	1	2	0	0	0
IRF4 в биоптате N	2	4	1	1	0
KCNQ2 в биоптате N	3	2	2	3	0
KCNQ2 в крови до лечения N	0	0	0	1	0
KCNQ2 в крови после лечения	0	0	0	0	0

Наличие метилирования гена SLC9A3 в биоптатах значимо различалось в подгруппах пациенток с различными биологическими подтипами опухоли. В частности, данная разница определялась за счёт подгрупп с люминальным В Her2 отрицательным, люминальным В Her2-положительным и тройным негативным подтипами. Метилирование гена SLC9A3 в биоптате чаще встречался в подгруппе с люминальным В Her2 отрицательным, чем с тройным негативным подтипом (41,7% vs. 0,0%, $p=0,037$). SLC9A3 в биоптате чаще встречался в подгруппе с люминальным В Her2 положительным, чем с тройным негативным подтипом (75,0% vs. 0,0%, $p=0,009$) (Рисунок 41).

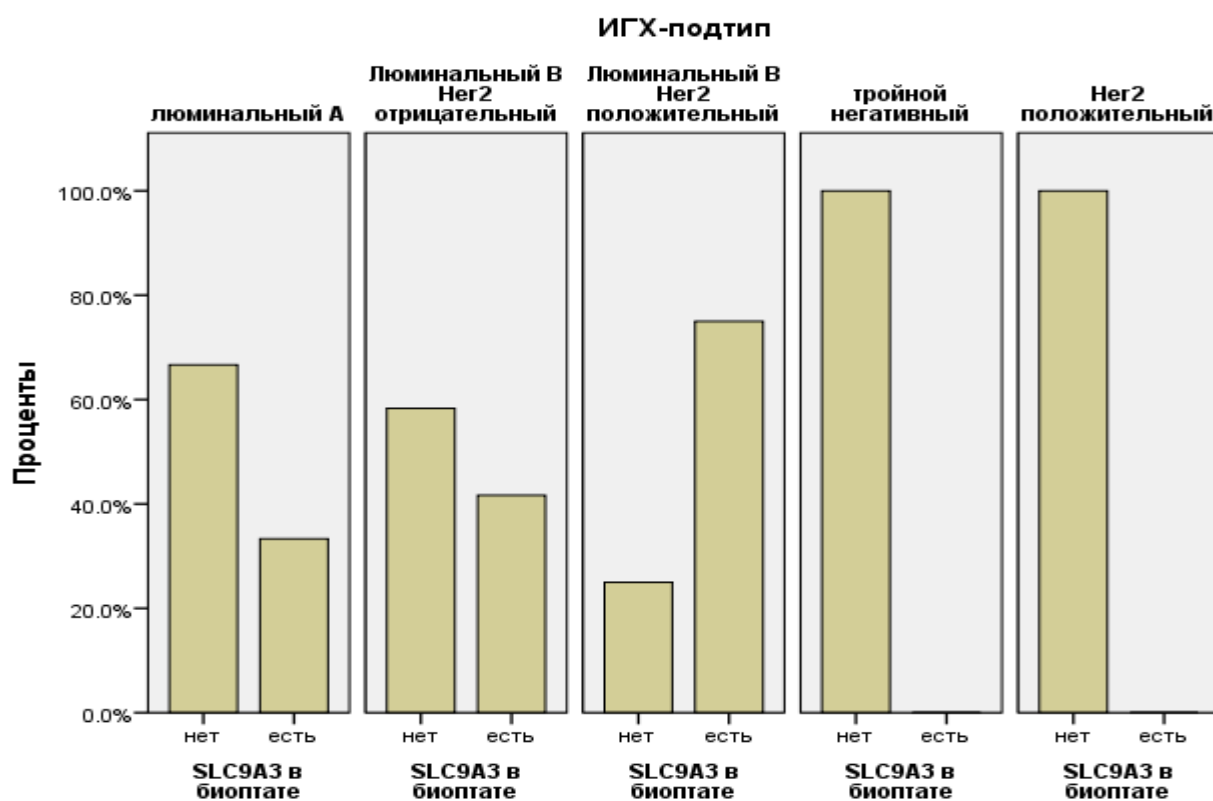


Рисунок 41 – Частота выявления метилирования гена SLC9A3 в биоптатах в зависимости от биологического подтипа рака молочной железы

Метилирование гена ADCY8 в биоптате и образцах крови до начала и после окончания лечения преимущественно встречалось в группе женщин со

стабилизацией и частичным регрессом по данным клинического обследования ($p=0,306$). Метилирование генов TERT, SKOR, SYNDIG, ADCY8, DPYS в биоптате не встречалось среди больных с полным клиническим регрессом опухоли и прогрессированием заболевания (Таблица 36).

Таблица 36 – Зависимость частоты выявления метилирования генов в биоптатах, крови до начала и после окончания лечения от клинического ответа опухоли на лечение

	Клинический ответ			
	Стабилизация	Частичный регресс	Полный регресс	Прогрессирование
TERT в биоптате, N (%)	1 (9.1%)	2 (9.5%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
SYNDIG в биоптате, N (%)	2 (18.2%)	4 (19.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
SKOR в биоптате, N (%)	0 (0.0%)	2 (9.5%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
SLC9A3 в биоптате, N (%)	5 (45.5%)	5 (23.8%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
SLC9A3 в крови до лечения, N (%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
SLC9A3 в крови после лечения, N (%)	1 (9.1%)	1 (4.8%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
ADCY8 в биоптате, N (%)	5 (45.5%)	10 (47.6%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
ADCY8 в крови до лечения, N (%)	2 (18.2%)	4 (19.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
ADCY8 в крови после лечения, N (%)	3 (27.3%)	6 (28.6%)	1 (50.0%)	0 (0.0%)
DPYS в биоптате, N (%)	0 (0.0%)	3 (14.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
IRF4 в биоптате, N (%)	3 (27.3%)	4 (20.0%)	0 (0.0%)	1 (50.0%)
KCNQ2 в биоптате, N (%)	4 (36.4%)	3 (14.3%)	2 (100.0%)	1 (50.0%)
KCNQ2 в крови до лечения, N (%)	0 (0.0%)	1 (4.8%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
KCNQ2 в крови после лечения, N (%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)

Выявлена выраженная положительная корреляция между метилированием гена KCNQ2 в биоптате и клиническим ответом по результатам методов инструментальной диагностики после окончания лечения. Наличие метилирования гена KCNQ2 в биоптате значимо различалось в подгруппах пациенток с различным клиническим ответом на лечение. В частности, данная разница определялась за счёт подгрупп с частичным и полным регрессом. Метилирование гена KCNQ2 в биоптате чаще встречалось в подгруппе пациентов с полным клиническим регрессом опухоли в процессе лечения (100% vs. 14,3%, $p=0,04$). При этом все женщины в данной группе (с наличием метилирования гена

KCNQ2 в биоптате и полным патоморфологическим регрессом) имели тройной негативный подтип опухоли (Рисунок 42).

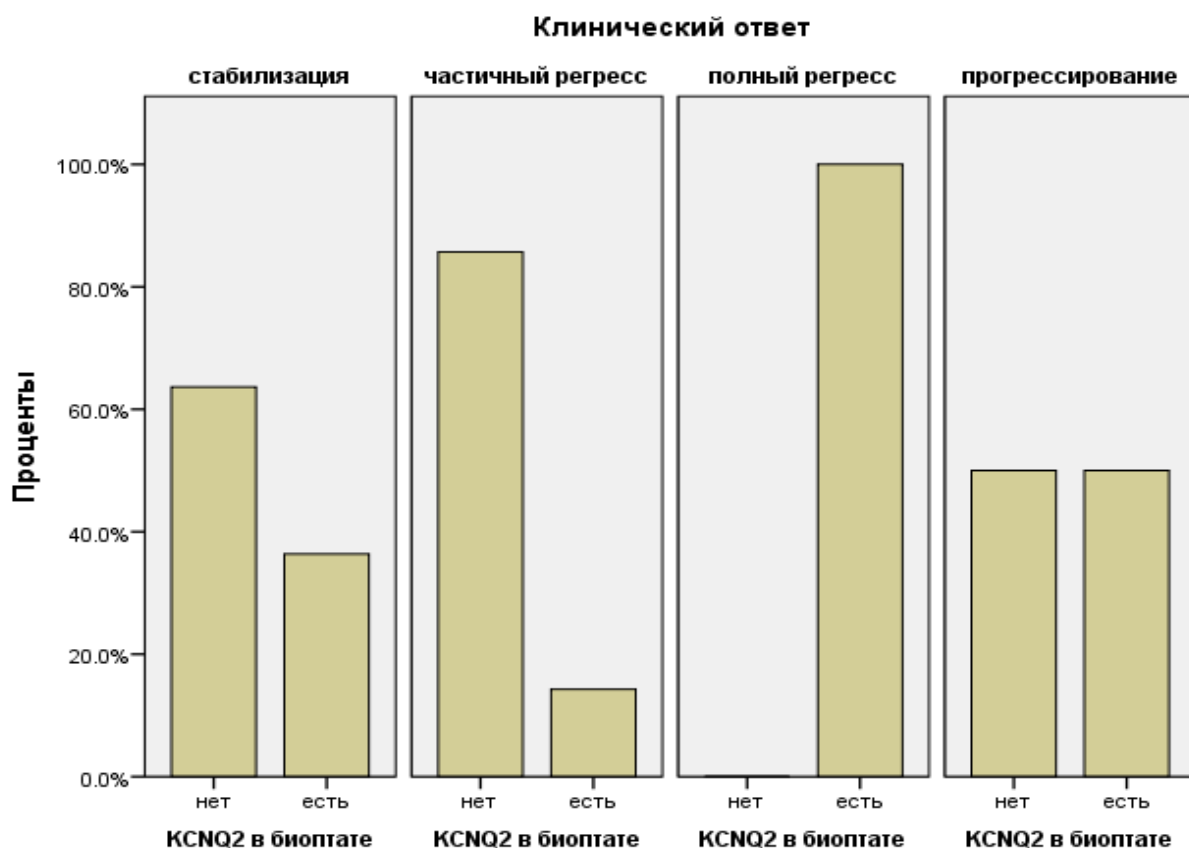


Рисунок 42 – Зависимость частоты определения метилирования гена KCNQ2 в биоптате от клинического ответа

В группе женщин со слабым ответом опухоли на лечение (1-2 степень по шкале Лавниковой) (N=24) в биоптатах первичной опухоли 11(45,8%) пациенток выявлено аномальное метилирование гена ADCY8. В той же группе больных в биоптатах опухоли 9 (37,5%) женщин определялось метилирование гена KCNQ2 и 8(33,4%) - гена SLC9A3.

В группе женщин с выраженным ответом опухоли на лечение (3-4 степень по шкале Лавниковой) (N=10) наиболее встречающимся было метилирование гена ADCY8 - в биоптатах 4 (40,0%) больных, в крови до начала лечения у 2 (20,0%) женщин, в крови после окончания лечения у 4 (40,0%) пациенток.

Среди женщин с отсутствием ответа на лечение (0 степень по шкале Лавниковой) (N=2) – у одной определялось аномальное метилирование гена

ADCY8 в крови до лечения и у одной метилирование гена IRF4 в биоптате (Таблица 37).

Таблица 37 – Зависимость частоты выявления метилирования генов в биоптатах, крови до начала и после окончания лечения от степени патоморфологического ответа по Лавниковой

	Патоморфологический ответ (степень по Лавниковой Г.А.)				
	0	1	2	3	4
TERT в биоптате, N	0	0	3	0	0
SYNDIG в биоптате, N	0	2	3	1	0
SKOR в биоптате, N	0	1	1	0	0
SLC9A3 в биоптате, N	0	3	5	2	0
SLC9A3 в крови до лечения, N	0	0	0	0	0
SLC9A3 в крови после лечения, N	0	0	1	1	0
ADCY8 в биоптате, N	0	5	6	3	1
ADCY8 в крови до лечения, N	1	2	1	2	0
ADCY8 в крови после лечения, N	0	0	6	2	2
DPYS в биоптате, N	0	1	1	1	0
IRF4 в биоптате, N	1	1	5	1	0
KCNQ2 в биоптате, N	0	1	8	1	0
KCNQ2 в крови до лечения, N	0	0	0	1	0
KCNQ2 в крови после лечения, N	0	0	0	0	0

Среди пациенток, достигших в процессе лечения pCR (N= 3) у 2 (75,0%) женщин определялось метилирование гена ADCY8 в крови после окончания лечения, при этом у одной из них, метилирование этого же гена определялось в биоптате до начала лечения. Аномальное метилирование других генов в биоптатах и образцах крови больных, достигших в процессе лечения полного лекарственного патоморфоза, по данным нашего исследования выявлено не было (Таблица 38).

Таблица 38 – Зависимость частоты выявления метилирования генов в биоптатах, крови до начала лечения и после окончания лечения от частоты достижения pCR

	Полный патоморфологический ответ (pCR)	
	Нет	Есть
TERT в биоптате, N (%)	3 (9.1%)	0 (0.0%)
SYNDIG в биоптате, N (%)	6 (18.2%)	0 (0.0%)
SKOR в биоптате, N (%)	2 (6.1%)	0 (0.0%)
SLC9A3 в биоптате	10 (30.3%)	0 (0.0%)
SLC9A3 в крови до лечения, N (%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
SLC9A3 в крови после лечения, N (%)	2 (6.1%)	0 (0.0%)
ADCY8 в биоптате, N (%)	14 (42.4%)	1 (33.3%)
ADCY8 в крови до лечения, N (%)	6 (18.2%)	0 (0.0%)
ADCY8 в крови после лечения, N (%)	8 (24.2%)	2 (66.7%)
DPYS в биоптате, N (%)	3 (9.1%)	0 (0.0%)
IRF4 в биоптате, N (%)	8 (25.0%)	0 (0.0%)
KCNQ2 в биоптате, N (%)	10 (30.3%)	0 (0.0%)
KCNQ2 в крови до лечения, N (%)	1 (3.0%)	0 (0.0%)
KCNQ2 в крови после лечения, N (%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)

По результатам проведенного нами анализа, значимой динамики генетических полиморфизмов SLC9A3, ADCY8, KCNQ2 в крови до и после лечения выявлено не было. Частота выявления метилирования генов TERT, SYNDIG, SKOR, SLC9A3, ADCY8, DPYS, IRF4, KCNQ2 в биоптатах и образцах крови больных, получавших предоперационную химиотерапию по поводу РМЖ II-III стадий, не зависела от возраста больных, менопаузального статуса, гистологического подтипа опухоли, стадии заболевания, степени патоморфологического ответа по шкале Лавниковой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По данным официальной статистики у 67% женщин в России РМЖ диагностируется на II и III стадии заболевания, при которых активно используется предоперационная химиотерапия [1]. Степень лекарственного ответа на данный вид лечения определяет прогноз заболевания [4; 5; 7; 8; 10; 28]. Уже доказана зависимость эффективности неoadъювантного лечения от подтипа опухоли, а именно увеличение частоты достижения полного лекарственного патоморфоза в группе больных с высокоагрессивными подтипами РМЖ [7; 8; 10; 130; 131]. При этом «золотым стандартом» оценки степени выраженности ответа на предоперационную химиотерапию продолжает оставаться плановое патоморфологическое исследование послеоперационного материала.

В настоящее время не существует надежных предикторов ответа на неoadъювантную химиотерапию РМЖ (как рентгенологических, так и серологических), позволяющих не только рано предсказать развитие противоопухолевого ответа, но и для ряда больных вовремя прекратить неэффективную высокотоксичную терапию. В то же время, выявление таких маркеров или их наиболее прогностически значимого сочетания позволит повысить эффективность лечения у больных РМЖ II-III стадии и требует дальнейшего изучения.

В данное исследование было включено 85 женщин, проходивших обследование и лечение по поводу РМЖ на клинических базах кафедры онкологии РМАНПО: ФГБУ «ЛРЦ» Минздрава России, Клинической больнице №1 МЕДСИ в Отрадном, в период с 2015 по 2018гг. Все пациентки имели II-III стадии заболевания и получали на 1-м этапе лечения полихимиотерапию. Медиана возраста больных составила 55 лет. Среди них 42 (49,4 %) женщины с сохранной функцией яичников, 43 (50,6 %) – в менопаузе.

Анализ крови на генетические мутации, чаще всего встречающиеся при РМЖ (BRCA1, BRCA2, CHEK2, tp53) был выполнен 48 (56,5%) женщинам в

исследовании. При этом у 7 (14,6%) женщин были обнаружены генетические мутации: у 5 (10,4%) из них в гене BRCA1, у 2 (4,2%) - в гене CHEK2. Профилактическая мастэктомия контрлатеральной молочной железы и профилактическая овариоэктомия были выполнены 3 (42,8%) из них.

Большая часть пациенток, включенных в протокол исследования, имели IIb и IIIb стадии заболевания – 33(38,8%) и 18 (21,2%) соответственно.

Наиболее часто встречающимся гистологическим типом опухоли был инфильтративный протоковый рак, который наблюдался у 73 (85,8%) женщин. Инфильтративный дольковый рак встречался у 8 (9,4%) пациенток. Значительно реже наблюдались смешанные раки и другие гистологические варианты РМЖ (папиллярный, тубулярный, медуллярный, слизистый и др.) – 4 (4,7%). Высокоагрессивные низкодифференцированные опухоли (G3) встречались у 49 (58,3%) женщин.

У равного количества больных в протоколе исследования определялся люминальный В Her2-отрицательный и тройной негативный подтипы опухолей – по 27 (31,8%) женщин в каждой группе. Люминальный А и люминальный В Her2-положительный подтипы встречались реже и, примерно, с одинаковой частотой – 12 (14,1%) и 11 (12,9%) соответственно.

Наличие пораженных лимфатических узлов до начала лечения, подтвержденное тонкоигольной аспирационной биопсией, а также по данным УЗИ молочных желез и МРТ желез с контрастированием наблюдалось в 71 (83,5%) случае. Из них: N1 (метастаз(ы) в подвижный подмышечный лимфатический узел (узлы) I, II уровня, расположенный на той же стороне тела) – у 45 (52,9%) женщин, N2 (метастазы в расположенных на той же стороне тела подмышечных лимфоузлах I, II уровня, клинически определяющихся как конгломерат) - у 17 (20%), N3 (метастазы в подключичном и/или надключичном лимфатическом узле (узлах) расположенном на той же стороне тела) – у 9 (10,6%). По данным комплексного обследования, поражение внутригрудных лимфатических узлов у данной группы больных не встречалось.

На всех этапах исследования для оценки местного статуса больным проводились: клинический осмотр, маммография, УЗИ молочных желез и регионарных лимфатических узлов, МРТ молочных желез с контрастированием, забор крови для исследования биологических маркеров (ЦОК, аномальное метилирование генов). Клинический ответ опухоли на лечение сравнивался с результатами патоморфологического ответа.

Лечение с использованием препаратов антрациклинового ряда проведено 32 (37,6%) женщинам, таксанового ряда и (или) препаратами платины – 25 (29,4%), их комбинацией - 28 (32,9%)

По результатам клинического обследования после окончания лечения, стабилизация заболевания зарегистрирована у 27 (31,8%) женщин, частичный регресс – у 36 (42,4%), полный регресс у 17 (20,5%), прогрессирование заболевания – у 5 (5,9%) пациенток.

При анализе результатов планового патоморфологического исследования, полный патоморфологический регресс (4 степень по шкале Лавниковой) наблюдался у 22 (25,9%) больных, получавших неoadьювантную химиотерапию.

Нами отмечено, что среднее значение индекса пролиферации Ki67 в группе пациенток с pCR было выше и составило 51,0% ($p=0,003$). Среди женщин, достигших pCR, чаще встречались высокоагрессивные подтипы опухоли и не встречались больные с люминальным А подтипом РМЖ. Тройной негативный фенотип опухоли отмечен у 45,4% (10) пациенток, люминальный В Her2-положительный и Her2-положительный подтипы - у 36,4% (8) ($p=0,034$).

Частота достижения pCR не зависела от возраста больных ($p=0,924$), менопаузального статуса ($p=0,401$), гистологического типа опухоли ($p=0,615$), стадии заболевания ($p=0,404$), схемы и количества курсов НПХТ ($p=0,404$). Однако, в группе женщин, получавших лечение комбинацией препаратов антрациклинового и таксанового ряда с включением или без препаратов платины (N=28 (33,0%)) частота достижения pCR была самой высокой и составила 54,5% ($p=0,003$).

Для более детального анализа выполнено разделение больных по подгруппам: 1) с выраженным ответом на лечение (3-4 степень лекарственного патоморфоза по шкале Лавниковой), 2) слабым (1-2 степень) и 3) отсутствием ответа на лечение (0 степень), выявлены следующие закономерности. Учитывая, небольшое количество женщин с отсутствием ответа на лечение – 2(2,3%), данная группа больных не включалась в анализ.

При анализе результатов исследования в группах женщин с выраженным и слабым ответом на лечение, выявлены достоверно значимые корреляции в зависимости от биологического подтипа опухоли и значения индекса пролиферации Ki67%.

Среди биологических подтипов, в группе больных с выраженным ответом на лечение преобладали женщины с тройным негативным раком молочной железы - 17(40,5%). В группе больных со слабым ответом на лечение (N=43 (50,6%)) люминальный А и люминальный В HER2 – негативный подтипы опухолей зарегистрированы у 27 (62,8%) ($p=0,008$).

Пациентки с выраженным лекарственным патоморфозом имели достоверно более высокий индекс пролиферации клеток Ki67 по сравнению с другими пациентками ($44,6\pm 24,6$ vs. $30,5\pm 21,6$, $p=0,005$).

По данным нашего исследования возраст больных ($p=0,817$), менопаузальный статус ($p=0,798$), стадия заболевания ($p=0,114$), гистологический тип опухоли ($p=0,548$) не повлияли на распределении больных по группам с выраженным (3-4 степень по шкале Лавниковой) и слабым (1-2 степень по шкале Лавниковой) ответом на лечение.

До начала, в процессе и по окончании лекарственной терапии производилась оценка местного статуса заболевания. При физикальном осмотре особое внимание уделялось наличию кожных симптомов, размеру опухоли, состоянию регионарных лимфатических узлов. Среднее значение размеров опухолевого образования до начала лечения по результатам клинического осмотра составило 31,4 мм. На момент окончания лечения средний размер опухоли по данным физикального осмотра составлял 16,3мм. Такие размеры

опухоли значимо не различались с результатами планового гистологического исследования ($16,3 \pm 11,5$ vs. $15,8 \pm 16,0$, $p=0,388$). А уменьшение средних размеров образования в 1,9 раз по данным осмотра свидетельствовало об эффекте лекарственного лечения. Разница в размерах опухоли менее 5 мм по данным клинического осмотра на 3-м этапе исследования и планового патоморфологического заключения была отмечена в 53,6 % (45) случаев. Разница в размерах опухоли менее 10 мм выявлена в 72,6 % (61) случаев.

Частота полных регрессов по данным клинического осмотра оказалось больше, чем по данным патоморфологического заключения, коэффициент cCR/pCR составил 0,64. Из этого мы можем сделать вывод, что информативности одного этого метода для оценки эффективности неoadьювантного лечения у больных раком молочной железы недостаточно. По данным нашего исследования на информативность метода, не влияли: менопаузальный статус женщин, стадия заболевания, гистологический и биологический подтипы опухоли.

По результатам маммографии уменьшение средних размеров образования в процессе лечения в 1,7 раз (с $28,5 \pm 13,7$ до $16,8 \pm 14,6$) говорило об эффективности лечения и подтверждалось результатами планового патоморфологического исследования. Разница в размерах опухоли менее 5 мм по данным маммографии на 3-м этапе исследования и результатами планового патоморфологического заключения была отмечена в 55,4 % (46) случаев. Разница в размерах опухоли менее 10 мм выявлена в 66,3 % (55) случаев. Коэффициент (cCR/pCR) составил 0,81, что говорит о высокой точности исследования в предсказании полного патоморфологического регресса опухоли по окончании предоперационного лекарственного лечения. На информативность метода, по данным нашего исследования, не влияли: менопаузальный статус женщин, стадия заболевания, гистологический и биологический подтипы опухоли.

По данным УЗИ молочных желез средние размеры опухоли значимо не различались после окончания лечения с результатами планового гистологического исследования ($17,7 \pm 12,4$ vs. $15,8 \pm 16,0$, $p=0,186$). Уменьшение размеров опухоли в 1,57 раз в процессе лечения говорило об эффективности

НПХТ. Разница в размерах опухоли менее 5 мм по данным УЗИ молочных желез на 3-м этапе исследования и результатам планового патоморфологического заключения была отмечена в 52,9 % (45) случаев, менее 10 мм - в 68,2 % (58) случаев.

При оценке эффективности НПХТ с помощью УЗИ молочных желез коэффициент (сCR/pCR) составил 0,55, что говорит о недостаточной точности метода в предсказании полного лечебного патоморфоза в процессе НПХТ у больных РМЖ. Корреляций с гистологическим и биологическим типами опухоли, возрастом и менопаузальным статусом обнаружено не было. Стоит отметить достаточную информативность метода в предсказании метастатического поражения регионарных лимфатических узлов. У 42 из 58 (72,4 %) больных с предполагаемым по данным УЗИ молочных желез и регионарных зон метастатическим процессом в лимфоузлах, поражение лимфатических узлов подтверждено при плановом гистологическом исследовании.

Нами проанализированы данные об изменении МР-характеристик опухоли в процессе системного лечения РМЖ. Разница в размерах опухоли менее 5 мм по данным МРТ молочных желез на 3-м этапе исследования и результатам планового патоморфологического заключения была отмечена в 56,0 % (47) случаев. Разница в размерах опухоли менее 10 мм выявлена в 76,2 % (64) случаев. Однако коэффициент сCR/ pCR равнялся 0,9 и оказался самым высоким среди других методов оценки ответа, что говорит о высокой чувствительности метода в отношении определения полного лекарственного патоморфоза.

Стоит отметить, что МРТ молочных желез с контрастированием была наиболее точным методом визуализации отсевов в ткани молочной железы и их динамики в процессе НПХТ ($p=0,003$).

В 85,7 % случаев определяемое по МРТ поражение регионарных лимфатических узлов было подтверждено плановым патоморфологическим исследованием. Из этого следует, что МРТ молочных желез является наиболее информативным методом в оценке статуса регионарных лимфатических узлов в процессе НПХТ.

По результатам нашего исследования, наличие разницы размеров опухоли по данным МРТ молочных желез после окончания лечения и результатами планового гистологического исследования не зависело от возраста пациенток, клинического размера опухоли, стадии заболевания, индекса пролиферации клеток, ИГХ-подтипа опухоли и менопаузального статуса.

Взаимосвязь между полным клиническим ответом опухоли на лечение (сCR) по результатам методов клинического обследования (физикального осмотра, УЗИ молочных желез, маммографии и МРТ молочных желез с динамическим контрастированием) на 3-м этапе исследования и полным патоморфологическим регрессом опухоли (pCR) по результатам планового гистологического исследования оценивалась по вероятностному коэффициенту предсказания полного ответа опухоли на лечение (сCR/pCR).

По данным нашего исследования самый высокий коэффициент (сCR/pCR) наблюдался при МРТ молочных желез с динамическим контрастированием – 0,90. Наименьший показатель при УЗИ молочных желез – 0,55 и клиническом осмотре – 0,64. По данным маммографии вероятностный коэффициент оказался достаточно высоким и составил 0,81.

Отсюда можно сделать вывод, что для предсказания полного лечебного патоморфоза у больных РМЖ после неoadьювантного лечения целесообразно использовать МРТ молочных желез с динамическим контрастированием (Таблица 39).

Таблица 39 – Вероятностный коэффициент предсказаний полных ответов опухоли на лечение по результатам методов клинического обследования после окончания лечения

Метод исследования	Клинический осмотр	УЗИ молочных желез	Маммография	МРТ молочных желез с динамическим КУ
Коэффициент сCR/pCR	0,64	0,55	0,81	0,90

При оценке возможностей использования МР-диффузии и МР-спектроскопии выявлены следующие закономерности.

У пациенток, достигших полного лечебного патоморфоза в процессе НПХТ регистрировалось увеличение ИКД, в то время как в группе больных, не достигших полного патоморфологического регресса, показатель ИКД уменьшался в процессе лечения. Прогностическая значимость для определения полного лечебного патоморфоза с учетом регрессионного анализа была выше в группе больных с выраженной динамикой ИКД на 3-м этапе исследования ($B=2652.4$, $p=0,001$). По литературным данным, увеличение ИКД в процессе лечения, сопровождающееся уменьшением контрастности изображения на ДВИ, уменьшением клеточности и расширением межклеточных пространств на молекулярном уровне, происходит быстрее, чем изменение объёма опухоли и может служить ранним предиктором ответа на проводимую химиотерапию у больных РМЖ [53; 54; 55]. Также, по данным нашего исследования, значение ИКД после окончания лечения было в среднем достоверно выше в группе пациентов с выраженным лечебным патоморфозом (3-4 степень по шкале Лавниковой) (0.0014260 vs. 0.0011818 , $p=0,001$).

Вероятностный коэффициент cCR/pCR по данным МР-диффузии на 3-м этапе исследования составил 0,75. Таким образом, прогностическая значимость метода в предсказании полного ответа на НПХТ оказалась выше прогностического значения УЗИ молочных желез (0,55) и клинического осмотра (0,64), но не превысила значения показателя cCR/pCR по результатам маммографии (0,81) и МРТ молочных желез с динамическим контрастированием (0,9).

Значение и динамика ИКД в процессе лечения не зависели от стадии заболевания, индекса пролиферации клеток, гистологического и биологических подтипов опухоли, менопаузального статуса.

Частота встречаемости и площадь под пиком холина в процессе лечения зависели от размера узлового образования по данным инструментальных методов обследования. С увеличением размера образования увеличивалась частота

регистрации пика холина, площадь под пиком холина ($p=0,001$). Так, у женщин с индексом пролиферации Ki67 более 50,0%, средняя площадь под пиком холина была больше, чем в группе женщин с меньшим индексом пролиферации ($r=0,555$, $p<0,001$).

Снижение пика холина в процессе НПХТ наблюдалось чаще и было более выраженным в группе пациенток с полным лекарственным патоморфозом, чем без него ($-693,88\pm 478,27$ vs. $-200,60\pm 501,43$, $p=0,041$). Прогностическая значимость для определения полного лечебного патоморфоза с учетом регрессионного анализа была выше в группе больных, имевших положительную динамику (снижение площади под пиком холина, исчезновение пика) к 3-му этапу исследования (после окончания лечения) ($B=-0,002.6$, $p=0.019$).

Исчезновение пика холина после 2-х курсов лечения с высокой частотой наблюдалось в группе больных с pCR. По данным регрессионного анализа выявлена высокая прогностическая значимость ранней динамики пика холина (уменьшение площади под пиком после 2-х курсов НПХТ) в общей группе больных (95% ДИ 0,514-0,835, AUC 0,674) с критическим уровнем выше 0,0001635. Это говорит о возможности использования данного маркера в качестве предиктора раннего ответа на неоадьювантную химиотерапию у РМЖ II-III стадии. Результаты нашего исследования совпадают с данными мировой литературы [46, 47-49].

Частота определения пика холина и площадь под пиком не зависели от гистологического и биологического подтипов опухоли, менопаузального статуса и возраста женщин.

Вероятностный коэффициент cCR/pCR по данным МР-спектроскопии на 3-м этапе исследования составил 0,87, был выше рассчитанных коэффициентов для других методов обследования и приближался по своему значению к коэффициенту cCR/pCR рассчитанному для МРТ молочных желез с динамическим контрастированием (0,9). Данный анализ говорит о высокой значимости МР-спектроскопии в предсказании полного патоморфологического регресса опухоли после НПХТ у больных РМЖ II-III стадии.

Оценка ЦОК в крови пациенток проводилась с использованием фильтрационной методики ISET, определенным достоинством которой является то, что факт наличия ЦОК устанавливает врач-цитолог, а дальнейшие иммуноцитохимические и молекулярно-генетические исследования являются важными, но не обязательными элементами исследования. В то же время, такой подход неизбежно снижает специфичность метода, потенциально приводя к появлению ложно-положительных результатов. Эта проблема не была решена в нашем исследовании: мы не можем исключить, что на мембранах могла содержаться примесь эпителиальных или эндотелиальных клеток неопухолевого происхождения.

По данным нашего исследования у 22 (37,3 %) женщин ЦОК были обнаружены до начала лечения (1-й этап исследования). По литературным данным, частота встречаемости ЦОК в крови больных местно-распространенным РМЖ составляет около 36,0% [66].

Частота встречаемости и количество ЦОК зависели от стадии заболевания ($p=0,03$), размера опухолевого образования ($p=0,009$), статуса регионарных лимфатических узлов (N+) ($r=0.289$, $p=0,026$) и их размера ($r=0.293$, $p=0,024$) (по данным УЗИ молочных желез и регионарных зон) до начала лечения. Так, у больных с III стадией заболевания ЦОК на 1-м этапе исследования выявлялись чаще. При размерах опухоли более 2,5 см (по данным УЗИ молочных желез) частота обнаружения клеток была выше. Также, стоит отметить, что частота встречаемости и количество ЦОК были выше в группе женщин с наличием пораженных лимфатических узлов и коррелировало с размером наибольшего лимфатического узла (по данным УЗИ регионарных лимфатических узлов).

Частота встречаемости и количество ЦОК в крови до начала лечения, после 2-х курсов НПХТ, а также динамика ЦОК на 2-м и на 3-м этапах исследования не имели значимых корреляций со степенью лечебного патоморфоза по шкале Лавниковой.

Количество ЦОК в крови до начала лечения, после 2-х курсов НПХТ, а также динамика ЦОК на 2-м и на 3-м этапах исследования не зависели от менопаузального статуса женщин, гистологического и биологического подтипов опухоли.

Количество ЦОК в крови после окончания лечения было значимо выше у пациенток в менопаузе, чем у пациенток репродуктивного возраста ($51,7 \pm 84,9$ vs. $4,8 \pm 13,4$, $p=0,011$). В то время как наличие ЦОК в крови до начала лечения и после 2-х курсов НПХТ не зависело от менопаузального статуса.

Малое количество включенных в исследование пациенток с каждым из биологических подтипов РМЖ и короткий период наблюдения за ними не позволяют нам на сегодняшний день говорить о клиническом значении этих наблюдений. В целом, мы полагаем, что оценка динамики ЦОК в процессе лекарственного лечения, является перспективным направлением и требует дальнейшего изучения.

В нашем исследовании проанализирована возможность использования метилирования генов TERT, SYNDIG, SKOR, SLC9A3, ADCY8, DPYS, IRF4, KCNQ2 в биоптатах и образцах крови больных, получавших неoadъювантную химиотерапию по поводу местно-распространенного РМЖ, для оценки эффективности лекарственного лечения.

Метилирование генов TERT, SYNDIG, SKOR, DPYS, IRF4 в крови до начала и после окончания лечения обнаружено не было.

Значимых корреляций метилирования генов ADCY8, KCNQ2 в биоптатах и крови на всех этапах исследования с биологическим подтипом опухоли не выявлено. Метилирование гена SLC9A3 в биоптате чаще встречалось в подгруппе с люминальным В Her2-отрицательным и люминальным В Her2-положительным подтипами РМЖ ($p=0,009$).

По результатам генетического исследования выявлена положительная корреляция между метилированием гена KCNQ2 в биоптате и клиническим ответом по результатам методов инструментальной диагностики после окончания лечения у больных с тройным негативным РМЖ. Мутация KCNQ2 в биоптате в

данной группе больных чаще встречалась среди пациентов с полным клиническим регрессом опухоли в процессе лечения (100% vs. 14,3%, $p=0,040$)

Ген *KCNQ2* кодирует белки, формирующие трансмембранные потенциал-зависимые Ca^{2+} каналы, чей генетический дефицит ассоциирован с избыточной возбудимостью нейронов [133]. Неоднократно показана его роль в патогенезе эпилепсии, в связи с чем его рассматривали как потенциальную мишень новых противоэпилептических средств [134]. Также описана специфическая *KCNQ*-ассоциированная энцефалопатия [135]. Единственное исследование, связывавшее экспрессию *KCNQ2* каналов с опухолями молочной железы продемонстрировало 7-кратное её увеличение в опухолевых линиях MBDA-MB453 по сравнению с линиями здоровых клеточных культур эпителия протоков молочной железы MCF-10A. Ещё более интересным представляется тот факт, что специфический ингибитор каналов *KCNQ2* продемонстрировал небольшой, но достоверный эффект по снижению скорости пролиферации именно у линий опухолевых клеток с повышенным числом каналов [136]. Таким образом, вероятно, увеличение численности *KCNQ2* каналов оказывает косвенное влияние на скорость пролиферации за счёт ещё не изученных сигнальных систем внутри клетки. Снижая экспрессию гена *KCNQ2*, метилирование сокращает число каналов на клеточной мембране, тем самым не позволяя реализовывать описанный выше путь стимулирования пролиферации и обуславливая более благоприятный прогноз лечения. В недавних исследованиях *in vitro* была установлена взаимосвязь между наличием *KCNQ2* каналов и ответом рака молочной железы на эндокринотерапию тамоксифеном [137]. При этом ранее не оценивалась взаимосвязь экспрессии или модификации *KCNQ2* с клиническим течением опухолевого процесса.

В виду малой выборки больных ($N=36$) и короткого периода наблюдения за ними, на сегодняшний день не представляется возможным в полном объёме оценить возможности использования данного маркера и говорить о клиническом значении этих наблюдений.

Выводы

1) Включение МРТ молочных желез с динамическим контрастированием в классический алгоритм диагностики (осмотр, маммография, УЗИ молочных желез и регионарных лимфатических узлов), проводимой в процессе предоперационного лекарственного лечения РМЖ, позволяет увеличить точность в предсказании полного патоморфологического ответа опухоли на лечение. Вероятностный коэффициент достижения полного патоморфологического ответа (сCR/ pCR) для МРТ составил 0,90 (по данным осмотра – 0,64, УЗИ молочных желез – 0,50, маммографии – 0,81).

2) МРТ молочных желез с динамическим контрастированием - наиболее точным методом визуализации отсевов в ткани молочной железы и их динамики в процессе НПХТ ($p=0,003$), обладает самой высокой информативностью в оценке статуса регионарных лимфатических узлов в процессе НПХТ (точность МРТ 85,7%, УЗИ -72,4%).

3) Увеличение ИКД определяемое при МР-диффузии в процессе НПХТ у больных со II-III стадиями рака молочной железы может являться предиктором выраженного ответа опухоли на лекарственное лечение ($p=0,001$). Метод обладает высокой прогностической значимостью в предсказании полного ответа на НПХТ, коэффициент сCR/ pCR = 0,75.

4) Уменьшение пика холина в процессе НПХТ по данным МР-спектроскопии у больных со II-III стадиями рака молочной железы может являться ранним предиктором выраженного ответа опухоли на лекарственное лечение ($p=0,001$), маркер способен предсказать ответ опухоли после 2-х курсов химиотерапии с критическим уровнем выше 0,0001635 (95% ДИ 0,514-0,835). Вероятностный коэффициент сCR/pCR по данным МР-спектроскопии составил 0,87, был выше рассчитанных коэффициентов для других методов обследования и приближался по своему значению к коэффициенту сCR/pCR рассчитанному для МРТ молочных желез с динамическим контрастированием (0,90).

5) Циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК), определяемые с помощью ISET методики, не показали своей значимости в прогнозировании ответа на неoadъювантную химиотерапию, методика требует дальнейшего изучения.

6) Метилирование ДНК - прогностический и предиктивный маркер нового поколения, изучение которого является перспективным направлением. Аномальное метилирование гена KCNQ2 может являться предиктором хорошего клинического ответа на предоперационную химиотерапию у больных тройным негативным раком молочной железы II-III стадий заболевания и требует дальнейшего изучения.

Практические рекомендации

При планировании неoadъювантного лечения первично-операбельных и местно-распространенных форм рака молочной железы целесообразно использовать весь комплекс диагностических методов: физикальное обследование, УЗИ молочных желез и регионарных зон, маммографию и магнитно-резонансную томографию.

Магнитно-резонансная томография с динамическим контрастированием позволяет наиболее точно предсказать полный патоморфологический регресс и тем самым решить вопрос об объеме последующего хирургического вмешательства.

МР-диффузия – легко выполнимый в рамках протокола МРТ молочных желез с динамическим КУ метод, позволяет в процессе неoadъювантного лечения предсказать выраженный ответ опухоли на химиотерапию. В виду высокой прогностической точности метода и доступности, целесообразно его использование для оценки эффективности НПХТ при РМЖ II-III стадии.

Использование МР-спектроскопии даёт возможность оценить ответ опухоли после 2-х курсов химиотерапии и тем самым максимально рано изменить лечебную тактику, предотвратив воздействие на организм женщины высокотоксичного и неэффективного лечения. Метод применим для опухолей солидного строения, размером более 2,0 см, легко выполним при наличии технических навыков. Учитывая возможности МР-спектроскопии в наиболее короткие сроки предсказывать ответ опухоли на лечение, метод может быть рекомендован для оценки ответа на НПХТ при РМЖ II-III стадии в рутинной клинической практике.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВИ – взвешенные изображения

ДВИ – диффузионно-взвешенные изображения

ДИ – доверительный интервал

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИК – индекс корреляции

КТ – компьютерная томография

КУ – контрастное усиление

ЛУ – лимфатический узел

ММГ – маммография

МЖ – молочная железа

МРТ – магнитно-резонансная томография

НПХТ – неoadьювантная полихимиотерапия

ПЭТ-КТ – позитронная эмиссионная томография

РМЖ – рак молочной железы

РП – рецепторы прогестероновые

РЭ – рецепторы эстрогеновые

ТАБ – тонкоигольная аспирационная биопсия

ТС – томосинтез

УЗИ – ультразвуковая диагностика

ЦДК – цветное доплеровское картирование

ЦОК - циркулирующие опухолевые клетки

ЭКГ – электрокардиография

ADC (apparent diffusion coefficient) – карта измеряемого коэффициента диффузии

AUC – Area Under the Curve – площадь под кривой

cCR – клинический полный ответ

cNR – отсутствие клинического ответа (стабилизация)

cPR – клинический частичный ответ

DWI (Diffusion Weighted Imaging) – диффузионно-взвешенные изображения

^1H -MPC протонная магнитно-резонансная спектроскопия

G – grade – степень гистологической злокачественности

HER 2 – Human Epidermal growth factor Receptor 2 – рецептор

эпидермального фактора роста 2

pCR – полный патоморфологический ответ

ROC-кривая (англ. receiver operating characteristic,

рабочая характеристика приёмника) – кривая ошибок

SE – standard error – стандартная ошибка

TE (time echo) время эхо

SV ^1H -MPC (single voxel) – одновоксельная протонная

магнитно - резонансная спектроскопия

tCho – total Choline-общий холин

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каприн, А. Д. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность) / А. Д. Каприн, В. В. Старинский, Г. В. Петрова // М.: МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2017. – С. 10.
2. Mirza, A.N. Prognostic factors in node-negative breast cancer: a review of studies with sample size more than 200 and follow-up more than 5 years / A.N. Mirza, N.Q. Mirza, G. Vlastos, et al // *AnnSurg.* – 2002. – 235. – P. 10–26.
3. Fisher, B. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer / B. Fisher, S. Anderson, J. Bryant , et al // *N Engl Med.* – 2002. – 347. – P. 1233–1241.
4. Bonnefoi, H. Pathological complete response after neoadjuvant chemotherapy is an independent predictive factor irrespective of simplified breast cancer intrinsic subtypes: a landmark and two-step approach analyses from the EORTC 10994/BIG 1-00 phase III trial / H. Bonnefoi , S. Litière , M. Piccart et al // *Ann Oncol.* – 2014. – 25(6). – P.1128–1136.
5. Cirier, J. Impact of pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in invasive breast cancer according to molecular subtype / J. Cirier, G. Body, M. Bedouet, et al. // *Gynecol Obstet Fertil Senol.* – 2017. – 45(10). – P. 535–544.
6. Семиглазов, В.Ф. Руководство по лечению раннего рака молочной железы / В.Ф. Семиглазов, В.В. Семиглазов, П.В. Криворотько и др. // СПб. – 2016. – 10-15с.
7. Von Minckwitz, G. 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. – 30(15). – P. 1796–1804.

8. Szentmartoni, G. Morphological and pathological response in primary systemic therapy of patients with breast cancer and the prediction of disease free survival: a single center observational study / G. Szentmartoni, A. Tokes, T. Tokes // *Croat Med J.* – 2016. – 57(2). – P.131–139.
9. Montagna, E. Pathological complete response after preoperative systemic therapy and outcome: relevance of clinical and biologic baseline features / E. Montagna, V. Bagnardi, N. Rotmensz // *Breast Cancer Res Treat.* – 2010. – 124(3). – P. 689–699.
10. Поддубная, И.В. Неoadъювантная химиотерапия HER2-положительного рака молочной железы / И.В. Поддубная, И.В. Колядина // *Практическое руководство.* — М.: МедиаМедика, 2016. – С. 92.
11. Корнеева, И. А. Современные подходы к оценке эффективности лечения опухолей репродуктивной системы с использованием критериев RECIST, GCIG / И. А. Корнеева, Е. Г. Новикова, Н. А. Рубцова и др // *Российский онкологический журнал.* – 2012. – N. 3. – С. 54–58.
12. Семиглазов, В.Ф. Клинические рекомендации по диагностике и лечению рака молочной железы / В.Ф. Семиглазов, Р.М. Палтуев, Т.Ю. Семиглазова и др. // СПб. АБС-пресс, 2013. – С. 234.
13. Гажонова, В.Е. Современные методы неинвазивной лучевой диагностики рака молочной железы / В.Е. Гажонова, М.П. Ефремова, Е.А. Дорохова // *РМЖ.* – 2016. – N. 5. – С. 321–324.
14. Stachs, A. Accuracy of Tumor Sizing in Breast Cancer: A Comparison of Strain Elastography, 3-D Ultrasound and Conventional B-Mode Ultrasound with and without Compound Imaging/ A. Stachs, A. Pandjaitan , A. Martin // *Ultrasound Med Biol.* – 2016. –42(12). – P. 2758–2765.
15. Kavtaradze, S.N. Importance of color Doppler in diagnostics of breast diseases / S.N. Kavtaradze, T.G. Mosidze // *Georgian Med News.* – 2010. – 178. – P. 9–15.

16. Zou, H . Factors Affecting the Quality of Breast Quasistatic Ultrasound Elastograms / H. Zou, Y. Xue, Y. Ou // J. Ultrasound Med. – 2018. – 37(7). – P. 1701-1712.
17. Sarma, E.A. Barriers to screening mammography / E.A. Sarma // Health Psychol Rev. – 2015. – N. 9(1). – P. 42-62.
18. Mistry, K.A. The effect of chemotherapy on the mammographic appearance of breast cancer and correlation with histopathology/ K.A. Mistry, M.H. Thakur, S.A. Kembhavi // Brit. J. Radiol. – 2016. – N. 89. – P.1057–1063.
19. Helvie, M.A. Locally advanced breast carcinoma: accuracy of mammography versus clinical examination in the prediction of residual disease after chemotherapy / M.A. Helvie, L.K. Joynt, R.L. Cody, et al. // Radiology. – 1996. – N. 198. – P. 327–332.
20. Schulz-Wendtland, R. Neoadjuvant chemotherapy-monitoring: clinical examination, ultrasound, mammography, MRI, elastography: only one, only few or all? / R. Schulz-Wendtland // Eur. J. Radiol. – 2012. – Vol. 81. – P. 147–148.
21. Stein, R.G. The impact of breast cancer biological subtyping on tumor size assessment by ultrasound and mammography - a retrospective multicenter cohort study of 6543 primary breast cancer patients/ R.G. Stein, D. Wollschläger, R. Kreienberg // BMC Cancer. – 2016. – N. 16. – P.459.
22. Лисаева, А.А. Лечебный патоморфоз злокачественных опухолей: клинические и морфологические критерии. Классификации. Прогностическое значение лечебного патоморфоза при раке молочной железы и других опухолях / А.А. Лисаева, Я.В. Вишневецкая, Е.М. Рощин и др. // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2011. – N. 4. – С.19–23
23. Франк, Г.А. Роль и критерии оценки морфологического регресса рака молочной железы после неoadъювантной терапии / Г.А. Франк, М.Е. Илатовская, Ю.Ю. Андреева и др. // Современная онкология. – 2015. – 17 (2). – С. 30–34.
24. Bossuyt, V et al. Recommendations for standardized pathological characterization of residual disease for neoadjuvant clinical trials of breast cancer by the BIG-NABCG collaboration / V. Bossuyt, et al. //Ann Oncol. – 2015. – P. 1–12.

25. Symmans, W.F. Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy / W.F. Symmans, et al. // *J. Clin Oncol.* – 2007. – 25 (28). – P. 4414–4422.
26. Miller, I.D. A new histological grading system to assess response of breast cancer to primary chemotherapy / I.D. Miller, S. Payne, K.N. Ogston K.N. // *Int. J. Oncol.* – 2002. 20(4). – P. 791–796.
27. Лавникова, Г.А. Гистологические методы количественной оценки степени терапевтического повреждения опухоли/Методические рекомендации. – Москва, 1979.
28. Von Minckwitz, G. Response-guided neoadjuvant chemotherapy for breast cancer / G. Von Minckwitz, et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2013. – 31 (29). – P. 3623–3630.
29. Cortazar, P. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: The CTNeoBC pooled analysis / P. Cortazar, et al. // *Lancet.* – 2014. – 384 (9938). – P.164–172.
30. Меладзе, Н.В. МР-спектроскопия в дифференциальной диагностике узловых образований молочных желез / Н.В. Меладзе, С.К. Терновой, А.Б. Абдураимов // *Бюллетень сибирской медицины.* – 2012. – N.5. –P. 78–79.
31. Zhang, Y. Meta-analysis of diagnostic accuracy of magnetic resonance imaging and mammography for breast cancer / Y. Zhang, H. Ren // *J. Cancer Res. Ther.* – 2017. – 13(5). – P. 862–868.
32. Hylton, N.M. Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer: Functional Tumor Volume by MR Imaging Predicts Recurrence-free Survival—Results from the ACRIN 6657/CALGB 150007 I-SPY 1 TRIAL / N.M. Hylton, A. Constantine, M. Gatsonis // *Radiology.* – 2016. – 279(1). – P. 44–55.
33. Bufi, E. Hypervascularity Predicts Complete Pathologic Response to Chemotherapy and Late Outcomes in Breast Cancer / E. Bufi, P. Belli, M. Matteo // *Clinical Breast Cancer.* – 2016. – 1526-8209(16). – P. 30162–30168.
34. Marinovich, M.L. Meta-analysis of agreement between MRI and pathologic breast tumour size after neoadjuvant chemotherapy / M.L. Marinovich, P. Macaskill, L. Irwig et al. // *Br. J. Cancer.* – 2013. – N. 109. P. 1528–1536.

35. Adrada, B.E. MRI for the Staging and Evaluation of Response to Therapy in Breast Cancer / B.E. Adrada, R. Candelaria, G.M. Rauch // *Top. Magn. Reson. Imaging.* – 2017. – 26(5). – P. 211–218.
36. Weber, J.J. MRI and Prediction of Pathologic Complete Response in the Breast and Axilla after Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer / J.J. Weber, M.S. Jochelson, A. Eaton // *J. Am. Coll. Surg.* – 2017. – 225(6). – P. 740–746.
37. Murphy, C. Evaluating the role of Magnetic Resonance Imaging post Neoadjuvant Therapy for Breast Cancer in the NEONAB trial / C. Murphy, V. Mukaro, R. Tobler // *Intern. Med. J.* – 2018. – P. 699–705.
38. Dialani, V. Role of imaging in neoadjuvant therapy for breast cancer / V. Dialani, T. Chadashvili, P. Slanetz // *Ann Surg Oncol.* – 2015. – 22(5). – P. 1416–1424.
39. Leong, K.M. Utilisation of MR spectroscopy and diffusion weighted imaging in predicting and monitoring of breast cancer response to chemotherapy / K.M. Leong, P. Lau, S. Ramadan // *J. Med. Imaging Radiat. Oncol.* – 2015. – 59(3). – P. 268–277.
40. Sardanelli, F. Clinical Breast MR Using MRS or DWI: Who Is the Winner? / F. Sardanelli, L.A. Carbonaro, L. Montemezzi // *Front. Oncol.* – 2016. – N. 6. – P. 217.
41. Greenwood, H.I. Clinical Breast Magnetic Resonance Imaging: Technique, Indications, and Future Applications / H.I. Greenwood, R.I. Freimanis, B.M. Carpentier // *Semin. Ultrasound. CT. MR.* 2018. 39(1). – P. 45–59.
42. Danishad, K.K. Assessment of therapeutic response of locally advanced breast cancer (LABC) patients undergoing neoadjuvant chemotherapy (NACT) monitored using sequential magnetic resonance spectroscopic imaging / K.K. Danishad, U. Sharma, R.G. Sah, et al. // *NMR Biomed.* – 2010. – 23(3). – P. 233–241.
43. Jonathan, K.P. In vivo proton magnetic resonance spectroscopy of breast cancer: a review of the literature / K.P. Jonathan, L. Begley, W. Thomas // *Breast Cancer Research.* – 2012. – N. 14. – P. 207.
44. Podo, F. Activation of Phosphatidylcholine-Specific Phospholipase C in Breast and Ovarian Cancer: Impact on MRS-Detected Choline Metabolic Profile and

Perspectives for Targeted Therapy / F. Podo, L. Paris, S. Cecchetti, et al // *Front. Oncol.* – 2016. – 6. – P. 171.

45. Jagannathan, N.R. Evaluation of total choline from in-vivo volume localized proton MR spectroscopy and its response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer / N.R. Jagannathan, M. Kumar, V. Seenu // *Br. J. Cancer.* 2001. – 84(8). – P. 1016–1022.

46. Cheng, M. Molecular Effects of Doxorubicin on Choline Metabolism in Breast Cancer / M. Cheng, A. Rizwan, L. Jiang // 2017. – 19(8). – P. 617–627.

47. Baek, H.M. Predicting Pathologic Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer by Using MR Imaging and Quantitative ^1H MR Spectroscopy / H.M. Baek, J.H. Chen, K. Nie // *Radiology.* – 2009. – 251(3). – P. 653–662.

48. Cho, N. Early prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients: comparison of single-voxel (^1H) H-magnetic resonance spectroscopy and (^{18}F) F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography / N.Cho, S.A. Im, K.W. Kang // *Eur. Radiol.* – 2016. – 26(7). – P. 2279–2290.

49. Cao, M. Predicting long-term survival and treatment response in breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy by MR metabolic profiling / M. Cao, B. Sitter, T.F. Bathen // *NMR. Biomed.* – 2012. – 25(2). – P. 369–378.

50. Bammer, R. Basic principles of diffusion-weighted imaging / R. Bammer // *Eur. Radiol.* – 2003. – 45. – P. 169–184.

51. Partridge, S.C. Amornsiripanitch N. DWI in the Assessment of Breast Lesions/ S.C. Partridge // *Top. Magn. Reson. Imaging.* – 2017. – 26(5). – P. 201–209.

52. Kwee, T. Whole-body diffusion weighted magnetic resonance imaging / T. Kwee, T. Takahara, R. Ochiai et al. // *Eur. Radiol.* – 2009. – N. 70. – P. 409–417.

53. Kim, Y. Intravoxel incoherent motion diffusion-weighted MRI for predicting response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer / Y. Kim, S.H. Kim, H.W. Lee // *Magn. Reson. Imaging.* – 2017. – N. 48. – P. 27–33.

54. Virostko, J. Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging and diffusion-weighted magnetic resonance imaging for predicting the response of locally

advanced breast cancer to neoadjuvant therapy: a meta-analysis / J. Virostko, A. Hainline, H. Kang // *J. Med. Imaging. (Bellingham)*. – 2018. – 5(1). – P. 110-111.

55. Hu, X.Y. Diffusion-weighted MR imaging in prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer / X.Y. Hu, Y. Li, G.Q. Jin // *Oncotarget*. – 2017. – 8(45). – P. 79642–79649.

56. Bufi, E. Role of the Apparent Diffusion Coefficient in the Prediction of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Patients With Locally Advanced Breast Cancer / E. Bufi, P. Belli, M. Costantini // *Clin. Breast Cancer*. – 2015. – 15(5). – P. 370–380.

57. Shin, H.J. Prediction of pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer using diffusion-weighted imaging and MRS / H.J. Shin, H.M. Baek, J.H. Ahn // *NMR. Biomed.* – 2012. – 25(12). – P. 1349–1359.

58. Смирнова, Н.А. Радионуклидные методы в диагностике и лечении рака молочной железы / Н.А. Смирнова, А.А. Назаров, Л.Э. Дельгадильо-Кузнецов // *Вестник РУДН*. – 2005. – №1 (29). – С. 45–49.

59. Брянцева, Ж.В. Маммосцинтиграфия, как маркер эффективности неoadъювантного лечения рака молочной железы для различных биологических подтипов рака молочной железы / Ж.В. Брянцева, С.В. Канаев, В.Ф. Семиглазов // *VIII Съезд онкологов и радиологов стран СНГ*. – 2014. – С. 155–156.

60. Novikov, S.N. Technetium-99m methoxyisobutylisonitrile scintimammography for monitoring and early prediction of breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy / S.N. Novikov, S.V. Kanaev, K.V. Petr // *Nucl. Med. Commun.* – 2015. – 36(8). – P. 795–801.

61. Trehan, R. Role of scintimammography in assessing the response of neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer / R. Trehan, R.K. Seam, M.K. Gupta // *World. J. Nucl. Med.* – 2014. – 13(3). – P. 163–169.

62. Liu, Q. The Role of ¹⁸F-FDG PET/CT and MRI in Assessing Pathological Complete Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis / Qiufang Liu, Chen Wang, Panli Li // *Biomed Res Int*. – 2016. – N.10. – P. 1–10.

63. Eberl, M.M. BI-RADS classification for management of abnormal mammograms / M.M. Eberl, C.H. Fox, S.B. Edge, et al. // J. Amer. Board Fam. Med. – 2006. – Vol. 19. – N 2. – P. 161–164.
64. Рожкова, Н.И. Лучевая диагностика в маммологии / Н.И. Рожкова, И.И. Бурдина, А.Р. Дабагов и др. // М.: СИМК. 2014. – С. 150–170.
65. Fehm, T. Methods for isolating circulating epithelial cells and criteria for their classification as carcinoma cells / T. Fehm, E.F. Solomayer, S. Meng et al. // Cytotherapy. – 2005. – N. 2. – P. 171–185.
66. Лядов, В. К. Выделение циркулирующих в крови опухолевых клеток методом "изоляции по размеру (ISET)" (обзор) / В.К. Лядов, М.А. Скрыпникова, О.П. Попова // Вопросы онкологии. – 2014. – Т. 60, № 5. – С. 548–552.
67. Ashworth, T. R. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death / T. R. Ashworth // Aust. Med. J. – 1869. – N. 14. – P. 146–149.
68. Ковалев, А.А. Гетерогенность циркулирующих опухолевых клеток / А.А. Ковалев, Т.А. Грудинская, Т.П. Кузнецова и др. // Онкология. – Том 14. – №2. – 2012. – С.126–129.
69. Hay, E.D. An overview of epithelio-mesenchymal transformation / E.D. Hay // Act. Anat. – 1995. – 154. – С.8–20.
70. Пучинская, М.В. Эпителиально-мезенхимальный переход в норме и патологии / М.В. Пучинская // Архив патологии 1. – 2015. – С.75–83.
71. Ковалев, А.А. Циркулирующие опухолевые клетки / А.А. Ковалев // Онкология. – 2012. – С. 36–37.
72. Fidler, I. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor / I. Fidler, M. Kripke // Science. – 1977. – N. 197. – P. 893–895.
73. Vona, G. Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells / G. Vona, A. Sabile, M. Louha et al. // The American journal of pathology. – 2000. – 156. – N 1. – P. 57–63.

74. Зубцов, Д. А. Циркулирующие опухолевые клетки при раке молочной железы (ЦОК): прогностическая значимость и методы выделения / Д. А. Зубцов, Ж. И. Зубцова, А. В. Лавров и др. // ТРУДЫ МФТИ. – 2012. – Т. 4, № 3 – С. 18–26.
75. Брянцева, Ж.В. Маммосцинтиграфия, как ранний маркер эффективности неoadьювантного лечения рака молочной железы / Ж.В. Брянцева // Сборник научных трудов молодых ученых. – 2015. – С.9–11.
76. Alix-Panabieres, C. EPISPOT assay: detection of viable DTCs/CTCs in solid tumor patients/ C. Alix-Panabieres // Recent Results Cancer Res. – 2012. – 195. – P.69–76.
77. Kallergi, G. Evaluation of Isolation Methods for Circulating Tumor Cells (CTCs) / G. Kallergi, E. Politaki, S. Alkahtani // Cell Physiol Biochem. – 2016. – 40(3-4). – P. 411–419.
78. Исмаилова, Г. Диагностика циркулирующих опухолевых клеток с помощью технологии ISET и их молекулярная характеристика для жидкостной биопсии / Г. Исмаилова, S. Laget, P. Paterlini-bréchet // Журн. Клиническая медицина Казахстана. – 2015. – № 1 (35). – С.15–20.
79. Krebs, M.G. Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and – independent approaches / M.G. Krebs, J.M. Hou, R. Sloane et.al. // J. Thorac. Oncol. – 2012. – 7 (2). – P.306–308.
80. Farace, F. A direct comparison of Cell Search and ISET for circulating tumour-cell detection in patients with metastatic carcinomas / F. Farace, C. Massard, N. Vimond et.al. // Br. J. Cancer. – 2011. – 105 (6). – P. 847–853.
81. Kallergi, G. Cell Physiol Biochem. Evaluation of Isolation Methods for Circulating Tumor Cells (CTCs) / G. Kallergi, E. Politaki, S. Alkahtani // Cell Physiol. Biochem. – 2016. – 40 (3–4). – P. 411–419.
82. Smith, B.M. Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain

reaction and immunocytochemical techniques / B.M. Smith, M.J. Slade, J. English et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2000. – N. 7. – P. 1432–1439.

83. Бжадуг, О.Б. Значение выявления микрометастазов в крови и костном мозге у больных раком молочной железы / О.Б. Бжадуг, Н.Н. Тупицын, С.А. Тюляндин // *Современная онкология.* – 2004. – Т. 6, №4. – С.149–154.

84. Xenidis, N. Clinical relevance of circulating CK-19 mRNA-positive cells detected during the adjuvant tamoxifen treatment in patients with early breast cancer / N. Xenidis, V. Markos, S. Apostolaki et al // *Ann. Oncol.* – 2007. – N. 10. – P. 1623–1631.

85. Gafforio, J.J. Detection of breast cancer cells in the peripheral blood is positively correlated with estrogen_ receptor status and predicts for poor prognosis / J.J. Gafforio, M.J. Serrano, P. Sanches – Rovira, et al // *Int. J. Cancer.* – 2003. – Vol. 107. – N. 6. – P. 984–990.

86. Cristofanilli, M. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast / M. Cristofanilli, G. Budd, M. Ellis et al // *Cancer. Seminars in Onc.* – 2006. – N. 33. – P. 9–14.

87. Бжадуг, О.Б. Циркулирующие опухолевые клетки в крови больных местно - распространенным и диссеминированным раком молочной железы / О.Б. Бжадуг, Л.Ю. Гривцова, Н.Н. Тупицын, и др. // *Вестник Российского онкологического научного центра имени Н.Н.Блохина РАМН.* – № 3. – 2007. – С. 19–22.

88. Alix-Panabieres, C. Prognostic relevance of viable circulating tumor cells detected by EPISPOT in metastatic breast cancer patients / C. Alix-Panabieres, K. Pantel, J.M. Ramirez // *Clin. Chem.* – 2014. – 60(1). – P.214–221.

89. Aktas, B. Comparison of the HER2, estrogen and progesterone receptor expression profile of primary tumor, metastases and circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients / B. Aktas, S. Kasimir-Bauer, V. Müller // *BMC Cancer.* – 2016. – 16. – P. 522.

90. Giuliano, M. Circulating tumor cells as early predictors of metastatic spread in breast cancer patients with limited metastatic dissemination / M. Giuliano, A. Giordano // *Breast Cancer Research*. – 2014. – 16. – P. 440 .
91. Apostolaki, S. Circulating HER2 mRNA-positive cells in the peripheral blood of patients with stage I and II breast cancer after the administration of adjuvant chemotherapy: evaluation of their clinical relevance / S. Apostolaki, M. Perraki , A. Pallis et al. // *Ann. Oncol.* – 2007. – V. 18. – N. 5. – P. 851–858.
92. Bidard, F.C. Single circulating tumor cell detection and overall survival in nonmetastatic breast cancer / F.C. Bidard, C. Matio, S. Delaloge, et al. // *Annals of oncology*. – 2010. – V.4. – N. 2. – P. 729–733.
93. Lu, Y.J. The significant prognostic value of circulating tumor cells in triple-negative breast cancer: a meta-analysis / Y.J. Lu, P. Wang, X. Wang // *Clin. Cancer Res.* – 2010. – 16 (9). – P. 79–93.
94. Mikulová, V. Detection of circulating tumor cells during follow-up of patients with early breast cancer: Clinical utility for monitoring of therapy efficacy / V. Mikulová, M. Cabiňáková, I. Janatková // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* – 2014. – 74 (2). – P. 132–142.
95. Bidard, F.C. Circulating tumor cells in breast cancer / F.C. Bidard, C. Proudhona, J. Pierga // *Molecular Oncology*. – 2016. – P.418–430.
96. Riethdorf , S. Detection and Her2 Expression of Circulating Tumor Cells: Prospective Monitoring of Breast Cancer Patient Treated in the Neoadjuvant GeparQuattro Trial / S. Riethdorf , V. Muller, L. Zhang, et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2010. – Vol. 16(9). – P.79–93.
97. Camara, O. The relevance of circulating epithelial tumor cells (CETC) for therapy monitoring during neoadjuvant (primary systemic) chemotherapy in breast cancer / O. Camara, M. Rengsberger, A. Egbe, et al. // *Ann. Oncol.* – 2007. – V. 9. – P. 1484–1492.
98. Alpers, I. Minimal Residual Disease (MRD) in cancer of solid tumors / I. Alpers, B. Brandt // *Haemopoiesis Immunology*. – 2007. – N. 4. – P. 14–37.

99. Meng, S. HER2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses / S. Meng, D. Tripathy, S. Shete, et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – 101(25). – P. 9393–9398.
100. Pestrin, M. Correlation of HER2 status between primary tumors and corresponding circulating tumor cells in advanced breast cancer patients / M. Pestrin, S. Bessi, F. Galardi, et al. // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2009. – 118(3). – P.523–530.
101. Воропаев, Е.В. Биологические аспекты метилирования ДНК (обзор литературы) / Е.В. Воропаев, Н.Е. Фомченко // *Проблемы здоровья и экологии.* – 2012. – № 3. – С. 55–59.
102. Залетаев, Д. В. Маркеры метилирования в диагностике онкологических заболеваний / Д. В. Залетаев, В. В. Стрельников, М. В. Немцова и др. // *Медицинская генетика.* 2010. – Т. 9. – № 1. – С. 15–21.
103. Bogdanović, O. DNA methylation and the preservation of cell identity / O. Bogdanović, R. Lister // *Curr Opin Genet Dev.* – 2017. – 46. – P. 9–14.
104. Suelves, M. DNA methylation dynamics in cellular commitment and differentiation / M. Suelves, E. Carrió, Y. Núñez-Álvarez, et al. // *Brief. Funct. Genomics.* – 2016. – 15(6). – P. 443–453.
105. Лихтенштейн, А.В. Метилирование ДНК и канцерогенез / А.В. Лихтенштейн, Н.П. Киселева // *Биохимия.* – 2001. – № 66. – С. 293–317.
106. Iglesias González, T. New strategy to address DNA-methyl transferase activity in ovarian cancer cell cultures by monitoring the formation of 5-methylcytosine using HPLC-UV / T. Iglesias González, E. Blanco-González, M. Montes-Bayón // *J. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* – 2016. – 15(1028). – P. 16-24.
107. Schuermann, D. Global Active DNA demethylation by DNA repair: Facts and uncertainties / D. Schuermann, A.R. Weber, P. Schär // *DNA Repair (Amst).* – 2016. – 44. – P. 92–102.
108. Takai, D. Large scale mapping of methylcytosines in CTCF-binding sites in the human H19 promoter and aberrant hypomethylation in human bladder cancer /

D. Takai, F.A. Gonzales, Y.C. Tsai, et al. // *Hum. Mol. Genet.* – 2001. – 10. – P. 2619–2626.

109. Stefansson, O.A. DNA methylation-based definition of biologically distinct breast cancer subtypes / O.A. Stefansson, S.I. Moran, A. Gomez et al. // *Mol Oncol.* – 2015. – 9(3). – P. 555–568.

110. Cheng, J. Blood-based DNA methylation as biomarker for breast cancer: a systematic review / J.Cheng, Q. Tang, X.Cao // *Clin Epigenetics.* – 2016. – 14(8) – P. 115.

111. Tang, Q. DNA methylation array analysis identifies breast cancer associated RPTOR, MGRN1 and RAPSN hypomethylation in peripheral blood DNA/ Q. Tang, T. Holland-Letz, A. Slynko // *Oncotarget.* – 2016. – 7(39). – P. 64191–64202.

112. Khan, S.I. Epigenetic events associated with breast cancer and their prevention by dietary components targeting the epigenome / S.I. Khan, P. Aumsuwan, I.A. Khan // *Chem Res Toxicol.* – 2013. – 25(1). – P. 61-73.

113. Benevolenskaya, E.V. DNA methylation and hormone receptor status in breast cancer / E.V. Benevolenskaya, A.B. Islam, H. Ahsan // *Clin Epigenetics.* – 2016. – 16. – P. 8 –17.

114. Скрябин, Н.А. М. Ф. Методы исследования метилирования ДНК: возможности использования в современной онкологии / Н.А. Скрябин, А.А. Кашеварова, Е.В. Денисов // *Сибирский онкологический журнал.* – 2013. – 6(60). – С. 64–69.

115. Vélez-Cruz, R. The Retinoblastoma (RB) Tumor Suppressor: Pushing Back against Genome Instability on Multiple Fronts / R. Vélez-Cruz, D.G. Johnson // *Int. Journal Molecular Science.* – 2017. – 18(8). – P. 1776.

116. Стрельников, В. В. Методология локус-специфического анализа метилирования ДНК / Стрельников В. В., Танас А. С., Кузнецова Е. Б // LAP Lambert Academic Publishing. – 2014.

117. Pinto, R. DNA methylation and miRNAs regulation in hereditary breast cancer: epigenetic changes, players in transcriptional and post- transcriptional

regulation in hereditary breast cancer / R. Pinto, S. De Summa, B. Pilato, // *Curr Mol Med.* – 2014. – 14(1). – P. 45–57.

118. Fiolka, R. Promoter hypermethylation of the tumor-suppressor genes RASSF1A, GSTP1 and CDH1 in endometrial cancer / R. Fiolka, P. Zubor, V. Janusicova et al. // *Oncol Rep.* – 2013. – 30(6). – P. 2878–2886.

119. Pouliot, M.C. The Role of Methylation in Breast Cancer Susceptibility and Treatment / M.C. Pouliot, Y. Labrie, C. Diorio // *Anticancer Res.* – 2015. – 35(9). – P. 4569–4574.

120. Tanas, A.S. Rapid and affordable genome-wide bisulfite DNA sequencing by XmaI-reduced representation bisulfite sequencing / A.S. Tanas, M.E. Borisova, E.B. Kuznetsova, et al. // *Epigenomics.* – 2017. – 9(6). – P. 833–847.

121. Шкарупо (Руденко), В. В. Современные подходы к скринингу дифференциального метилирования геномов клеток рака молочной железы / В. В. Шкарупо (Руденко), А. С. Танас, Е. Б. Кузнецова и др. // *Медицинская генетика.* – 2009. – Т. 8, № 12. – С. 41–45.

122. Цыганов, М.М. Метилирование промоторов генов множественной лекарственной устойчивости в опухолевой ткани молочной железы и эффект неoadьювантной химиотерапии / М.М. Цыганов, А.Г. Щербакова // *Сибирский онкологический журнал.* – 2012. – С. 172–173.

123. Казанцева, П.В. Молекулярно-генетические маркеры эффективности неoadьювантной химиотерапии с применением антрациклинов у больных раком молочной железы / П.В. Казанцева, М.М. Цыганов, Е.М. Слонимская и др. // *Сибирский онкологический журнал.* – 2016. – 15(2). – С. 29–35.

124. Сигин, В.О. Оценка чувствительности опухолей молочной железы к неoadьювантной химиотерапии с применением антрациклинов / В.О. Сигин, А.С. Танас // *Сб. тезисов устных докладов. Конференция молодых ученых ФГБНУ «МГНЦ», Москва, 2017.* – С. 15.

125. Gay-Bellile M. ERCC1 and telomere status in breast tumours treated with neoadjuvant chemotherapy and their association with patient prognosis. / M. Gay-Bellile, P. Romero, F. Cayre et al. // *J Pathol Clin Res.* – 2016. – 2(4). – P. 234-246.

126. Кухарева, Л.И. Роль ультразвукового исследования в диагностике рака молочной железы/ Л.И. Кухарева, В.И. Невожай //Тихоокеанский медицинский журнал. – 2005. – N. 4. – С. 33–34.

127. Liu, Q. Preoperative assessment of axillary lymph node status in breast cancer patients by ultrasonography combined with mammography: A STROBE compliant article / Q. Liu, P. Xing, H. Dong // *Medicine (Baltimore)*. – 2018. – 97(30). – P. 11441.

128. Брянцева, Ж.В. Маммосцинтиграфия, как ранний маркер эффективности неoadъювантного лечения рака молочной железы / Ж.В. Брянцева, С.В. Канаев, В.Ф. Семиглазов и др. // XVIII Российский онкологический конгресс. – Москва. –2014. – С. 197–198.

129. Колядина, И.В. Эволюция неoadъювантного подхода при первично - операбельном раке молочной железы в последнюю декаду: модный тренд или реальная клиническая практика? /И.В. Колядина, И.В. Поддубная, О.А. Павликова и др. // Современная онкология, 2017, №1, том 19, С.9–16.

130. Павликова, О.А. Факторы-предикторы достижения полного лекарственного патоморфоза при неoadъювантной химиотерапии первично-операбельного рака молочной железы /О.А. Павликова, И.В. Колядина, Д.В. Комов, Я.В. Вишневская, И.В. Поддубная// Современная онкология, 2017, №1, том 19, С.24–29.

131. Павликова, О.А. Клинико-рентгенологическая оценка эффективности предоперационной лекарственной терапии при различных биологических подтипах рака молочной железы стадий T1-3N0-1M0 /О.А. Павликова, И.В. Поддубная, И.В. Колядина и др. // Современная онкология, 2017, №4, том 19, С.16–21.

132. Mukhtar, R.A. Clinically meaningful tumor reduction rates vary by prechemotherapy MRI phenotype and tumor subtype in the I-SPY 1 TRIAL (CALGB 150007/150012; ACRIN 6657) / R.A Mukhtar, V.J. Tandon, M. I. Rosen // *Ann. Surg. Oncol.* – 2013. –20. – P. 3823–3830.

133. Delmas, P. D. Pathways modulating neural KCNQ/M (Kv7) potassium channels / P. D. Delmas, A. Brown // *Nat Rev Neurosci.* – 2005. – 6(11). – P. 850–862.
134. Mehta, P. Probing voltage sensing domain of KCNQ2 channel as a potential target to combat epilepsy: a comparative study / P. Mehta, S. Srivastava, B.S. Choudhary // *J. Recept Signal Transduct Res.* – 2017. – 37(6). – P. 578–589.
135. Spagnoli, C. KCNQ2 encephalopathy: A case due to a de novo deletion / C. Spagnoli, G. Salerno, A. Iodice // *Brain Dev.* – 2018. – 40(1). – P. 65–68.
136. Salyer, S.A. Vacuolar ATPase driven potassium transport in highly metastatic breast cancer cells / S.A. Salyer, J.R. Olberding, A.A. Distler // *Biochim Biophys Acta.* – 2013. – 1832(10). – P. 1734–1743.
137. Ferrer, T. Tamoxifen inhibition of kv7.2/kv7.3 channels / T. Ferrer, I. A. Aréchiga-Figueroa, M. S. Shapiro // *PLoS One.* 2013. – 8(9). – P. 1–10.
138. Сигин, В.О. Медицинская ДНК-технология оценки чувствительности опухолей молочной железы люминального В подтипа к неoadьювантной химиотерапии с применением антрациклинов на основе маркеров метилирования ДНК / В. О. Сигин, Е. Б. Кузнецова, О. А. Симонова // *Медицинская генетика.* 2017. – №16(10). – С. 29–35.
139. Практические рекомендации по лечению злокачественных опухолей Российского общества клинической онкологии. – 2017г. – С. 119–120.
140. Колядина, И.В. Особенности хирургического лечения больных раком молочной железы, получающих предоперационную лекарственную терапию / И.В. Колядина, И.В. Поддубная, О.А. Павликова, Д.В. Комов // *Современная онкология.* 2016. – 18. № 1. – С. 50–54.
141. Поддубная, И.В. Популяционный «портрет» рака молочной железы в России: анализ данных российского регистра / И.В.Поддубная, И.В.Колядина, Н.Д.Калашников, Д.А.Борисов // *Современная онкология.* 2015. – 17.№1. – С. 25–29.
142. Kuhl, C.K. Dynamic breast MR1 imaging: are signal intensity time course data useful for differential diagnosis of enhancing lesions / C.K. Kuhl, P. Mielcarek, S. Klaschik // *Radiology.* – 1999. – Vol. 211. – P. 101–110.

143. Васильев, А.Ю. Томосинтез в дифференциальной диагностике непальпируемых образований молочных желез / А. Ю. Васильев, к.м.н. Т. В. Павлова, О. О. Мануйлова // Учебное пособие. – 2016. – С. 1–25.

144. Park, J. Comparison of mammography, digital breast tomosynthesis, automated breast ultrasound, magnetic resonance imaging in evaluation of residual tumor after neoadjuvant chemotherapy / J .Park , E.Y.Chae , J.H. Cha // Eur J Radiol. – 2018. – 108. – P. 261–268.

145. Jochelson, M.S. Do MRI and mammography reliably identify candidates for breast conservation after neoadjuvant chemotherapy? / M.S. Jochelson, K. Lampen-Sachar, G. Gibbons // Ann Surg Oncol. 2015. –22(5). – P. 1490–1495.