

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н.Н. Блохина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

На правах рукописи

ТАЛИПОВ ОРИФЖОН АБСАМАТИЛЛАЕВИЧ

**РОЛЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ МИКРОРНК В ПРОГНОЗЕ И
ЛЕЧЕНИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

14.01.12 – Онкология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Воротников Игорь Константинович

Москва — 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Молекулярно-биологические аспекты рака молочной железы.....	12
1.1.1. МикроРНК и их роль в патогенезе рака	13
1.1.2. Роль некоторых микроРНК в патогенезе РМЖ	14
1.2. Клиническая и молекулярно-биологическая характеристика рака молочной железы	19
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	31
2.1. Общая характеристика больных РМЖ.....	31
2.2. Виды и объем лечения больных РМЖ, включенных в исследование	35
2.3. Генетические методы исследования	42
2.3.1. Выделение геномной ДНК	42
2.3.2. Бисульфитная конверсия ДНК. Метил-специфичная полимеразная цепная реакция (МС-ПЦР).....	43
2.4. Статистическая обработка результатов исследования.....	45
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.	46
3.1. Обсуждение результатов лечения больных раком молочной железы.....	46
3.2. Отдаленные результаты лечения РМЖ в зависимости от метилирования микроРНК.....	54
3.3. Анализ изменения частоты метилирования генов микроРНК в зависимости от клинико-морфологических параметров опухоли молочной железы	56
ГЛАВА 4. ПРОФИЛИ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ МикроРНК ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.....	59
4.1. Результаты молекулярно-генетических исследований опухолевых образцов и гистологически неизмененных тканей молочных желез	59
4.2. Результаты сравнения молекулярно-генетического статуса люминального и нелюминального РМЖ	62
4.3. Анализ изменения частоты метилирования генов микроРНК в подтипах РМЖ и поиск кометилируемых пар микроРНК при РМЖ	65
ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	71

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	78
ВЫВОДЫ	80
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	82
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	83

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Рак молочной железы (РМЖ) является лидирующим онкозаболеванием у женщин в мире. По мировым данным, общая ежегодная ожидаемая смертность от РМЖ в мире составляет более 500000 женщин. Частота РМЖ в структуре мировой заболеваемости злокачественными опухолями достигает 12%, а смертности — 7% [31]. В структуре онкологических заболеваний среди обоих полов в 2017 г. РМЖ занял второе место с 11,5% всех злокачественных новообразований и первое среди злокачественных опухолей женских репродуктивных органов с 21,1% [3]. На сегодняшний день не существует достоверной и полной информации о точных механизмах возникновения РМЖ, по этой причине все результаты лечения остаются лишь относительно удовлетворительными. Следует отметить, что у некоторых пациенток в крови и костном мозге можно выявить диссеминированные опухолевые клетки уже на ранних стадиях заболевания. Эти клетки, впоследствии, могут стать источником метастазов даже после радикального комплексного и комбинированного лечения. Это событие известно под названием «эффект материнской опухоли» [127].

Канцерогенез представляет собой многоуровневый процесс накопления генетических и эпигенетических нарушений в геноме клеток, приводящих к их неконтролируемому росту и делению, и в дальнейшем, к образованию метастазов [103]. Механизмы эпигенетической регуляции экспрессии генов служат фактором клеточной защиты от развития многих заболеваний, включая злокачественные опухоли молочных желез. Однако, в случае системных нарушений, вызванных множеством факторов, возникают изменения в структуре генов. Эти изменения, в конечном итоге, могут приводить к аномальному метилированию [103]. Процесс аномального метилирования двунаправленный: с одной стороны, наблюдается гиперметилирование промоторных областей ряда генов-супрессоров опухолевого роста, с другой – деметилирование онкогенов. Таким образом, изменение статуса метилирования промоторных районов некоторых генов является характерной чертой опухолевых клеток, причем аномальное метилирование наблюдается уже

на ранних этапах канцерогенеза. Изменения метилирования промоторных районов ряда генов были показаны для РМЖ, и рака других локализаций [113].

Важно отметить, что в исследованиях последних десятилетий отмечается высокая гетерогенность РМЖ в широком спектре его морфологических и иммунологических подтипов [7]. Длительное время заболевание классифицировалось лишь по клинико-морфологическим параметрам. С конца XX века для диагностики и выбора тактики лечения используют молекулярные и иммуногистохимические маркеры, включающие экспрессию рецепторов эстрогенов, прогестерона, Her2, уровня пролиферативной активности Ki-67, а также мутации генов [102; 35]. Согласно принятым на конференции St.Gallen-2015 договорённостям, в настоящее время подтипы РМЖ можно определять с помощью мультипараметрических молекулярных тестов — PAM-50 или Mamma Print/Blue Print [120]. Однако, большинство клиник мира такие исследования провести не сможет по логистическим и/или финансовым причинам. В связи с этим, альтернативным подходом по установлению точного подтипа РМЖ представляется поиск различных гормональных, иммуногистохимических, генетических и иммунологических маркеров прогноза и эффективности лечения РМЖ. В частности, это справедливо и для люминальных А и В подтипов РМЖ, которые выявляются примерно у 70% больных. Их отличает экспрессия рецепторов эстрогенов и/или прогестерона и связанная с ними потенциальная чувствительность к гормонотерапии [110; 116]. Однако, несмотря на относительно благоприятный клинический прогноз люминального РМЖ, у 10-20% больных в течение первого года адъювантной гормонотерапии тамоксифеном наблюдается прогрессия заболевания и в дальнейшем данный показатель увеличивается до 20-40% [110; 116].

В настоящее время не существует общепринятых прогностических маркеров эффективности гормонотерапии и химиотерапии РМЖ, поэтому сложно предугадать случаи низкой чувствительности и устойчивости опухоли к лечению. Одной из причин может быть феномен множественной лекарственной резистентности опухолевых клеток к различным лекарственным препаратам,

различным по химической структуре и механизму действия [56]. Поэтому нужен иной способ, позволяющий оценить риск прогрессирования РМЖ. Таким прогностическим маркером агрессивности РМЖ, помогающим в выборе терапевтической тактики с учетом препарата и расчёта дозы, может служить метилирование генов микроРНК. Само открытие этих малых некодирующих молекул стало весьма значительным событием в молекулярной биологии конца XX века [55]. Механизм их действия основан на связывании с 3'-UTR мРНК генов-мишеней по принципу полной или частичной комплементарности, за счет чего микроРНК пост-транскрипционно регулируют генную экспрессию, способствуя инактивации или ингибированию мРНК [21]. В настоящее время приведена значительная доказательная база о роли микроРНК не только в регулировании многих ключевых процессов в жизнедеятельности клетки и поддержании ее гомеостаза [139], но и участии их в патогенезе многих заболеваний, в том числе и онкологических [63].

В настоящее время уже получены убедительные данные о том, что в опухолях разных локализаций происходит нарушение регуляции генов микроРНК и сами малые РНК могут выступать в роли онкогенов или опухолевых супрессоров [130]. Известно, что при злокачественных новообразованиях (ЗНО) значения статуса аномального метилирования многих микроРНК могут смещаться в ту или иную сторону, в зависимости от тканевого происхождения опухоли, микроокружения и генов-мишеней, участвующих в канцерогенезе опухоли [98; 129]. Аномальное метилирование генов микроРНК может быть следствием различных причин, таких как, делеции, амплификации хромосомных локусов микроРНК, мутации или нарушение регуляции транскрипционных факторов, регулирующих экспрессию микроРНК [79].

Изучение молекулярных особенностей механизма развития злокачественных опухолей и их ассоциация с клиническими проявлениями делает диагностику этих заболеваний более информативной, а также лежит в основе создания методов персонализированной терапии и оценки риска рецидива. Разработка методов ранней диагностики онкологических заболеваний является

общей проблемой для опухолей различных локализаций. Однако и до момента обнаружения злокачественной опухоли и после того как она уже обнаружена, возникает необходимость дополнительной характеристики опухоли для оптимального выбора дальнейшей тактики лечения.

Таким образом, несмотря на многообразие предполагаемых факторов онкогенеза, необходим дальнейший поиск новых биологических маркеров диагностики и прогноза эффективности лечения РМЖ. На основании вышеизложенного были сформулированы цель и задачи исследования.

Цель исследования

Изучить непосредственные, отдаленные результаты лечения и прогноз заболевания у больных раком молочной железы с учетом влияния молекулярно-генетических факторов (метилования генов микроРНК).

Задачи исследования

1. Изучить частоту изменения метилирования промоторных CpG-островков 10 генов микроРНК (*miR-107*, *-124a-1/2/3*, *-125b-1*, *-127*, *-130b*, *-137*, *-203a*, *-375*) в опухолевых образцах и непораженной ткани молочной железы.

2. Изучить особенности клинического течения и прогноз рака молочной железы в зависимости от уровня метилирования генов микроРНК в первичной опухоли молочной железы.

3. Провести анализ возможных корреляций между клиническими данными течения заболевания, эффективностью лечения, прогнозом и метилированием промоторных регионов генов микроРНК.

4. Оценить выживаемость больных РМЖ в зависимости от наличия в первичной опухоли молочной железы метилирования генов микроРНК и от эффективности проведенной терапии.

5. Разработать алгоритм прогнозирования течения заболевания по совокупности выявленных эпигенетических и клинических данных, влияющих на выживаемость больных РМЖ.

Научная новизна

Впервые изучен совместный профиль метилирования группы генов микроРНК при люминальных А и В (В-Her2-негативный и В-Her2-позитивный), Her2-позитивном и трижды-негативном подтипах РМЖ. Впервые выявлен высокий уровень метилирования генов микроРНК (*miR-124a-1/3*, *miR-125b-1*, *miR-127*, *miR-137*, *miR-130b*) в опухолевых клетках рака молочной железы. Показано, что метилирование промоторных районов генов *miR-124a-2* и *miR-107* значимо коррелирует со степенью дифференцировки опухолевых клеток, а генов *miR-127*, *miR-137* — с клинической стадией заболевания. Впервые обнаружено, что метилирование гена *miR-107* коррелирует с редкими морфологическими типами опухолей. Также на уровне тенденции ($0.05 < p < 0.1$) отмечена высокая частота метилирования генов *miR-127* в опухолях с низкой дифференцировкой. Метилирование *miR-124a-3* специфически ассоциирует с высоким уровнем экспрессии антигена Ki-67, а метилирование *miR-375* с опухолями нелюминального типа. Таким образом, определено, что гены *miR-124a-2*, *miR-107*, *miR-127*, *miR-137*, *miR-124a-3*, *miR-375* связаны с развитием и прогрессией опухоли, нарушение регуляции которых участвует в патогенезе РМЖ. Полученные данные свидетельствуют о нарушении регуляции исследуемых микроРНК в патогенезе РМЖ. Выявленную зависимость между метилированием промоторных регионов генов микроРНК (*miR-124a-2* и *miR-107*, *miR-127* и *miR-137*, *miR-124a-3*, *miR-375*) и клинико-патологическими признаками РМЖ можно использовать для неинвазивной диагностики, стратификации больных РМЖ, при оценке прогноза заболевания и разработке индивидуальной тактики лечения пациентов.

Подтверждены данные ранее проведенных исследований о том, что выживаемость больных РМЖ статистически значимо зависит от стадии и степени злокачественности опухоли, уровня экспрессии Ki-67 и Her2. Выявлена тенденция к статистической значимости влияния возраста больных на общую выживаемость. Показано, что у больных с уровнем экспрессии Ki-67 более 20% результаты лечения люминального РМЖ хуже за счет достоверно более высокой частоты

отдаленного метастазирования (>3-5 раз) и смертности пациентов (>6 раз), а также статистически значимого снижения 5-летней выживаемости без признаков прогрессирования заболевания (77,9% против 81,8%) и общей выживаемости (78,6% против 90,9%).

Теоретическая и практическая значимость

Впервые в России на базе Федерального Государственного Бюджетного Учреждения «Национальный Медицинский Исследовательский Центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России) проведено комплексное изучение опухолей, включающее клинические, патоморфологические, иммуногистохимические, иммунологические и молекулярно-генетические исследования.

Впервые изучен профиль метилирования генов микроРНК (*miR-107*, *-124a-1/2/3*, *-125b-1*, *-127*, *-130b*, *-137*, *-203a*, *-375*) у больных с разными клинико-патологическими признаками РМЖ. Показано, что метилирование промоторных районов изученных генов связано с развитием и прогрессией РМЖ. Полученные данные рекомендовано использовать при определении молекулярных подтипов РМЖ. Впервые выдвинута гипотеза о синергизме генов микроРНК и их регуляторных эффекторах, связанных с ключевыми процессами канцерогенеза.

Полученные данные можно использовать для неинвазивной диагностики РМЖ и стратификации больных, а также при оценке прогноза заболевания и разработке индивидуальной тактики лечения пациентов.

Методы и методология исследования

Настоящая работа основана на анализе ретроспективных данных комплексного обследования и лечения 70 больных раком молочной железы, получавших лечение в НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина с 2004 по 2017 гг.

Парные образцы опухолевой и здоровой ткани (резекционный материал) был получен в Отделе патологической анатомии опухолей человека ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина». Исследование проводилось с

соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ от 24.12.93 № 2288). Использовались ткани только тех больных, которые до операции не получали лучевую или химиотерапию. ДНК выделяли из опухолевых (T-tumor) и прилегающих гистологически нормальных (N-norm.) тканей. Все случаи РМЖ классифицированы клинически по системе TNM в соответствии с требованиями Международного противоракового общества (UICC, версия 2002 г.) и описаны гистологически на основании классификации Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) в отделе патоморфологии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина».

Молекулярно-генетические исследования провели на базе лаборатории патогеномики и транскриптомики ФГБНУ «Научно-исследовательского института общей патологии и патофизиологии» (заведующий лабораторией – д.б.н., проф. Брага Э.А.)

Оценка метилирования CpG-районов промоторных областей указанных генов *miR-107*, *-124a-1/2/3*, *-125b-1*, *-127*, *-130b*, *-137*, *-203a*, *-375* проводилась методом метил-специфичной ПЦР, основанной на бисульфитной конверсии ДНК.

Для статистической обработки результатов проведенного исследования все данные 70 больных РМЖ формализованы с помощью специально разработанного кодификатора и внесены в «базу данных», созданную на основе электронных таблиц EXCEL v. 2010 г. Полученные результаты обработаны стандартными пакетами STATISTICA, v. 10 и IBM SPSS Statistics, v. 21.

Положения, выносимые на защиту

Результаты лечения раннего РМЖ зависят от молекулярного подтипа опухоли и её клиничко-морфологических, гормональных, молекулярно-генетических, иммуногистохимических и иммунологических параметров. В частности, при уровне экспрессии Ki-67 более 20% достоверно выше частота отдаленных метастазов (>3-5 раз) и смертности пациентов (6 раз), и ниже общая выживаемость (78,6% против 90,9%).

Впервые изучен профиль метилирования генов микроРНК: *miR-124a-1/2/3*, *miR-125b-1*, *miR-127*, *miR-137*, *miR-130b*, что позволило обнаружить аномально высокую частоту метилирования этих генов при РМЖ. При этом метилирование промоторных районов генов *miR-124a-2* и *miR-107* значимо коррелирует со степенью дифференцировки опухоли, а генов *miR-127*, *miR-137* — с клинической стадией заболевания. Метилирование гена *miR-107* коррелирует с редкими типами РМЖ.

Степень достоверности и апробация результатов

Анализ результатов обследования и лечения 70 больных раннего РМЖ, проведенных в ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России в период с января 2004 г. по декабрь 2017 г., позволяет считать материал исследования достоверным. Всем пациентам по показаниям выполнен необходимый объем обследований на современном уровне с учетом последних научно-технических достижений. Достоверность полученных данных также подтверждается проведением статистического анализа.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Молекулярно-биологические аспекты рака молочной железы

Механизм онкогенеза сложен и представляет собой многофакторный процесс. К настоящему времени известен ряд свойств опухолевой клетки. Во-первых, сниженная потребность во внешних сигналах для поддержания клеточной пролиферации, так называемая, самодостаточность в пролиферативных сигналах [44]. Во-вторых, им свойственно пониженная чувствительность к антипролиферативным сигналам. Опухолевые клетки значительно менее чувствительны к действию факторов, подавляющих рост опухоли и факторов специфического и неспецифического противоопухолевого иммунитета. Они могут продолжать пролиферацию при повреждении ДНК и при прочих неблагоприятных условиях – недостатке нуклеотидов, гипоксии и т.д. [77]. Кроме того, опухолевым клеткам свойственно иммортализация – неограниченное деление клеток. В зрелых клетках человека число делений ограничено в пределах 50-70 делений. Между тем, в опухолевых клетках наблюдается нарушение работы такого "счетно-ограничительного" механизма контроля репликации, и связано это с возобновлением работы теломеразы. Также, важным представляется способность уходить от апоптоза, что резко повышает жизнеспособность опухолевой клетки, делает ее не чувствительной к факторам противоопухолевого иммунитета и терапевтическим воздействиям [20]. Эти и другие свойства являются основанием для поиска методов выявления механизма образования опухоли и способов ранней диагностики, а также прогнозирования течения болезни и выживаемости больных в процессе и после лечения.

Одним из способов оценки развития и прогрессии рака может служить гиперметилирование генов микроРНК. Показано, что эпигенетические механизмы, в частности метилирование промоторных областей генов микроРНК, оказывают системное влияние на ключевые процессы и сигнальные пути в патогенезе рака [129]. При РМЖ было выявлено значительное влияние метилирования как фактора регуляции экспрессии так называемых супрессорных микроРНК [27].

1.1.1. МикроРНК и их роль в патогенезе рака

МикроРНК представляют собой малые некодирующие РНК, состоящие из 20-22 нуклеотидов, способные регулировать экспрессию гена на посттранскрипционном уровне. Они также играют важную роль во всех биологических процессах у многоклеточных организмов. МикроРНК участвуют в регуляции таких фундаментальных биологических процессов, как клеточная пролиферация, дифференцировка, апоптоз, адгезия, ангиогенез, ответ на стресс, а также задействованы в регуляции ключевых сигнальных путей, в том числе в механизмах с обратной связью [65; 12]. МикроРНК, связанные с болезнями человека впервые были охарактеризованы при хронической лимфоцитарной лейкемии.

МикроРНК комплементарно связывается с участками генома в 3'-нетранслируемой области (3'-НТО) генов. В зависимости от степени (полная или неполная) комплементарности микроРНК с участком связывания в 3'-НТО гена-мишени, их взаимодействие приводит либо к деградации мРНК-мишени, если она полностью комплементарна, либо к блокировке трансляции, если комплементарность частичная. В любом случае мРНК становится нефункциональной и в дальнейшем деградирует. Наконец, само по себе нахождение RISC-комплекса (*RNA-Induced Silencing Complex*, РНК-индуцированный комплекс сайленсинга) на мРНК препятствует посадке и продвижению рибосомы. Важно отметить, что одна и та же микроРНК может воздействовать на все мРНК, имеющие в своей последовательности соответствующие сайты связывания. Более того, поскольку для посадки RISC-комплекса не требуется полной комплементарности, эти сайты могут иметь слегка различающиеся последовательности. Таким образом, микроРНК обладает универсальным механизмом подавления экспрессии и по разным оценкам, от 30 до 60% генов человека являются мишенями микроРНК [46]. Нарушение экспрессии и регуляторной функции микроРНК может быть одним из ключевых процессов в развитии разных патологий. МикроРНК вовлечены в развитие более 300 заболеваний, включая онкологические. По роли в развитии опухоли

микроРНК разделяют на два типа – онкогенные, подавляющие экспрессию генов - супрессоров опухолевого роста и, таким образом, индуцирующие опухолевую трансформацию, и супрессорные, которые, ингибируя экспрессию онкогенов, напротив, сдерживают опухолевую трансформацию [86].

В зависимости от вида рака, одна и та же микроРНК может играть роль как онкогена в случае, если её активность запускает процессы, способствующие развитию опухоли, так и гена-супрессора, если микроРНК подавляет экспрессию генов-супрессоров опухоли. Каждый вид злокачественных новообразований имеет определенный набор запускаемых микроРНК. При этом, среди них можно выделить те микроРНК, которые наиболее часто встречаются только при конкретном виде рака [27].

Понимание механизмов влияния микроРНК на процессы при онкогенезе может помочь выявить дополнительные молекулярные мишени для использования в терапевтических целях. Поскольку одна микроРНК может потенциально воздействовать на несколько клинически значимых мишеней, метилирование определённых микроРНК несёт диагностический потенциал при выявлении новых случаев рака, в том числе РМЖ. Потенциальное использование микроРНК в качестве инструмента диагностики обусловлено тем, что микроРНК являются тканеспецифичными, и соответственно связаны с типом опухоли, и они могут стабильно обнаруживаться в биологических жидкостях [46].

Присутствие микроРНК в биожидкостях обусловлено их пассивным высвобождением из опухолевых клеток, таким образом, внеклеточные микроРНК поступают из апоптотных или некротических тканей. Также существует мнение, что микроРНК активно секретруется опухолевыми клетками.

1.1.2. Роль некоторых микроРНК в патогенезе РМЖ

К настоящему времени для РМЖ получен ряд данных о роли микроРНК в регуляции генов-мишеней, а также в развитии и прогрессии этого заболевания [63]. Одним из путей регуляции экспрессии генов микроРНК является изменение метилирования CpG-островка, прилежащего или перекрывающего ген микроРНК. В исследовании был использован ряд микроРНК, некоторые из которых

составляют целые семейства. Выбор данных микроРНК обусловлен в первую очередь, большим набором публикаций с противоречивыми результатами, и потому требующими дополнительных исследований с использованием собственной выборки пациентов. Следует отметить, что нам подобная практика дает возможность оценить результаты, с точки зрения клинических характеристик. Кроме того, это позволяет связать результаты с лечением, что даёт возможность улучшить существующие протоколы ведения больных, исходя из современных молекулярно-генетических классификаций, включающих базовые терапевтические подтипы.

В регуляции экспрессии генов, связанных с развитием онкологических заболеваний, существенную роль играет метилирование CpG-островков в промоторных районах, которое можно использовать как прогностический фактор РМЖ и его ответа на лекарственную терапию [27]. Эпигенетические изменения затрагивают клетки опухоли и редко определяются в нормальных клетках того же органа, при этом выявлена существенная разница уровней метилирования. В литературе встречаются сообщения о том, что метилирование можно обнаружить за несколько лет до манифестации РМЖ [3; 11].

miR-107. Ген *miR-107* (10q23.31) расположен в интроне гена *PANK1*. В регуляции экспрессии *miR-107* может участвовать как собственный CpG-островок, отстоящий на 400 п.н. от 5'-конца гена, так и CpG-остров в промоторной области хозяйского гена. *miR-107* в норме участвует в регуляции метаболизма глюкозы в ответ на гипоксию [125], ангиогенеза и дифференцировки клеток [43]. Интересно отметить, что в зависимости от вида ткани, *miR-107* проявляет свойства, как онкогена, так и супрессора опухолевого роста. *miR-107* снижает экспрессию в гепатоцеллюлярной карциноме [68], опухолях головы и шеи [38]. В новообразованиях желудка, наоборот, наблюдается гиперэкспрессия *miR-107*, ассоциированная с метастазами и репрессией *DICER1* [58]. Гиперэкспрессия *miR-107* в опухолях молочной железы подавляет аутофагию, опухолевый рост и миграцию клеток, через подавление экспрессии гена *HMGB1* (*high-mobility group protein B1*).

Эпигенетическая регуляция гена *miR-107* исследована на клеточных линиях рака поджелудочной железы MiaPACA-2 и PANC-1, и была показана роль изменений хроматина и метилирования ДНК. Причем, при восстановлении экспрессии, *miR-107* подавляла клеточный рост и уровень экспрессии гена *CDK6* [71]. Метилирование локуса *miR-107* показано и при хронической лимфоцитарной лейкемии [100].

miR-124a. МикроРНК *miR-124a* представлена в геноме тремя локусами: *miR-124a-1* (8p23.1), *miR-124a-2* (8q12.3) и *miR-124a-3* (20q13.33). По данным литературы, экспрессия всех трех генов микроРНК *miR-124a* обычно снижена в результате метилирования их промоторных CpG-островков, в новообразованиях толстой кишки, молочной железы, желудка, печени и при лейкемии [81; 45; 103]. Было показано, что низкий уровень экспрессии *miR-124a* был характерен для метастатических и агрессивных форм РМЖ [75]. В то же время, повышенная экспрессия *miR-124a* приводит к подавлению экспрессии генов *STAT3*, *BCL2* и *Cyclin D1*, тем самым, ингибируя клеточную инвазию и пролиферацию, индуцируя остановку клеточного цикла в фазе G₀/G₁ и облегчая апоптоз клетки [140]. В другом исследовании было показано, что гиперэкспрессия *miR-124a* ингибировала пролиферацию, метастазирование, эпителиально-мезенхимальный переход (EMT) [59; 143]. Таким образом, *miR-124a* может быть потенциальной терапевтической мишенью для лечения злокачественных новообразований молочной железы в будущем.

МикроРНК ***miR-125b*** кодируется двумя генами *miR-125b-1* и *miR-125b-2* расположенными в локусах 11q24 и 21q21 соответственно [65]. Было показано, что в зависимости от типа опухоли, уровень экспрессии *miR-125b* может быть, как повышен, так и понижен. Это говорит о том, что *miR-125b* является тканеспецифичной микроРНК [35]. В ряде работ было выявлено подавление экспрессии *miR-125b* при метастазирующем РМЖ [91], что, по-видимому, связано с гиперметилированием промоторного CpG-островка *miR-125b-1* [42]. Можно предполагать, что *miR-125b* является геном супрессором опухоли, и взаимодействуя со своими генами мишенями (*ERBB2* и *ERBB3*), подавляет

прогрессию РМЖ [134]. Следовательно, часто встречающаяся пониженная экспрессия *miR-125b* в сочетании повышенным метилированием, может представлять дальнейший интерес, как биомаркер, который мог бы улучшить результаты лечения, способствуя ранней диагностики РМЖ.

Ген *miR-127* расположен в локусе 14q32.2, вместе с еще четырьмя генами микроРНК (*miR-431*, *-432*, *-433* и *-136*). И хотя эти гены имеют общий CpG-островок, каждая микроРНК транскрибируется отдельно [121]. Сама *miR-127* действует как супрессор, подавляя экспрессию генов, вовлеченных в развитие рака яичников [29]. В ряде работ показано, что гиперметилирование промоторного CpG-островка *miR-127* приводило к снижению уровня её экспрессии при РМЖ и раке яичников. [78; 109]. Следует отметить, что восстановление экспрессии *miR-127* под действием деметилирующих агентов в клеточных линиях рака молочной железы приводило к инактивации гена-мишени *miR-127* – *BCL-6* (*B-cell lymphoma protein-6*) [149]. Эти результаты позволяют отнести *miR-127* к онкосупрессорным микроРНК. За последние несколько лет в зарубежной литературе появлялись предложения об использовании *miR-127* в диагностике, прогнозе и лечении РМЖ. Так, *miR-127* рассматривается и как новый биологический маркер для раннего выявления метастазов и как новый прогностический маркер течения РМЖ, или же, как новая молекулярная мишень для лечения этого вида опухоли [117].

Ген *miR-130b* находится около крупного CpG-островка в межгенной области 22-й хромосомы (22q11.21). Свойства гена *miR-130b* в новообразованиях отличаются двойственностью. Так, *miR-130b* проявляет черты гена-супрессора опухолевого роста в опухолях яичников и молочной железы [80; 142]. В новообразованиях молочной железы *miR-130b* подавляет экспрессию протоонкогена *PIEZO2* и гена *DLL1*, тем самым блокируя клеточную инвазию и миграцию [80; 118]. В опухолях печени и желудка ген *miR-130b* гиперэкспрессируется, участвуя в процессе опухолевого роста [69; 76]. Такая дифференциальная экспрессия этого гена может быть связана, в том числе, и с эпигенетической регуляцией его активности.

Действительно, выявлено участие метилирования в подавлении экспрессии *miR-130b* в опухолях яичников. Снижение экспрессии *miR-130b* ассоциировано с III-IV клиническими стадиями, низкой степенью дифференцировки. Применение 5'-азацитидина в клеточных культурах восстанавливало экспрессию *miR-130b*, причем у лекарственно-устойчивых линий усиливалась чувствительность к Цисплатину и Таксолу и снижалась экспрессия гена *CSF-1*, вероятно ответственного за формирование резистентного фенотипа [142]. Таким образом, представляет интерес оценка роли метилирования гена *miR-130b* в опухолях других локализаций.

Ген *miR-137* (1p21.3) расположен внутри некодирующего белок гена-хозяина MIR137HG. *miR-137* подавляет пролиферацию клеток, вызывает остановку клеточного цикла в G₁ фазе и апоптоз, ингибирует миграцию и инвазию клеток, влияет на дифференцировку стволовых клеток [146]. Исследования, проведенные на клеточной линии MDA-MB-231 РМЖ, показали, что гиперэкспрессия *miR-137* приводит к уменьшению пролиферации и миграции, воздействуя на экспрессию эстрогенового рецептора (*ERRα*) [150]. Это говорит о том, что *miR-137* можно использовать в качестве потенциального терапевтического агента для лечения РМЖ.

Гиперметилирование промоторного района *miR-137* ассоциировано с подавлением экспрессии этого гена при многих новообразованиях, в том числе при РМЖ [132]. За последние 5 лет в зарубежной литературе появились исследования об использовании анализа статуса метилирования гена *miR-137* в диагностике, прогнозе и лечении различных онкозаболеваний. Так в одних работах гиперметилирование *miR-137* рассматривается как прогностический маркер для колоректального рака [52], в других, как маркер неблагоприятного прогноза и низкой выживаемости при диффузном раке желудка [123].

МикроРНК *miR-203a* локализована в области 14q32.33 и участвует в активации программы дифференцировки эпидермальных стволовых клеток. К выявленным мишеням *miR-203a* относят ряд онкогенов *Akt2*, *ABL1*, *BCL2*, а также гены, ответственные за метастатический потенциал опухоли: *ZEB2*, *Bmi*, *Survivin*

и *Runx2* [148]. Статус метилирования *miR-203a* в опухолях различных локализаций по результатам анализа литературы весьма противоречив. Так, показана высокая частота метилирования и эпигенетическое подавление экспрессии в опухолях различных локализаций [93; 26]. Напротив, деметилирование промоторных участков вносит вклад в повышение экспрессии *miR-203a* при новообразованиях яичников [148].

Ген *miR-375* локализован в локусе 2q35. Известно, что CpG-островок гена *miR-375* довольно крупный и включает, как сам ген *miR-375*, так и его промоторную область. На основании литературных данных по изменению метилирования гена *miR-375* в опухолях можно судить о неоднозначности результатов и, что важно, о специфичности этого гена для каждого вида рака. Гиперметилирование *miR-375* показано в опухолях разных локализаций и ассоциировано со снижением экспрессии этого гена [141; 109]. В зарубежной литературе рассматриваются разные варианты использования *miR-375* в диагностике, прогнозе и лечении РМЖ. Так в одних работах *miR-375* рассматривается как новый биологический маркер для раннего выявления метастазов [82], в других – как новый прогностический маркер течения РМЖ [85].

1.2. Клиническая и молекулярно-биологическая характеристика рака молочной железы

Несмотря на успехи в области лечения РМЖ в большинстве стран мира эта проблема остается актуальной и первоочередной в попытках восстановления женского здоровья. Согласно международным данным на долю заболеваемости и смертности от РМЖ в мировой статистике женских злокачественных новообразований приходится 25,2 и 14,7% соответственно [31].

На протяжении очень длительного периода времени заболеваемость РМЖ у женщин является патологией номер один. Было отмечено, что за последние 10 лет каждый год количество женщин с заболеваемостью РМЖ стабильно увеличивается в нашей стране примерно на 1,5%. Считается, что увеличение случаев заболеваемости связано прежде всего с улучшением раннего выявления РМЖ, а также с естественным увеличением “женского генофонда” и, как

следствие, с увеличением количества больных [15]. Однако, к настоящему времени строгих и однозначных детерминант и, соответственно, точных и единых механизмов возникновения опухоли молочной железы не выявлено. Здесь следует отметить, что опухоли молочной железы характеризуются широкой вариабельностью клеточного состава, а также гистологической и генетической гетерогенностью. Под этим надо понимать, что в патогенез вовлечено не только большое число генов, участвующих в различных клеточных процессах, но и, что более важно, нарушения в путях их взаимодействия с различными факторами внешней среды. Например, влияния веществ, входящих в средства по уходу за кожей и/или гормональных препаратов, которые потенциально могут иметь канцерогенные свойства, вызывая сайт-специфический мутагенез генов системы репарации. Кроме того, имеется широкий спектр морфологических и молекулярных подтипов РМЖ, что ещё раз подчёркивает высокую гетерогенность опухоли [4].

На протяжении многих лет классификация РМЖ включала только клинко-морфологические параметры, а именно: размер, распространенность, степень злокачественности и морфологический тип опухоли. Современная классификация учитывает и иммуногистохимические показатели опухоли. И здесь на первый план выходят молекулярные маркеры трёх рецепторов — рецепторы эстрогенов (ER), прогестерона (PR) и Her2. Таким образом, были выделены «люминальный» и «базальный» РМЖ в соответствии с названием слоев нормального эпителия молочной железы в зависимости от экспрессии цитокератинов в опухоли [41]. Следует отметить, что в одной из работ установили связь между увеличением экспрессии базальных цитокератинов и ранним рецидивом заболевания [87]. Таким образом, «базальный» РМЖ представляет собой преимущественно эстроген-негативные опухоли с низкой степенью дифференцировки и плохим прогнозом [99].

Ещё в 2000 году коллектив ученых впервые опубликовал результаты индивидуальных экспрессионных профилей опухоли, полученных с помощью микрочипов с гибридизационными пробами 8102 мРНК белоккодирующих генов

[104]. Финальным результатом стало разделение всех образцов опухоли по молекулярным подтипам. Два из этих подтипов показали положительный ER-статус – люминальные А и В подтипы. Третий тип отметился гиперэкспрессией рецепторов Her2. Четвертый тип показал нормальную экспрессию рецепторов эстрогенов, прогестерона и Her2. И, наконец, пятый тип представлен трижды-негативными опухолями. Годом позже эта же группа исследователей [122] скорректировала подтипы РМЖ на основе изучения 78 образцов ткани молочной железы и анализа экспрессии 1753 генов. В результате были сформированы 4 основных подтипа РМЖ: люминальный А; люминальный В; гиперэкспрессирующий Her2 (нелюминальный) и трижды-негативный. Впоследствии классификация, основанная на разделении на 4 подтипа, многократно подвергалась корректировке.

Так, одним из этапов развития классификации РМЖ стало использование SSP-предикторов (SSP – single sample predictor), позволявших посредством коэффициента корреляции оценить сходство экспрессионного профиля анализируемой опухоли к «среднему экспрессионному профилю», для каждого подтипа РМЖ [22]. Данный метод применялся в клинической практике. Тем не менее, выявилась проблема: результаты во многом зависели от используемой панели генов и варианта статистической обработки [53]. Так, при сравнении подтипов по трем разным диагностическим панелям SSP-предикторов была обнаружена низкая конкордантность ($k = 0,238-0,780$) для люминальных А и В-подтипов РМЖ и невозможность точной идентификации для 10-30% опухолей [111]. Кроме того, молекулярная классификация РМЖ с помощью экспрессионного профайлинга и SSP-предикторов отличалась высокой стоимостью и трудоемкостью.

Позднее была предложена упрощенная (суррогатная) модель молекулярной классификации РМЖ по иммуногистохимическим маркерам, включающим экспрессию эстрогенов (ER), прогестерона (PR), Her2 и уровня пролиферативной активности Ki-67.

Важно отметить, что стандартизация индекса Ki-67 является предметом для обсуждения, ввиду его важности при диагностике люминальных A и B-Her2(-) негативного подтипов РМЖ [111]. Изначально коллектив китайских ученых предложил полуколичественную оценку экспрессии Ki-67 с пограничным уровнем, $\leq 14\%$. Чувствительность и специфичность метода составили соответственно 77% и 78% [34]. В настоящее время, согласно результатам обсуждения, проведенного в рамках международной конференции 2015 года, рекомендовано оценивать уровень Ki-67 исходя из опыта отдельной локальной патоморфологической лаборатории. Таким образом, приняты рекомендованные критерии оценки. Если медиана значений Ki-67 при люминальном РМЖ составляет 20%, то показатель экспрессии рецептора выше 30% следует расценивать как высокий, а менее 10% — как низкий [133]. Если надежное и достоверное определение индекса Ki-67 недоступно, в качестве альтернативы можно использовать оценку гистологической степени злокачественности опухоли.

Определение подтипа РМЖ, согласно утвержденным на той же конференции принципам, возможно с помощью мультипараметрических молекулярных тестов — PAM-50 или Mamma Print/Blue Print [111]. Следует учитывать, что основной целью врача-клинициста является правильное назначение специфической терапии, а не определение формального подтипа РМЖ. Поэтому важно использовать несколько мультипараметрических молекулярных маркеров [152]. Проблема, однако, состоит в том, что в большинстве стран мира проведение таких исследований невозможно по логистическим и/или финансовым причинам. Поэтому приоритетными остаются суррогатные иммуногистохимические методы определения ER, PR, индекса Ki-67 и сверхэкспрессии или амплификации Her2 с помощью *in situ* гибридизации (FISH) [74].

Попытка объединить и оценить результаты по методам выявления гистотипов и сравнить эти два метода была предпринята коллективом авторов в 2015 году [108]. Результаты изучения 5994 опухолевых образцов выявили

несоответствие у трети пациентов. Авторы высказали мнение, что 3-4 биомаркера не отражают всех особенностей различных подтипов РМЖ и необходимо искать другие молекулярно-генетические показатели.

На сегодняшний день существуют три системы исследования молекулярно-генетических показателей РМЖ: The Cancer Genome Atlas Project (TCGA), The International Cancer Genome Consortium (ICGC) и The Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium (METABRIC). Основной целью данные исследования ставят улучшить существующую систему классификации РМЖ и выделение групп пациентов, у которых можно эффективно реализовать новые терапевтические возможности. К примеру, в проекте «Атлас генома рака» (The Cancer Genome Atlas Project (TCGA)) на 500 образцах первичных опухолей проведен анализ метилирования, изменений хромосомных копий, соматических и герминальных мутаций ДНК, экспрессии микроРНК и мРНК, экспрессии белка и фосфор-протеина. Таким образом, было выделено 4 группы, соответствующие 4 основным подтипам РМЖ, определенным по экспрессии мРНК [32]: люминальный А; люминальный В; Her2 - гиперэкспрессирующий и базальноподобный.

В итоге, модель молекулярно-генетической классификации РМЖ, основанная на показателях экспрессии ER, PR, Her2 и уровня пролиферативной активности Ki-67, включает нижеперечисленные категории [32].

- Люминальный А (высоко дифференцированный рак, ER+, PR+, Her2 -, Ki-67≤20%).

- Люминальный В: (люминальный В-Her2-негативный – низко дифференцированный рак, ER+, PR±, Her2(-), Ki-67>20% или ER+, PR -, Her2(-), Ki-67 любой), люминальный В-Her2-позитивный (ER+, PR±, Her2(+), Ki-67 любой).

- Нелюминальный Her2-экспрессирующий (ER-, PR-, Her2(+), Ki-67 любой).

- Трижды-негативный (ER-, PR-, Her2(-), Ki-67 любой).

На данный момент итоговая классификация суррогатного определения биологических подтипов РМЖ, принятая по итогам конференции 2015 года,

выглядит следующим образом: трижды-негативный, гормон-рецептор-негативный и Her2-позитивный, гормон-рецептор-позитивный и Her2-позитивный, гормон-рецептор-позитивный и Her2-негативный, который включает люминальный А, промежуточный и люминальный В (Таблица 1).

Следует отметить, что некоторые работы посвящены поиску корреляции между Ki-67 и TNM-критериями опухоли, однако полученные данные противоречивы. Так, в одной из работ исследователи не обнаружили корреляции ни с размером опухоли, ни с наличием метастазов в лимфатических узлах [54]. В другой работе выявлена ассоциация между высоким уровнем Ki-67 и иммуногистотипами опухоли [40]. Наконец, в крупном исследовании показана корреляция между высоким уровнем экспрессии Ki-67 и плохим прогнозом РМЖ. Следует, однако, учесть, что общий уровень Ki-67 в исследованных работах находился в диапазоне от 5 до 30% [106].

Было показано, что люминальный РМЖ диагностируют примерно у 70% пациенток. Этот гистотип характеризуется экспрессией рецепторов эстрогенов и/или прогестерона, а также потенциальной чувствительностью к гормонотерапии [24]. Также интересны результаты некоторых клинических исследований, проведенных выборочно в разных регионах. Интересно, что в период менопаузы неoadьювантная гормонотерапия ингибиторами ароматазы эффективна у 40-60% пациенток с люминальным РМЖ (ER+/PR+) [23]. Для женщин в период пременопаузы этот показатель еще ниже [61]. Такая устойчивость к гормонотерапии может быть вызвана ростовыми факторами и нарушениями регуляции клеточного цикла, так как известно, что циклин-зависимые киназы (*CDK4/6*) контролируют рост эстроген-позитивного РМЖ [39; 145]. Неoadьювантная гормонотерапия люминального РМЖ остается предметом активного научного поиска.

Важным аспектом, затрагивающим результаты анализа классификации раннего РМЖ, согласно материалам той же конференции, является следующая тактика лечения: при высокой экспрессии гормональных рецепторов лечение зависит от менопаузального статуса. Пациентам с низким риском (люминальный

А подтип РМЖ) возможно проведение одной эндокринотерапии (в основном тамоксифен). При высоком риске (Т3, N+, пременопауза, возраст менее 35 лет) рекомендована овариальная супрессия и прием Экземестана. Больным в постменопаузе показаны ингибиторы ароматазы; при Her2-позитивных опухолях рекомендована комбинированная химиотерапия и анти-Her2-терапия; при II стадии трижды-негативного РМЖ — неоадьювантная цитотоксическая терапия [23].

Здесь следует подчеркнуть, что снижение эффективности эндокринотерапии у ряда пациенток с гормон-позитивным (ER+/PR+) РМЖ может быть связано, главным образом, с неверным определением подтипа опухоли. Так в ряде исследований отмечается, что при сравнении случаев с люминальным А подтипом с помощью двух методов, описанных выше, выявлено лишь 62% совпадений [30]. При этом отмечается, что частота ошибочно диагностированного люминального В подтипа составила 27%, нелюминального Her2-экспрессирующего — 10.2%, базальноподобного — 0.6%. Также следует отметить, что неправильно определенные случаи люминального А подтипа на самом деле оказываются или трижды-негативными или Her2-позитивными опухолями молочной железы [30].

Высокий риск рецидива РМЖ наблюдается при Т₃-стадии, наличии метастазов в 4-х и более лимфатических узлах, высоком уровне Ki-67, низком уровне гормональных рецепторов. В таких случаях оправдано проведение адьювантной химиотерапии [23].

Было показано, что количество случаев с люминальным А подтипом достигает до 45% всех РМЖ. Анализ результатов позволил выявить основные черты люминального А подтипа: характеризуется медленным ростом, с низким риском рецидивов, а также низкой смертностью от прогрессии. Наибольший процент выявления данного гистотипа показан для европеоидной части женщин в постменопаузе [33; 36; 84]. Результаты ряда исследований убедительно подтверждают данные особенности, так, например, в одной из работ медиана времени до прогрессии данного типа РМЖ составила 55 месяцев, что

статистически значимо превысило тот же показатель для люминального В гистотипа [119]. Также люминальный подтип А характеризуется высокой экспрессией рецепторов ER/PR, низким индексом Ki-67, маленьким размером опухоли (T_{1-2}), отсутствием или малым количеством метастазов в лимфатических узлах (N_{0-1}), а также повышенной экспрессией некоторых, характерных для люминального А гистотипа РМЖ, генов, таких как *ESR1*, *GATA3*, *XBPI*, *PIC3CA* и *MAP3K1* [57; 153]. Важно, что большая часть опухолей с люминальным А подтипом имеет I стадию. В работе Zoppino F. et al 2018 было показано, что частота встречаемости среди T_{1a} опухолей достигает 67%, впоследствии, с ростом опухоли - частота падает [153]. Кроме того, охарактеризована выживаемость пациентов с люминальным подтипом рака. Показано, что 5-я летняя выживаемость для люминального А подтипа составляет 96%, в тоже время люминального В – 60% (Рисунок 1) [153].

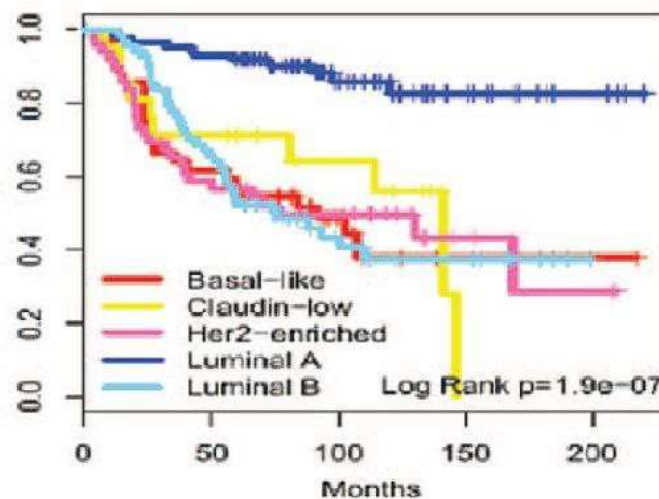


Рисунок 1 - Общая выживаемость больных РМЖ в соответствии с молекулярно-биологическими подтипами [153].

Таким образом, используя молекулярно-генетические критерии оценки при характеристике подтипов РМЖ, в перспективе будет возможно улучшить выбор адекватного лечения.

Переходя к характеристике люминального В подтипа следует отметить, что он составляет 14-18% от всех подтипов РМЖ. Среди случаев опухоли РМЖ с I стадией частота В-Her2-негативного рака (ER+, PR±, Her2(-), Ki-67>20%) достигает 25.2%, тогда как В-Her2-позитивного (ER+, PR±, Her(+)) – лишь 9.6%

[153]. Опухоли с люминальным В подтипом характеризуются повышенной экспрессией гена *ESR1* и других генов, в частности *TP53*, *MDM2* и *CyclinD1*, экспрессия которых также повышена при базальноподобном и Her2-гиперэкспрессирующем подтипах [153].

Таблица 1 - Лечебно-ориентированная классификация подгрупп РМЖ (По материалам конференции St.Gallen [17])

Клиническая группа РМЖ	Примечания
Трижды-негативный	Негативные ER, PR и HER2
Гормон-рецептор-негативный Her2- позитивный (ER-/Her2+)	Рекомендации ASCO/CAP
Гормон-рецептор-позитивный Her2- позитивный (ER+/Her2+)	Рекомендации ASCO/CAP
Гормон-рецептор-позитивный Her2- негативный	ER и/или PR-позитивные >1%
Высокая экспрессия рецепторов стероидных гормонов, низкая пролиферация, ограниченное распространение опухоли (люминальный А), благоприятный прогноз, низкий риск рецидива заболевания	Прогностически благоприятные мультипараметрические молекулярные маркеры. Высокая экспрессия ER/PR и низкий индекс Ki-67, отсутствие или малое количество метастазов в лимфатические узлы (N ₀₋₃), маленький размер опухоли (T _{1,2})
Промежуточный прогноз	Неопределенная степень риска и чувствительности к эндокринотерапии и цитотоксическому лечению
Низкая экспрессия рецепторов стероидных гормонов, высокая пролиферация, значительное распространение опухоли (tumour burden) (люминальный Б), высокий риск рецидива заболевания	Неблагоприятные мультипараметрические молекулярные маркеры. Низкая экспрессия ER/PR и высокий индекс Ki-67, большее количество метастазов в лимфатические узлы, III степень гистологической злокачественности, выраженная лимфоваскулярная инвазия, большой размер опухоли (T ₃)
<p>Значения ER 1-9% считаются сомнительными.</p> <p>Оценка Ki-67 проводится с учетом местных лабораторных показателей (например, если среднее значение Ki-67 при гормон-рецептор-положительном РМЖ составляет 20%, то >30% считается высоким, ≤10% — низким).</p>	

Клинически, люминальный В подтип характеризуется как опухоль с низкой экспрессией рецепторов стероидных гормонов, высокой пролиферацией, значительной распространенностью и высоким риском рецидивирующей активности. Для данного типа отмечен также большой размер (T_3) опухоли, большое количество метастазов в лимфатические узлы, выраженная лимфо-васкулярная инвазия, степень III гистологической злокачественности, и высокий индекс Ki-67.

Согласно другой классификации люминальный В подтип может иметь две разновидности [153]: один вариант представлен Her2-негативным люминальным В подтипом (ER+, Her2- и наличием одного из следующих факторов: Ki-67 высокий (>30%), PR низкие (<20%)). Другой Her2-позитивный люминальный В подтип (ER+, Her2+, Ki-67 любой, PR любые).

Исходя из этой классификации можно выделить, что В-Her2-негативный вариант составляет примерно 70% подтипа В и имеет формальные признаки люминального А подтипа (ER+ и/или PR+/Her2-), отличаясь от него высоким пролиферативным потенциалом (Ki-67>30%), обуславливающим неблагоприятный прогноз, либо отсутствием PR – что является неблагоприятным фактором. Практически аналогичный прогноз у Her2-позитивного и трижды-негативного подтипов [153; 94].

При сопоставлении подтипов РМЖ со стадией заболевания и размером опухоли было установлено, что рост опухоли сопровождался увеличением доли люминального В-Her2-негативного рака. При T_{1a} -стадии его частота составила 6,7%, при T_{1b} — возросла до 20,9%, при T_{1c} — до 27,3%. Значимых изменений доли В-Her2-позитивного подтипа не наблюдалось [153].

Важно отметить, что в отличие от подтипа А, для которого характерна низкая чувствительность к химиотерапии [96], для больных с наличием люминального В подтипа в связи с его пролиферативной активностью, предполагается системное цитостатическое лечение [137], а при одновременной гиперэкспрессии онкопротеина Her2 необходимо назначение таргетных препаратов, таких как Трастузумаб [151].

С точки зрения молекулярной структуры, одним из основных критериев выделения люминального РМЖ является наличие в опухолевой ткани рецепторов к эстрогенам и прогестерону. В настоящее время в ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России используется метод иммунофлуоресцентного анализа посредством проточной цитофлуориметрии, который позволяет количественно оценить экспрессию разных видов эстрогеновых рецепторов, а также клеток, экспрессирующих маркер в исследуемой опухоли и интенсивности экспрессии ER в каждой клетке [1]. Проведенные ранее исследования показали, что экспрессия ER α ограничена люминальными клетками, а ER β широко распространены как в люминальных эпителиальных клетках, так и базальных, жировых и эндотелиальных клетках, а также в фибробластах и лимфоцитах [48].

К настоящему времени установлено, что среди опухолей молочной железы с люминальным А подтипом количество случаев с ER β -позитивным статусом составляет 72%, с люминальным В подтипом – 68%. В одной из работ выявлена статистически значимая коэкспрессия ER β с ER α в опухолях с PR и Her2-негативным статусом, при этом опухоли с ER β -негативным статусом отличаются большими размерами, высокой степенью злокачественности, склонностью к распространению в регионарные лимфатические узлы [48]. В тоже время в ряде исследований показано, что повышенная экспрессия ER β статистически значимо коррелировала с хорошим прогнозом РМЖ, при том, что уровень экспрессии снижался во время прогрессии заболевания [48]. По данным многофакторного анализа 442 больных инвазивным РМЖ, получивших Тамоксифен в адьювантном режиме, статус ER β является независимым предиктором рецидива и смертности от рака [48].

Суммируя данные литературы, следует отметить необходимость отбора ряда маркеров, оптимальных для диагностики, прогноза и мониторинга заболевания.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Общая характеристика больных РМЖ

Настоящая работа основана на анализе ретроспективных данных комплексного обследования и лечения 70 больных раком молочной железы (РМЖ), получавших лечение в НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина с 2004 по 2017 гг.

Среднее время наблюдения за больными РМЖ, включенными в исследование, составило $56 \pm 47,2$ месяца (от 4,5 до 222,0 месяцев, медиана 37,6 месяца). В исследование включены 70 женщин в возрасте от 30 до 72 лет (средний возраст $51,9 \pm 9,8$ лет, медиана 54 года, Таблица 2).

Таблица 2 - Распределение пациентов в зависимости возраста

Возраст	N	%
30-39	8	11,4
40-49	21	30,0
50-59	25	35,7
60-69	14	20,0
70 и старше	2	2,9
Средний возраст	51,9±9,8 лет	

Парные образцы опухолевой и здоровой ткани (резекционный материал) был получен в Отделе патологической анатомии опухолей человека ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина». Исследование проводилось с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ от 24.12.93 № 2288). Использовались ткани только тех больных, которые до операции не получали лучевую или химиотерапию. ДНК выделяли из опухолевых (T-tumor) и прилегающих гистологически нормальных (N-norm.) тканей. Все случаи РМЖ классифицированы клинически по системе TNM в соответствии с требованиями Международного противоракового общества (UICC, версия 2002 г.)

и описаны гистологически на основании классификации Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) в отделе патоморфологии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина (Таблицы 3 и 4).

Таблица 3 - Распределение больных по стадиям и гистологическим характеристикам

Клинико-гистологические характеристики	N	%
Гистологический тип		
Инфильтративно-протоковый рак	51	72,8
Инфильтративно-дольковый рак	9	12,8
Смешанный рак	4	5,7
Редкие формы	6	8,6
Стадии заболевания		
I	11	15,7
IIa	20	28,6
IIб	16	22,8
IIIa	16	22,8
IIIб	6	8,6
IV	1	1,4
Степень дифференцировки опухоли		
G1	3	4,3
G2	52	74,3
G3	15	21,4
Метастазы в лимфатических узлах		
N0	28	40,0
N1-2	42	60,0

Стадирование заболевания выполнено в послеоперационном периоде после получения ответа планового гистологического исследования. Только у одной пациентки была IV стадия заболевания (Таблица 3). В связи с угрозой кровотечения из распадающейся опухоли пациентке на I этапе выполнена оперативное лечение.

Молекулярно-биологические подтипы РМЖ выделяли по следующим критериям: Люминальный А:

- позитивный статус ER (по Allred) и PR (≥ 6 по Allred);
- экспрессия Her2 менее 0-1+;

- низкая (G1) степень злокачественности;
- Ki-67 менее 20%.

Люминальный В (Her2-негативный):

- позитивный статус ER (по Allred) и/или PR (≤ 5 по Allred или отрицательный);

- умеренная (G 2) и высокая степень (G 3) злокачественности;
- Ki-67 более 20%.

Люминальный В (Her2-позитивный):

- позитивный статус ER и/или PR;
- гиперэкспрессия Her2 (3+);
- Ki-67 более 20%.

Her2 — сверхэкспрессирующий или Erb-B2:

- гиперэкспрессия Her2 (3+) или амплификация Her2 (FISH);
- отсутствие экспрессии рецепторов стероидных гормонов.
- Ki-67 любое

Трижды-негативный:

- отсутствие экспрессии рецепторов стероидных гормонов;
- отсутствие экспрессии Her2 ($<2+$).
- Ki-67 любое

Таблица 4 - Распределение больных в зависимости от молекулярного подтипа и стадии РМЖ

Показатель	Подтип РМЖ					
	Люминальный А (n=19)	Люминальный В Her2 негативный (n=13)	Люминальный В Her2 позитивный (n=23)	Нелюминальный Her2 позитивный (n=5)	Трижды - негативный (n=10)	
	Абс (%)	Абс (%)	Абс (%)	Абс (%)	Абс (%)	
Стадия						
T	T1	6 (31,6%)	3 (23,1%)	3 (13,0%)	2 (40,0%)	1 (10,0%)
	T2	12 (63,2%)	6 (46,1%)	15 (65,2%)	2 (40,0%)	8 (80,0%)
	T3	0 (0,0%)	1(7,7%)	2 (8,7%)	1 (20,0%)	1 (10,0%)
	T4	1 (5,2%)	3 (23,1%)	3 (13,1%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
N	N0	13 (68,4%)	4 (30,8%)	7 (30,4%)	1 (20,0%)	3 (30,0%)
	N+	6 (31,6%)	9 (69,2%)	16 (69,6%)	4 (80,0%)	7 (70,0%)
G	G1	2 (10,5%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (10,0%)
	G2	14 (73,7%)	11 (84,6%)	18 (78,3%)	3 (60,0%)	6 (60,0%)
	G3	3 (15,8%)	2 (15,4%)	5 (21,7%)	2 (40,0%)	3 (30,0%)

Общая	I	4 (21,1%)	2 (15,4%)	3 (13,0%)	1 (20,0%)	1 (10,0%)
	II	13 (68,4%)	5 (38,5%)	12 (52,2%)	1 (20,0%)	5 (50,0%)
	III	2 (10,5%)	5 (38,5%)	8 (34,8%)	3 (60,0%)*	4 (40,0%)
	IV	0 (0,0%)	1 (7,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
* различия достоверны по сравнению с подтипом А при $p < 0,05$						

Таким образом, были изучены результаты лечения 55 (78,6%) люминальных раков и 15 (21,4%) – нелюминальных РМЖ.

Статистически значимых различий распределения больных по возрастным группам в зависимости от молекулярного подтипа РМЖ не отмечено (Таблица 5).

Таблица 5 - Распределение больных по возрасту и по молекулярно-биологическим подтипам.

Возраст	Люминальный А	Люминальный В Her2 негативный	Люминальный В Her2 позитивный	Нелюминальный Her2 позитивный	Трижды-негативный
	Абс(%)	Абс(%)	Абс(%)	Абс(%)	Абс(%)
N	19 (27,1%)	13 (18,6%)	23 (32,9%)	5 (7,1%)	10 (14,3%)
30-39	0 (0,0%)	1 (7,7%)	4 (17,4%)	1 (20,0%)	2 (20,0%)
40-49	7 (36,8%)	3 (23,1%)	6 (26,1%)	1 (20,0%)	4 (40,0%)
50-59	7 (36,8%)	6 (46,1%)	6 (26,1%)	3 (60,0%)	3 (30,0%)
60-69	4 (21,1%)	3 (23,1%)	6 (26,1%)	0 (0,0%)	1 (10,0%)
70 и старше	1 (5,3%)	0 (0,0%)	1 (4,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Средний возраст	53,6±9,6	53,1±8,4	52,1±11,0	48,8±11,4	48,5±9,1

Как видно из таблицы, большинство выборки составили пациентки от 40 до 60 лет.

Для отбора образцов с высоким содержанием опухолевых клеток был проведен дополнительный гистологический анализ микросрезов (толщина 3-5 мкм), окрашенных эозином и гематоксилином. Отбирали образцы с содержанием опухолевых клеток не менее 70%. Образцы тканей хранили при -70°C . Выборка включала парные (опухоль/прилежащая гистологически нормальная ткань) образцы РМЖ.

2.2. Виды и объем лечения больных РМЖ, включенных в исследование

Всем пациентам на 1 этапе выполнено хирургическое лечение – 55 (78,6%) в объеме радикальная мастэктомия (РМЭ), в том числе РМЭ с одномоментной реконструкцией эндопротезом, 15(21,4%) – в объеме радикальная резекция (РР). Адьювантную химиотерапию (ХТ) провели 65(92,9%). Использовали схемы: АС – у 35 (53,9%) из 65 пациентов, САФ – у 11 (16,9%), АС + Таксаны – у 9 (13,9%), FAC - у 7 (10,8%), и в единичных случаях Таксаны (1 (1,5%)), АТ (1 (1,5%)) и САФ + АТ (1 (1,5%)).

Пациенты с Her2(+)положительным статусом получали таргетную анти Her2-терапию. Трастузумаб 8мг /кг 1 нагрузочная доза и далее 6 мг/кг каждые 3 недели до года.

Лучевая терапия в дозе 45-50 Гр – проведена 26 (37,1%) пациентам.

Гормонотерапия препаратами Тамоксифен, Анастрозол и Летрозол назначена 55 (78,6%) пациентам.

Всего комплексное (применение трех и более методов, обладающих местным воздействием на опухоль и системным воздействием на организм) лечение получила 28 (40%) пациентка, комбинированное (использование двух методов воздействия, один из которых оказывает местное воздействие на опухоль, а другой - системное влияние на организм, примером комбинированного лечения является, в частности, проведение хирургического лечения и химиотерапии, которые могут быть применены в различной последовательности) лечение – 42 (60%).

Виды и объем лечения, проведенного 70 больным РМЖ, включенным в исследование, представлен в таблице 6. Комбинированное лечение получили 74,5% (41) больных люминальным РМЖ, 0% пациенток с Her2 позитивным подтипом и 10% (1) — с трижды-негативным РМЖ; комплексное — соответственно 25,5 (14)%, 100% (5) и 90% (9).

Таблица 6 – Вид и объем лечения больных РМЖ, включенных в исследование

Вид и объем лечения	Люминальный (n=55)		Нелюминальный Her2 (+) позитивный (n=5)		Трижды- негативный (n=10)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Комбинированное:	41	74,5	-	-	1	10
Хирургическое						
РМЭ	41	100	-	-	1	100
Адьювантное						
ХТ	37	90,2	-	-	1	100
ГТ	41	100	-	-	-	-
Комплексное:	14	25,5	5	100	9	90
Хирургическое						
РМЭ	2	14,3	4	80	7	77,8
Радикальная резекция	12	85,7	1	20	2	22,2
Адьювантное						
ХТ	13	92,8	5	100	9	100
ЛТ	12	85,7	5	100	9	100
ГТ	14	100	-	-	-	-
РМЭ — радикальная мастэктомия, ХТ — химиотерапия, ЛТ — лучевая терапия, ГТ — гормонотерапия						

Выбор метода хирургического лечения зависел от размера опухоли, стадии заболевания, молекулярно-биологического подтипа РМЖ и предпочтения пациентки. Показаниями к радикальной мастэктомии, а также радикальной мастэктомии с одномоментной и отсроченной реконструкцией эндопротезом являлись:

- большие размеры опухоли (>5 см);
- наличие генетической мутации в генах BRCA-1/2;
- отсутствие возможности получить хороший косметический эффект при радикальной резекции молочной железы.

Показания к профилактической контрлатеральной подкожной мастэктомии с одномоментной реконструктивно-пластической операцией включали наличие генетических мутаций в генах BRCA-1 и BRCA-2.

В остальных случаях выполняли радикальную резекцию молочной железы в одном из следующих вариантов:

широкая клиновидная резекция – радикальная резекция, квадрантэктомия, лампэктомия – экономная резекция с простым техническим решением, повышающим косметический эффект.

В полной мере использовали технику пластических операций для восстановления формы и дефицита объема молочной железы — перемещение лоскута, β-пластика, Z-пластика, «перевернутая T». Во время операции иссекали 1/3-1/4 объема молочной железы, включающего опухоль, единым блоком с кожей, фасцией большой грудной мышцы и клетчаткой I-III уровней по Berg.

Все хирургические вмешательства выполняли с соблюдением «чистого» края резекции более 1мм микроскопического отступа от опухоли согласно рекомендации 13th St. Gallen IBCC, 2013года. Края резекции изучали во время операции со срочным гистологическим исследованием.

Химиотерапию проводили в следующих режимах:

CAF — Циклофосфамид 100 мг/м² в 1-14 дн., Доксорубицин 30 мг/м² в 1-8 дн., 5-Фторурацил 500 мг/м² в 1-8 дн., каждые 4 недели, 2-6 курсов.

FAC — Циклофосфамид 500 мг/м² + Доксорубицин 50 мг/м² + 5-Фторурацил 500 мг/м², каждые 3 недели, 2-6 курсов.

AC — Доксорубицин 60 мг/м² + Циклофосфамид 600 мг/м², 4-6 курсов.

AT — Доксорубицин 50 мг/м² + Доцетаксел 75 мг/м², каждые 3 недели, 4-6 курсов.

Адювантную гормонотерапию получили 55 пациентов.

Адювантную лучевую терапию проводили по стандартной методике: РОД 2 Гр, СОД 50 Гр, на зоны регионарного метастазирования – СОД 45Гр.

Гистологические исследования выполнены в отделе патологической анатомии опухолей человека ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Операционный материал первичных опухолей и парных образцов условно нормальной ткани молочных желез 70 больных РМЖ, включенных в исследование, фиксировали в нейтральном забуференном формалине и заключали в парафин. Срезы с парафиновых блоков окрашивали гематоксилином и эозином для проведения гистологических исследований. Готовые препараты и парафиновые блоки отобраны из архива патологоанатомического отделения ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России. Пересмотр всех гистологических препаратов проведен одним патоморфологом с последующей унификацией диагнозов в соответствии с классификацией опухолей молочной железы ВОЗ [5].

Морфологический анализ включал определение:

- а) гистологического типа опухоли;
- б) распространения опухоли в протоки соска и подсосковой зоны;
- в) наличия *in situ* компонента опухоли;
- г) наличия сосудистой инвазии;
- д) митотического индекса;
- е) общего количества лимфатических узлов и количества узлов, пораженных метастазами;

Оценку гистологического типа опухоли провели по классификации ВОЗ (2012 г.) с выделением инвазивного рака неспецифического типа и специфических форм РМЖ. Уточнили нозологические единицы и гистологические варианты. Во всех случаях оценили степень злокачественности опухоли по методике Nottingham Histologic Score [70]. Сосудистую инвазию оценили на парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, по наличию комплексов опухолевых клеток внутри пространств, выстланных эндотелием, без дополнительного разделения сосудистых структур на кровеносные и лимфатические.

Иммуногистохимические исследования выполнены в отделе патологической анатомии опухолей человека ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России на серийных депарафинизированных срезах опухолевой ткани с помощью биотин-стрептавидинового иммунопероксидазного метода с антителами к рецепторам эстрогенов (ER), прогестерона (PR), рецептору эпидермального фактора роста 2 типа (Her2) и Ki-67 (Таблица 7).

Таблица 7 - Характеристика антител, использованных при проведении иммуногистохимического исследования

Антиген	Антитело	Фирма	Титр	Функция белка
PR	SP42	Cell Marque	1:35	Рецептор прогестерона
ER	SP1	Cell Marque	1:35	Рецептор эстрогена
Her2	Herceptest	Dako		Рецептор к человеческому эпидермальному фактору роста 2 типа
Ki-67	MIB-1	Dako	1:35	Антиген делящихся клеток

Срезы толщиной 3-4 мкм депарафинизировали и регидратировали по стандартной схеме. Для демаскировки антигенов провели предварительную обработку депарафинизированных срезов в водяной бане при 95°C в течение 1 мин с использованием цитратного буфера pH 6,0 (Dako). Срезы инкубировали с первичными антителами в течение 1 часа при комнатной температуре. В качестве вторичных антител и пероксидазного комплекса использовали стандартный набор реагентов LSAB+ Kit или систему детекции Super Sensitive™ Polymer-HRP («BioGenex»). Для визуализации реакции применили раствор диаминобензидина DAB+ (Dako). Ядра клеток докрасили гематоксилином.

Оценку иммуногистохимической реакции гормональных рецепторов провели только в инвазивном компоненте рака полуколичественным методом с учетом интенсивности окрашивания и количества антиген-позитивных клеток по методике Allred [72]. Интенсивность иммуногистохимической реакции оценили в баллах:

0 баллов — отсутствует окрашивание ядер опухолевых клеток;

1 балл – однородная бледно-коричневая окраска ядер опухолевых клеток;

2 балла — однородная умеренно насыщенная коричневая окраска ядер опухолевых клеток или неоднородная, варьирующая от бледно- до темно-коричневой;

3 балла — однородная темно-коричневая окраска ядер опухолевых клеток. Цитоплазматическую и мембранную экспрессию маркеров не учитывали.

Долю окрашенных ядер опухолевых клеток оценили следующим образом:

- до 1% окрашенных клеток – 1 балл,
- 1-10% окрашенных клеток – 2 балла,
- 11-33% окрашенных клеток – 3 балла,
- 34-66% окрашенных клеток – 4 балла,
- 67-100% окрашенных клеток – 5 баллов.

Так как пороговые значения экспрессии рецепторов андрогенов в опухоли молочной железы не установлены, результаты экспрессии оценили по схеме Allred, адаптированной для рецепторов эстрогенов и прогестерона [72]. Учитывали только ядерную экспрессию маркера в инвазивном компоненте опухоли.

Оценку иммуногистохимической реакции Her2 провели исключительно в инвазивном компоненте рака по установленной методике с учетом требований обновленных клинических рекомендаций «Американского общества клинических онкологов и колледжа Американских патологоанатомов» по определению Her2 в РМЖ от 2013 г. [138]. При оценке экспрессии маркера рассматривали окраску только мембран клеток инвазивной опухоли.

Результаты иммуногистохимической экспрессии Her2 оценены в баллах по протоколу ASCO/CAP (2013 г.):

0 баллов – отсутствие окраски или неполная (нециркулярная) бледная/едва различимая мембранная окраска $\leq 10\%$ опухолевых клеток;

1 балл – неполная бледная/едва различимая мембранная окраска $\geq 10\%$ опухолевых клеток;

2 балла – неполная яркая/однородная бледная мембранная окраска $>10\%$ опухолевых клеток или яркая циркулярная мембранная окраска $\leq 10\%$ опухолевых клеток;

3 балла – циркулярная яркая и интенсивная мембранная окраска $>10\%$ опухолевых клеток.

Результат иммуногистохимической экспрессии Her2, равной 0 или 1 баллу, расценили как негативный, не требующий уточнения с помощью флюоресцентной *in situ* гибридизации (FISH); равный 2 баллам, – как неопределенный, требующий уточнения с помощью FISH; равный 3 баллам, – как позитивный, не требующий уточнения с помощью FISH.

Внутренним позитивным контролем иммуногистохимической экспрессии маркеров служили:

для всех гормональных рецепторов (ER, PR и AR) — гетерогенная слабая и/или умеренная окраска ядер клеток предсуществующих долек и протоков молочной железы;

для Her2 – слабая окраска мембраны люминальных клеток предсуществующих протоков молочной железы.

Внутренним негативным контролем экспрессии гормональных рецепторов и Her2 служили мезенхимальные элементы стромы молочной железы.

Индекс пролиферативной активности опухоли оценили по экспрессии Ki-67. Использовали моноклональные антитела к MIB-1 (Dako). Индекс Ki-67 оценили в зонах максимальной экспрессии антигена при 400-кратном увеличении исключительно в инвазивном компоненте опухоли и рассчитали, как процент окрашенных ядер из расчета на 400 опухолевых клеток [115]. При подсчете индекса Ki-67 учитывали любую интенсивность окрашивания ядер опухолевых клеток; любой тип экспрессии маркера в ядре (перихромосомный, (пери)нуклеолярный, нуклеоплазмальный) расценивали как позитивный. Пороговым считали значение $>20\%$.

Материалом для молекулярно-генетических исследований послужили парные образцы опухолевой и гистологически неизменной ткани молочных желез 70 больных РМЖ.

2.3. Генетические методы исследования

Молекулярно-генетические исследования провели на базе лаборатории патогеномики и транскриптомики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» (заведующий лабораторией – д.б.н., проф. Брага Э.А.)

2.3.1. Выделение геномной ДНК

Геномную ДНК из парных образцов опухоли и прилежащей к ней гистологически неизменной (условно нормальной) ткани молочных желез выделили с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kits фирмы Qiagen (США) строго по инструкции производителя.

Концентрацию и чистоту выделения ДНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, USA). Концентрация составила от 250 до 550 нг/мкл, $A_{260}/A_{280} = 2.10-2.35$; $A_{260}/A_{230} = 2.15-2.40$. Целостность ДНК оценивалась при помощи 0.8% агарозного геля. В качестве стандарта использовали ДНК фага лямбда с известной концентрацией. На рисунке 2 хорошо видно, что фрагменты ДНК, в основном, имеют массу более 45 т.п.н. Выделенная ДНК хранилась при -20°C и использовалась для бисульфитной модификации с последующей ПЦР.

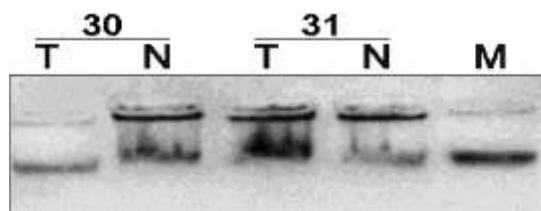


Рисунок 2 - Картина электрофоретического разделения препаратов ДНК образцов РМЖ в 0.8% агарозном геле. **T** – ДНК из опухолевой ткани; **N** – ДНК из нормальной ткани; **M** – маркер фаг λ (45 т.п.н.).

2.3.2. Бисульфитная конверсия ДНК. Метил-специфичная полимеразная цепная реакция (МС-ПЦР)

Метод основан на способности молекулы гидросульфита взаимодействовать с цитозином в составе одноцепочечной ДНК с превращением последнего в урацил; 5-метилцитозин при тех же условиях модификации не подвергается. В дальнейшем проводится амплификация исследуемой последовательности ДНК с помощью ПЦР. При этом все остатки урацила и тимина амплифицируются как тимин и только 5'-метилцитозин воспроизводится как цитозин.

Бисульфитная конверсия проводилась с использованием 0.5–2 мкг ДНК, как описано ранее [10]. ДНК после обработки бисульфитом очищали, используя колонки Centrifugal Filter Microcon, Ultracel YM-30 («Millipore», США). Модифицированную бисульфитом ДНК хранили при +4°C и использовали в качестве матрицы при проведении метил-специфичной ПЦР с праймерами, приведенными в таблице 8.

Таблица 8 - Параметры праймеров, использованных в исследовании

ГЕН	Структура праймеров (5'-3')*	Тотж, C ⁰	Размер продукта п.н.	Ссылка
miR-107	MF: TGTGTAGTAGTTCGTTTATAGC MR: GACTCTACGACTACTAAATCG	50	220	Lee et al., 2009
	UF: TGTGTAGTAGTTTGTTTATAGTG UR: CCAACTCTACAATACTAAATC	52	220	
miR-125b-1	MF: TGGTGTATCGTTTTTGTTTTC MR: ACCCATTCGAAACGAAAC	53	190	Soto-Reyes et al., 2012
	UF: ATTTGGTGTATTGTTTTTGTTTTT UR: CTCACCCATTCAAAAACAAAAC	53	190	
miR-130b	MF: AAAGATGGAGTCGGTAGGC MR: AAACGCGAAAAATTAACGA	56	109	Yang et al., 2012
	UF: GTTAAAGATGGAGTTGGTAGGT UR: AAACACAAAAAATTAACAAAAA	54	112	
MIR-137	MF: TTTTGATTTTTTTCGGTGAC MR: TACCGCTAATACTCTCCTCG	54	98	Balaguer et al., 2010
	UF: TTTTTTGATTTTTTTGGTGAT UR: CTACCACTAATACTCTCCTCAA	52	98	
miR-375	MF: TCGTTATCGTTATTTTAATCGTACG MR: AAAAATTTCTATTCTAAACCACGAC	53	200	*
	UF: TGTTATTGTTATTTTAATTGTATGG UR: AAAAATTTCTATTCTAAACCACAAC	53	199	
miR-127	MF: GTTTTGCGATGATGTTGAAGCGTTT MR: CGCCAAACCGTAAATTCCTAAACTT	60	181	*
	UF: GGGGTTTTGTGATGATGTTGAAGTGT UR: CCACCAAACCATAAAAATTCCTAAACTT	58	185	

<i>miR-203</i>	MF: GGGTCGTGGAGGATTAGTC MR: CGACGACGCCTTTTATG	55	133	*
	UF: TGGAGGATTATGTGTGGGATTTAT UR: AACCAACACAACAACACCTTTTAT	56	135	
<i>miR-124a-3</i>	MF: GATAGTATAGTCGGTTGAGCGTAGC MR: CCTCAAAACTAAAACGAACGACG	52	152	Ando et al., 2009
	UF: TAGTTGGTTGAGTGTAGTGTTTTTG UR: CAAAACATAAAACAACAACAACATC	52	142	
<i>miR-124a-2</i>	MF: GGTTTATGTATGTTTTAGGCG MR: TCCGTAAAAATATAAACGATAG	49,1	93	Ando et al., 2009
	UF: TAGGTTTATGTATGTTTTAGGTG UR: СТАТТССАТАААААТАТАААСААТАСА	49,1	99	
<i>miR-124a-1</i>	MF: AGAGTTTTTGGAAGACGTCG MR: AAAAAAATAAAAAACGACGC	56,2	155	Ando et al., 2009
	UF: AATAAAGAGTTTTTGGAAGATGTT UR: CAAAAAAAAAAAAATAAAAAACAACAC	56,2	166	

*подобраны в лаборатории патогеномики и транскриптомики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Метод метил-специфичной ПЦР (МС-ПЦР). Препараты ДНК из опухолей и из соответствующей нормальной ткани подвергали конверсии бисульфитом, а затем исследовали с помощью МС-ПЦР. Праймеры подбирали к исследуемому локусу в двух вариантах: 1) к метилированному аллелю, 2) к неметилированному аллелю. Предполагалось, что CpG-динуклеотиды, входящие в состав праймеров, или полностью метилированы или, наоборот, полностью свободны от этой модификации. МС-ПЦР проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 67 мМ Трис-НСl, рН 8.8, 16.7 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.01% Tween-20; 1.5 мМ MgCl₂, 0.25 мМ каждого dNTP; 10-20 нг ДНК; 25 пмолей каждого праймера; 0.5 ед. Hot Start Taq ДНК полимеразы («СибЭнзим», Новосибирск).

Аmplификацию проводили по программе: 95°C, 2 мин; 37-40 циклов {92°C, 10 с; 25 с.; 72°C, 25с}; 72°C, 3 мин. ПЦР проводили на амплификаторе T100 («Bio-Rad», США). Для каждой пары праймеров проверяли отсутствие продукта ПЦР на неконвертированной ДНК и наличие продукта ПЦР на конвертированной ДНК. В качестве контролей для неметилированных аллелей использовали коммерческий препарат ДНК #G1471 (Promega, США). В качестве позитивного контроля 100%-ого метилирования использовали коммерческий препарат ДНК #SD1131 (Thermo Fisher Scientific, США). Продукты ПЦР разделяли с помощью электрофореза в 2%

агарозном геле и результат анализировали с помощью системы Gel Doc EZ System (Bio-rad, США).

Подбор праймеров для МС-ПЦР осуществляли с помощью программ Methyl Primer Express v.1.0 (“Invitrogen”, США) и Primer Select (“DNASTAR”, США) со следующими параметрами: размер ампликонов 100-200 пар оснований, от 4 до 7 CpG-динуклеотидов на пару праймеров, от 4 до 10 цитозинового остатков не входящих в CpG-динуклеотиды, разница в температурах плавления праймеров в паре праймеров не более 5 градусов. Первоначальные варианты пар праймеров проверяли на образование димеров, самодимеров и вторичных структур с помощью программы Vector NTI v.10.0 (“Invitrogen”, США).

2.4. Статистическая обработка результатов исследования

Для статистической обработки результатов проведенного исследования все данные 70 больных РМЖ формализованы с помощью специально разработанного кодификатора и внесены в «базу данных», созданную на основе электронных таблиц EXCEL v. 2010 г. Полученные результаты обработаны стандартными пакетами STATISTICA, v. 10 и IBM SPSS Statistics, v. 21.

Достоверность различий между количественными показателями вычисляли по критерию t Стьюдента для нормально распределенных величин. Для сравнения качественных параметров применяли точный критерий Фишера и χ^2 (Хи-квадрат).

Различия считали значимыми при $p < 0,05$ (точность $\geq 95\%$), также использовалась маргинальная значимость ($0,05 < p < 0,1$) для обозначения тенденции.

Показатели выживаемости рассчитали по методу Каплана-Майера. Различия выживаемости в группах определили по log-rank test. Оценили общую выживаемость пациентов и выживаемость без признаков прогрессирования РМЖ. Провели регрессионный анализ по Коксу.

Использовали результаты корреляционного, одно- и многофакторного регрессионного анализа.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

3.1. Обсуждение результатов лечения больных раком молочной железы

Средний срок наблюдения за 70 больными РМЖ, включенными в исследование, составил $56,1 \pm 47,2$ месяца (от 4,5 до 222,0 месяцев, медиана 37,6 месяца). Распределение пациенток, в зависимости от объема полученного лечения представлено на рисунке 3.

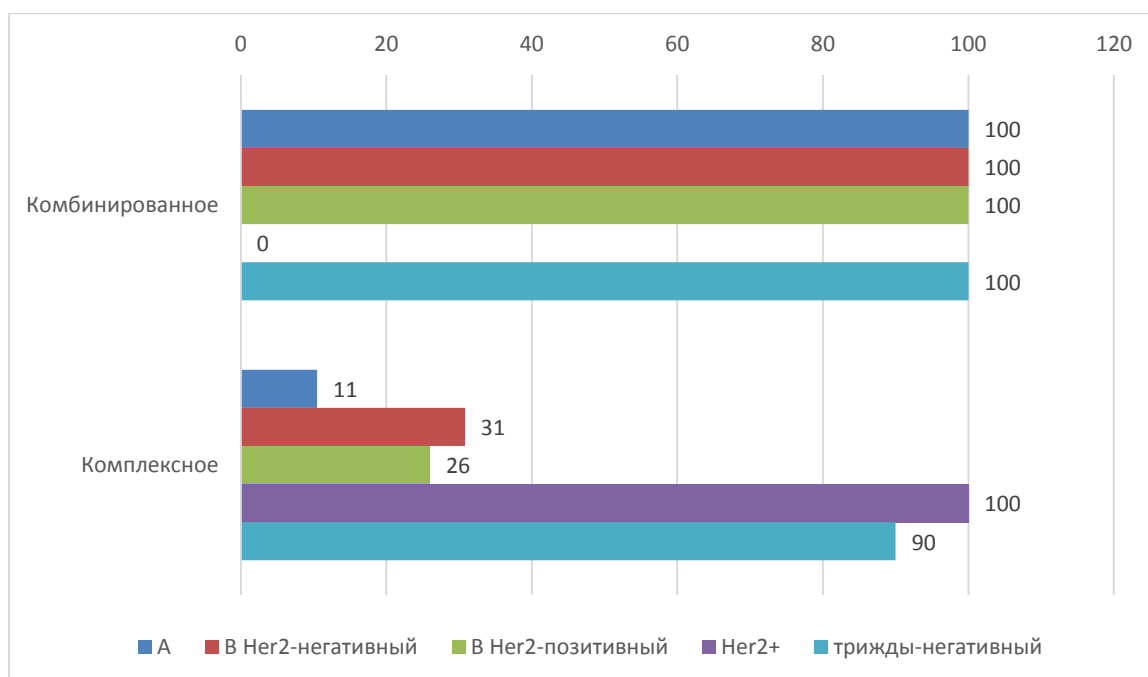


Рисунок 3 - Распределение больных в зависимости от молекулярного подтипа РМЖ и объема лечения

Все виды лечения подробно описаны в Главе 2. Большинству проведена комплексная или комбинированная терапия. Комбинированное лечение получили 74,5% пациенток с люминальными подтипами, 0% – с подтипом Her2 (+) позитивным и 10% — с трижды-негативным РМЖ. Частота комплексного лечения составила соответственно 25,5%, 100% и 90%. (таблица 7).

Адювантное лечение получили все пациентки. Вид лечения представлен в таблице 9.

Таблица 9 - Распределение больных в зависимости от молекулярного подтипа РМЖ и вида адьювантного лечения.

Вид адьювантного лечения	Подтипы РМЖ				
	люминальный			нелюминальный Her2 – позитивный (n=5)	Трижды - негативный (n=10)
	А (n=19)	В-Her2-негативный (n=13)	В-Her2-позитивный (n=23)		
	Абс (%)	Абс (%)	Абс (%)	Абс (%)	Абс (%)
ХТ	15 (79,0%)	12 (92,3%)	23 (100%)	5 (100%)	10 (100%)
ЛТ	2 (10,5%)	4 (30,8%)	6 (26%)	5 (100%)	9 (90,0%)
ГТ	19 (100%)	13 (100%)	23 (100%)	-	-
ТТ			23 (100%)	5 (100%)	

ХТ — химиотерапия, ЛТ — лучевая терапия, ГТ — гормонотерапия, ТТ - таргетная терапия

За время наблюдения смертность больных составила 17,1% (12/70 пациентов). Частота прогрессирования заболевания составила – 20,0% (14/70 пациентов). У 12 пациентов зарегистрированы отдаленные метастазы и лишь у 2-х развился местный рецидив.

Проведенный нами анализ отдаленных результатов лечения различных подтипов РМЖ (таблица 10) выявил несомненные преимущества подтипа А: уровень смертности больных составил 5,3% (1/19 пациентов) и был ниже, чем у других подтипов, но различия не достигли статистической значимости. Частота прогрессирования заболевания составила только 10,5% и также была ниже, чем у других подтипов.

Основным видом прогрессирования во всех группах стали отдаленные метастазы.

Общая 5-летняя выживаемость больных с подтипом А составила 90,9% (таблица 10, рисунок 4) и превысила показатели остальных групп (В-Her2-негативный подтип — 78,6%, В-Her2 - позитивный — 87,0%, нелюминальный Her2 (+) позитивный — 0% и трижды - негативный — 54,0%), однако полученные результаты статистически недостоверны. В тоже время, 5-летняя выживаемость без признаков прогрессирования у подтипа А составила 81,8% (Таблица 10,

Рисунок 5) статистически значимо превысила показатели Her2 (+) позитивного подтипа, $p=0.027$).

Таблица 10 - Отдаленные результаты лечения различных молекулярных подтипов РМЖ

Отдаленные результаты	Люминаль- ный А	В-Her2 негативный	В-Her2- позитивный	Нелюминаль- ный Her2+	Трижды - негативный
	(n=19)	(n=13)	(n=23)	(n=5)	(n=10)
	Абс (%)	Абс (%)	Абс (%)	Абс (%)	Абс (%)
Смертность	1 (5,3%)	2 (15,4%)	4 (17,4%)	2 (40,0%)	3 (30,0%)
Прогрессирование	2 (10,5%)	2 (15,4%)	5 (21,7%)	2 (40,0%)	3 (30,0%)
Локальный рецидив	1 (5,3%)	-	1 (4,4%)	-	-
Отдаленные метастазы	1 (5,3%)	2 (15,4%)	4 (17,4%)	2 (40,0%)	3 (30,0%)
Общая выживаемость (%±δ)					
3-летняя	90,9±8,7	90,9±8,7	95,7±4,3	60,0±21,9	72,0±17,8
5-летняя	90,9±8,7	78,6±13,9	87,0±9,1	-	54,0±20,5
10-летняя	90,9±8,7	78,6±13,9	63,4±15,8	-	54,0±20,5
Медиана, мес	не достигнута	не достигнута	не достигнута	не достигнута	не достигнута
Выживаемость без прогрессирования РМЖ (%±δ)					
3-летняя	90,9±8,7	91,7±8,0	83,6±8,8	53,3±24,8	72,0±17,8
5-летняя	81,8±11,6	77,9±14,1	83,6±8,8	-	54,0±20,5
10-летняя	81,8±11,6	77,9±14,1	62,7±14,4	-	54,0±20,5
Медиана, мес	не достигнута	не достигнута	не достигнута	не достигнута*	не достигнута
* различия достоверны по сравнению с подтипом А, $p=0,027$					

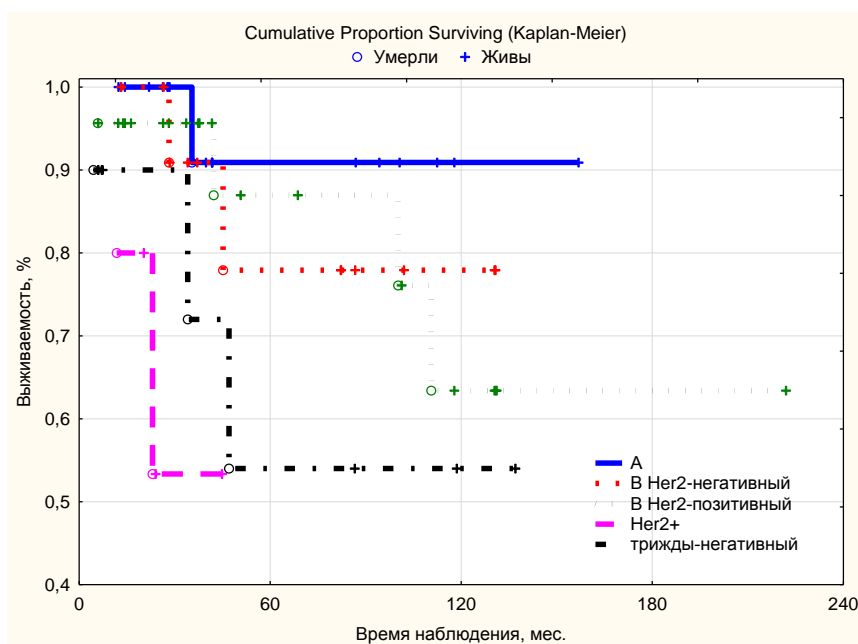


Рисунок 4 - Общая выживаемость больных РМЖ различных молекулярных подтипов

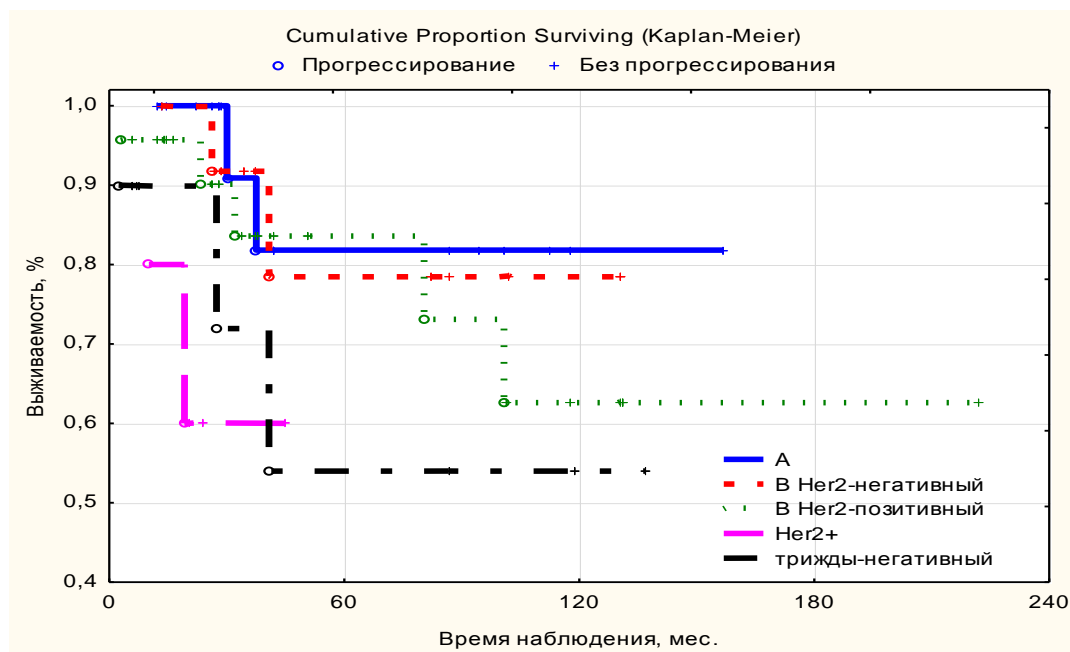


Рисунок 5 - Выживаемость без прогрессирования различных молекулярных подтипов РМЖ

Люминальный подтип А характеризовался статистически значимыми минимальными уровнями смертности больных (5,3%) и прогрессирования заболевания (10,5%). Максимальной общей выживаемости (5- и 10-летняя) достигли 90,9% и выживаемости без прогрессирования заболевания (5- и 10-летняя) достигли 81,8%.

Для выявления факторов, повлиявших на общую выживаемость и выживаемость без признаков прогрессирования РМЖ, мы провели регрессионный анализ по Коксу (Cox), результаты которого представлены в таблицах 11 и 12.

Проанализировали ряд основных параметров, включая:

- возраст больных и их распределение по возрастным группам, сформированным как с учетом 10-летнего периода;
- T-, N-, G-критерии и общую стадию РМЖ;
- морфологическую форму рака;
- наличие маркеров Her2 и высокий индекс Ki-67;
- молекулярный подтип РМЖ (люминальный А, люминальный В-Her2(-) негативный, люминальный В-Her2(+) позитивный, нелюминальный Her2 (+) позитивный, трижды-негативный); а также люминальный/нелюминальный:
- объем проведенного лечения с учетом всех видов лечения;

- метилирование промоторных CpG-островков 10 генов микроРНК.

Таблица 11 - Зависимость общей выживаемости больных РМЖ от возрастных и клинико-молекулярно-морфологических факторов

Фактор	p	HR	95% CI	
Возраст	0,5995	0,98	0,92	1,05
Возрастная группа (по 10 лет)	0,7197	0,90	0,50	1,62
Возрастная группа (младше и старше 50 лет)	0,4770	0,66	0,21	2,06
T-стадия РМЖ (1-4)	0,0047	2,21	1,28	3,83
Общая стадия РМЖ (I,II,III,IV)	0,0013	6,35	2,05	19,67
Общая стадия РМЖ (I/IIa/IIb/IIIa/IIIb/IIIc/IV)	0,0005	2,81	1,56	5,04
G (степень злокачественности)	0,2243	2,02	0,65	6,32
Морфологическая форма РМЖ	0,8822	0,93	0,35	2,44
Объем лечения (комбинированное/комплексное)	<u>0,0584</u>	3,00	0,96	9,33
Объем лечения (стандартное/нестандартное)	0,538	0,70	0,23	2,18
Вид хирургического лечения (РМЭ/радикальная резекция)	0,2302	0,29	0,04	2,21
Адьювантная ЛТ (нет/да)	0,386	1,65	0,53	5,14
Наличие Her2 (нет/да)	0,4957	1,48	0,48	4,61
Уровень Ki-67(нет/да)	0,4162	1,88	0,41	8,62
Молекулярный подтип РМЖ люминальный/нелюминальный	0,0349	1,38	1,02	1,87
<i>miR-124a-1</i>	0,7831	1,24	0,27	5,70
<i>miR-124a-2</i>	0,8536	0,88	0,24	3,29
<i>miR-124a-3</i>	0,5275	1,46	0,45	4,68
<i>miR-125b-1</i>	0,2110	2,09	0,66	6,64
<i>miR-127</i>	0,2536	1,94	0,62	6,02
<i>miR-137</i>	<u>0,0816</u>	2,91	0,87	9,71
<i>miR-203a</i>	<u>0,0916</u>	0,17	0,02	1,33
<i>miR-375</i>	0,1191	0,35	0,09	1,31
<i>miR-130b</i>	0,3111	1,81	0,57	5,74
<i>miR-107</i>	0,3073	1,87	0,56	6,23

Проведенный нами регрессионный анализ показал, что на общую выживаемость больных РМЖ повлияли 5 статистически значимых факторов и 4

на уровне тенденции (таблица 11). Приводим их в порядке снижения уровня значимости:

- 1) общая стадия — I/IIa/IIb/IIIa/IIIb/IIIc/IV
- 2) общая стадия — I/II/III/IV
- 3) T-стадия
- 4) люминальный/нелюминальный
- 5) Молекулярный подтип РМЖ
- 6) Объем лечения (комбинированное/комплексное)
- 7) Адьювантная ЛТ (нет/да)
- 8) *miR-137*
- 9) *miR-203a*

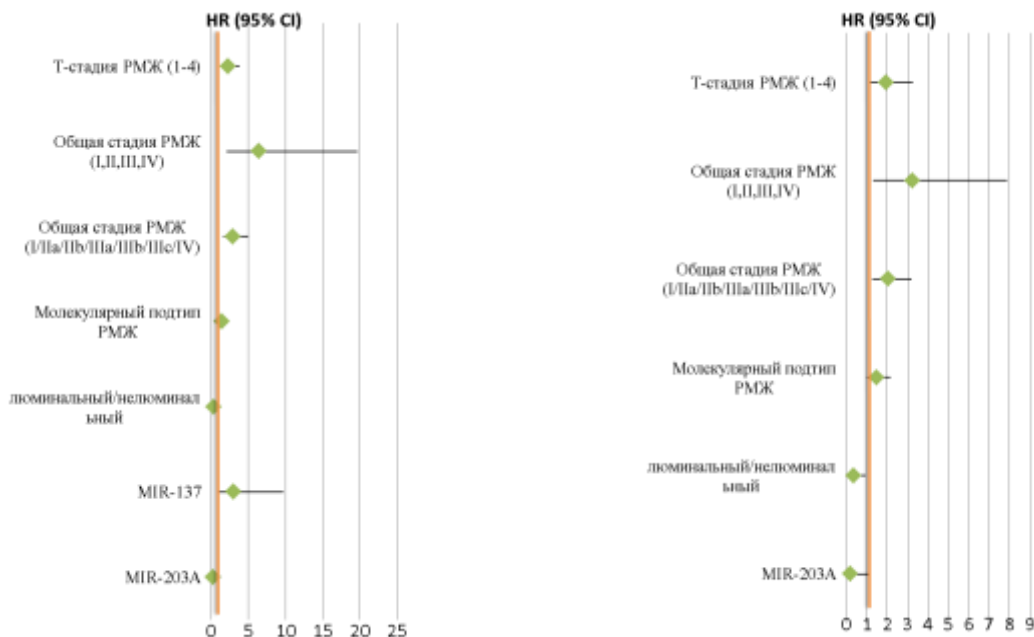
Таблица 12 - Зависимость выживаемости больных без признаков прогрессирования РМЖ от возрастных и клиничко-молекулярно-морфологических факторов

Фактор	p	HR	95% CI	
Возраст	0,2545	0,97	0,91	1,02
Возрастная группа (по 10 лет)	0,3709	0,78	0,45	1,35
Возрастная группа (младше и старше 50 лет)	0,1438	0,45	0,16	1,31
T-стадия РМЖ (1-4)	0,0136	1,93	1,14	3,25
Общая стадия РМЖ (I,II,III,IV)	0,0109	3,21	1,31	7,88
Общая стадия РМЖ (I/IIa/IIb/IIIa/IIIb/IIIc/IV)	0,0034	2,01	1,26	3,20
G (степень злокачественности)	0,2700	1,83	0,63	5,32
Морфологическая форма РМЖ	0,8444	0,91	0,35	2,36
Объем лечения (комбинированное/комплексное)	0,1261	2,29	0,79	6,61
Объем лечения (стандартное/нестандартное)	0,473	0,68	0,24	1,95
Вид хирургического лечения (РМЭ/радикальная резекция)	0,8871	0,91	0,25	3,27
Адьювантная ЛТ (нет/да)	0,294	1,75	0,62	5,01
Наличие Her2 (нет/да)	0,3692	1,62	0,57	4,62
Уровень Ki-67(нет/да)	0,5096	1,54	0,43	5,53
Молекулярный подтип РМЖ люминальный/нелюминальный	0,0510	1,47	1,00	2,17
	0,0402	0,32	0,11	0,95

<i>miR-124a-1</i>	0,8754	0,90	0,25	3,27
<i>miR-124a-2</i>	0,7468	0,81	0,22	2,92
<i>miR-124a-3</i>	0,4488	1,51	0,52	4,42
<i>miR-125b-1</i>	0,2697	1,82	0,63	5,29
<i>miR-127</i>	0,4167	1,55	0,54	4,49
<i>miR-137</i>	0,1797	2,07	0,72	5,98
<i>miR-203a</i>	<u>0,0673</u>	0,15	0,02	1,15
<i>miR-375</i>	0,4573	0,66	0,22	1,98
<i>miR-130b</i>	0,1085	2,45	0,82	7,33
<i>miR-107</i>	0,1254	2,36	0,79	7,06

На выживаемость больных без признаков прогрессирования РМЖ статистически значимо повлияли 4 фактора (таблица 12) и 2 на уровне тенденции:

- 1) общая стадия — I/IIa/IIb/IIIa/IIIb/IIIc/IV
- 2) общая стадия — I/II/III/IV
- 3) T-стадия
- 4) люминальный/нелюминальный подтип
- 5) Молекулярный подтип РМЖ
- 6) *miR-203a*



Общая выживаемость

Выживаемость без прогрессирования

Рисунок 6 – Величина влияющих факторов на ОВ и БРВ при однофакторном регрессионном анализе

Факторы, влияющие на выживаемость на уровне $p < 0,1$ при однофакторном анализе (значимые и с тенденцией к значимому влиянию), включены в многофакторный регрессионный анализ, выполненный методом пошагового исключения.

Для общей выживаемости получилась значимая (Хи-квадрат=28,7, $p=0,0001$) модель, включающая 4 независимых прогностических фактора (Таблица 13).

Таблица 13 - Многофакторный регрессионный анализ по Коксу зависимости ОВ от возрастных и клинико-молекулярно-морфологических факторов

	В	Стд. Ошибка	Вальд	р	HR	95% ДИ	
Молекулярный подтип РМЖ	1,548	0,478	10,499	0,001	4,700	1,843	11,984
Общая стадия РМЖ (I/IIa/IIb/IIIa/IIIb/IIIc/IV)	1,519	0,469	10,510	0,001	4,567	1,823	11,441
<i>miR-203a</i>	-4,396	1,413	9,675	0,002	0,012	0,001	0,197
<i>miR-137</i>	1,562	0,770	4,117	0,042	4,768	1,055	21,553

Соответственно, метилирование *miR-203a* увеличивает ОВ, снижая вероятность умереть. Напротив метилирование *miR-137* ухудшает прогноз.

Для выживаемости без прогрессирования получилась значимая (Хи-квадрат=22,2, $p=0,0001$) модель, включающая 3 независимых фактора (Таблица 14).

Таблица 14 - Многофакторный регрессионный анализ по Коксу зависимости ВБП от возрастных и клинико-молекулярно-морфологических факторов

	В	Стд. Ошибка	Вальд	р	HR	95% ДИ	
люминальный/нелюминальный	-1,768	0,605	8,532	0,003	0,171	0,052	0,559
Общая стадия РМЖ (I/IIa/IIb/IIIa/IIIb/IIIc/IV)	0,780	0,265	8,705	0,003	2,182	1,300	3,665
<i>miR-203a</i>	-2,800	1,090	6,600	0,010	0,061	0,007	0,515

3.2. Отдаленные результаты лечения РМЖ в зависимости от метилирования микроРНК

Для выявления влияния метилирования генов микроРНК на отдаленные результаты лечения РМЖ, мы провели корреляционный анализ с использованием Т-критерия Стьюдента для независимых выборок для общей выборки РМЖ, люминального и нелюминального рака, а также для каждого исследованного иммуногистохимического подтипа. В таблицах (табл. 15, 16, 17) статистически значимые ($p < 0,05$) коэффициенты корреляции Спирмена выделены жирно красным цветом.

Таблица 15 - Зависимость метилирования генов микроРНК с отдаленными результатами лечения для общей группы пациенток с РМЖ.

Ген	Смертность	Прогрессирование
<i>miR-124a-1</i>	0,08	0,03
<i>miR-124a-2</i>	0,02	-0,02
<i>miR-124a-3</i>	0,18	0,19
<i>miR-125b-1</i>	0,09	0,09
<i>miR-127</i>	0,20	0,14
<i>miR-137</i>	0,28	0,21
<i>miR-203a</i>	-0,17	-0,20
<i>miR-375</i>	-0,15	-0,06
<i>miR-130b</i>	0,20	0,28
<i>miR-107</i>	0,20	0,25

Выявлена корреляция гиперметилирования гена *miR-137* со смертностью пациентов (пациентки без метилирования – 9,1% (4/44), с метилированием – 30,8% (8/26); $p=0,024$). Также выявлена корреляция гиперметилирования генов *miR-130b* и *miR-107* с прогрессированием опухоли (11,4% (5/44) без метилирования против 34,6% (9/26) с метилированием ($p=0,022$) и 15,5% (9/58) против 41,7% (5/12), $p=0,05$, соответственно).

При разбиении общей группы РМЖ на люминальный и нелюминальный РМЖ нами была выявлена корреляция метилирования гена *miR-127* с увеличением смертности при люминальном РМЖ, а гена *miR-137* при нелюминальном (Таблица 16). В тоже время, при изучении влияния

метилирования на прогрессию опухоли было показано, что высокая частота метилирования в образцах с прогрессированием показана для генов *miR-130b* и *miR-107* при люминального РМЖ, а для гена *miR-137* при нелюминальном РМЖ.

Таблица 16 - Зависимость метилирования генов микроРНК с отдаленными результатами лечения для пациенток с люминальным и нелюминальным РМЖ

Ген	Люминальный		Нелюминальный	
	(n=55)		(n=15)	
	Смертность	Прогрессирование	Смертность	Прогрессирование
<i>miR-124a-1</i>	0,07	0,00	0,20	0,20
<i>miR-124a-2</i>	0,15	0,08	-0,28	-0,28
<i>miR-124a-3</i>	0,24	0,24	0,10	0,10
<i>miR-125b-1</i>	-0,02	-0,01	0,29	0,29
<i>miR-127</i>	0,36	0,26	-0,20	-0,20
<i>miR-137</i>	0,16	0,07	0,58	0,58
<i>miR-203a</i>	-0,20	-0,23	-0,20	-0,20
<i>miR-375</i>	-0,14	-0,03	0,00	0,00
<i>miR-130b</i>	0,24	0,34	0,21	0,21
<i>miR-107</i>	0,24	0,30	0,14	0,14

При рассмотрении отдельных подтипов РМЖ была выявлена корреляция частоты выявления метилирования гена *miR-127* с увеличением смертности при люминальном А, для гена *miR-124a-3* с увеличением смертности и прогрессией при В-Her2-позитивном, а для гена *miR-107* только с прогрессией при В-Her2-позитивном РМЖ (Таблица 17).

Таблица 17 - Зависимость метилирования генов микроРНК с отдаленными результатами лечения для пациенток отдельными иммуногистохимическими подтипами РМЖ

Ген	Люминальный А		В-Her2-негативный		В-Her2-позитивный		Her2+		трижды-негативный	
	(n=19)		(n=13)		(n=23)		(n=5)		(n=10)	
	Смертность	Прогрессирование	Смертность	Прогрессирование	Смертность	Прогрессирование	Смертность	Прогрессирование	Смертность	Прогрессирование
<i>miR-124a-1</i>	-0,34	-0,32	0,18	0,18	0,30	0,12	0,67	0,67	-0,05	-0,05
<i>miR-124a-2</i>	-0,20	-0,29	0,41	0,41	0,39	0,31			-0,33	-0,33
<i>miR-124a-3</i>	-0,14	-0,20	0,10	0,10	0,44	0,50	0,17	0,17	0,05	0,05
<i>miR-125b-1</i>	-0,20	0,05	0,10	0,10	-0,02	-0,13	0,17	0,17	0,43	0,43
<i>miR-127</i>	0,46	0,24	0,18	0,18	0,39	0,28	-0,17	-0,17	-0,33	-0,33
<i>miR-137</i>	-0,14	-0,20	0,39	0,39	0,15	0,06	1,00	1,00	0,36	0,36
<i>miR-203a</i>	-0,10	-0,15	-0,23	-0,23	-0,27	-0,31			-0,22	-0,22

<i>miR-375</i>	-0,18	0,09	-0,18	-0,18	-0,17	-0,04	0,61	0,61	-0,33	-0,33
<i>miR-130b</i>	0,28	0,40	0,18	0,18	0,29	0,39	0,17	0,17	0,22	0,22
<i>miR-107</i>	-0,06	-0,08	0,18	0,18	0,31	0,49	0,61	0,61	-0,22	-0,22

3.3. Анализ изменения частоты метилирования генов микроРНК в зависимости от клинико-морфологических параметров опухоли молочной железы

Используя Т-критерий Стьюдента для независимых выборок, нами был проведен анализ изменения частоты метилирования генов микроРНК *miR-107*, *miR-124a-1/2/3*, *miR-125b-1*, *miR-127*, *miR-130b*, *miR-137*, *miR-203a* и *miR-375* в зависимости от клинико-морфологических параметров опухоли молочной железы:

- возраст пациенток,
- Т-, N-, G- и общая стадия опухоли,
- гистологический тип опухоли,
- наличие Her2, Ki-67.

Для генов *miR-203a*, *miR-124a-1*, *miR-125b-1*, *miR-130b* статистически значимых корреляций найдено не было ни для одного из параметров. Также не было найдено статистически значимых различий в частоте метилирования исследованных генов микроРНК (*miR-203a*, *miR-375*, *miR-124a-1/2/3*, *miR-137*, *miR-130b*, *miR-107*, *miR-125b-1*) в зависимости от возраста пациенток и фенотипа РМЖ.

В то же время для генов *miR-127* и *miR-137* показано статистически значимое увеличение частоты метилирования на поздних III-IV стадиях по сравнению с I-II стадией ($R_s=0.503$, $p<0.001$ и $R_s=0.243$, $p<0.05$, соответственно) (Рисунок 7). Статистически значимо высокая частота метилирования показана для гена *miR-124a-2* и *miR-107* в образцах с низким уровнем дифференцировки клеток (G_{3-4}) ($R_s=0.245$, $p<0.05$ и $R_s=0.250$, $p<0.05$, соответственно) (Рисунок 8), для гена *miR-107* с гистологическим типом опухоли ($R_s=0.328$, $p<0.05$). Также статистически значимо высокая частота метилирования для гена *miR-127* связана

с увеличением размера опухоли ((T_1/T_2 против T_3), 10/56 против 11/14, $p=0,0018$), а для генов *miR-125b-1*, *miR-127*, *miR-137* с наличием метастазов в лимфатических узлах (N_0 против N_{1-2}) (9/28 против 25/42, $p=0.0302$; 0/28 против 21/42, $p<0.0001$; 6/28 против 20/42, $p=0.0425$, соответственно).

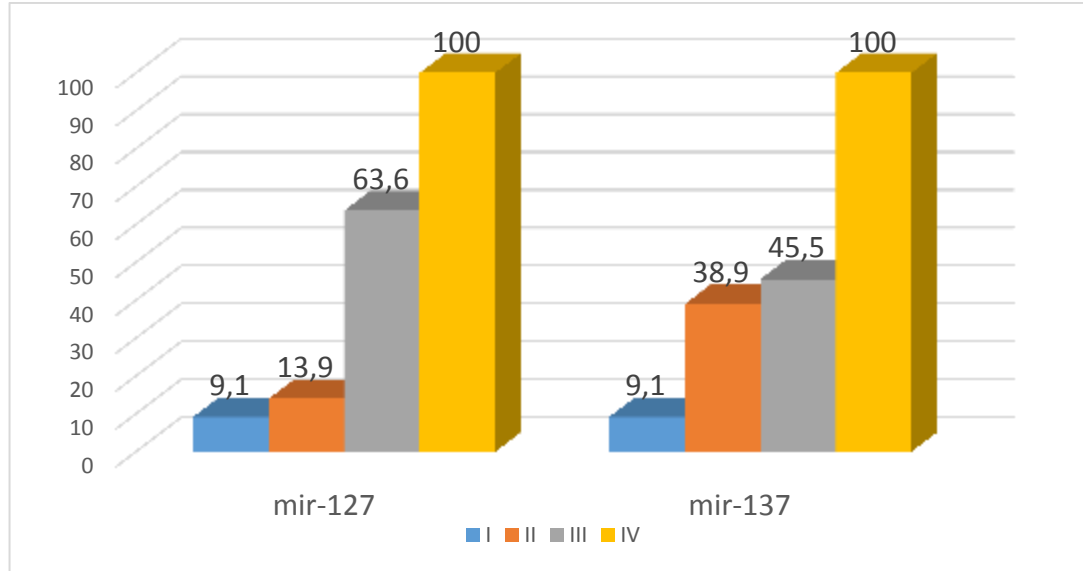


Рисунок 7 - Связь частоты метилирования генов микроРНК *miR-127* и *miR-137* со стадией онкологического процесса при РМЖ (Количество пациенток со стадией I-IV соответственно 11, 36, 22 и 1)

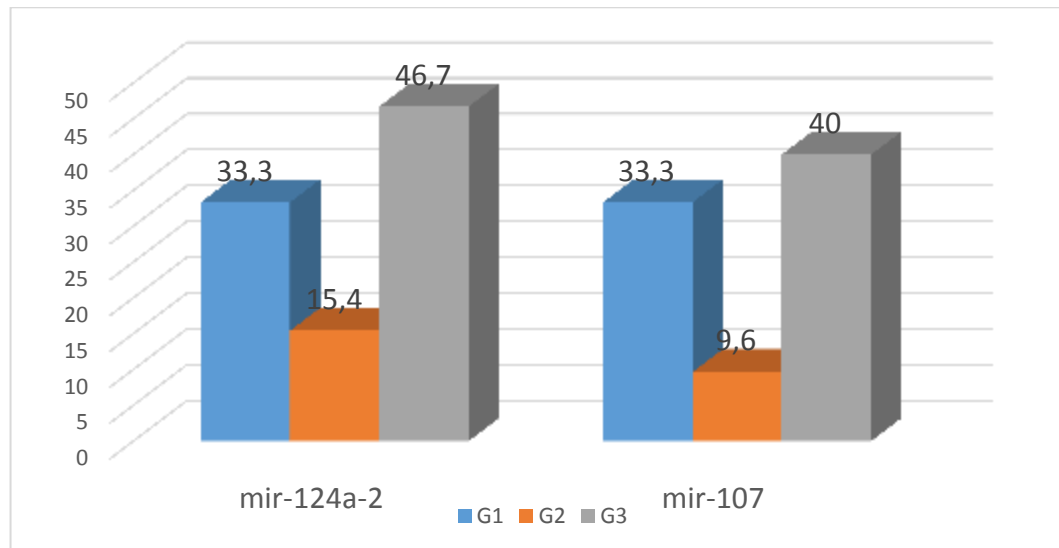


Рисунок 8 - Связь частоты метилирования генов микроРНК *miR-124a-2* и *miR-107* со степенью дифференцировки опухолевых клеток при РМЖ. Связь с G (Количество пациенток с G соответственно 3, 52 и 15).

Следует также отметить, что для ряда исследованных генов было найдено изменение частоты метилирования на уровне тенденции ($0.1 < p < 0.05$) для следующих клинических факторов:

- 1) со степенью дифференцировки (G) для *miR-127* ($R_s=0.220$)
- 2) с N (N_0 против N_{1-2}) для *miR-124a-3* (7/28 против 20/42)
- 3) гистологическим типом опухоли для *miR-375* ($R_s=0.222$);
- 4) с Ki-67 для *miR-124a-3* ($R_s=0.220$)

Полученные данные подтверждают участие метилирования группы генов микроРНК в эпигенетической модификации ДНК в опухолях молочных желез во время прогрессии и метастазирования.

ГЛАВА 4. ПРОФИЛИ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ МикроРНК ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

4.1. Результаты молекулярно-генетических исследований опухолевых образцов и гистологически неизмененных тканей молочных желез

Исследованы профили метилирования 10 генов микроРНК у которых были локализованы CpG-островки: *miR-107*, *miR-124a-1/2/3*, *miR-125b-1*, *miR-127*, *miR-130b*, *miR-137*, *miR-203a* и *miR-375*. Исследование выполнено на представительной выборке из 70 парных (опухоль/непораженная ткань молочной железы) образцов ДНК РМЖ с использованием метода метил-специфичной ПЦР с праймерами, специфичными к метилированным и неметилированным аллелям (Таблица 8, раздел «Материалы и методы»). При проведении МС-ПЦР, специфичной к неметилированному аллелю, продукт амплификации выявлен во всех анализированных образцах ДНК опухолей. Образование такого продукта при анализе ДНК первичных опухолей связывают, главным образом, с их загрязнением прилежащей гистологически нормальной тканью и нормальными клетками, составляющими микроокружение опухолевого очага, например, клетки иммунной системы и ассоциированные с опухолью фибробласты, составляющие значительную часть опухолевой массы. Поэтому данный тест не позволяет выявлять различия между опухолевой и нормальной тканью и служит только для подтверждения целостности ДНК (Рисунок 9).

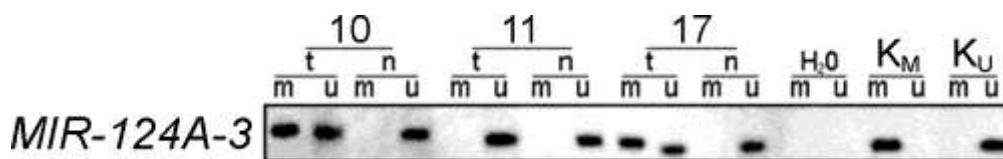


Рисунок 9 - Пример результатов МС-ПЦР при РМЖ (образцы 10, 11 и 17). МС-ПЦР проводили в парных (опухоль, Т / норма, N) образцах, приведены данные, полученные с праймерами к метилированным (М) и неметилированным аллелям (U). K_U - 100% положительный контроль отсутствия метилирования; K_M - 100% положительный контроль метилирования; H_2O – проба, не содержащая ДНК. Продукты МС-ПЦР разделяли в 2,5% агарозном геле.

Частоты встречаемости метилирования 10 исследованных генов микроРНК, представлены в таблице 18. Было показано, что частота метилирования генов микроРНК *miR-124a-1*, *-124a-3*, *-125b-1*, *-127*, *-137*, *-130b* в опухоли была статистически значимо выше ($p < 0,05$ по Фишеру), чем в образцах гистологически неизменной ткани молочной железы. Следует отметить, что частота метилирования для генов *miR-124a-1*, *-124a-3*, *-137*, *-130b* в гистологически неизменной ткани варьировала в диапазоне 10,0-27,1%. Такое повышение частоты метилирования гена в условной норме может означать, что события, выявленные нами на молекулярном уровне, опережают изменения происходящие на гистологическом уровне, и могут указывать на вовлеченность ткани близлежащей к опухоли в онкогенез. Можно предполагать, что метилирование этих генов относится к ранним событиям в патогенезе РМЖ. Эти данные также указывают на возможность применения метилирования этих генов для ранней диагностики РМЖ.

Таблица 18 - Частота метилирования генов микроРНК в парных образцах РМЖ и гистологически неизменной ткани молочной железы (n=70)

Ген	Ткань молочной железы				$p <$
	Опухолевая		Нормальная		
	абс.	%	абс.	%	
<i>miR-124a-1</i>	53	75,7	19	27,1*	$p < 0,05$
<i>miR-124a-2</i>	16	22,9	17	24,3	1,0000
<i>miR-124a-3</i>	27	38,6	7	10,0*	$p < 0,05$
<i>miR-125b-1</i>	34	48,6	4	5,7*	$p < 0,05$
<i>miR-127</i>	21	30,0	-	-*	$p < 0,05$
<i>miR-137</i>	26	37,1	14	20,0*	$p < 0,05$
<i>miR-203a</i>	17	24,3	16	22,9	1,0000
<i>miR-375</i>	29	41,4	20	28,6	0,1559
<i>miR-130b</i>	26	37,1	10	14,3*	$p < 0,05$
<i>miR-107</i>	12	17,1	7	10,0	0,3237

* различия достоверны по сравнению с нормальной тканью, $p < 0,05$

Таблица 19 - Величина статистически значимой взаимосвязи частот метилирования (кометилирования) микроРНК в тканях РМЖ

<i>miR-</i>	<i>124a-1</i>	<i>124a-2</i>	<i>124a-3</i>	<i>125b-1</i>	<i>127</i>	<i>137</i>	<i>107</i>
<i>124a-1</i>		0,308	-	-	-	0,297	-
<i>124a-2</i>	0,308		-	-	-	-	-
<i>124a-3</i>	-	-		0,242	-	0,302	-
<i>125b-1</i>	-	-	0,242		-	-	-
<i>127</i>	-	-	-	-		-	0,281
<i>137</i>	0,297	-	0,302	-	-		-
<i>107</i>	-	-	-	-	0,281	-	

*Показаны только статистически значимые результаты ($p < 0,05$)

Следует подчеркнуть, что гиперметилирование генов микроРНК *miR-125b-1* и *miR-127* при РМЖ показано впервые. В то же время изменение частоты метилирования для генов микроРНК *miR-124a-2*, *-203a*, *-375* и *-107* в опухоли по сравнению с гистологически неизменной тканью варьировало в диапазоне 0-1.7 раза и было статистически незначимо.

Далее нами были сопоставлены данные по конкордантному изменению статуса метилирования исследованных генов микроРНК с использованием выборки из 70 образцов РМЖ. Конкордантность данных оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмена и выявили статистически значимую взаимосвязь между (Таблица 19):

miR-124a-1 и *miR-124a-2*;

miR-124a-1 и *miR-137*;

miR-124a-3 и *125b-1*;

miR-124a-3 и *miR-137*;

miR-127 и *miR-107*.

Полученные данные по кометилированию исследованных микроРНК могут свидетельствовать о том, что данные микроРНК предположительно участвуют в регуляции одних и тех же процессов в клетке, нарушение которых может приводить к прогрессированию РМЖ. Так, например, *miR-124a-1*, *miR-124a-2* и *miR-137* могут участвовать в совместной регуляции пролиферации клеток,

вызывать остановку клеточного цикла в G_1 фазе и апоптоз, ингибировать миграцию и инвазию клеток, влиять на дифференцировку стволовых клеток [146; 140]. Таким образом, полученные пары можно использовать как маркер прогрессии РМЖ.

4.2. Результаты сравнения молекулярно-генетического статуса люминального и нелюминального РМЖ

Нами был проведен анализ статуса метилирования 10 генов микроРНК (*miR-107*, *miR-124a-1/2/3*, *miR-125b-1*, *miR-127*, *miR-130b*, *miR-137*, *miR-203a* и *miR-375*) в зависимости от иммуногистохимического статуса опухоли.

Как отмечено выше, у 55 больных был верифицирован люминальный РМЖ, у 15 пациенток – нелюминальный РМЖ (Her2 позитивный (Her2 (+), РЭ/РП–) и трижды - негативный). При сравнении групп пациенток с люминальным и нелюминальным РМЖ статистически значимых различий в частоте метилирования генов микроРНК (*miR-107*, *miR-124a-1/2/3*, *miR-125b-1*, *miR-127*, *miR-130b*, *miR-137*, *miR-203a* и *miR-375*) не было выявлено (Таблица 20). Следует отметить, что для *miR-375* была выявлена тенденции к увеличению частоты метилирования при люминальном РМЖ (47.3% против 20%, $p=0.077$).

Мы также проанализировали изменение частоты метилирования исследованных генов в парных образцах опухолевой и гистологически нормальной ткани молочных желез в отдельных группах с люминальным и нелюминальным гистотипом РМЖ (Таблица 20 и рисунок 10).

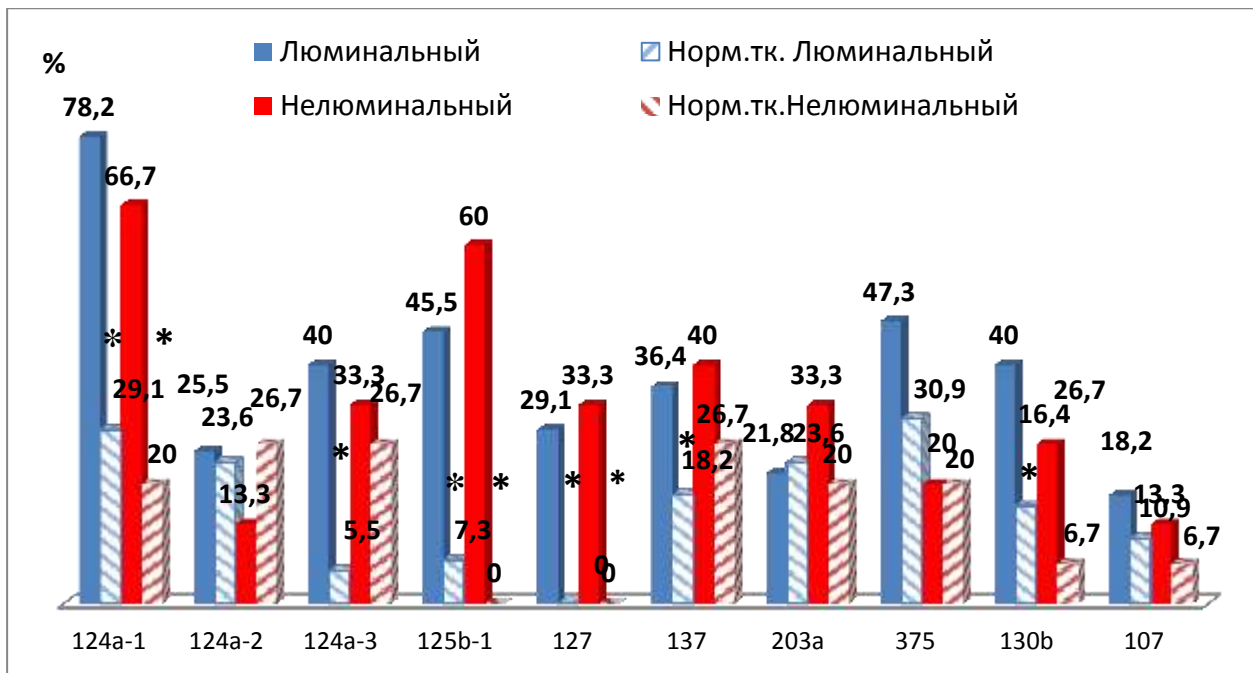


Рисунок 10 - Профиль метилирования генов микроРНК в образцах люминального и нелюминального РМЖ

Таблица 20 - Частота метилирования микроРНК в образцах люминального и нелюминального РМЖ

микро РНК	Люминальный, n=55			Нелюминальный, n=15		
	РМЖ	Нормальная ткань МЖ	p	РМЖ	Нормальная ткань МЖ	p
	Абс (%)	Абс (%)		Абс (%)	Абс (%)	
124a-1	43 (78,2%)	16 (29,1%)	0,00001	10 (66,7%)	3 (20,0%)	0,0253
124a-2	14 (25,5%)	13 (23,6%)	-	2 (13,3%)	4 (26,7%)	-
124a-3	22 (40,0%)	3 (5,5%)	0,00001	5 (33,3%)	4 (26,7%)	-
125b-1	25 (45,5%)	4 (7,3%)	0,00001	9 (60,0%)	0 (0,0%)	0,0021
127	16 (29,1%)	0 (0%)	0,00001	5 (33,3%)	0 (0,0%)	<u>0,0829</u>
137	20 (36,4%)	10 (18,2%)	<u>0,053</u>	6 (40,0%)	4 (26,7%)	-
203a	12 (21,8%)	13 (23,6%)	-	5 (33,3%)	3 (20,0%)	-
375	26 (47,3%)	17 (30,9%)	-	3 (20,0%)	3 (20,0%)	-
130b	22 (40,0%)	9 (16,4%)	0,0103	4 (26,7%)	1 (6,7%)	-
107	10 (18,2%)	6 (10,9%)	-	2 (13,3%)	1 (6,7%)	-

Нами были показаны статистически значимые ($p \leq 0.05$) различия в частоте метилирования генов микроРНК *miR-124a-1* и *miR-125b-1* в опухоли и гистологически неизменной ткани молочной железы независимо от иммуногистотипа (люминального и нелюминального). В тоже время мы показали

статистически значимое изменение частоты метилирования генов микроРНК *miR-124a-3* и *miR-130b* в опухоли относительно неизменной ткани только при люминальном РМЖ ($p=0.00001$ и $p=0.0103$, соответственно). Также при люминальном РМЖ отмечено увеличение частоты метилирования *miR-137* в опухоли по сравнению с неизменной тканью в 2 раза ($p=0.053$).

Далее нами были сопоставлены данные по конкордантному изменению статуса метилирования исследованных генов микроРНК с использованием коэффициента корреляции Спирмена у пациенток с люминальным (Таблица 21) и нелюминальным РМЖ (Таблица 22). Для люминального РМЖ были характерны взаимосвязь между генами

mir124a-1 и *mir124a-2*;

mir124a-2 и *mir107*;

mir124a-3 и *mir137*;

mir127 и *mir107*;

Таблица 21 - Величина статистически значимой взаимосвязи частоты метилирования генов микроРНК в образцах люминального РМЖ

	<i>124a-1</i>	<i>124a-2</i>	<i>124a-3</i>	<i>125b-1</i>	<i>127</i>	<i>137</i>	<i>203a</i>	<i>375</i>	<i>130b</i>	<i>107</i>
<i>124a-1</i>		0,309	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>124a-2</i>	0,309		-	-	-	-	-	-	-	0,266
<i>124a-3</i>	-	-		-	-	0,463	-	-	-	-
<i>125b-1</i>	-	-	-		-	-	-	-	-	-
<i>127</i>	-	-	-	-		-	-	-	-	0,321
<i>137</i>	-	-	0,463	-	-		-	-	-	-
<i>203a</i>	-	-	-	-	-	-		-	-	-
<i>375</i>	-	-	-	-	-	-	-		-	-
<i>130b</i>	-	-	-	-	-	-	-	-		-
<i>107</i>	-	0,266	-	-	0,321	-	-	-	-	

*показаны только статистически значимые результаты ($p<0.05$)

Для нелюминального РМЖ было найдено всего две значимые кометилируемые пары с высокой степенью конкордантности:

miR-124a-1 и *miR-137* ($R_s=0.577$, $p<0.001$);

miR-375 и *miR-107* ($R_s=0.784$, $p<0.0001$).

Таблица 22 – Величина статистически значимой взаимосвязи частоты метилирования генов микроРНК в образцах нелюминального РМЖ

	<i>124a-1</i>	<i>124a-2</i>	<i>124a-3</i>	<i>125b-1</i>	<i>127</i>	<i>137</i>	<i>203a</i>	<i>375</i>	<i>130b</i>	<i>107</i>
<i>124a-1</i>		-	-	-	-	0,577	-	-	-	-
<i>124a-2</i>	-		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>124a-3</i>	-	-		-	-	-	-	-	-	-
<i>125b-1</i>	-	-	-		-	-	-	-	-	-
<i>127</i>	-	-	-	-		-	-	-	-	-
<i>137</i>	0,577	-	-	-	-		-	-	-	-
<i>203a</i>	-	-	-	-	-	-		-	-	-
<i>375</i>	-	-	-	-	-	-	-		-	0,784
<i>130b</i>	-	-	-	-	-	-	-	-		-
<i>107</i>	-	-	-	-	-	-	-	0,784	-	

Полученные пары генов микроРНК можно использовать как дополнительные маркеры при дифференцировке люминального и нелюминального РМЖ.

4.3. Анализ изменения частоты метилирования генов микроРНК в подтипах РМЖ и поиск кометилируемых пар микроРНК при РМЖ

Из 55 образцов люминального РМЖ в 19 (34,5%) случаях установлен подтип А, в 13 (23,6%) – Her2-негативный подтип В, в 23 (41,8%) – Her2-позитивный подтип В. В то же время среди 15 образцов нелюминального РМЖ в 5 (33,3%) случаях установлен нелюминальный Her2 позитивный (Erb-B2 – сверхэкспрессирующий) РМЖ, в 10 (66,7%) случаев – трижды-негативный РМЖ. По результатам анализа частоты метилирования CpG-островков 10 генов микроРНК (*miR-107*, *miR-124a-1/2/3*, *miR-125b-1*, *miR-127*, *miR-130b*, *miR-137*, *miR-203a* и *miR-375*) в зависимости от подтипа РМЖ статистически значимые различия в частоте метилирования генов микроРНК в опухоли найдены только для *miR-375* (Таблица 23). Показано, что частота метилирования *miR-375* статистически значимо снижается в опухоли с трижды-негативным фенотипом в

сравнении с люминальным В Her2-негативным фенотипом РМЖ (20% против 69,2%, $p=0.036$). Отмечена маргинально значимая ($0.1 < p < 0.05$) ассоциация увеличения частоты метилирования гена *miR-124a-2* в образцах люминального А по сравнению с Her2-позитивным подтипом В ($p=0.097$). Следует так же отметить, что в образцах люминального А подтипа РМЖ частота метилирования *miR-137* и *miR-107* была в 2 и более раз ниже, чем в образцах с люминальным В подтипом.

Таблица 23 - Частота метилирования микроРНК в опухолевых образцах в зависимости от фенотипа РМЖ

ГЕН	Люминаль- ный А	Люминаль- ный В Her2 негативный	Люминаль- ный В Her2 позитивный	Нелюминаль- ный Her2 – позитивный	Трижды - негативный
	Абс (%)	Абс (%)	Абс (%)	Абс (%)	Абс (%)
<i>MIR</i>	19 (27,1%)	13 (18,6%)	23 (32,9%)	5 (7,1%)	10 (14,3%)
РМЖ					
<i>124a-1</i>	16 (84,2%)	11 (84,6%)	16 (69,6%)	3 (60,0%)	7 (70,0%)
<i>124a-2</i>	8 (42,1%)	2 (15,4%)	4 (17,4%)	0 (0,0%)	2 (20,0%)
<i>124a-3</i>	5 (26,3%)	5 (38,5%)	12 (52,2%)	2 (40,0%)	3 (30,0%)
<i>125b-1</i>	8 (42,1%)	5 (38,5%)	12 (52,2%)	2 (40,0%)	7 (70,0%)
<i>127</i>	4 (21,1%)	4 (30,8%)	8 (34,8%)	3 (60,0%)	2 (20,0%)
<i>137</i>	5 (26,3%)	7 (53,9%)	8 (34,8%)	2 (40,0%)	4 (40,0%)
<i>203a</i>	3 (15,8%)	3 (23,1%)	6 (26,1%)	0 (0,0%)	5 (50,0%)
<i>375</i>	7 (36,8%)	9 (69,2%)	10 (43,5%)	1 (20,0%)	2 (20,0%)
<i>130b</i>	8 (42,1%)	4 (30,8%)	10 (43,5%)	2 (40,0%)	2 (20,0%)
<i>107</i>	1 (5,3%)	4 (30,8%)	5 (21,7%)	1 (20,0%)	1 (10,0%)

*Жирным шрифтом в сером квадрате отмечен статистически значимый результат ($p \leq 0,05$).

При сравнении частоты метилирования в опухоли и гистологически неизменённой ткани молочной железы при люминальном А подтипе РМЖ было выявлено два статистически значимых изменения. Так, обнаружено статистически значимое увеличение частоты метилирования в опухоли для *miR-124a-1* и *miR-125b-1* в 2,3 и 8 раз соответственно (16/19 против 7/19, $p=0.0069$ и 8/19 против 1/19, $p=0.0189$) (Рисунок 11).



Рисунок 11 - Профиль метилирования генов микроРНК в образцах РМЖ и гистологически неизменной ткани молочной железы при люминальном А подтипе. * – статистически значимый результат ($p < 0.05$)

Как и в случае с общей выборкой, в поиске пар микроРНК были проанализированы результаты совместного метилирования микроРНК для люминального А гистотипа. Статистически значимые результаты были получены только для двух кометилируемых пар: *miR-127 – miR-107* ($R_s = 0.456$, $p < 0.01$) и *miR-124a-3 – miR-137* ($R_s = 0.457$, $p < 0.01$).

По результатам сравнительного анализа статуса метилирования в опухоли и гистологически неизменной ткани для люминального В подтипа РМЖ были построены диаграммы частоты метилирования исследованных генов (Рисунки 12, 13).

Нами были показаны общие статистически значимые ($p \leq 0.05$) различия в частоте метилирования генов микроРНК *miR-124a-1* и *miR-375* в опухоли и гистологически неизменной ткани молочной железы у пациенток с Her2-негативным (11/13 против 5/13, $p = 0.0414$, 9/13 против 3/13, $p = 0.0472$, соответственно) и Her2-позитивным подтипами люминального В рака молочной железы (16/23 против 4/23, $p = 0.0008$, 10/23 против 3/23, $p = 0.0472$).

В тоже время показаны и специфические изменения частот метилирования исследованных генов в подтипах люминального В рака молочной железы. Так,

статистически значимое увеличение частоты метилирования *miR-137* (7/13 против 1/13, $p=0.0302$) показано для Her2-негативного В типа РМЖ. Для Her2-позитивного В типа РМЖ показано статистически значимое увеличение частоты метилирования генов микроРНК: *miR-124a-3* (12/23 против 0/23, $p=0.0003$), *miR-125b-1* (12/23 против 1/23, $p=0.0006$), *miR-127* (8/23 против 0/23, $p=0.0226$), и *miR-130b* (10/23 против 2/23, $p=0.0165$).



Рисунок 12 - Профиль метилирования генов микроРНК в образцах РМЖ и гистологически неизменной ткани молочной железы при люминальном В Her2 – негативном подтипе

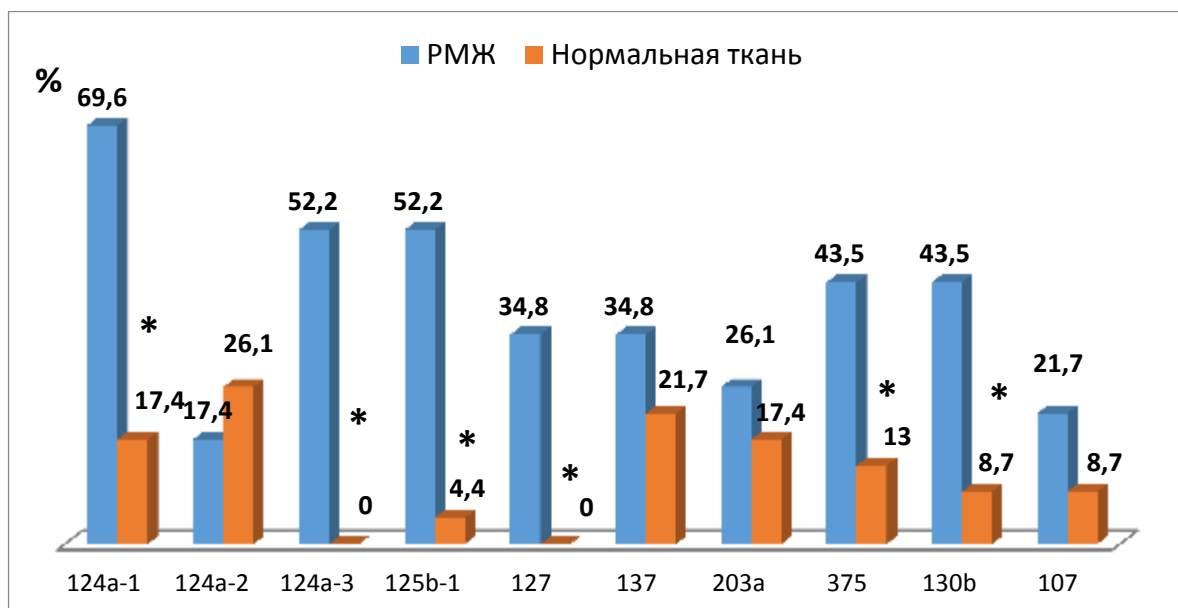


Рисунок 13 - Профиль метилирования генов микроРНК в образцах РМЖ и гистологически неизменной ткани молочной железы при люминальном В Her2 – позитивном подтипе.

По результатам анализа кометилирования микроРНК при люминальных В подтипах рака молочной железы было найдено 4 пары предположительно взаимодействующих микроРНК специфичных для каждого иммуногистотипа. Для Her2-негативного В типа РМЖ найдена как общая с люминальным А типом пара кометилируемых микроРНК *miR-124a-3* и *miR-137* ($R_s=0.732$, $p<0.0001$), так и уникальная – *miR-124a-2* и *miR-107* ($R_s=0.640$, $p<0.0001$). Для Her2-позитивного В типа РМЖ найдены свои специфичные пары: *miR-203a* – *miR-130b* ($R_s=0.478$, $p<0.01$) и *miR-375* – *miR-130b* ($R_s=0.469$, $p<0.01$).

Также нами был проанализирован статус метилирования 10 исследованных генов микроРНК в нелюминальных подтипах РМЖ. Для Her2 обогащенного подтипа статистически значимых различий найдено не было (Рисунок 14), что, по-видимому, связано с малым количеством образцов ($n=5$). Для трижды - негативного подтипа РМЖ статистически значимое различие в частоте метилирования опухолевых образцов относительно гистологически неизмененной ткани было показано для *miR-125b-1* (7/10 против 0/10, $p=0,0075$) (Рисунок 15).

При анализе кометилирования генов микроРНК при нелюминальных подтипах РМЖ выявлена единственная пара не встречающаяся в других подтипах РМЖ, а именно *miR-375* – *miR-107* ($R_s=0.667$, $p<0.0001$).

Таким образом, наши результаты можно рассматривать как маркеры для дифференцировки разных подтипов РМЖ, а именно люминального А, Her2-негативного В, Her2-позитивного В и трижды-негативного РМЖ.



Рисунок 14 - Профиль метилирования генов микроРНК в образцах РМЖ и гистологически неизменной ткани молочной железы при нелюминальном Her2 позитивном подтипе.

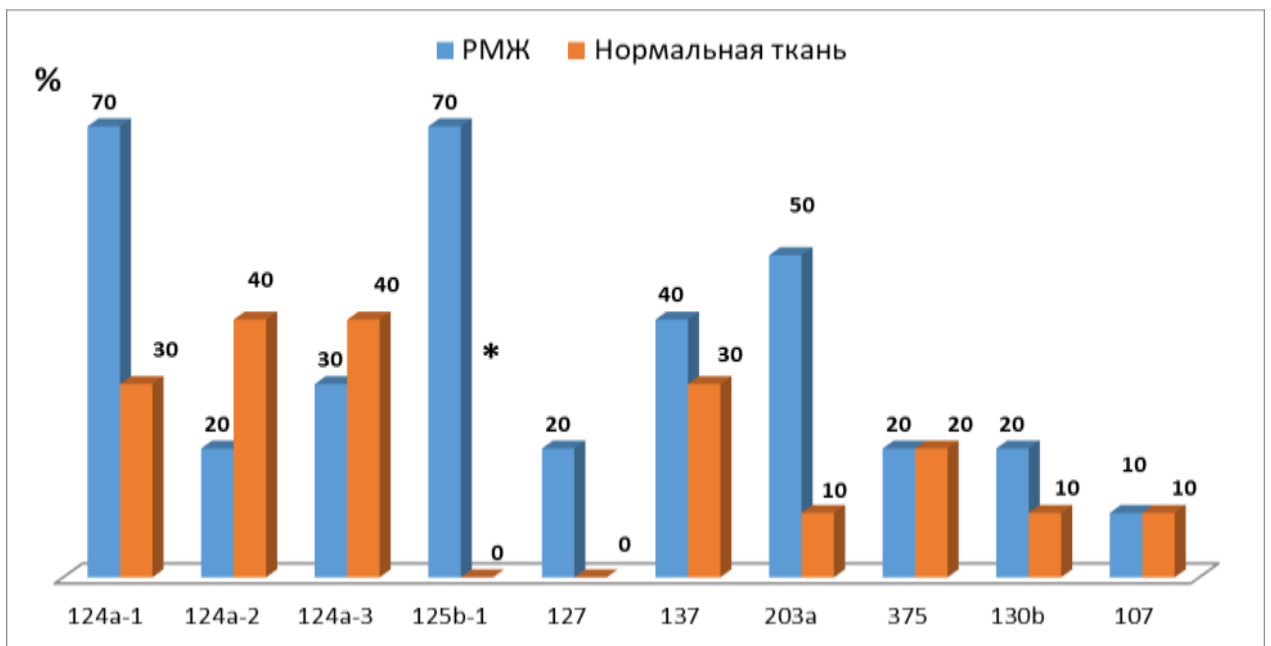


Рисунок 15 - Профиль метилирования генов микроРНК в образцах РМЖ и гистологически неизменной ткани молочной железы при трижды-негативном подтипе

ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Несмотря на успехи ранней диагностики и лечения, РМЖ остается лидером среди онкологических заболеваний у женщин и потенциально смертельной болезнью. Ежегодный стандартизированный показатель прироста заболеваемости в нашей стране за последние 10 лет составляет 1,8% [14].

Точные механизмы возникновения и развития опухолей в настоящее время не известны, поэтому меры первичной профилактики в группах риска развития РМЖ недостаточно эффективны [9; 17]. Исследования последних десятилетий свидетельствуют о гетерогенности РМЖ и широком спектре его морфологических и молекулярных подтипов. Длительное время заболевание классифицировали только по клинико-морфологическим параметрам. С конца 20 века для диагностики и выбора адекватного лечения используют молекулярные маркеры и мутации генов в геномах [126]. В 2009 г. предложена упрощенная (суррогатная) модель молекулярной классификации РМЖ по иммуногистохимическим маркерам, включающим экспрессию рецепторов эстрогенов (ER), прогестерона (PR), Her2 и уровня пролиферативной активности Ki-67 [28; 50].

Современная суррогатная модель молекулярно-генетической классификации РМЖ, основанная на показателях экспрессии ER, PR, Her2 и уровня пролиферативной активности Ki-67, включает следующие подтипы [6; 13; 19; 49; 92]:

- Люминальный А (высоко дифференцированный рак, ER(+), PR(+), Her2 (-), Ki-67<20%),
- Люминальный В: люминальный В-Her2 (-) негативный (низко дифференцированный рак, ER(+), PR(±), Her2 (-), Ki-67>20%);
люминальный В-Her2 (+) позитивный (ER(+), PR(±), Her2 (+), Ki-67 любой).
- Her2 обогащенный (экспрессирующий) (ER(-), PR(-), Her2 (+), Ki-67 любой),
- Трижды-негативный (ER(-), PR(-), Her2 (-), Ki-67 любой).

Люминальные А и В подтипы диагностируют примерно у 70% больных РМЖ, их отличает экспрессия рецепторов эстрогенов и/или прогестерона и потенциальная чувствительность к гормонотерапии [116].

Для улучшения диагностики и лечения рака молочной железы мы провели собственное клинико-лабораторное исследование и включили в него 70 женщин, больных РМЖ. Все пациентки прошли обследование и лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России в период с января 2004 г. по декабрь 2017 г.

Люминальный РМЖ диагностирован в 55 случаях:

подтип А – в 19;

В-Her2-негативный - в 13;

В-Her2-позитивный - в 23.

Другие молекулярные подтипы РМЖ — в 15: трижды-негативный — в 10 и Her2 (+) обогащенный – в 5.

Отсутствие статистически значимых различий между анализируемыми подтипами рака по возрасту больных и общей стадии РМЖ позволило нам провести сравнение результатов лечения; гормонального статуса больных по экспрессии рецепторов эстрогенов, прогестерона; молекулярно-генетического и эпигенетического статусов по частоте метилирования генов микроРНК.

Сравнение полученных нами результатов с данными литературы свидетельствует об их идентичности. В нашем исследовании доля подтипа А среди люминального РМЖ составила 34,5%. В литературе сообщается о 30-45% среди всех подтипов [6; 49; 92; 108]. При этом, как и в нашем исследовании, результаты разнятся в зависимости от стадии РМЖ. Так, среди T1a опухолей частота подтипа А составляет 66,7%, T1b — 47,8%, T1c — 31,4% [8].

По данным литературы, В-Her2-негативный вариант составляет примерно 70% подтипа В и имеет формальные признаки люминального А подтипа (ER+ и/или PR+, Her2-), отличаясь от него высоким пролиферативным потенциалом, обуславливающим неблагоприятный прогноз, практически аналогичный прогнозу

Her2-позитивного и трижды-негативного подтипов [108; 135]. В нашем исследовании частота В-Her2-негативного варианта составила 36,1% подтипа В.

Как и в исследованиях других авторов, в нашей работе люминальный подтип А был самым благоприятным вариантом РМЖ и отличался медленным ростом, низким риском рецидивов и смерти от прогрессирования заболевания [64; 101; 107]. У этого подтипа мы отметили максимальное время до прогрессирования — 58.6 мес. В литературе приведены аналогичные показатели. У подтипа А они соответствуют 55.4 мес, у подтипа В — 48.3 мес [89].

Аналогичны и уровни выживаемости: максимальные показатели у больных люминальным РМЖ подтипа А. Так, в нашем исследовании общая 5-летняя выживаемость таких пациенток составила 90,9%, пациенток с В-Her2-негативным РМЖ — 78,6%, с В-Her2-позитивным — 87,0%. По данным литературы, общая 5-летняя выживаемость больных люминальным Her2-негативным РМЖ составляет 96% [101; 105]. Проведенные ранее исследования свидетельствуют о связи Ki-67 с размером опухоли и лимфогенным метастазированием [97]. В публикации Viale и соавт. [131] сообщается об ассоциации высокого уровня Ki-67 с низкой безрецидивной выживаемостью. Проведенное нами исследование показало отсутствие статистически значимых различий результатов комплексного и комбинированного лечения больных люминальным РМЖ с аналогичным статусом Ki-67. При этом эффективность терапии люминального РМЖ напрямую зависела от экспрессии Ki-67 и была хуже у больных с высокой экспрессией Ki-67 за счет: достоверно более высокой частоты смертности пациентов и прогрессирования заболевания в виде развития отдаленных метастазов.

Наше исследование показало, что результаты лечения больных Ki-67-положительного В-Her2-позитивного РМЖ достоверно лучше по сравнению с В-Her2-негативным подтипом. Сравнение результатов лечения больных В-Her2-позитивных и Her2 (+) обогащенных подтипов не выявило статистически значимых различий.

Еще раз подчеркнем, что проведенное исследование подтверждает данные литературы об обнадеживающих результатах лечения люминального РМЖ

подтипа А. Как известно, одним из основных критериев выделения люминального РМЖ является наличие в опухолевой ткани рецепторов к эстрогенам и прогестерону. По сравнению с другими молекулярными подтипами РМЖ эстроген-позитивные (ER+) опухоли отличаются медленным развитием и низкой степенью злокачественности. В настоящее время уровень экспрессии ER, равный или превышающий 1%, служит показанием для эндокринотерапии с включением антиэстрогеновых препаратов, блокирующих рост опухоли. Так, тамоксифен (трифенилэтилен) может конкурирующим образом занимать рецептор-«ловушку» эстрогена, снижать транскрипцию генов, и, блокируя G₁-фазу клеточного цикла, замедлять пролиферацию опухолевых клеток. Ингибиторы ароматазы препятствуют синтезу эстрогенов из андрогенов, однако, учитывая способность стимулировать функцию яичников, в периоде пременопаузы их используют только в сочетании с овариальной супрессией. Больным с ER+/Her2+ в адьювантном режиме в соответствии с менструальным статусом дополнительно назначают цитотоксическую и анти-Her2 терапию. Учитывая высокий риск рецидива заболевания, показанием к адьювантной химиотерапии является наличие опухоли, соответствующей стадии T₄, метастазов в четырех и более лимфатических узлах и высокого уровня Ki-67 [16]. Согласно рекомендациям, принятым на конференции St. Gallen-2015, основные критерии для проведения овариальной супрессии после адьювантной химиотерапии — это наличие четырех и более метастазов в регионарных лимфатических узлах, возраст старше 35 лет и пременопаузальный уровень эстрогенов [18].

Рандомизированные клинические исследования неадьювантной гормонотерапии показали, что чувствительность эстроген- и прогестерон-позитивного (ER+/PR+) РМЖ к ингибиторам ароматазы составляет 40-60% [2], при этом чувствительность больных в пременопаузе ниже [37]. Анализ последних исследований неадьювантной эндокринотерапии люминального (ER+/PR+) и Her2-позитивного РМЖ свидетельствует, что одно иммуногистохимическое определение ER, PR и Her2-мишеней не позволяет в полной мере оценить

чувствительность опухоли к гормонотерапии. Необходимы дополнительные критерии и предиктивные маркеры.

Открытие селективных эстрогеновых рецепторов показало, что более 50% опухолей, ранее классифицируемых как рецептор-негативные, экспрессируют ER β , который может влиять на гормоночувствительность РМЖ с условно отрицательным статусом эстрогеновых рецепторов [88]. Однако результаты дальнейших исследований оказались не однозначными в отношении прогностической и предиктивной значимости ER β [90].

Как известно, течение РМЖ зависит от многих факторов, включая эпигенетические нарушения в генах микроРНК, ассоциированных с развитием опухоли. По разным оценкам, от 30 до 60 % генов человека являются мишенями микроРНК [136]. Нарушение экспрессии и регуляторной функции микроРНК может быть одним из ключевых процессов в развитии разных патологий, включая онкологические. Следует отметить, что метилирование генов микроРНК встречается в 5-6 раз чаще, чем белок-кодирующих генов [67]. Прежде всего, это касается микроРНК, относящихся к классу генов-супрессоров опухоли *miR-107*, *miR-124a-1/2/3*, *miR-125b-1*, *miR-127*, *miR-130b*, *miR-137*, *miR-203a* и *miR-375*.

Учитывая, что нарушение паттерна метилирования ДНК наблюдается на всех этапах канцерогенеза и может быть использовано для диагностики и прогнозирования течения РМЖ [66], мы изучили метилирование промоторных районов генов микроРНК *miR-107*, *miR-124a-1/2/3*, *miR-125b-1*, *miR-127*, *miR-130b*, *miR-137*, *miR-203a* и *miR-375* в парных образцах РМЖ и гистологически неизмененных тканей, которые считали условно нормальными.

Наше исследование показало, что частота метилирования генов микроРНК *miR-124a-1*, *miR-124a-3*, *miR-137*, *miR-127*, *miR-125b-1*, *miR-130b* в РМЖ составила соответственно 75.7%, 38,6%, 37.1%, 30.0%, 48.6% и 37.1% и во всех случаях была значимо выше, чем в образцах гистологически нормальной ткани ($p < 0.01$). Полученные данные аналогичны результатам мировых исследований [124; 42; 132].

Обращает внимание, что изменение частоты метилирования CpG-островков генов *miR-124a-2*, *-203a*, *-375* и *-107* в опухолевой ткани по сравнению с прилегающей гистологически нормальной тканью молочной железы статистически не значимо.

Достоверных различий частоты метилирования исследованных генов в зависимости от молекулярного подтипа РМЖ не найдено. В то же время, сравнение внутри отдельных подтипов РМЖ показало, что частота метилирования генов *miR-124a-1* (78.2%, $p=0.00001$), *miR-124a-3* (40.0%, $p=0.00001$), *miR-125b-1* (45.5%, $p=0.00001$), *miR-130b* (40.0%, $p=0.01$) в опухоли статистически значимо превышала показатели прилегающей нормальной ткани при люминальном РМЖ. Учитывая, что аналогичные данные литературы весьма противоречивы или отсутствуют, полученные нами результаты могут внести свой вклад в понимание роли генов микроРНК в развитие люминального РМЖ.

Наше исследование не выявило статистически значимых различий частот метилирования исследованных 10 генов микроРНК в образцах люминального РМЖ. Однако при сравнении отдельных иммуногистохимических подтипов между собой было показано статистически значимое снижение частоты метилирования гена *miR-375* в образцах с трижды-негативным по сравнению с Her2 негативным РМЖ ($p=0.036$). Следует также отметить увеличение частоты метилирования гена *miR-124a-2* в 2.5 раза и снижение частоты метилирования генов *miR-137* и *miR-107* в 2 и более раз в образцах РМЖ подтипа А (тенденция, $0.1 < p < 0,05$) по сравнению с В-подтипами.

Полученные нами результаты свидетельствуют о возможной связи данных генов с развитием люминального В подтипа РМЖ и согласуются с данными литературы [124; 132], что дает возможность рассматривать эти гены в качестве молекулярных маркеров неблагоприятного прогноза РМЖ.

Проведенный нами анализ статуса метилирования генов *miR-124a-1*, *miR-124a-3*, *miR-137*, *miR-127*, *miR-125b-1*, *miR-130b* с учетом патоморфологических характеристик РМЖ показал, связь повышения частоты метилирования генов *miR-127* и *miR-137* с общей стадией опухолевого процесса, генов *miR-124a-2* и

miR-107 со степенью дифференцировки клеток опухоли. Также статистически значимо высокая частота метилирования для гена *miR-127* была связана с увеличением размера опухоли, а для генов *miR-125b-1*, *miR-127*, *miR-137* с наличием метастазов в лимфатических узлах. Наши данные согласуются с результатами мировых исследований [124; 147].

В нашем исследовании проведен анализ смертности больных РМЖ в зависимости от метилирования генов микроРНК *miR-203a*, *-375*, *-124a-1/2/3*, *-137*, *-127*, *-125b-1*, *-130b*, *-107*. Данный анализ показал, что сильное влияние на увеличение смертности при нелюминальном РМЖ оказывает метилирование гена *miR-137*. В то же время метилирование генов *miR-127* и *miR-124a-3* оказывает влияние на смертность пациенток с люминальным А и В Her2-позитивном РМЖ, соответственно. Также по результатам этого анализа было показано, что метилирование гена *miR-107* связано с ранним прогрессированием РМЖ, гена *miR-137* с нелюминальным РМЖ, а гена *miR-124a-3* с В Her2-позитивным РМЖ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эпигенетические механизмы, в частности метилирование промоторных областей генов микроРНК, оказывают системное влияние на ключевые процессы и сигнальные пути в патогенезе рака. Учитывая, что нарушение паттерна метилирования ДНК наблюдается на всех этапах канцерогенеза и может быть использовано для диагностики и прогнозирования течения ряда опухолей, мы изучили метилирование промоторных районов 10 генов микроРНК. Наше исследование показало, что частота метилирования генов микроРНК *miR-124a-1*, *miR-124a-3*, *miR-137*, *miR-127*, *miR-125b-1*, *miR-130b* при РМЖ составила 75.7%, 38,6%, 37,1%, 30.0%, 48.6% и 37,1% соответственно и во всех случаях была достоверно выше, чем в образцах гистологически нормальной ткани ($p < 0,01$). Для *miR-127*, *miR-137*, *miR-125b-1* установлена ассоциация метилирования с параметрами прогрессирования РМЖ. Данные о повышенной частоте метилирования большинства из 10 изученных генов микроРНК, их связь с клиническими характеристиками опухоли, полученные в этой работе, указывают на онкосупрессорную функцию этих микроРНК при РМЖ, что может быть использовано для разработки методов ранней диагностики. Анализ кометилирования генов микроРНК установил пары микроРНК, которые могут служить маркером неблагоприятного прогноза РМЖ.

Таким образом, проведенное нами исследование показало статистически значимую высокую частоту метилирования генов *miR-124a-1*, *miR-124a-3*, *miR-137*, *miR-127*, *miR-125b-1*, *miR-130b* в эпителиальных опухолях молочной железы по сравнению с парными образцами гистологически нормальной ткани. Выявлены значимые корреляции частоты метилирования генов *miR-127*, *miR-137*, *miR-124a-2*, *miR-125b-1* и *miR-107* с клинико-морфологическими параметрами РМЖ. Впервые показана связь метилирования промоторного района *miR-375* с люминальным В фенотипом. Полученные нами данные об эпигенетических нарушениях дополняют «молекулярный портрет» РМЖ и вносят вклад в понимание его патогенеза. Выявленные особенности метилирования исследованных генов в дальнейшем могут быть использованы в разработке

современных подходов к прогнозированию, профилактике и выбору тактики лечения РМЖ.

Определены гены микроРНК, изменение метилирования которых ассоциировано с клиническими, патоморфологическими, гистологическими и иммуногистохимическими характеристиками образцов больных раком молочной железы – со стадией, степенью дифференцировки, размером опухоли, наличием или отсутствием метастазов, показателями гормональной зависимости (Her2 и PR) и пролиферации раковых клеток (Ki-67).

ВЫВОДЫ

1. Исследование метилирования промоторных CpG-островков 10 генов микроРНК выявило, что у 6 из них (*miR-124a-1*, *miR-124a-3*, *miR-137*, *miR-127*, *miR-125b-1*, *miR-130b*) метилирование в опухолях молочной железы статистически достоверно превышает таковое в гистологически нормальной ткани (75.7%, 38,6%, 37,1%, 30.0%, 48.6% и 37,1%, соответственно), ($p < 0,01$).

2. Показано, что метилирование генов *miR-127* и *miR-137* коррелирует со стадией заболевания, причем наблюдается с высокой частотой при поздних стадиях РМЖ, по сравнению с I-II стадией. ($R_s = 0.503$, $p < 0.001$ и $R_s = 0.243$, $p < 0.05$, соответственно).

3. Определены гены микроРНК (*miR-124a-2* и *miR-107*) увеличение частоты метилирования которых ассоциировано с такими клинико-патоморфологическими признаками, как низкая степень дифференцировки опухоли (G_3) ($R_s = 0,245$, $p < 0.05$ и $R_s = 0.250$, $p < 0.05$ соответственно), а гена *miR-127* с увеличением размера опухоли (T_1/T_2 против T_3), 10/56 против 11/14, $p = 0,0018$). Выявлена статистически значимая зависимость частоты метилирования генов *miR-125b-1*, *miR-127*, *miR-137* с наличием метастазов в лимфатических узлах (N_0 против N_{1-2}) (9/28 против 25/42, $p = 0.0302$; 0/28 против 21/42, $p < 0.0001$; 6/28 против 20/42, $p = 0.0425$, соответственно), что дает возможность рассматривать эти гены в качестве молекулярных маркеров неблагоприятного прогноза РМЖ.

4. На основе анализа 5-летней выживаемости больных РМЖ показано, что у пациентов с метилированием гена *miR-137* выживаемость снижается – 69,2% против 89,9%, ($p = 0,024$). У пациентов с метилированием *miR-130b* и *miR-107* прогрессирование заболевания отмечено 34,6% ($p = 0,022$) и 41,7% ($p = 0,054$), соответственно и наблюдалось чаще, чем у больных, у которых метилирования в этих генах не было (11,4% и 15,5%, соответственно).

5. Гены микроРНК, изменение метилирования которых достоверно коррелирует с клиническими, патоморфологическими, иммуногистохимическими параметрами опухолей молочной железы, могут быть предложены как маркеры

для диагностики, дифференциальной диагностики и прогнозирования течения РМЖ и требуют дальнейшего изучения в более крупных исследованиях.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
- ГТ — гормонотерапия
- ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
- ЗНО–злокачественные новообразование
- мРНК – матричная РНК (информационная РНК)
- МС-ПЦР —метил-специфичная полимеразная цепная реакция
- МТС - метастаз
- НМИЦ — национальный медицинский исследовательский центр
- ПЦФ — проточная цитофлуориметрия
- РМЖ — рак молочной железы
- РМЭ — радикальная мастэктомия
- РР — радикальная резекция
- ТТ — таргетная терапия
- ХТ — химиотерапия
- 3'-UTR - 3'-нетранслируемая область
- EGFR — рецептор эпидермального фактора роста
- ER — рецептор эстрогена
- Erb-B2 — ген рецептора эпидермального фактора роста
- ER α — рецептор эстрогена альфа
- ER β — рецептор эстрогена бета
- HER-2/neu — рецептор эпидермального фактора роста
- Ki-67 — индекс пролиферативной активности
- PR — рецепторы прогестерона
- RISC-комплекс (*RNA-Induced Silencing Complex*) – РНК-индуцированный комплекс сайленсинга
- ЛТ – лучевая терапия

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Богуш, Т.А. Количественная иммунофлуоресцентная оценка с использованием проточной цитофлуориметрии экспрессии эстрогеновых рецепторов β в солидных опухолях человека / Богуш Т.А., Шатурова А.С., Дудко Е.А. и др. // Вестн. Моск. ун-та, Сер. 2, Химия. 2011. Т. 52, № 4. С. 305-312.
2. Богуш, Т.А. Сравнительная оценка экспрессии эстрогеновых рецепторов бета в ткани немелкоклеточного рака легкого и метастазов в легком опухолей других первичных локализаций / Богуш Т.А., Шатурова А.С., Дудко Е.А. и др. // Доклады Академии Наук. 2014. Т. 454, № 6, С. 720-724.
3. Бурденный, А.М. Роль гиперметиличивания промоторных районов генов RASSF1A и MGMT в развитии рака молочной железы и яичников / Бурденный А.М., Челышева Д.С., Ходырев Д.С. и др. // Вестн. РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН. 2015. Т.26, №2. С. 39-44.
4. Гордеева, Л.А. Мутации в генах — супрессорах опухолевого роста и их связь с фенотипическими особенностями рака молочной железы у женщин молодого возраста / Гордеева Л.А., Лойко И.Е., Воронина Е.Н., Кутонова Е.Е., Поленок Е.Г., Мун С.А., Вержбицкая Н.Е., Васильченко И.Л., Филипенко М.Л., Глушков А.Н. // Экологическая генетика. – 2018. – Т. 16. – № 3. – С. 62–71.
5. Грабовой, А.Н. Гистологическая оценка ответа опухоли на химио-/лучевую терапию / Грабовой А.Н., Тарасова Т.О., Кошубарова М.В. // Клиническая онкология. 2012. Т. 6, № 2. С. 138-143.
6. Гришина, К.А. Молекулярно-генетические маркеры рака молочной железы / Гришина К.А., Музаффарова Т.А., Хайленко В.А., Карпухин А.В. // Опухоли женской репродуктивной системы. 2016. Т. 12, № 3. С. 36- 42.
7. Каприн, А.Д. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность) / А.Д. Каприн, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М. // МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2018. 250 с.

8. Колядина, И.В. Гетерогенность рака молочной железы I стадии: биологическое и прогностическое значение / Колядина И.В., Поддубная И.В., Франк Г.А. и др. // *Malignant Tumours*. 2015. № 1. С. 31-40.
9. Кулигина, Е.Ш. Эпидемиологические и молекулярные аспекты рака молочной железы / Кулигина Е.Ш. // *Практическая онкология*. 2010. Т. 11, № 4 (44). С. 203-216.
10. Логинов, В.И. Уровень метилирования гена RASSF1A в эпителиальных опухолях почки, молочной железы и яичников / Логинов В.И., Малюкова А.В., Серегин Ю.А. и др. // *Молекулярная биология*. 2004, 38 (4), 654-667.
11. Логинов, В.И. Метилирование генов микроРНК и онкогенез (Обзор) / Логинов В.И., Рыков С.В., Фридман М.В., Брага Э.А. // *Биохимия*. 2015. Т.80, № 2, С. 184-203.
12. Логинов, В.И. Супрессорные и гиперметилируемые микроРНК в патогенезе рака молочной железы / Логинов В.И., Филиппова Е.А., Куревлев С.В., Фридман М.В., Бурденный А.М., Брага Э.А. // *Генетика*, 2018, том 54, № 7, с. 757–775.
13. Моисеенко, В.М. Практические рекомендации по лекарственному лечению злокачественных опухолей (RUSSCO) / В.М. Моисеенко. // *Российское общество клинической онкологии*. 2015, 456 с. ISBN 978-5-9903154-5-7.
14. Рак молочной железы. Клинические рекомендации. Министерство здравоохранения Российской Федерации. — М., 2017. — 88 с.
15. Рожкова, Н.И. Диагностика и лечение рака молочной железы: что изменилось за 20 лет / Рожкова Н.И., Прокопенко С.П., Мазо М.Л. // *Гинекология. Эндокринология*. 2018; Т. 2, № 146, С. 35-40
16. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. ред. Н.И. Переводчикова. *Практическая медицина*. М., 2011. 512 с.
17. Семиглазов, В.Ф. Многоликая биология рака молочной железы: поиски адекватного лечения / Семиглазов В.Ф. // *Злокачественные опухоли*. 2016. Т. 3, № 19. С. 5-10.

18. Семиглазов, В.Ф. Общие рекомендации по лечению раннего рака молочной железы St. Gallen-2015, адаптированные экспертами Российского общества онкомамологов / Семиглазов В.Ф., Палтуев Р.М., Семиглазов В.В. и др. // Опухоли женской репродуктивной системы. 2015. Т. 11, № 3. С. 43-60.

19. Стенина, М.Б. Практические рекомендации по лекарственному лечению инвазивного рака молочной железы / Стенина М.Б., Жукова Л.Г., Королева И.А. и др. // Злокачественные опухоли. 2016. № 4, Спецвыпуск 2, С. 97-122.

20. Amin, AR.MR. Evasion of anti-growth signaling: A key step in tumorigenesis and potential target for treatment and prophylaxis by natural compounds / Amin ARM.R., Karpowicz P.A., Carey TE, Arbiser J, Nahta R, Chen ZG, Dong JT, Kucuk O, Khan GN, Huang GS, Mi S, Lee HY, Reichrath J, Honoki K, Georgakilas AG0, Amedei A, Amin A, Helferich B, Boosani CS, Ciriolo MR, Chen S, Mohammed SI, Azmi AS, Keith WN, Bhakta D, Halicka D, Niccolai E, Fujii H, Aquilano K, Ashraf SS, Newsheen S, Yang X, Bilslan A, Shin DM. // *Semin Cancer Biol.* 2015; 35 Suppl:S55-S77. doi: 10.1016/j.semcancer.2015.02.005.

21. Anglicheau, D. MicroRNAs: small RNAs with big effects / Anglicheau D., Muthukumar T., Suthanthiran M. // *Transplantation.* 2010; 90(2):105-12. doi: 10.1097/TP.0b013e3181e913c2.

22. Apaya, M.K. Integrated omics-based pathway analyses uncover CYP epoxygenase-associated networks as theranostic targets for metastatic triple negative breast cancer / Apaya M.K., Shiao J.Y., Liao G.S., Liang Y.J., Chen C.W., Yang H.C., Chu C.H., Yu J.C., Shyur L.F. // *J Exp Clin Cancer Res.* 2019; 38(1):187. doi: 10.1186/s13046-019-1187-y.

23. Apuri, S. Neoadjuvant and Adjuvant Therapies for Breast Cancer / Apuri S. // *South Med J.* 2017; 110(10):638-642. doi: 10.14423/SMJ.0000000000000703.

24. Aure, M.R. OSBREAC. Integrative clustering reveals a novel split in the luminal A subtype of breast cancer with impact on outcome / Aure M.R., Vitelli V., Jernström S., Kumar S., Krohn M., Due E.U., Haukaas T.H., Leivonen S.K., Vollan H.K., Lüders T., Rødland E., Vaske C.J., Zhao W., Møller E.K., Nord S., Giskeødegård

G.F., Bathen T.F., Caldas C., Tramm T., Alsner J., Overgaard J., Geisler J., Bukholm IR, Naume B, Schlichting E, Sauer T, Mills GB, Kåresen R, Mælandsmo GM, Lingjærde OC, Frigessi A, Kristensen VN, Børresen-Dale AL, Sahlberg KK // *Breast Cancer Res.* 2017; 19(1):44. doi: 10.1186/s13058-017-0812-y

25. Bado, I. ER β alters the chemosensitivity of luminal breast cancer cells by regulating p53 function / Bado I., Pham E., Soibam B., Nikolos F., Gustafsson J.A., Thomas C. // *Oncotarget.* 2018; 9(32):22509-22522. doi: 10.18632/oncotarget.25147

26. Benati, M. Evaluation of mir-203 Expression Levels and DNA Promoter Methylation Status in Serum of Patients with Endometrial Cancer / Benati M., Montagnana M., Danese E., Paviati E., Giudici S., Franchi M., Lippi G. // *Clin Lab.* 2017; 63(10):1675-1681. doi: 10.7754/Clin.Lab.2017.170421.

27. Bertoli, G. MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer / Bertoli G., Cava C., Castiglioni I. // *Theranostics.* 2015; 5(10):1122-43. doi: 10.7150/thno.11543.

28. Bhargava, R. Immunohistochemical surrogate markers of breast cancer molecular classes predicts response to neoadjuvant chemotherapy: a single institutional experience with 359 cases / Bhargava R., Beriwal S., Dabbsetal D.J. // *Cancer.* 2010. Vol. 116, N 6. P. 1431-1439;

29. Bi, L. MicroRNA-127-3p acts as a tumor suppressor in epithelial ovarian cancer by regulating the BAG5 gene // Bi L., Yang Q., Yuan J., Miao Q., Duan L., Li F., Wang S. // *Oncol Rep.* 2016; 36(5):2563-2570. doi: 10.3892/or.2016.5055.

30. Biswal, A. The Effect of the New Eighth Edition Breast Cancer Staging System on 100 Consecutive Patients / Biswal A., Erler J., Qari O., Topilow A.A., Gupta V., Hossain M., Asif A., Erler B., Johnson Miller D. // *J Clin Med Res.* 2019; 11(6):407-414. doi: 10.14740/jocmr3803.

31. Bray, F. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R.L., Torre LA, Jemal A. // *CA Cancer J Clin.* 2018; 68(6): 394-424. doi: 10.3322/caac.21492.

32. Bustamante Eduardo, M. Characterization of molecular scores and gene expression signatures in primary breast cancer, local recurrences and brain metastases / Bustamante Eduardo M., Popovici V., Imboden S., Aebi S., Ballabio N., Altermatt H.J., Günthert A., Jaggi R. // *BMC Cancer*. 2019; 19(1):549. doi: 10.1186/s12885-019-5752-8.
33. Cen, D. BI-RADS 3-5 microcalcifications can preoperatively predict breast cancer HER2 and Luminal a molecular subtype / Cen D., Xu L., Li N., Chen Z., Wang L., Zhou S., Xu B., Liu C.L., Liu Z., Luo T. // *Oncotarget*. 2017; 8(8):13855-13862. doi: 10.18632/oncotarget.14655.
34. Cheang, M.C. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer / Cheang M.C., Chia S.K., Voduc D. et al. // *J. Natl. Cancer Inst.* 2009. Vol. 101, N 10. P. 736-750.
35. Chen, Y.F. miR-125b suppresses oral oncogenicity by targeting the anti-oxidative gene PRXL2A / Chen Y.F., Wei Y.Y., Yang C.C., Liu C.J., Yeh L.Y., Chou C.H., Chang K.W., Lin S.C. // *Redox Biol.* 2019; 22:101140. doi: 10.1016/j.redox.2019.101140.
36. Cherbal, F. Distribution of molecular breast cancer subtypes among Algerian women and correlation with clinical and tumor characteristics: a population-based study / Cherbal F., Gaceb H., Mehemmai C., Saiah I., Bakour R., Rouis A.O., Boualga K., Benbrahim W., Mahfouf H. // *Breast Dis.* 2015; 35(2):95-102. doi: 10.3233/BD-150398.
37. Colleoni, M. Debate: The biology of breast cancer in young women is unique / Colleoni M., Anders C.K. // *Oncologist*. 2013. Vol. 18, N 4, P. 13-15.
38. Datta, J. microRNA-107 functions as a candidate tumor-suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma by downregulation of protein kinase C ϵ / Datta J., Smith A., Lang J.C., Islam M., Dutt D., Teknos T.N., Pan Q. // *Oncogene*, 2012, 31, 4045-4053.
39. Ellis, M. Lessons in precision oncology from neoadjuvant endocrine therapy trials in ER+ breast cancer / Ellis M. // *Breast*. 2017. Suppl. 1. P. 104-107. doi: 10.1016/j.breast.2017.06.039.

40. Ferguson, N.L. Prognostic value of breast cancer subtypes, Ki-67 proliferation index, age, and pathologic tumor characteristics on breast cancer survival in Caucasian women / Ferguson N.L., Bell J., Heidel R., Lee S., Vanmeter S., Duncan L., Munsey B., Panella T., Orucevic A. // *Breast J.* 2013; 19(1):22-30. doi: 10.1111/tbj.12059.
41. Fettig, L.M. Cross talk between progesterone receptors and retinoic acid receptors in regulation of cytokeratin 5-positive breast cancer cells / Fettig L.M., McGinn O., Finlay-Schultz J., LaBarbera D.V., Nordeen S.K., Sartorius C.A. // *Oncogene.* 2017; 36(44):6074-6084. doi: 10.1038/onc.2017.204.
42. Filippova, E.A. A Group of Hypermethylated miRNA Genes in Breast Cancer and Their Diagnostic Potential / Filippova E.A., Loginov V.I., Pronina I.V., Khodyrev D.S., Burdennyaya A.M., Kazubskaya T.P., Braga E.A. // *Mol Biol (Mosk).* 2019; 53(3):421-429. doi: 10.1134/S0026898419030054.
43. Finnerty, J.R. The miR-15/107 group of microRNA genes: evolutionary biology, cellular functions, and roles in human diseases / Finnerty J.R., Wang W.X., Hébert S.S., Wilfred B.R., Mao G., Nelson P.T. // *J. Mol. Biol.*, 2010, 402, 491-509.
44. Fraser, J. Interplay of autophagy, receptor tyrosine kinase signalling and endocytic trafficking / Fraser J., Cabodevilla A.G., Simpson J., Gammoh N. // *Essays Biochem.* 2017; 61(6):597-607. doi: 10.1042/EBC20170091.
45. Furuta, M. MiR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma / Furuta M., Kozaki K.I., Tanaka S., Arii S., Imoto I., Inazawa J. // *Carcinogenesis*, 2010, 31, 766–776.
46. Gaetano Santulli. Editor microRNA / Gaetano Santulli. // *Basic Science From Molecular Biology to Clinical Practice* 2015, 267p.
47. Gao, J.J. Luminal A Breast Cancer and Molecular Assays: A Review / Gao J.J., Swain S.M // *Oncologist.* 2018; 23(5):556-565. doi: 10.1634/theoncologist.2017-0535.
48. Girgert, R. Estrogen Signaling in ER α -Negative Breast Cancer: ER β and GPER / Girgert R., Emons G., Gründker C. // *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019; 9: e781. doi: 10.3389/fendo.2018.00781.

49. Gluz, O. Genomic profiling in luminal breast cancer / Gluz O., Hofmann D., Würstlein R. et al. // *Breast Care (Basel)*. 2013. Vol. 8, N 6. P. 414-422. doi: 10.1159/000357535.
50. Goldhirsch, A. Strategies for subtypes – dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011 / Goldhirsch A., Wood W.C., Coates A.S. et al. // *Ann. Oncol.* 2011. Vol. 22, N 8, P.1736-1747.
51. Gul, A. A combination of the PI3K pathway inhibitor plus cell cycle pathway inhibitor to combat endocrine resistance in hormone receptor-positive breast cancer: a genomic algorithm-based treatment approach / Gul A., Leyland-Jones B., Dey N., De P. // *Am J Cancer Res*. 2018; 8(12):2359-2376.
52. Harada, T. Analysis of DNA methylation in bowel lavage fluid for detection of colorectal cancer / Harada T., Yamamoto E., Yamano H.O., Nojima M., Maruyama R., Kumegawa K., Ashida M., Yoshikawa K., Kimura T., Harada E., Takagi R., Tanaka Y., Aoki H., Nishizono M., Nakaoka M., Tsuyada A., Niinuma T., Kai M., Shimoda K., Shinomura Y., Sugai T., Imai K., Suzuki H. // *Cancer Prev Res (Phila)*. 2014 Oct; 7(10):1002-10.
53. He, Z. Stratification of Breast Cancer by Integrating Gene Expression Data and Clinical Variables / He Z., Zhang J., Yuan X., Xi J., Liu Z., Zhang Y. // *Molecules*. 2019; 24(3), pii: E631. doi: 10.3390/molecules24030631.
54. Holleczeck, B. Risk of loco-regional recurrence and distant metastases of patients with invasive breast cancer up to ten years after diagnosis - results from a registry-based study from Germany / Holleczeck B. Stegmaier C., Radosa J.C., Solomayer E.F., Brenner H. // *BMC Cancer*. 2019; 19(1):520. doi: 10.1186/s12885-019-5710-5.
55. Hu, W.L. Identification of prognostic signature in cancer based on DNA methylation interaction network / Hu W.L., Zhou X.H. // *BMC Med Genomics*. 2017; 10(Suppl 4):63. doi: 10.1186/s12920-017-0307-9.

56. Hussain, S. Cancer drug resistance: A fleet to conquer / Hussain S., Singh A., Nazir S.U., Tulsyan S., Khan A., Kumar R., Bashir N., Tanwar P., Mehrotra R. // *J Cell Biochem.* 2019. doi: 10.1002/jcb.28782.
57. Inic, Z. Difference between Luminal A and Luminal B Subtypes According to Ki-67, Tumor Size, and Progesterone Receptor Negativity Providing Prognostic Information / Inic Z., Zegarac M., Inic M., Markovic I., Kozomara Z., Djuriscic I., Inic I., Pupic G., Jancic S. // *Clin Med Insights Oncol.* 2014; 8:107-11. doi: 10.4137/CMO.S18006.
58. Inoue, T. Clinicopathological and prognostic significance of microRNA-107 and its relationship to DICER1 mRNA expression in gastric cancer / Inoue T., Inuma H., Ogawa E., Inaba T., Fukushima R. // *Oncol. Rep.*, 2012, 27, 1759-1764.
59. Ji, H. miR-124 regulates EMT based on ZEB2 target to inhibit invasion and metastasis in triple-negative breast cancer / Ji H., Sang M., Liu F., Ai N., Geng C. // *Pathol Res Pract.* 2019 Apr;215(4):697-704. doi: 10.1016/j.prp.2018.12.039.
60. Jonsson, P. Support of a bi-faceted role of estrogen receptor β (ER β) in ER α -positive breast cancer cells / Jonsson P., Katchy A., Williams C. // *Endocr Relat Cancer.* 2014; 21(2):143-60. doi: 10.1530/ERC-13-0444.
61. Jóźwik, M. Breast cancer in an 18-year-old female: A fatal case report and literature review / Jóźwik M., Posmyk R., Jóźwik M., Semczuk A., Gogiel-Shields M., Kuś-Słowińska M., Garbowicz M., Klukowski M., Wojciechowicz J. // *Cancer Biol Ther.* 2018; 19(7):543-548. doi: 10.1080/15384047.2017.1416931.
62. Kastrati, I. Insights into how phosphorylation of estrogen receptor at serine 305 modulates tamoxifen activity in breast cancer / Kastrati I., Semina S., Gordon B., Smart E. // *Mol Cell Endocrinol.* 2019; 483:97-101. doi: 10.1016/j.mce.2019.01.014.
63. Khordadmehr, M. Key microRNAs in the biology of breast cancer; emerging evidence in the last decade / Khordadmehr M., Shahbazi R., Ezzati H., Jigari-Asl F., Sadreddini S., Baradaran B. // *J Cell Physiol.* 2019; 234(6):8316-8326. doi: 10.1002/jcp.27716.

64. Kim, H.S. Analysis of the potent prognostic factors in luminal-type breast cancer / Kim H.S., Park I., Cho H. J. et al. // *J. Breast Cancer*. 2012. Vol. 15, N 4. P. 401-406.
65. Kim, K.C. Suppression of metastasis through inhibition of chitinase 3-like 1 expression by miR-125a-3p-mediated up-regulation of USF1 / Kim K.C., Yun J., Son D.J., Kim J.Y., Jung J.K., Choi J.S., Kim Y.R., Song J.K., Kim S.Y., Kang S.K., Shin D.H., Roh Y.S., Han S.B., Hong J.T. // *Theranostics*. 2018; 8(16):4409-4428. doi: 10.7150/thno.26467.
66. Kulis, M. DNA methylation and cancer / M. Kulis, M. Esteller // *Adv. Genet*. 2010. Vol. 70. P. 27-56.
67. Kunej, T. Epigenetic regulation of microRNAs in cancer: an integrated review of literature / Kunej T., Godnic I., Ferdin J., Horvat S., Dovc P., Calin G.A. // *Mutat. Res.*, 2011, 717, 77-84.
68. Ladeiro, Y. MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations / Ladeiro Y., Couchy G., Balabaud C., Bioulac-Sage P., Pelletier L., Rebouissou S., Zucman-Rossi J. // *Hepatology*, 2008, 47, 1955-1963.
69. Lai, K.W. MicroRNA-130b regulates the tumour suppressor RUNX3 in gastric cancer. Lai K.W., Koh K.X., Loh M., Tada K., Subramaniam M.M., Lim X.Y., Vaithilingam A., Salto-Tellez M., Iacopetta B., Ito Y., Soong R. // *Eur. J. Cancer*, 2010, 46, 1456-1463.
70. Lakhari, S.R. World Health Organization classification of tumours of the breast / Lakhari S.R., Ellis I.O., Schnitt S.J., Tan P.H. (Eds.). // Lyon: IARC, 2012. 240 p.
71. Lee, K.H. Epigenetic silencing of MicroRNA miR-107 regulates cyclin-dependent kinase 6 expression in pancreatic cancer / Lee K.H., Lotterman C., Karikari C., Omura N., Feldmann G., Habbe N., Goggins M.G., Mendell J.T., Maitra A. // *Pancreatology*, 2009, 9, 293-301.

72. Lester, S.C. Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast / Lester S.C., Bose S., Chen Y.Y. et al. // Arch. Pathol. Lab. Med. 2009. Vol. 133, N 10. P. 1515-1538.

73. Leyland-Jones, B. BIG 1-98 Collaborative Group. ESR1 and ESR2 polymorphisms in the BIG 1-98 trial comparing adjuvant letrozole versus tamoxifen or their sequence for early breast cancer / Leyland-Jones B., Gray K.P., Abramovitz M., Bouzyk M., Young B., Long B., Kammler R., Dell'Orto P., Biasi M.O., Thürlimann B., Harvey V., Neven P., Arnould L., Maibach R., Price K.N., Coates A.S., Goldhirsch A., Gelber R.D., Pagni O., Viale G., Rae J.M., Regan M.M. // Breast Cancer Res Treat. 2015; 154(3):543-55. doi: 10.1007/s10549-015-3634-6.

74. Li, J. Clinicopathological classification and traditional prognostic indicators of breast cancer / Li J., Chen Z., Su K., Zeng J. // Int J Clin Exp Pathol. 2015; 8(7):8500-5.

75. Li, W. MicroRNA-124 inhibits cellular proliferation and invasion by targeting Ets1 in breast cancer / Li W., Zang W., Liu P. et al. (2014) // Tumour Biol. 35(11): 10897–10904.

76. Liu, A.M. Circulating miR-15b and miR-130b in serum as potential markers for detecting hepatocellular carcinoma: a retrospective cohort study / Liu A.M., Yao T.J., Wang W., Wong K.F., Lee N.P., Fan S.T., Poon R.T., Gao C., Luk J.M. // BMJ Open, 2012, 2, e000825.

77. Liu, T. Tumor-associated macrophages in human breast cancer produce new monocyte attracting and pro-angiogenic factor YKL-39 indicative for increased metastasis after neoadjuvant chemotherapy / Liu T., Larionova I., Litviakov N., Riabov V., Zavyalova M., Tsyganov M., Buldakov M., Song B., Moganti K., Kazantseva P., Slonimskaya E., Kremmer E., Flatley A., Klüter H., Cherdyntseva N., Kzhyshkowska J. // Oncoimmunology. 2018; 7(6): e1436922. doi: 10.1080/2162402X.2018.1436922.

78. Loginov, V.I. Novel miRNA genes deregulated by aberrant methylation in ovarian carcinoma are involved in metastasis / Loginov V.I., Pronina I.V., Burdenny A.M., Filippova E.A., Kazubskaya T.P., Kushlinsky D.N., Utkin D.O., Khodyrev D.S.,

Kushlinskii N.E., Dmitriev A.A., Braga E.A. // *Gene*. 2018 Jul 1;662:28-36. doi: 10.1016/j.gene.2018.04.005.

79. Loginov, V.I. Methylation of miRNA genes and oncogenesis *Biochemistry / Loginov V.I., Rykov S.V., Fridman M.V., Braga E.A. // (Mosc)*. 2015; 80(2):145-62. doi: 10.1134/S0006297915020029.

80. Lou, W. Five miRNAs-mediated PIEZO2 downregulation, accompanied with activation of Hedgehog signaling pathway, predicts poor prognosis of breast cancer / Lou W., Liu J., Ding B., Jin L., Xu L., Li X., Chen J., Fan W. // *Aging (Albany NY)*. 2019 May 6;11(9):2628-2652. doi: 10.18632/aging.101934.

81. Lujambio, A. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells / Lujambio A., Ropero S., Ballestar E., Fraga M.F., Cerrato C., Setién F., Casado S., Suarez-Gauthier A., Sanchez-Cespedes M., Gil A., Spiteri I., Das P.P., Caldas C., Miska E., Esteller M. // *Cancer Res.*, 2007, 67, 1424-1429.

82. Madhavan, D. Circulating miRNAs with prognostic value in metastatic breast cancer and for early detection of metastasis / Madhavan D., Peng C., Wallwiener M., Zucknick M., Nees J., Schott S., Rudolph A., Riethdorf S., Trumpp A., Pantel K., Sohn C., Chang-Claude J., Schneeweiss A., Burwinkel B. // *Carcinogenesis*. 2016; 37(5):461-70. doi: 10.1093/carcin/bgw008.

83. Maehle, B.O. Estrogen receptor beta - an independent prognostic marker in estrogen receptor alpha and progesterone receptor-positive breast cancer? / Maehle B.O., Collett K., Tretli S., Akslen L.A., Grotmol T. // *APMIS*. 2009; 117(9):644-50. doi: 10.1111/j.1600-0463.2009.02510.x.

84. Mahmood, H. Impact of age, tumor size, lymph node metastasis, stage, receptor status and menopausal status on overall survival of breast cancer patients in Pakistan / Mahmood H., Faheem M., Mahmood S., Sadiq M., Irfan J. // *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015; 16(3):1019-24.

85. Manzanarez-Ozuna, E. Model based on GA and DNN for prediction of mRNA-Smad7 expression regulated by miRNAs in breast cancer / Manzanarez-Ozuna E., Flores D.L., Gutiérrez-López E., Cervantes D., Juárez P. // *Theor Biol Med Model*. 2018; 15(1):24. doi: 10.1186/s12976-018-0095-8.

86. McAnena, P. Role of micro-RNAs in breast cancer surgery / McAnena P., Lowery A., Kerin M.J. // *Br J Surg.* 2018; 105(2): e19-e30. doi: 10.1002/bjs.10790.
87. Meyer-Schaller, N. Foxf2 plays a dual role during transforming growth factor beta-induced epithelial to mesenchymal transition by promoting apoptosis yet enabling cell junction dissolution and migration / Meyer-Schaller N., Heck C., Tiede S., Yilmaz M., Christofori G. // *Breast Cancer Res.* 2018; 20(1):118. doi: 10.1186/s13058-018-1043-6.
88. Murphy, L. New insights into estrogen receptor function in human breast cancer / Murphy L., Cherlet T., Lewis A. et al. // *Ann. Med.* 2003. Vol. 35, N 8, P. 614-631
89. Najafi, B. Disease free survival among molecular subtypes of early stage breast cancer between 2001 and 2010 in Iran / Najafi B., Anvari S., Roshan Z.A. // *Asian. Pac. J. CancerPrev.* 2013. Vol. 14, N 10. P. 5811-5816
90. Nakopoulou, L. The favourable prognostic value of oestrogen receptor beta immunohistochemical expression in breast cancer. Nakopoulou L., Lazaris A., Panayotopoulou E. et al. // *J. Clin. Pathol.* 2004. Vol. 57, N 5, P. 523- 528
91. Nie, J. MiR-125b regulates the proliferation and metastasis of triple negative breast cancer cells via the Wnt/ β -catenin pathway and EMT / Nie J., Jiang H.C., Zhou Y.C., Jiang B., He W.J., Wang Y.F., Dong J. // *Biosci Biotechnol Biochem.* 2019; 83(6):1062-1071. doi: 10.1080/09168451.2019.1584521.
92. Nielsen, T.O. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma / Nielsen T.O., Hsu F.D., Jensen K. et al. // *Clin. Cancer Res.* 2004. 10, N 16. P. 5367-5374. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0220.
93. Obayashi, M. microRNA-203 suppresses invasion and epithelial-mesenchymal transition induction via targeting NUA1 in head and neck cancer / Obayashi M., Yoshida M., Tsunematsu T., Ogawa I., Sasahira T., Kuniyasu H., Imoto I., Abiko Y., Xu D., Fukunaga S., Tahara H., Kudo Y., Nagao T., Takata T. // *Oncotarget.* 2016; 7(7):8223-39. doi: 10.18632/oncotarget.6972.

94. Oiu, J. Adjuvant Chemotherapy Guidance in Young Breast Cancer Patients With Luminal Subtypes and Stage pT1N0 / Oiu J., Du Z., Wang Y., Zhou Y., Zhang J., Liu P., Lv Q. // *J Surg Res.* 2019; 240:165-174. doi: 10.1016/j.jss.2019.01.059
95. Omoto, Y. Clinical significance of estrogen receptor β in breast and prostate cancer from biological aspects / Omoto Y., Iwase H. // *Cancer Sci.* 2015; 106(4):337-43. doi: 10.1111/cas.12613.
96. Onitilo, A.A. Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival / Onitilo A.A., Engel J.M., Greenlee R.T., Mukesh B.N. // *Clin Med Res.* 2009; 7(1-2):4-13. doi: 10.3121/cm.2009.825.
97. O'Shaughnessy, J. Iniparib plus chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer / O'Shaughnessy J., Osborne C., Pippen J.E. et al. // *N. Engl. J. Med.* 2011. Vol. 364, N. 3, P. 205-214.
98. Padrão, N.A. MicroRNA promoter methylation: a new tool for accurate detection of urothelial carcinoma / Padrão N.A., Monteiro-Reis S., Torres-Ferreira J., Antunes L., Leça L., Montezuma D., Ramalho-Carvalho J., Dias P.C., Monteiro P., Oliveira J., Henrique R., Jerónimo C. // *Br J Cancer.* 2017; 116(5):634-639. doi: 10.1038/bjc.2016.454.
99. Padua, M.B. Dependence receptor UNC5A restricts luminal to basal breast cancer plasticity and metastasis / Padua M.B., Bhat-Nakshatri P., Anjanappa M., Prasad M.S., Hao Y., Rao X., Liu S., Wan J., Liu Y., McElyea K., Jacobsen M., Sandusky G., Althouse S., Perkins S., Nakshatri H. // *Breast Cancer Res.* 2018; 20(1):35. doi: 10.1186/s13058-018-0963-5
100. Pallasch, C.P. miRNA deregulation by epigenetic silencing disrupts suppression of the oncogene PLAG1 in chronic lymphocytic leukemia / Pallasch C.P., Patz M., Park Y.J., Hagist S., Eggle D., Claus R., Debey-Pascher S., Schulz A., Frenzel L.P., Claasen J., Kutsch N., Krause G., Mayr C., Rosenwald A., Plass C., Schultze J.L., Hallek M., Wendtner C.M. // *Blood.* 2009, 114, 3255-3264.
101. Parise, C.A. Breast cancer subtypes as defined by the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and the human epidermal growth factor receptor 2

(HER2) among women with invasive breast cancer in California, 1999–2004 / Parise C.A., Bauer K.R., Brown M.M. et al. // *Breast J.* 2009. Vol. 15, N 6. P. 593-602.

102. Parsa, Y. A Review of the Clinical Implications of Breast Cancer Biology / Parsa Y., Mirmalek S.A., Kani F.E., Aidun A., Salimi-Tabatabaee S.A., Yadollah-Damavandi S., Jangholi E., Parsa T., Shahverdi E. // *Electron Physician.* 2016; 8(5):2416-24, doi: 10.19082/2416.

103. Peixoto, A. Protein Glycosylation and Tumor Microenvironment Alterations Driving Cancer Hallmarks *Front Oncol* / Peixoto A., Relvas-Santos M., Azevedo R., Santos L.L., Ferreira J.A. // 2019; 9: e380. doi: 10.3389/fonc.2019.00380

104. Perou, C.M. Molecular portraits of human breast tumours / C.M. Perou, T. Sørli, M.B. Eisen et al. // *Nature.* — 2000. — Vol. 406, N 6797. — P. 747-752.

105. Perou, C.M. Molecular stratification of triple-negative breast cancers / Perou C.M. // *Oncologist.* 2011. Vol. 16, Suppl. 1, P. 61-70.

106. Petrelli, F. Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients / Petrelli F., Viale G., Cabiddu M., Barni S. // *Breast Cancer Res Treat.* 2015; 153(3):477-91. doi: 10.1007/s10549-015-3559-0.

107. Prat, A. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer / Prat A., Cheang M.C, Martin M. et al. // *J. Clin. Oncol.* 2013. Vol. 31, N 2. P. 203-209.

108. Prat, A. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer / Prat A., Pineda E., Adamo B. et al. // *Breast.* 2015. Vol. 24, Suppl. 2. P. 26-35. doi: 10.1016/j.breast.2015.07.008.

109. Pronina, I.V. DNA methylation contributes to deregulation of 12 cancer-associated microRNAs and breast cancer progression / Pronina I.V., Loginov V.I., Burdenny A.M., Fridman M.V., Senchenko V.N., Kazubskaya T.P., Kushlinskii N.E., Dmitriev A.A., Braga E.A. // *Gene.* 2017; 604:1-8. doi: 10.1016/j.gene.2016.12.018.

110. Provenzano, E. Molecular Classification of Breast Cancer *PET Clin* / Provenzano E., Ulaner G.A., Chin S.F. // 2018; 13(3):325-338. doi: 10.1016/j.cpet.2018.02.004;

111. Raj-Kumar, P.K. PCA-PAM50 improves consistency between breast cancer intrinsic and clinical subtyping reclassifying a subset of luminal A tumors as luminal B / Raj-Kumar P.K., Liu J., Hooke J.A., Kovatich A.J., Kvecher L., Shriver C.D., Hu H. // *Sci Rep.* 2019; 9(1):7956. doi: 10.1038/s41598-019-44339-4.

112. Rani, A. Endocrine Resistance in Hormone Receptor Positive Breast Cancer-From Mechanism to Therapy / Rani A., Stebbing J., Giamas G., Murphy J. // *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019; 10:245. doi: 10.3389/fendo.2019.00245.

113. Rauscher, G.H. Exploring DNA methylation changes in promoter, intragenic, and intergenic regions as early and late events in breast cancer formation / Rauscher G.H., Kresovich J.K., Poulin M., Yan L., Macias V, Mahmoud A.M., Al-Alem U., Kajdacsy-Balla A., Wiley E.L., Tonetti D.O., Ehrlich M. // *BMC Cancer.* 2015; 15: e816. doi: 10.1186/s12885-015-1777-9.

114. Rodríguez-Cid, J.R. Expression of estrogen receptor beta (ER β) and its prognostic value in pleural mesothelioma / Rodríguez-Cid J.R., García-Acevedo O., Benjamin-Contreras J., Bonilla-Molina D., Flores-Mariñelarena R.R., Martínez-Barrera L., Alatorre-Alexander J.A., Sanchez-Ríos C.P., Flores-Soto MDR, Santillan-Doherty P.J, Peña-Mirabal E.S. // *J Thorac Dis.* 2019; 11(4):1456-1464. doi: 10.21037/jtd.2019.03.38.

115. Romero, Q. Ki-67 proliferation in core biopsies versus surgical samples – a model for neoadjuvant breast cancer studies / Romero Q., Bendahl P.O., Klintman M.et al. // *BMC Cancer.* 2011. Vol. 11, N 1. P. 341.

116. Russnes, H.G. Breast Cancer Molecular Stratification: From Intrinsic Subtypes to Integrative Clusters / Russnes H.G., Lingjærde O.C., Børresen-Dale A.L., Caldas C. // *Am J Pathol.* 2017; 187(10):2152-2162. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.04.022.

117. Sareyeldin, R.M. Gene Expression and miRNAs Profiling: Function and Regulation in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)-Positive Breast Cancer / Sareyeldin R.M., Gupta I., Al-Hashimi I., Al-Thawadi H.A., Al Farsi H.F., Vranic S., Al Moustafa A.E. // *Cancers (Basel).* 2019; 11(5). pii: E646. doi: 10.3390/cancers11050646.

118. Shui, Y. miR-130b-3p inhibits cell invasion and migration by targeting the Notch ligand Delta-like 1 in breast carcinoma / Shui Y., Yu X., Duan R., Bao Q., Wu J., Yuan H., Ma C. // *Gene*. 2017 Apr 20;609:80-87. doi: 10.1016/j.gene.2017.01.036.

119. Shukla, S. Role of Immunophenotypes in Carcinoma Breast / Shukla S., Acharya S., Vagha S., Dawande P., Tamhane A. // *Int J Appl Basic Med Res*. 2018; 8(4):210-216. doi: 10.4103/ijabmr.IJABMR_331_17.

120. Sinn, H.P. Comparison of immunohistochemistry with PCR for assessment of ER, PR, and Ki-67 and prediction of pathological complete response in breast cancer / Sinn H.P., Schneeweiss A., Keller M., Schlombs K., Laible M., Seitz J., Lakis S., Veltrup E., Altevogt P., Eidt S., Wirtz R.M., Marmé F. // *BMC Cancer*. 2017; 17(1):124. doi: 10.1186/s12885-017-3111-1.

121. Song, G. A conserved gene structure and expression regulation of miR-433 and miR-127 in mammals / Song G., Wang L. // *PLoS One*. 2009; 4(11):e7829. doi: 10.1371/journal.pone.0007829.

122. Sørlie, T. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications / Sørlie T., Perou C.M., Tibshirani R. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. Vol. 98, N 19. P. 10869-10874. DOI: 10.1073/pnas.191367098.

123. Steponaitiene, R. Epigenetic silencing of miR-137 is a frequent event in gastric carcinogenesis / Steponaitiene R., Kupcinskas J., Langner C., et al. // *Mol Carcinog*. 2016;55:376–386.

124. Sun, Y. Comprehensive Assessment of the Relationship Between MicroRNA-124 and the Prognostic Significance of Cancer / Sun Y., Duan F., Liu W., Peng Z., Dai L., Feng Y., Yang Z., Shang J., Wang K. // *Front Oncol*. 2018; 8:252. doi: 10.3389/fonc.2018.00252.

125. Tang, X. Identification of glucose-regulated miRNAs from pancreatic {beta} cells reveals a role for miR-30d in insulin transcription / Tang X., Muniappan L., Tang G., Ozcan S. // *RNA*, 2009, 15, 287-293.

126. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012. Vol. 490, N 7418. P. 61-70.

127. Tjensvoll, K. Disseminated tumor cells in bone marrow assessed by TWIST1, cytokeratin 19, and mammaglobin A mRNA predict clinical outcome in operable breast cancer patients / Tjensvoll K., Oltedal S., Farnen R.K., Shammas F.V., Heikkilä R., Kvaløy J.T., Gilje B., Smaaland R., Nordgård O. // *Clin Breast Cancer*. 2010; 10(5):378-84. doi: 10.3816/CBC.2010.n.050.

128. Toiyama, Y. DNA methylation and microRNA biomarkers for noninvasive detection of gastric and colorectal cancer / Toiyama Y., Okugawa Y., Goel A. // *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 455(1-2):43-57. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.08.001.

129. Toiyama, Y. A Panel of Methylated MicroRNA Biomarkers for Identifying High-Risk Patients With Ulcerative Colitis-Associated Colorectal Cancer / Toiyama Y., Okugawa Y., Tanaka K., Araki T., Uchida K., Hishida A., Uchino M., Ikeuchi H., Hirota S., Kusunoki M., Boland C.R., Goel A. // *Gastroenterology*. 2017; 153(6):1634-1646.e8, doi: 10.1053/j.gastro.2017.08.037.

130. Vannini, I. Emerging roles of microRNAs in cancer / Vannini I., Fanini F., Fabbri M. // *Curr Opin Genet Dev*. 2018; 48:128-133. doi: 10.1016/j.gde.2018.01.001.

131. Viale, G. The current state of breast cancer classification / Viale G. // *Ann. Oncol*. 2012. Vol. 23, N. 10, P. 207-210.

132. Vrba, L. miRNA Gene Promoters Are Frequent Targets of Aberrant DNA Methylation in Human Breast Cancer / Vrba L., Muñoz-Rodríguez J.L., Stampfer M.R., Futscher B.W. // *PLoS One*, 2013, 8(1):e54398. doi:10.1371/journal.pone.0054398.

133. Wang, J. Value of Breast Cancer Molecular Subtypes and Ki67 Expression for the Prediction of Efficacy and Prognosis of Neoadjuvant Chemotherapy in a Chinese Population / Wang J., Sang D., Xu B., Yuan P., Ma F., Luo Y., Li Q., Zhang P., Cai R., Fan Y., Chen S., Li Q. // *Medicine (Baltimore)*. 2016; 95(18):e3518. doi: 10.1097/MD.00000000000003518.

134. Wang, S. Functional cooperation of miR-125a, miR-125b, and miR-205 in entinostat-induced downregulation of erbB2/erbB3 and apoptosis in breast cancer cells / Wang S., Huang J., Lyu H., Lee C.K., Tan J., Wang J., Liu B. // *Cell Death Dis*. 2013; 4:e556. doi: 10.1038/cddis.2013.79.

135. Wang, Y. A retrospective study of breast cancer subtypes: the risk of relapse and the relations with treatments / Wang Y., Yin Q., Yu Q. et al. // *Breast Cancer Res. Treat.* 2011. Vol. 130, N 2. P. 489-498.
136. Wilson, R.C. Molecular mechanisms of RNA interference / Wilson R.C., Doudna J.A. // *Ann. Rev. Biophys.*, 2013, 42, 217–239.
137. Wind, N. Multidrug Resistance in Breast Cancer—From In Vitro Models to Clinical Studies / Wind N., Holen I. // *Int. J. Breast Cancer.* 2011. Vol. 2011. P. 1-12.
138. Wolff, A.C. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: ASCO/CAP clinical practice guideline update / Wolff A.C., Hammond E.H., Hicks D.G. et al. // *J. Clin. Oncol.* 2013. Vol. 31, N 31. P. 3997-4014.
139. Wu, W. MicroRNA, Noise, and Gene Expression Regulation / Wu W // *Methods Mol Biol.* 2018; 1699:91-96. doi: 10.1007/978-1-4939-7435-1_7.;
140. Wu, Z. Up-regulation of miR-124 inhibits invasion and proliferation of prostate cancer cells through mediating JAK-STAT3 signaling pathway / Wu Z., Huang W., Chen B. et al. (2017) // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 21(10): 2338–2345.
141. Yan, J.W. The emerging role of miR-375 in cancer / Yan J.W., Lin J.S., He X.X. // *Int J Cancer.* 2014; 135(5):1011-8. doi: 10.1002/ijc.28563.
142. Yang, C. Epigenetic silencing of miR-130b in ovarian cancer promotes the development of multidrug resistance by targeting colony-stimulating factor 1 / Yang C., Cai J., Wang Q., Tang H., Cao J., Wu L., Wang Z. // *Gynecol. Oncol.*, 2012, 124, 325-334.
143. Yuan, L. MiR-124 inhibits invasion and induces apoptosis of ovarian cancer cells by targeting programmed cell death 6 / Yuan L., Li S., Zhou Q., Wang D., Zou D., Shu J., Huang Y. // *Oncol Lett.* 2017 Dec;14(6):7311-7317. doi: 10.3892/ol.2017.7157.
144. Zhang, H. Evaluation of ER- α , ER-B1 and ER-B2 expression and correlation with clinicopathologic factors in invasive luminal subtype breast cancers / Zhang H., Zhang Z., Xuan L., Zheng S., Guo L., Zhan Q., Qu X., Zhang B., Wang Y., Wang X., Song Y. // *Clin Transl Oncol.* 2012; 14(3):225-31. doi: 10.1007/s12094-012-0788-0.

145. Zhang, M. Analysis of factors affecting endocrine therapy resistance in breast cancer / Zhang M., Chen H., Gu J. // *Oncol Lett.* 2016; 11(1):379-384.

146. Zhang, W. miR-137 is a tumor suppressor in endometrial cancer and is repressed by DNA hypermethylation / Zhang W., Chen J.H., Shan T., Aguilera-Barrantes I., Wang L.S., Huang T.H., Rader J.S., Sheng X., Huang Y.W. // *Lab Invest.* 2018 Nov;98(11):1397-1407. doi: 10.1038/s41374-018-0092-x.

147. Zhang, Y. miR-125b is methylated and functions as a tumor suppressor by regulating the ETS1 proto-oncogene in human invasive breast cancer / Zhang Y., Yan L.X., Wu Q.N., Du Z.M., Chen J., Liao D.Z., Huang M.Y., Hou J.H., Wu Q.L., Zeng M.S., Huang W.L., Zeng Y.X., Shao J.Y. // *Cancer Res.* 2011; 71(10):3552-62. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2435.

148. Zhao, G. miR-203 Functions as a Tumor Suppressor by Inhibiting Epithelial to Mesenchymal Transition in Ovarian Cancer / Zhao G., Guo Y., Chen Z., Wang Y., Yang C., Dudas A., Du Z., Liu W., Zou Y., Szabo E., Lee S.C., Sims M., Gu W., Tillmanns T., Pfeffer L.M., Tigyi G., Yue J. // *J Cancer Sci Ther.* 2015; 7(2):34-43.

149. Zhao, X. MicroRNA-127 is downregulated by Tudor-SN protein and contributes to metastasis and proliferation in breast cancer cell line MDA-MB-231 / Zhao X., Duan Z., Liu X., Wang B., Wang X., He J., Yao Z., Yang J. // *Anat Rec (Hoboken).* 2013; 296(12):1842-9. doi: 10.1002/ar.22823.

150. Zhao, Y. MiR-137 targets estrogen-related receptor alpha and impairs the proliferative and migratory capacity of breast cancer cells / Zhao Y., Li Y., Lou G., Zhao L., Xu Z., Zhang Y., He F. // *PLoS One.* 2012; 7(6):e39102.

151. Zheng, H. Elevated serum HER-2 predicts poor prognosis in breast cancer and is correlated to ADAM10 expression / Zheng H., Zhong A., Xie S., Wang Y., Sun J., Zhang J., Tong Y., Chen M., Zhang G., Ma Q., Kai J., Guo L., Lu R. // *Cancer Med.* 2019; 8(2):679-685. doi: 10.1002/cam4.1859.

152. Zhu, L. Clinical analysis of 21-gene recurrence score test in hormone receptor-positive early-stage breast cancer / Zhu L., Ma N., Wang B., Zhou C., Yan Y., Wang K., He J., Ren Y. // *Oncol Lett.* 2019; 17(6):5469-5480. doi: 10.3892/ol.2019.10277.

153. Zoppino, F.C.M. Comprehensive transcriptomic analysis of heat shock proteins in the molecular subtypes of human breast cancer / Zoppino F.C.M, Guerrero-Gimenez M.E., Castro G.N., Ciocca D.R. // BMC Cancer. 2018; 18(1):700. doi: 10.1186/s12885-018-4621-1.