

На правах рукописи



Бабышкина Наталия Николаевна

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ И ПРЕДСКАЗАТЕЛЬНАЯ ЗНАЧИМОСТЬ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ,
АССОЦИИРОВАННЫХ С PI3K/AKT/mTOR- СИГНАЛЬНЫМ ПУТЕМ
ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

14. 01. 12 – онкология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Томск - 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Научные консультанты:

Чердынцева Надежда Викторовна, доктор биологических наук, профессор, член-корр. РАН

Слонимская Елена Михайловна
доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Войцицкий Владимир Евгеньевич

доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
кафедра онкологии, заведующий кафедрой

Коваленко Сергей Петрович

доктор биологических наук, Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики, Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации
лаборатория гено-инженерных методов исследования, руководитель

Степовая Елена Алексеевна

доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, профессор кафедры

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург

Защита состоится «___» _____ 2019 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 002.279.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» по адресу г. Томск, пер. Кооперативный 5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», адрес сайта <http://tnimc.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор



Фролова Ирина Георгиевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В настоящее время рак молочной железы (РМЖ) представляет собой группу гетерогенных заболеваний [Prat et al., 2015; Baldassarre et al., 2016; Dai et al., 2016; Gao et al., 2018; Joseph et al., 2018]. Наиболее важным достижением последних десятилетий стало утверждение классификации биологических подтипов РМЖ, основанной на экспрессии опухолевыми клетками специфических молекулярных маркеров [Sorlie et al., 2003; Cejalvo et al., 2018]. Выделение четырех внутренних биологических подтипов РМЖ – люминального А, люминального В, HER2-позитивного и тройного негативного, позволило обосновать принципиально разные подходы к планированию терапии РМЖ. Данные молекулярные подтипы представляют собой разные варианты развития РМЖ, с разной этиологией, патогенезом, а значит и разными механизмами прогрессирования и исходом заболевания [Bianchini et al., 2016; Hennigs et al., 2016; Costa, et al., 2017; Alfarsi et al., 2018].

Люминальный А подтип характеризуется отсутствием экспрессии рецепторов к эпидермальному фактору роста 2-го типа (HER2), низким индексом пролиферативной активности Ki67 (<20%), а высокая экспрессия рецепторов стероидных гормонов предопределяет чувствительность этой подгруппы опухолей, прежде всего, к эндокринной терапии [Geyer et al., 2012; Franchet et al., 2015; Li et al., 2017].

Люминальный В подтип включает опухоли с положительной экспрессией рецепторов стероидных гормонов как с отсутствием экспрессии HER2 при высоком (>20%) индексе Ki67, так и HER2-позитивные с любым индексом пролиферативной активности. Опухоли этой подгруппы имеют худший прогноз и большую вероятность развития рецидивов, чем опухоли люминального А подтипа [Ades et al., 2014; Prat et al., 2015]. Низкий уровень экспрессии гормональных рецепторов, высокий индекс пролиферативной активности, G3 степень злокачественности, выраженная лимфоваскулярная инвазия, наличие метастатически пораженных лимфатических узлов N₂₋₃, а также средние/высокие значения шкал риска Oncotype DX[®], MammaPrint[®], PAM-50 ROR[®] или EndoPredict[®], определяют относительные показания к назначению адъювантной цитотоксической химиотерапии для пациентов с люминальным типом заболевания [Curigliano et al., 2017]. Несмотря на то, что эндокринотерапия является основным методом лечения больных люминальным РМЖ, как в монорежиме, так и в комбинации с химиотерапией, эффективность ее может быть ограничена развитием приобретенной резистентности [Osborne et al., 2011; Семиглазова Т.В. и соавт., 2012; Murphy et al., 2016; Mills et al., 2018].

Тройной негативный рак молочной железы (ТНРМЖ) характеризуется низкой степенью дифференцировки, высокой агрессивностью, большей вероятностью развития местнораспространенных и метастатических форм заболевания. Отсутствие мишеней воздействия для проведения гормонотерапии и таргетной терапии в

опухолях, негативных по всем трем рецепторам, определяет их чувствительность к стандартным химиотерапевтическим схемам [Wahba et al., 2015; Oualla et al., 2017]. Активно применяются различные схемы с включением антрациклинов, таксанов, препаратов платины [Sikov et al., 2015; Jin et al., 2017; Vetter et al., 2017; Tecza et al., 2018], однако их клинический эффект неоднозначен [Zeichner et al., 2016; Gómez-Miragaya et al., 2017]. Таким образом, развитие химио- и эндокринорезистентности остается в настоящее время существенной проблемой при лечении больных РМЖ.

Степень разработанности темы исследования

Механизмы терапевтической резистентности опухолей могут быть обусловлены коммуникацией специфически активированных для каждого молекулярного варианта РМЖ сигнальных каскадов с кумулятивными системами внутриклеточной передачи сигналов. К одной из таких универсальных систем относится PI3K/Akt/mTOR-сигнальный путь, ответственный за интеграцию пролиферативных стимулов и одновременную активацию процессов трансляции в опухолевых клетках [Yang et al., 2016; Dey et al., 2017; Costa et al., 2018]. Реализация этого сигналинга в опухолевых клетках может осуществляться посредством различных мембранных тирозинкиназ (рецепторов инсулиноподобного фактора роста 1-го типа (IGF1R); рецепторов сосудистого эндотелиального фактора роста 2-го типа (VEGFR2); рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR); рецепторов трансформирующего фактора роста β I/II типа (TGF- β R1/2), а также эстрогеновых рецепторов ER α , что обеспечивает регуляцию роста как эстроген-зависимых так и эстроген-независимых опухолей, и эффективность противоопухолевого ответа [Farabaugh et al., 2015; Xu et al., 2015; Zhu et al., 2015; Velloso et al., 2017; Wee et al., 2017; Ishida et al., 2018].

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что каждый из молекулярных подтипов РМЖ может иметь разный, присущий только этому типу опухоли механизм дисрегуляции PI3K/Akt/mTOR-ассоциированной активности, что определяет интерес к изучению основных компонентов данного сигналинга как факторов прогноза заболевания, так и чувствительности/резистентности к терапии [Boyault et al., 2012; Almstedt et al., 2015; Jhan et al., 2017]. Выявлено, что содержание IGF1R-позитивных клеток значимо коррелирует с высокими показателями безметастатической выживаемости у больных эстроген-зависимым РМЖ, однако для эстроген-независимых опухолей данный маркер является предиктором неблагоприятного исхода заболевания [Yan et al., 2015]. Показано, что повышение экспрессии IGF1R и снижение уровня экспрессии PTEN в опухоли связано со снижением общей выживаемости у больных трижды негативным раком [Iqbal et al., 2012; Beg et al., 2015]. Коэкспрессия EGFR и p-mTOR у больных данным подтипом РМЖ ассоциирована с неблагоприятным исходом заболевания [Lazaridis et al., 2014]. В недавних исследованиях продемонстрировано, что потеря экспрессии рецептора трансформирующего фактора роста β II типа (TGF- β R2) является одним из

механизмов неэффективности эндокринной терапии тамоксифеном у больных РМЖ [Busch et al., 2015]. Среди всех молекулярных подтипов РМЖ наиболее высокий уровень экспрессии VEGFR2 характерен для HER2-позитивного варианта, что может определять ответ таких опухолей на антиангиогенную терапию [Nasir et al., 2017].

Помимо рецепторных тирозинкиназ важной регуляторной активностью в отношении PI3K/Akt/mTOR сигнального пути обладают трансмембранные гликопротеины CD44 [Okabe et al., 2014; Liu et al., 2017]. Являясь рецепторами гиалуроновой кислоты, главного компонента внеклеточного матрикса, CD44 вовлечены в процессы клеточной миграции, адгезии и метастазирования посредством модуляции активности тирозинкиназных рецепторов EGFR/HER2, IGF1R, TGF- β R, VEGFR2 [Louderbough et al., 2011; Williams et al., 2013]. Экспериментальные исследования свидетельствуют о том, что уровень экспрессии CD44 может являться ключевым звеном в формировании тамоксифен-резистентного фенотипа эстроген-позитивных клеточных линий РМЖ [Hiscox et al., 2012]. В настоящее время общепризнанным считается использование маркера CD44 в комбинации с другим поверхностным гликопротеином CD24, для идентификации клеток со свойствами стволовых [Ponti et al., 2005; Horimoto et al., 2016]. В отношении эстроген-негативных опухолей, именно, тройного негативного рака, наличие субпопуляции CD44⁺/CD24^{low} связывают с более агрессивным течением заболевания [Giatromanolaki et al., 2011; Ahmed et al., 2012; Wu et al., 2013; Chen et al., 2015]. Значение субпопуляции стволовых опухолевых клеток в механизмах прогрессии эстроген-зависимых опухолей остается менее изученным [Tsunoda et al., 2011; Tsang et al., 2012].

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

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

Цель исследования

Разработать методологический подход к предсказанию ожидаемой эффективности терапии и прогнозированию возможного исхода заболевания у

больных с разными молекулярными подтипами РМЖ на основе комплексного анализа компонентов, ассоциированных с PI3K/Akt/mTOR сигнальным путем.

Задачи исследования

1. Исследовать полиморфизм генов, вовлеченных в процессы пролиферации и апоптоза опухолевых клеток при разных молекулярных подтипах рака молочной железы.

2. Изучить особенности белковой и генной экспрессии рецепторов ростовых факторов EGFR, TGF- β R1, VEGFR2, IGF1R в образцах опухолевой и прилежащей нормальной ткани у больных люминальным А, В и тройным негативным подтипами рака молочной железы.

3. Изучить уровень экспрессии внутриклеточных белков Akt (pS473) и PTEN в опухолевой ткани в зависимости от молекулярного подтипа рака молочной железы.

4. Изучить уровень экспрессии клеток с фенотипом CD44⁺/CD24^{-low}, CD44⁻/CD24⁺, CD44⁺/CD24⁺, CD44⁻/CD24⁻ в опухолевой ткани у больных с разными молекулярными подтипами РМЖ.

5. Провести анализ связи уровня белковой и генной экспрессии рецепторов ростовых факторов, стволовых опухолевых клеток, внутриклеточных белков и полиморфных вариантов изучаемых генов с эффективностью системного лечения при разных подтипах РМЖ.

6. Оценить ассоциации полиморфных вариантов изучаемых генов и их экспрессионных характеристик с показателями безметастатической выживаемости у больных раком молочной железы исследуемых подтипов.

7. Оценить возможность активации в опухоли PI3K/Akt/mTOR-каскада для определения механизмов формирования резистентности и чувствительности к терапии у больных эстроген-зависимым и эстроген-независимым раком молочной железы.

8. Создать математическую модель на основе выбранной панели значимых молекулярно-генетических маркеров для прогноза эффективности терапии тамоксифеном у больных эстроген-зависимым РМЖ.

9. Выделить наиболее информативные предсказательные критерии у больных эстроген-независимым РМЖ и создать математическую модель, позволяющую прогнозировать ожидаемую эффективность неoadъювантной химиотерапии (НАХТ).

Научная новизна

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

Получены новые данные о том, что каждый молекулярный вариант РМЖ характеризуется определенными показателями генетического фона, экспрессионного и белкового профиля маркеров, ассоциированных с PI3K/Akt/mTOR-путем, что может

обуславливать не только их различное клиническое поведение, но и ответ на терапевтическое воздействие.

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

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

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

Впервые определены молекулярные маркеры чувствительности и резистентности к адъювантной терапии тамоксифеном у больных эстроген-зависимым РМЖ и выявлены их особенности для пациенток люминального А и В подтипов. Установлено, что чувствительность опухоли к тамоксифену связана с носительством мутантного аллеля А гена *KDR* rs2305948, высоким уровнем генной и белковой экспрессии TGF-βRI, высоким процентом клеток с отсутствием коэкспрессии гликопротеина CD44 и рецептора инсулиноподобного фактора роста 1-го типа ($CD44^-/IGF1R^-$) и гомогенным характером распределения ERα в опухоли. Резистентность к тамоксифену у больных эстроген-зависимым РМЖ ассоциирована с высоким уровнем экспрессии фосфорилированного белка Akt(pS473) и популяции клеток, экспрессирующих гликопротеин CD44 в комбинации с рецептором инсулиноподобного фактора роста 1-го типа ($CD44^+/IGF1R^+$), а также с гетерогенным характером распределения ERα. Значимыми маркерами неэффективности терапии тамоксифеном у больных люминальным А РМЖ являются наличие мутантного аллеля G гена *IGFR1* rs2016347, высокий уровень экспрессии белка EGFR и высокий уровень экспрессии клеток с фенотипом стволовости $CD44^+/CD24^{-/low}$. Резистентность

к тамоксифену в опухолях люминального В подтипа связана с точечными мутациями гена *ESR1* rs2228480.

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

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

Теоретическая и практическая значимость работы

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

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

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

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

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

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

Методология и методы исследования

Теоретическую основу и методологическую базу диссертационной работы составляют современные представления о молекулярно-генетических механизмах развития гормоно - и химиорезистентности/чувствительности рака молочной железы.

Диссертационное исследование выполнено с использованием клинических, морфологических, молекулярно-генетических, иммуногистохимических, иммунологических и статистических методов.

В работе проведен комплексный анализ основных компонентов, ассоциированных с PI3K/Akt/mTOR сигнальным каскадом на трех регуляторных уровнях – генетической детерминированности (полиморфизм генов), транскрипционной активности генов (экспрессия генов) и фенотипа опухоли (белковая экспрессия). На первом этапе генотипирование двадцати шести полиморфных вариантов исследуемых генов с использованием ПЦР-анализа с рестрикционным гидролизом и метода ПЦР в режиме реального времени по технологии TaqMan, позволило отобрать наиболее значимые SNP, ассоциированные с молекулярными вариантами РМЖ. На втором этапе проведена оценка экспрессионных характеристик на уровне мРНК основных исследуемых генов с применением ПЦР с обратной транскрипцией, что дало возможность сопоставить индивидуально наследуемую генетическую компоненту с функциональной активностью гена. Далее с помощью иммуногистохимического анализа и иммунофенотипирования методом проточной цитофлуориметрии, были проанализированы особенности экспрессии рецепторных тирозинкиназ, внутриклеточных регуляторов PI3K/Akt/mTOR каскада и субпопуляций стволовых опухолевых клеток с целью понимания, насколько функциональный потенциал генов реализуется в конечный белковый продукт. Использование методов описательной статистики, логистического регрессионного анализа и математического моделирования позволило выделить наиболее информативные прогностические и предсказательные маркеры у больных РМЖ с разными молекулярными подтипами.

Положения, выносимые на защиту

1. На основе анализа патогенетически значимых компонентов PI3K/Akt/mTOR сигнального каскада на уровне генетической регуляции (полиморфизм генов), транскрипционной активности генов (экспрессия генов) и фенотипа опухоли (белковая экспрессия) определены специфические комплексы информативных прогностических и предсказательных маркеров у больных разных молекулярных подтипов РМЖ.
2. Точечные замены гена *KDR* rs2305948, высокий уровень транскрипционной и функциональной активности гена *TGF-βRI*, высокий процент опухолевых клеток с двойным негативным фенотипом CD44⁺/IGF1R⁻, а также гомогенный характер распределения ERα в опухоли ассоциированы с эффективностью адъювантной терапии тамоксифеном у больных эстроген-зависимым РМЖ. Механизмы реализации

тамоксифен-чувствительного фенотипа опухоли связаны с отсутствием активации PI3K/Akt/mTOR сигнального пути, ассоциированного с ингибированием VEGFR2-зависимых каскадов, усилением TGF- β 1/Smad-опосредованных антипролиферативных сигналов при функционально полноценном эстрогеновом рецепторе.

3. Мутации гена *ESR1* в локусе rs2228480, гетерогенный характер распределения ER α в опухолевой ткани, высокий уровень экспрессии фосфорилированной формы белка Akt1 и клеток с двойным позитивным фенотипом CD44⁺/IGF1R⁺ связаны с резистентностью к тамоксифену у больных эстроген-зависимым РМЖ. Механизмы реализации тамоксифен-резистентного фенотипа опухоли ассоциированы с наличием транскрипционно неактивного *ESR1* и стимуляцией PI3K/Akt/mTOR каскада посредством тирозинкиназ IGF1R и EGFR.

4. Генетические вариации *EGFR* rs1468727 и *KDR*-604T>C rs2071559 сопряжены со стабилизацией и прогрессированием опухолевого процесса у больных тройным негативным РМЖ. Активация PI3K/Akt/mTOR в опухолях с тройным негативным фенотипом определяется стимуляцией EGFR/PI3K/Akt трансдукции как одного из потенциальных механизмов неэффективности предоперационного химиотерапевтического лечения.

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

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных данных обеспечивается достаточным объемом групп исследования, использованием адекватных методов молекулярно-генетических, иммунологических и статистических исследований, позволивших получить комплекс логично дополняющих друг друга результатов и выводов.

Апробация материалов диссертации

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

клинические применения», Россия, Томск (2017), 22-м международном симпозиуме имени Чарльза Хайдельбергера, Россия, Томск, (2018).

Внедрение результатов исследования в практику

Научные положения, сформулированные в диссертации, используются при чтении лекционных курсов и проведении практических занятий на кафедрах онкологии, биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

Публикации

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

Личный вклад автора

В диссертационной работе представлены результаты исследований, выполненных автором лично или под его непосредственным руководством. Диссертант координировал сбор биологического материала, лично разрабатывал задачи исследования, подходы к их реализации, проводил анализ литературных источников, статистическую обработку результатов исследования и формулировал выводы. Результаты исследований автор лично представлял в виде статей, выступал с докладами на российских и зарубежных конференциях.

Структура и объем диссертации

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

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

Эстроген-зависимую группу составили 524 пациентки с люминальным РМЖ, из которых у 300 больных диагностирован люминальный А РМЖ, 157 пациенток имели люминальный В РМЖ, у 67 больных молекулярный подтип опухоли не был определен из-за отсутствия оценки уровня пролиферативной активности Ki67. Критериями включения пациенток в исследование явились стадия и распространенность процесса $T_{1-4}N_{0-3}M_0$, морфологически верифицированный диагноз, отсутствие неоадьювантного лечения, а также проведение адьювантной

антиэстрогенной терапии тамоксифеном в стандартной дозировке 20 мг/сут в течение 5 лет. Критериями исключения – выраженная сопутствующая патология, отказ от оперативного лечения. Дизайн исследования эстроген-зависимой группы больных представлен на Рисунке 1.

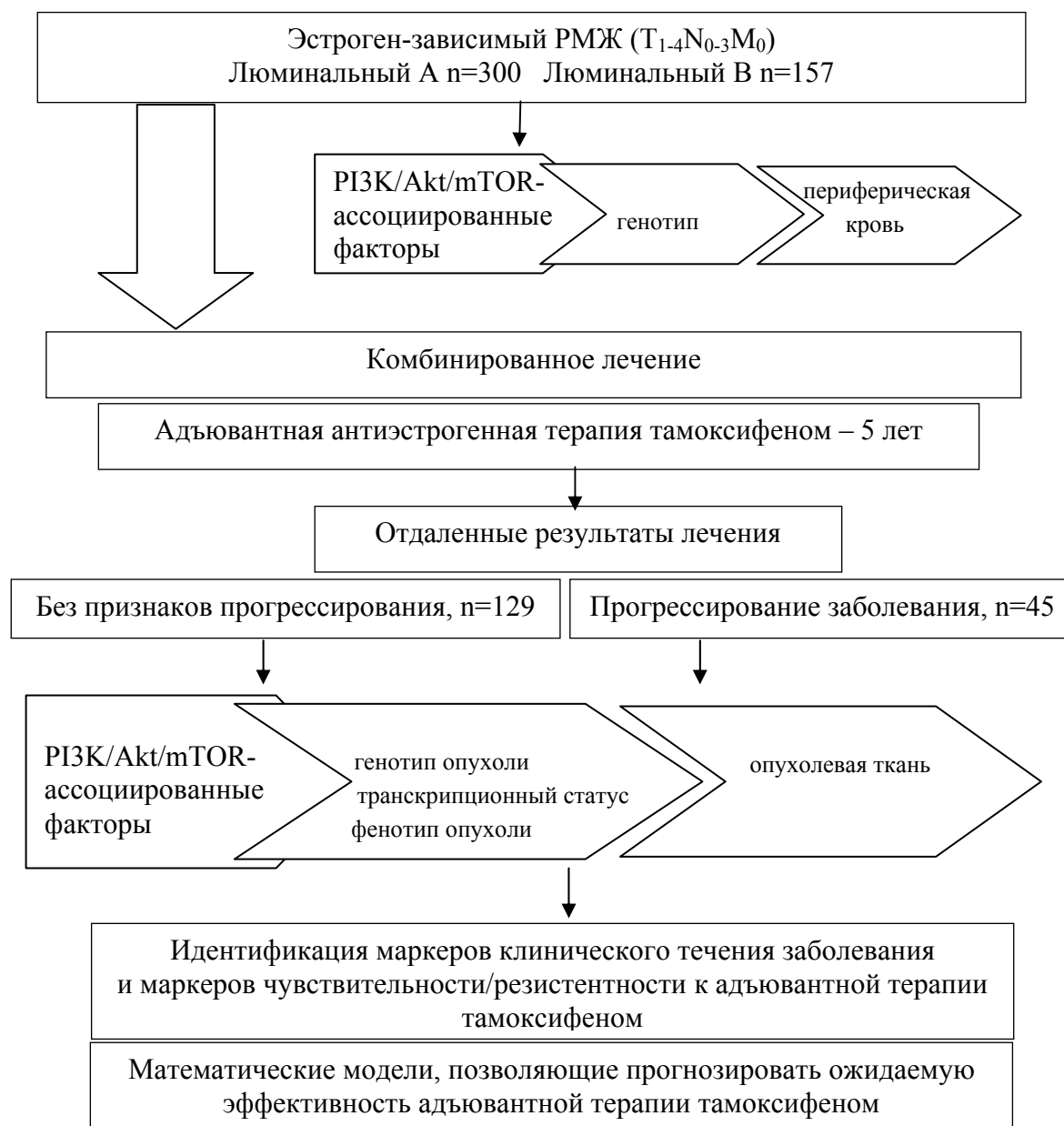


Рисунок 1 – Дизайн исследования эстроген-зависимой группы больных РМЖ

Все больные получали комбинированное лечение в объеме радикального хирургического лечения (радикальная мастэктомия или органосохраняющая операция), лучевой и химиотерапии – по показаниям. В адъювантном режиме все пациентки получали тамоксифен в стандартной дозировке 20 мг/сут в течение 5 лет. Отдаленные результаты антиэстрогенной терапии оценивались по наличию прогрессирования заболевания в виде гематогенных метастазов или рецидива заболевания. Согласно результатам лечения, 129 (74,1%) больных не имели признаков

прогрессирования заболевания (тамоксифен-чувствительная группа (ТАМ-Ч)), у 45 (25,9%) пациенток зарегистрировано гематогенное метастазирование или рецидив РМЖ (тамоксифен-резистентная группа (ТАМ-Р)). Все случаи прогрессирования наблюдались на фоне адъювантной терапии тамоксифеном. Среднее время до прогрессирования – $28,6 \pm 17,8$ мес.

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

Во вторую группу исследования была включена 101 пациентка с эстроген-независимым (тройным негативным) РМЖ (Рисунок 2). Критериями включения пациенток в данную группу явились стадия и распространенность процесса $T_{1-4}N_{0-3}M_0$, морфологически верифицированный диагноз, проведение неоадъювантной химиотерапии (НАХТ). Критерия исключения были аналогичны критериям для эстроген-зависимой группы исследования. Все больные ТНРМЖ получали в неоадъювантном режиме 2-4 курса полихимиотерапии по схеме FAC (5-фторурацил 500 мг/м^2 в 1-ый день, адриамицин 50 мг/м^2 в 1-ый день, циклофосфамид 500 мг/м^2 в 1-ый день, внутривенно; интервал между курсами 21 день), или САХ (циклофосфан 100 мг/м^2 внутримышечно в течение 14 дней, адриамицин 30 мг/м^2 внутривенно в 1-й и 8-й дни, кселода 1000 мг/м^2 2 раза в день, per os, в течение 14 дней; интервал между курсами 21 день) с последующим проведением хирургического лечения (в объеме радикальной мастэктомии или органосохраняющей операции). По показаниям в адъювантном режиме были проведены курсы полихимиотерапии (общим количеством до 6 курсов FAC) и лучевой терапии.

Оценка эффективности НАХТ осуществлялась по шкале RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, 2000) по результатам клинического осмотра, УЗИ молочных желез и маммографии. Непосредственная эффективность лечения оценивалась по сумме полных и частичных регрессий опухоли молочной железы, наличие стабилизации и прогрессирования заболевания рассматривалось как отсутствие эффективности лечения. Выраженность лекарственного патоморфоза в

ткани молочной железы и регионарных лимфатических узлах оценивалась по классификации, предложенной Лушниковым Е.Ф. от 1977 года [Лушников Е.Ф., 1977]. Диагноз «полная морфологическая регрессия» устанавливался при отсутствии опухолевых элементов, как в ткани молочной железы, так и в исследуемых лимфатических узлах. Сроки наблюдения за больными составили от 12 до 80 месяцев.

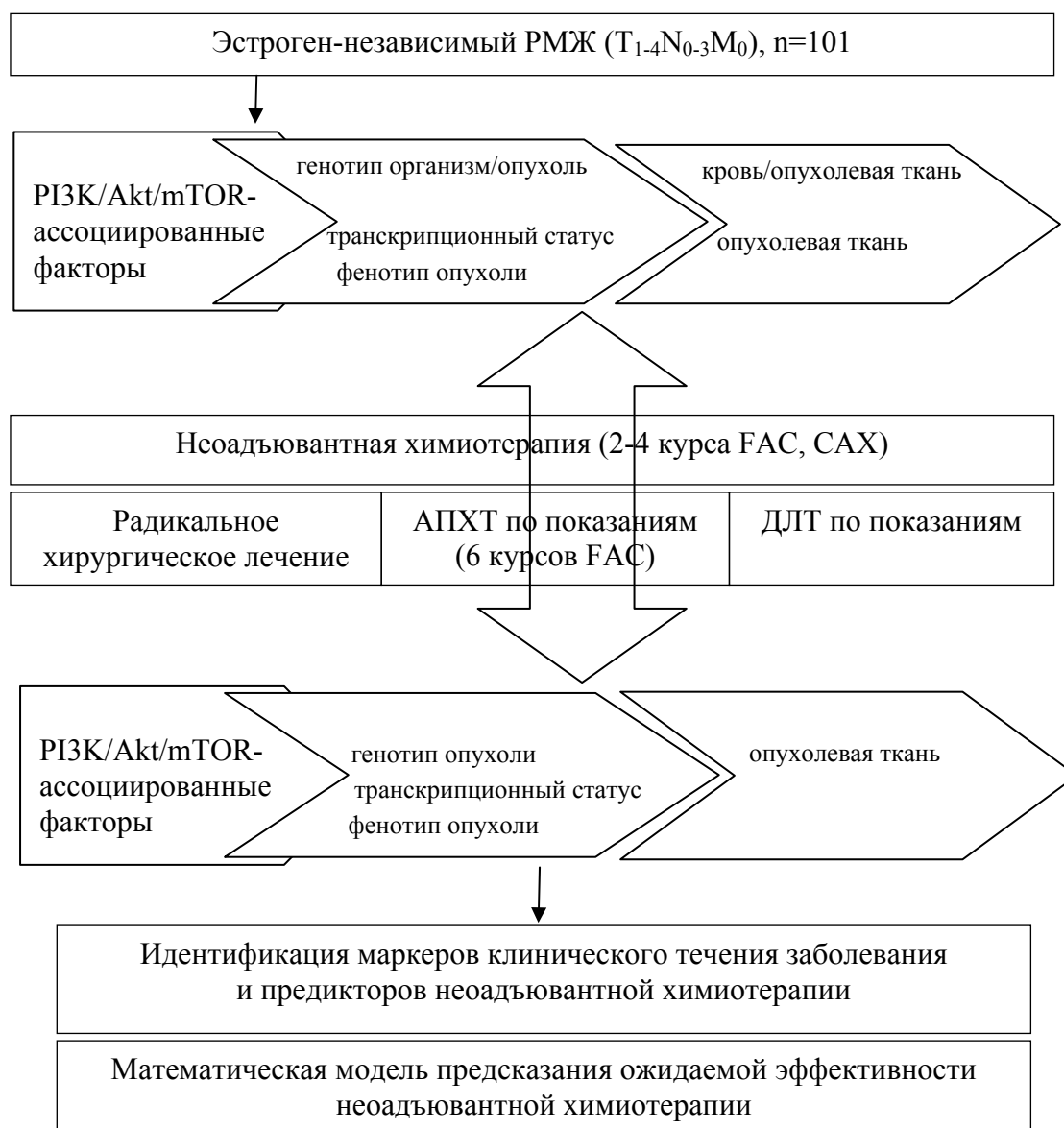


Рисунок 2 – Дизайн исследования эстроген-независимой группы больных РМЖ

Материалом для исследования в данной группе исследования являлись образцы периферической крови и образцы опухолевой ткани, взятые до начала лечения (биопсийные), а также образцы опухоли после выполнения оперативного лечения (операционные). В образцах периферической крови были изучены полиморфные варианты генов пролиферации и апоптоза, характеризующие индивидуально наследуемые особенности организма при эстроген-независимом РМЖ. Для поиска информативных предсказательных маркеров и создания математической модели,

позволяющей определять ожидаемую эффективность неoadъювантной химиотерапии, в биопсийных и операционных образцах опухолевой ткани изучены индивидуальные генетические особенности, уровень экспрессии мРНК и уровень белковой экспрессии основных компонентов PI3K/Akt/mTOR сигнального пути.

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

Для выделения геномной ДНК использован стандартный метод фенол-хлороформной экстракции [Sambrook et al., 2001]. ДНК из опухолевых образцов, фиксированных в формалине, была выделена с помощью наборов QIaamp DNA FFPE tissue kit («Qiagen», Германия). Для выделения тотальной РНК из опухолевой и прилежащей нормальной ткани использовали наборы RNeasy Plus mini Kit, содержащие ДНК-азу I («Qiagen», Германия).

Генотипирование полиморфных вариантов генов *FGFR2* (rs1219648, rs2981582), *XRCC1* (rs25487), *TP53* (rs1042522, rs17878362, rs1625895), *TGF-β1* (rs1800469, rs1800470), *VEGF* (rs699947), *MTHFR* (rs1801133, rs1801131), *MTR* (rs1805087), *DHFR* (rs70991108), *MTHFD1* (rs2236225), *MTRR* (rs1801394), *TS* (rs34743033, rs16430), *RFC1* (rs1051266) и *DNMT3b* (rs2424913) проведено с помощью ПЦР-анализа с последующим рестрикционным гидролизом образующихся фрагментов. Полиморфные варианты генов *ESR1* (rs2228480, rs2077647), *EGFR* (rs1468727), *TGF-βR1* (rs334354), *IGFR1* (rs2016347) и *KDR* (rs2071559, rs2305948) изучены методом ПЦР в режиме реального времени с использованием гибридационных TaqMan зондов на амплификаторе CFX96 («Bio-Rad», США).

Уровень экспрессия генов *EGFR*, *TGF-βR1*, *VEGFR2* и *IGF1R* оценивали с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией по методу $2^{-\Delta\Delta CT}$ [Livak et al., 2001].

Уровень белковой экспрессии рецепторов факторов роста EGFR, TGF-βR1, VEGFR2 проводили на парафиновых срезах с использованием иммуногистохимического анализа.

Для изучения характера распределения ERα в опухолевой ткани была проведена качественная оценка срезов при увеличении ×400 на световом микроскопе Axiostar plus («Carl Zeiss», USA) по запатентованному ранее методу [Вторушин и соавт., 2007].

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

Статистический анализ проведен с использованием программных пакетов SPSS 21.0 (IBM SPSS Statistics, Armonk, NY, USA), STATISTICA 6.1 (1203d, StatSoft Inc., 2007) и программного обеспечения R, версия 3.4.2 (<http://www.R-project.org>). Проверка закона распределения признаков на соответствие нормальному закону проводилась с использованием критерия согласия Колмогорова-Смирнова. Распределение генотипов исследуемых генов было проверено на соответствие равновесию Харди-Вайнберга. Сравнение частот встречаемости аллелей и генотипов генов, оценка их взаимосвязи с клинико-морфологическими факторами в исследуемых группах проводилась с использованием точного двустороннего критерия Фишера и χ^2 с поправкой Йейтса. Для оценки статистически значимых различий средних значений количественных показателей в изучаемых группах были использованы t-критерий Стьюдента для нормально распределенных групп и U-критерий Манна-Уитни для выборок, не подчиняющихся нормальному закону распределения. Показатели безметастатической выживаемости изучены с помощью множительных оценок Каплана-Мейера.

Для построения моделей, позволяющих прогнозировать ожидаемую эффективность адъювантной терапии тамоксифеном у больных эстроген-зависимым РМЖ и предсказания эффективности неоадъювантной химиотерапии у пациентов эстроген-независимым РМЖ был использован однофакторный и многофакторный логистический регрессионный анализ. Метод многократных генераций исходной выборки (bootstrap method) применяли для проверки точности многомерной модели логистической регрессии.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Генетические особенности, экспрессионный и белковый профиль маркеров, ассоциированных с PI3K/Akt/mTOR сигнальным каскадом при разных молекулярных подтипах РМЖ

На первом этапе для анализа маркеров на уровне генотипических особенностей были выбраны гены основных эффекторов PI3K/Akt/mTOR каскада и ключевые гены, вовлеченные в процессы пролиферации и апоптоза опухоли. Показано, что вариант Int7G24A аллель гена *TGF- β RI*, а также мутантные генотипы и аллели гена *KDR-604T>C* чаще выявлялись у больных с люминальным А РМЖ по сравнению с люминальным В подтипом ($p = 0,007$; $p = 0,031$ и $p = 0,019$ соответственно). Выявлено, что наличие точечной мутации *ESR1*2014AA rs2228480 ассоциировано с опухолями преимущественно люминального В подтипа ($p = 0,036$). Показано, что носители вариантного генотипа *EGFR*CC гена рецептора эпидермального фактора роста преобладали среди пациенток с тройным негативным подтипом в сравнении с люминальным В РМЖ ($p = 0,046$).

Следует отметить, что большинство имеющихся на сегодняшний день работ, посвященных изучению описанных выше полиморфных локусов генов, выполнено на

общих когортах больных разных популяционных выборок, без учета молекулярно-генетической классификации РМЖ. Результаты представленного нами исследования позволяют полагать, что каждый молекулярный вариант РМЖ характеризуется специфическими особенностями показателей генетического фона (Рисунок 3).

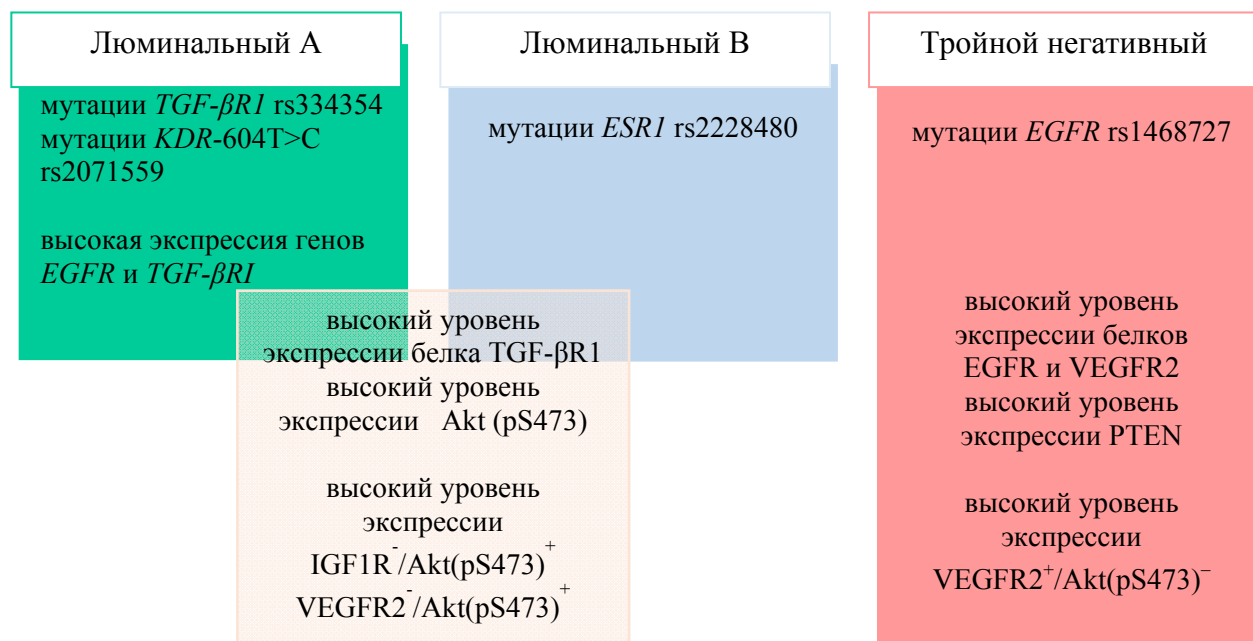


Рисунок 3 – Генетические особенности, экспрессионный и белковый профиль маркеров, ассоциированных с PI3K/Akt/mTOR сигнальным каскадом при разных молекулярных подтипах РМЖ

Проанализировав профиль экспрессии генов *EGFR*, *TGF-βR1*, *VEGFR2*, *IGF1R* и их белковых продуктов, мы показали, что в опухолях люминального А типа высокоэкспрессированы гены *EGFR* и *TGF-βR1* по сравнению с люминальным В РМЖ ($p = 0,038$ и $p = 0,050$; соответственно). Количественное содержание мРНК генов *KDR/VEGFR2* и *IGF1R* у больных РМЖ в зависимости от молекулярного подтипа значимо не различалось ($p > 0,050$). В отношении рецептора трансформирующего фактора роста высокая функциональная активность его гена обуславливала высокое содержание белка в эстроген-зависимых опухолях (как люминального А, так и В подтипа) по сравнению с эстроген-негативным РМЖ ($p = 0,003$ и $p = 0,000$; соответственно). Для опухолей с тройным негативным фенотипом отмечено преобладание опухолевых клеток с высокой экспрессией *EGFR* и *VEGFR2* по сравнению с люминальным А РМЖ ($p = 0,001$ и $p = 0,046$; соответственно).

В исследованиях Nachim et al., выявлено высокое количественное содержание мРНК гена *TGF-βR1* для HER2-позитивного РМЖ, тогда как для базально-подобного и люминального В фенотипа – низкое [Nachim et al., 2016]. В отношении белковой экспрессии показан высокий процент позитивной *TGF-βR1* экспрессии для больных люминальным А (73,7%) и В (81,8%) подтипами и более низкий процент *TGF-βR1*-

экспрессирующих клеток для тройного негативного подтипа (54,5%), что согласуется с результатами нашего исследования. Согласно литературным данным, высокий уровень экспрессии гена *EGFR* ассоциирован с тройным негативным фенотипом опухоли [Koutras A. et al., 2015]. Показано, что уровень белковой экспрессии EGFR максимален при ТНРМЖ и достигает 42-76% [Collins et al., 2009; Gumuskaya et al., 2010; Martin et al., 2012; Nogi et al., 2009; Zhang et al., 2015], что соотносится с полученными нами данными. Таким образом, в результате изучения белковой и генной экспрессии рецепторов ростовых факторов нами продемонстрирована вариабельность их экспрессионного профиля при различных подтипах рака молочной железы (Рисунок 3).

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

Для определения вклада в реализацию PI3K/Akt/mTOR сигнального пути рецепторов ростовых факторов, как их вышестоящих эффекторов, мы оценили экспрессию субпопуляций клеток, несущих комбинацию маркеров VEGFR2/Akt(pS473) и IGF1R/Akt(pS473). Выявлено, что число клеток, экспрессирующих IGF1R/Akt(pS473)⁺ выше в эстроген-зависимых опухолях по отношению к эстроген-независимым ($p = 0,000$ и $p = 0,000$; соответственно). Кроме того, для люминальных опухолей, независимо от подтипа, был характерен высокий процент VEGFR2/Akt(pS473)⁺ клеток, тогда как среди тройных негативных опухолей преобладала популяция VEGFR2/Akt(pS473)⁻ клеток. Следует обратить внимание на высокое количество клеток с двойным позитивным фенотипом VEGFR2/Akt(pS473)⁺ в опухоли у больных люминальным А и В подтипами по сравнению с тройным негативным РМЖ ($p = 0,032$ и $p = 0,004$; соответственно). Можно предположить, что активация PI3K/Akt/mTOR каскада в эстроген-зависимых опухолях происходит, в том числе, и за счет вовлечения в данный сигнальный путь рецептора сосудистого эндотелиального фактора роста.

Таким образом, каждый молекулярный вариант РМЖ характеризуется определенными показателями генетического фона, экспрессионного и белкового

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

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

На следующем этапе работы проведено изучение полиморфизма генов *ESR1*, *EGFR*, *TGF- β 1*, *VEGFR2/KDR*, *IGF1R*, особенностей их генной и белковой экспрессии, содержания белков Akt(pS473), PTEN и субпопуляций стволовых опухолевых клеток в трех группах больных эстроген-зависимым РМЖ (люминальный общая, люминальный А, люминальный В), которые были разделены на тамоксифен-резистентную (ТАМ-Р) и тамоксифен-чувствительную (ТАМ-Ч) подгруппы в зависимости от отдаленных результатов лечения.

Результаты генотипирования выявили значимое увеличение частоты встречаемости мутантного генотипа *ESR1* 2014AA rs2228480 в ТАМ-Р группе по сравнению с ТАМ-Ч в общей выборке больных люминальным РМЖ ($p = 0,040$) и пациенток с люминальным В подтипом ($p = 0,045$; Таблица 1). Хотя синонимичная замена в 8 экзоне гена *ESR1* не затрагивает аминокислотную последовательность экспрессируемого белка, однако может влиять на белковую экспрессию, изменяя сплайсинг или стабильность мРНК и, соответственно, эффективность процессов трансляции [Anghel et al., 2010]. Можно полагать, что мутации в этой области приводят к образованию транскрипционно-неактивного рецептора, изменяют способность ER α взаимодействовать с тамоксифеном и потенциально способствуют резистентности.

Доля гетерозигот *IGF1R* 3129TG преобладала в ТАМ-Р группе как в общей выборке больных люминальным РМЖ, так и среди больных люминального А подтипа ($p = 0,014$ и $p = 0,003$; соответственно). Кроме того, мутантный аллель G гена *IGF1R* rs2016347 был также ассоциирован с резистентностью к терапии тамоксифеном в двух исследуемых группах ($p = 0,046$ для люминального РМЖ и $p = 0,040$ для люминального А подтипа; Таблица 1). Учитывая расположение данного полиморфизма в пределах 3'-нетранслируемой области гена (3'UTR), с которой взаимодействуют микроРНК и РНК-связывающие белки, полагают, что *IGF1R* rs2016347 может влиять на стабильность мРНК и эффективность процессов трансляции [National Human Genome Research Institute, 2017]. Видимо наличие мутантного варианта гена *IGF1R* приводит к увеличению экспрессии мРНК, что может определять усиление активации IGF/IGF1-сигнальных путей и способствовать развитию резистентности. Оценка полиморфных вариантов гена *KDR* rs2305948 показала, что в ТАМ-Ч группе больных люминальным РМЖ (как в общей выборке, так и люминальном А типе) чаще встречается мутантный аллель А ($p = 0,015$ и $p = 0,032$; соответственно; Таблица 1).

Таблица 1 – Частота встречаемости полиморфных вариантов генов *ESR1*, *IGFR1* и *VEGFR2/KDR* у больных люминальным РМЖ в зависимости от эффективности лечения тамоксифеном

Генотип/ аллель	Люминальный РМЖ, n (%)				Люминальный А, n (%)				Люминальный В, n (%)			
	TAM-Ч	TAM-Р	OR (95% CI)	P	TAM-Ч	TAM-Р	OR (95% CI)	P	TAM-Ч	TAM-Р	OR (95% CI)	P
<i>ESR1</i> 2014G>A (rs2228480)												
<i>GG</i>	73(76,8)	20(74,1)	1,00		42(77,8)	12(75,0)	1,00		31(75,6)	8(72,7)	1,00	
<i>GA</i>	21(22,1)	4(14,8)	0,70 (0,18-2,49)	0,544	12(22,2)	4(25,0)	0,86 (0,20-3,85)	0,528	9(22,0)	0(0,0)	0,00 (0,00-2,88)	0,322
<i>AA</i>	1 (1,1)	3(11,1)	0,09 (0,00-1,08)	0,040 ¹	0 (0,0)	0 (0,0)	-		1(2,4)	3(27,3)	0,09 (0,00-1,16)	0,045 ³
Г аллель	167(87,9)	44(81,5)	1,00		96(88,9)	28(87,5)	1,00		71(86,6)	16(72,7)	1,00	
А аллель	23(12,1)	10(18,5)	1,65 (0,68-3,97)	0,224	12(11,1)	4(12,5)	1,14 (0,28-4,25)	0,761	11(13,4)	6(27,3)	0,41 (0,12-1,48)	0,189
<i>IGFR1</i> 3129G>T (rs2016347)												
<i>TT</i>	38(40,0)	4(14,8)	1,00		24(44,5)	1(6,2)	1,00		14(34,1)	3(27,3)	1,00	
<i>TG</i>	34(38,5)	15(55,6)	4,19 (1,14-6,70)	0,014 ¹	18(33,3)	11(68,8)	14,8 (1,66-2,15)	0,003 ²	16(39,0)	4(36,4)	1,17 (0,17-8,19)	0,596
<i>GG</i>	23(24,2)	8(29,6)	0,30 (0,07-1,29)	0,064	12(22,2)	4(25,0)	0,13 (0,00-1,45)	0,066	11(26,9)	4(36,3)	1,70 (0,24-2,56)	0,678
Т аллель	110(57,9)	23(42,6)	1,00		66(61,1)	13(40,7)	1,00		44(53,7)	10(45,5)	1,00	
Г аллель	80(42,1)	31(57,4)	1,85 (0,96-3,57)	0,046 ¹	42(38,9)	19(59,3)	2,30 (0,96-5,55)	0,040 ²	38(46,3)	12(54,5)	1,39 (0,49-3,96)	0,494
<i>KDR</i> 1192G>A (rs2305948)												
<i>GG</i>	77(83,7)	26(100,0)	1,00		41(80,4)	16(100,0)	1,00		36(87,8)	10(100,0)	1,00	
<i>GA</i>	12(13,0)	0(0,0)	0,00 (0,00-1,38)	0,065	8(15,7)	0(0,0)	0,00 (0,00-1,98)	0,184	4(9,8)	0(0,0)	0,00 (0,00-6,76)	0,571
<i>AA</i>	3(3,3)	0(0,0)	0,00 (0,00-7,14)	0,426	2(3,9)	0(0,0)	0,00 (0,00-11,7)	0,528	1(2,4)	0(0,0)	0,00 (0,00-1,50)	0,787
Г аллель	166(90,2)	52(100,0)	1,00		90(88,2)	32(100,0)	1,00		76(92,7)	20(100,0)	1,00	
А аллель	18(9,8)	0(0,0)	0,00 (0,00-0,93)	0,015 ¹	12(11,8)	0(0,0)	0,00 (0,00-1,29)	0,032 ²	6(7,3)	0(0,0)	0,00 (0,00-3,94)	0,595
Примечания												
TAM-Ч – тамоксифен-чувствительная группа, TAM-Р – тамоксифен-резистентная группа												
1 ¹ – значимые различия показателей в группе люминальный РМЖ												
2 ² – значимые различия показателей в группе люминальный А												
3 ³ – значимые различия показателей в группе люминальный В												

Интересно отметить, что и для второго полиморфного локуса гена *KDR* rs2071559, выявлена тенденция к взаимосвязи с благоприятными результатами лечения больных люминальным РМЖ ($p = 0,073$). Эти закономерности, по-видимому, отражают вовлеченность гена *KDR* в механизмы опухолевой прогрессии. Снижая уровень экспрессии VEGFR2 (rs2071559) или изменяя степень сродства VEGFR2 к его лигандам (rs2305948), данные мутации могут влиять на активность VEGFR2-опосредованных сигнальных каскадов и определять эффективность проводимой терапии.

Анализ профиля мРНК исследуемых генов показал, что уровень экспрессии гена *TGF- β RI* в опухоли тамоксифен-чувствительных пациенток с люминальным РМЖ (общая группа) почти в 10 раз превосходил таковой в образцах опухолевой ткани тамоксифен-резистентной группы ($4,64 \pm 1,56$ и $0,47 \pm 0,19$; $p = 0,046$; Рисунок 4)

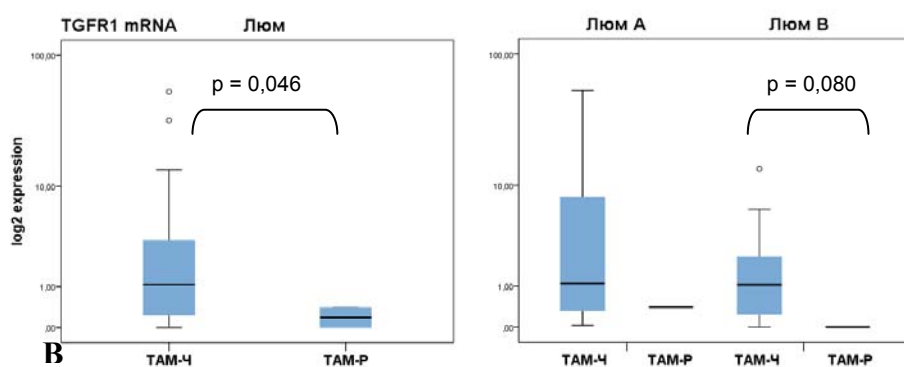


Рисунок 4 – Уровень экспрессии гена *TGF- β RI* в зависимости от эффективности терапии тамоксифеном в общей группе больных люминальным раком молочной железы, люминальным А (Люм А) и люминальным В (Люм В) типами. Результаты представлены в виде \log_2 значений экспрессии

Обнаружено, что показатели белковой экспрессии TGF- β RI также связаны с отдаленными результатами лечения больных эстроген-зависимым РМЖ. Позитивная экспрессия TGF- β RI выявлена в 72,1% люминальных опухолей TAM-Ч группы по сравнению с 48,0% в TAM-Р ($p = 0,030$; Рисунок 5). Таким образом, низкий уровень экспрессии как гена *TGF- β RI*, так и кодируемого им белка может являться одним из факторов, связанных с неэффективностью лечения тамоксифеном у больных люминальным РМЖ. Можно предположить, что низкая функциональная активность TGF- β RI обуславливает неполноценную функциональную реализацию TGF- β 1/Smad сигнальной трансдукции, что приводит к активации пролиферативных процессов в опухоли, в том числе и посредством запуска альтернативных сигнальных каскадов. Ключевую роль при этом, вероятно, имеет функциональный статус эстрогеновых рецепторов (активация ER α , наличие мутаций и точечных замен), которые могут быть вовлечены в супрессию TGF- β 1/Smad пути.

Мы показали, что преобладающее большинство TAM-Р опухолей имело высокий уровень экспрессии EGFR в отличие от TAM-Ч опухолей. Значимые различия

выявлены как для общей выборки люминального РМЖ, так и для люминального А типа ($p = 0,030$ и $p = 0,033$ соответственно; Рисунок 5).

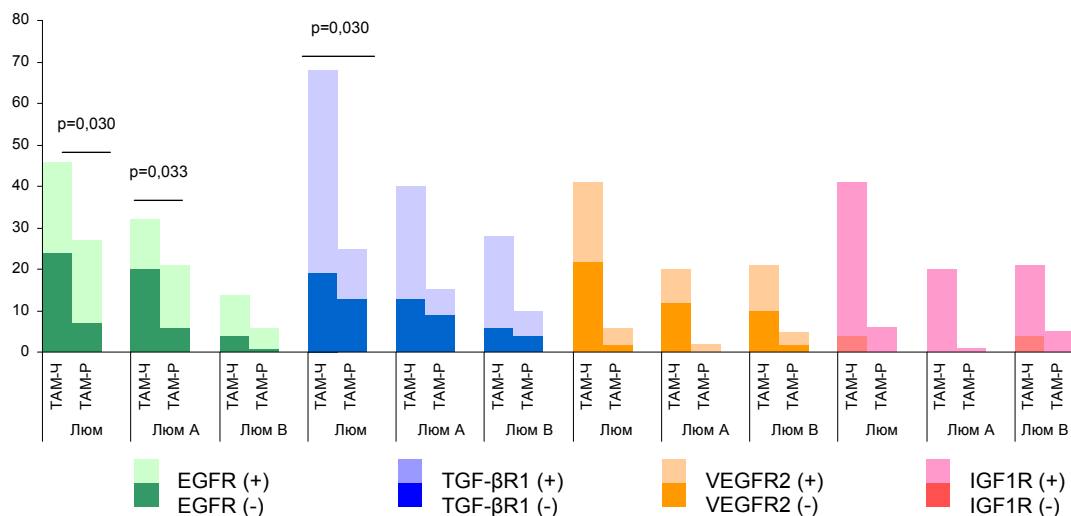


Рисунок 5— Наличие экспрессии (позитивная/негативная) рецепторов факторов роста в образцах опухолевой ткани больных люминальным (Люм), люминальным А (Люм А) и люминальным В (Люм В) раком молочной железы в зависимости от эффективности терапии тамоксифеном

Предполагается, что резистентность к тамоксифену инициируется активацией сигнальных каскадов EGFR (через MAPK и Akt), частично посредством запуска негеномного механизма активации ER α , поскольку классический ER α геномный путь в значительной степени супрессирован тамоксифеном [Ring et al., 2004; Nicholson et al., 2004; Chong et al., 2011; Xuan et al., 2014; Kim et al., 2015; Detre et al., 2017].

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

Анализ популяций клеток, экспрессирующих сочетание поверхностных маркеров стволовых опухолевых клеток показал, что для опухолей люминального А типа с высоким количеством CD44⁺/CD24^{low} в большей степени характерна устойчивость к тамоксифену ($p = 0,050$). Эти данные позволяют полагать, что клетки с фенотипом стволовых могут способствовать формированию не только клинически

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

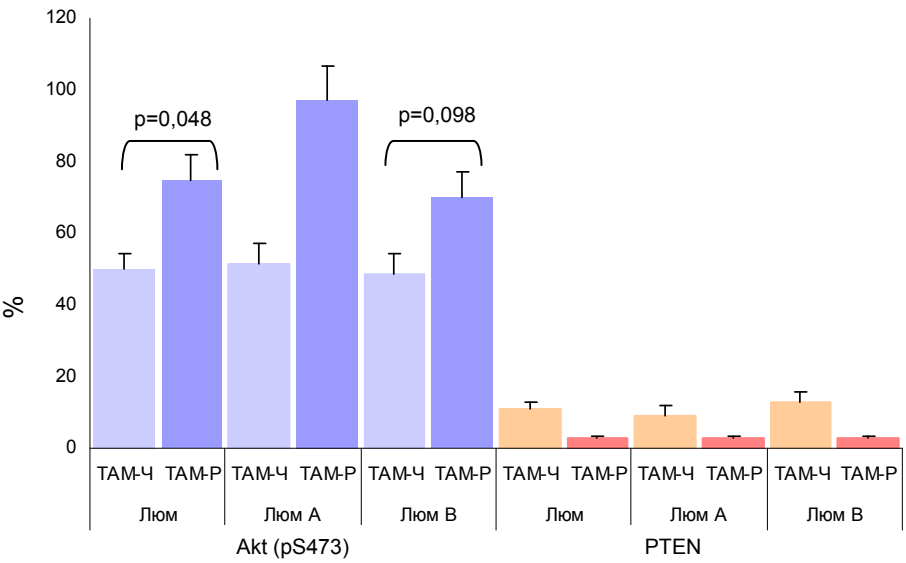


Рисунок 6 – Процент экспрессии Akt (pS473) и PTEN в образцах опухолевой ткани больных люминальным (Люм), люминальным А (Люм А) и люминальным В (Люм В) раком молочной железы в зависимости от эффективности терапии тамоксифеном

Изучив характер распределения ERα в ТАМ-Ч/ТАМ-Р группах, мы показали, что у больных люминальным РМЖ (как в общей группе, так и люминального А типа), не чувствительных к тамоксифену, чаще встречается гетерогенная экспрессия ERα по сравнению с пациентами, отвечающими на тамоксифен (Рисунок 7).

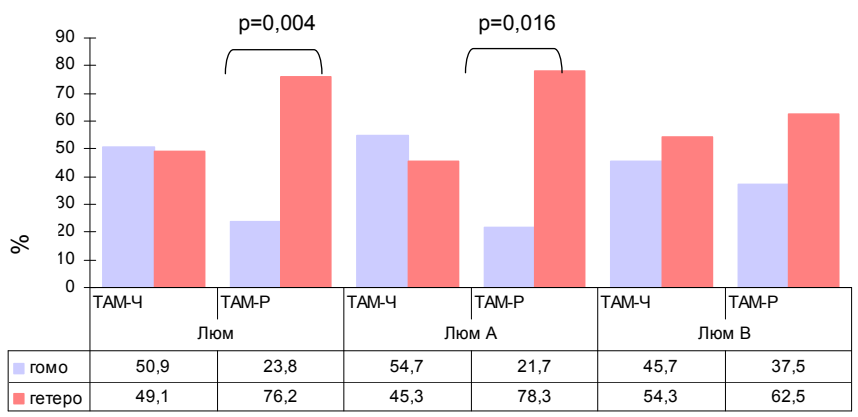


Рисунок 7 – Характер распределения ERα у больных люминальным (Люм), люминальным А (Люм А) и люминальным В (Люм В) раком молочной железы в зависимости от эффективности терапии тамоксифеном

Следует отметить, что мутантные варианты *ESR1*2014G>A (rs2228480) и уровень белковой экспрессии TGF-βRI во взаимосвязи с особенностями характера ERα в опухоли показали прогностическую значимость в качестве маркеров, связанных с эффективностью терапии тамоксифеном.

Оказалось, что пациенты как общей выборки эстроген-зависимого РМЖ, так и люминального А подтипа с наличием в опухолевой ткани мутаций в генах *ESR1* (rs2228480) и *IGFR1* (rs2016347) характеризуются не только резистентностью к тамоксифену, но и имеют низкие показатели безметастатической выживаемости. Пациенты с наличием в опухоли мутации в гене *KDR* (rs2305948), напротив, чувствительны к данной антиэстрогенной терапии и имеют высокие показатели выживаемости без прогрессирования (Рисунок 8).

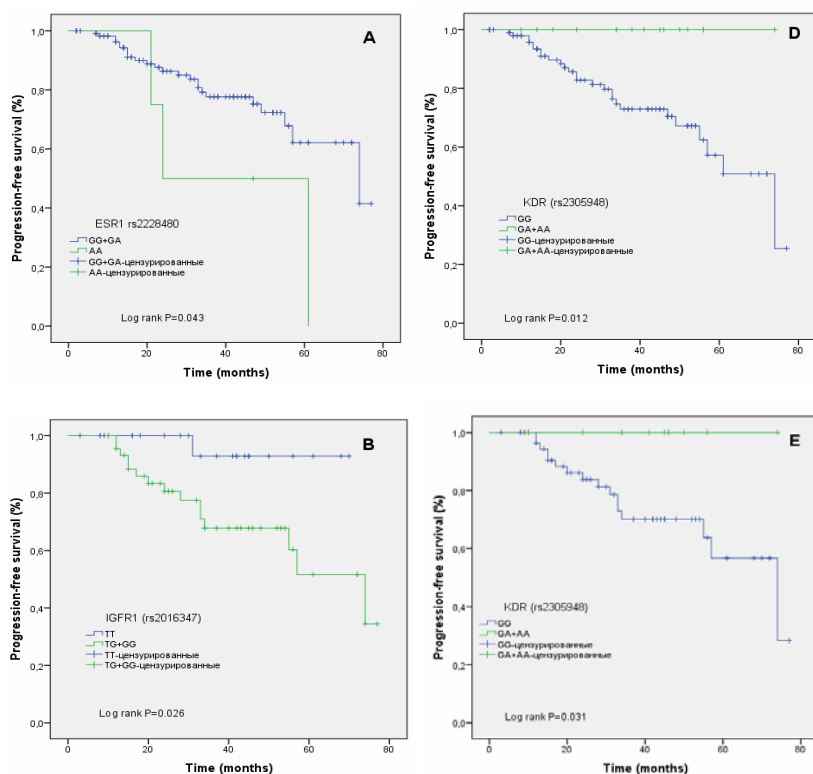


Рисунок 8 – Показатели безметастатической выживаемости в общей группе больных люминальным раком молочной железы (A,D) и люминальным А типом (B,E) в зависимости от генотипов *ESR1* (rs2228480), *IGFR1* (rs2016347) и *KDR* (rs2305948)

Отсутствие экспрессии TGF- β RI в опухолевой ткани связано с низкими показателями выживаемости у больных объединенной группы эстроген-зависимого РМЖ ($p = 0,032$; Рисунок 9 А). Прогностически неблагоприятным оказался позитивный уровень экспрессии EGFR, что подтверждают кривые выживаемости, как для общей группы, так и группы люминального А рака молочной железы ($p = 0,014$ и $p = 0,029$ соответственно; Рисунок 9 D, E). Выживаемость без прогрессирования была значительно хуже у больных с высоким уровнем экспрессии фосфорилированной формы белка Akt1 независимо от молекулярного подтипа эстроген-зависимого РМЖ ($p = 0,048$; Рисунок 9 B).

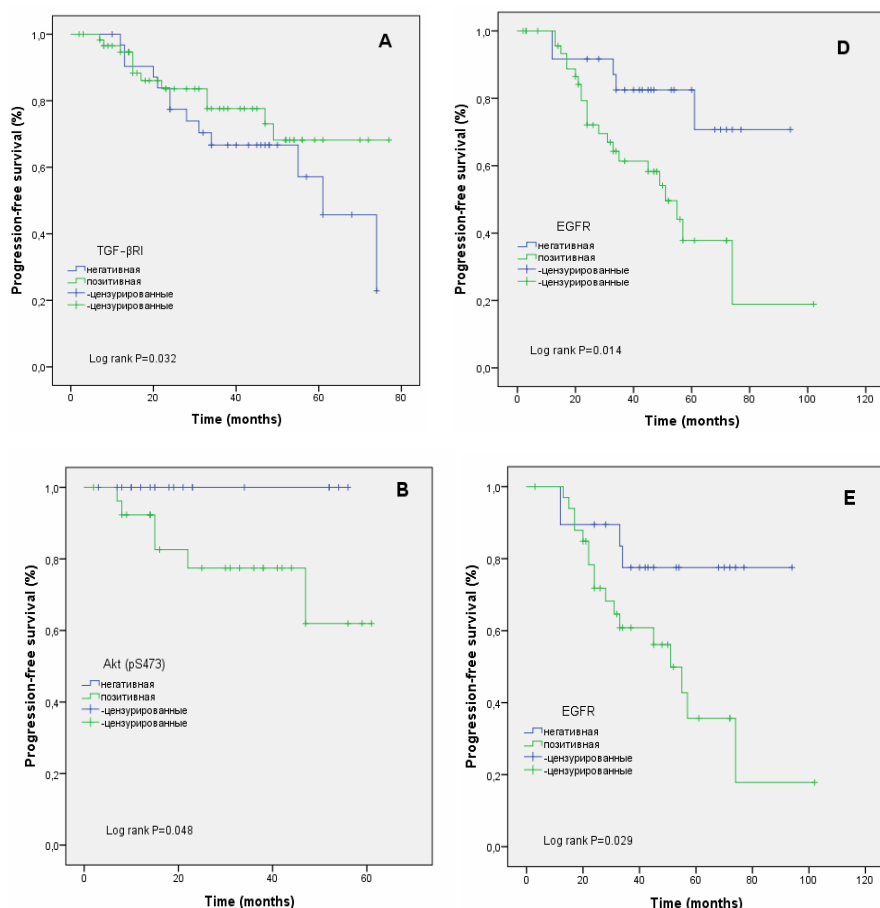


Рисунок 9 – Показатели безметастатической выживаемости в общей группе больных люминальным РМЖ (A,B,D), люминальным А подтипом (E) в зависимости от экспрессии TGF- β RI, EGFR и Akt(pS473)

Статистически значимо низкие показатели безметастатической выживаемости отмечены для опухолей с гетерогенным распределением ER α в общей выборке эстроген-зависимого рака и люминальной А подгруппе ($p = 0,002$ и $p = 0,013$ соответственно; Рисунок 10 A, B).

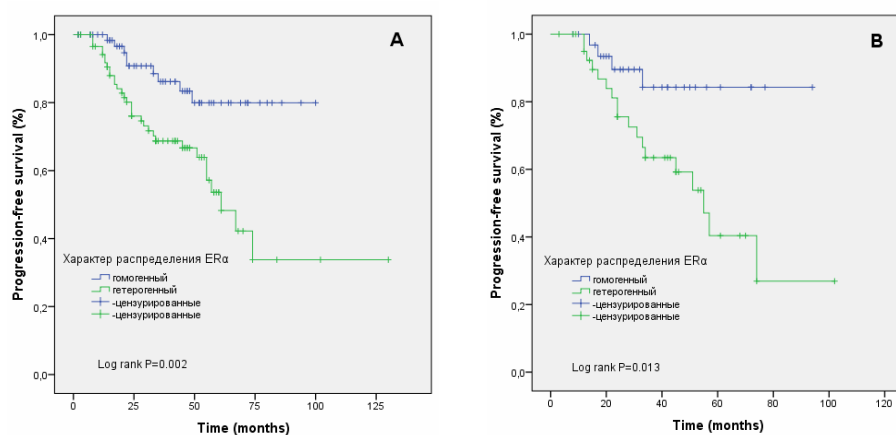


Рисунок 10 – Показатели безметастатической выживаемости в общей группе больных люминальным (A), люминальным А (B) РМЖ в зависимости от характера распределения ER α

Сочетанный ассоциативный анализ характера распределения ER α как с полиморфными вариантами гена *ESR1* (rs2228480), так и уровнем экспрессии белков TGF- β RI и EGFR подтвердил высокую значимость их комбинаций в отношении выживаемости у больных эстроген-зависимым РМЖ. Следует отметить, что, одновременный анализ нескольких неблагоприятных в плане чувствительности к антиэстрогенной терапии молекулярно-генетических параметров позволяет определить маркеры с наиболее выраженным прогностическим потенциалом.

С целью оценки вероятности развития прогрессирования заболевания на фоне терапии тамоксифеном для пациентов общей группы люминального РМЖ, люминального А и люминального В подтипов был применен логистический регрессионный анализ. Информативными факторами прогрессии в общей выборке пациентов люминальным РМЖ по данным многофакторного анализа с чувствительностью 98% и специфичностью 30% явились: характер распределения эстрогеновых рецепторов в опухоли (OR=3,763; 95%CI=1,241-11,410; p=0,019) и полиморфизм *ESR1*2014G>A (rs2228480) (OR=3,382; 95%CI=1,014-11,273; p=0,047). Маркерами исхода заболевания для люминального А РМЖ выступили состояние регионарных лимфатических узлов (OR=5,172; 95%CI=1,069-25,026; p=0,041), характер распределения ER α (OR=13,564; 95%CI=2,356-58,075; p=0,004) и уровень белковой экспрессии EGFR (OR=6,561; 95%CI=1,382-31,142; p=0,018). Чувствительность и специфичность данной модели составила 80% и 76%, соответственно. Единственным фактором прогноза, значимо влияющим на исход заболевания у больных люминальным В подтипом, было наличие/отсутствие мутации в полиморфном локусе 2014G>A гена *ESR1* (OR=3,824; 95%CI=1,159-12,619; p=0,028). Таким образом, получены две логистические регрессионные модели, позволяющие прогнозировать неэффективность адъювантной терапии тамоксифеном и как следствие, высокий риск прогрессирования заболевания у больных эстроген-зависимым РМЖ.

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

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

Выявлено, что содержание клеток с позитивной экспрессией EGFR снижалось с 85,7% до 44,8%; количество EGFR-негативных клеток, напротив, увеличивалось с 14,3% до 55,2% (p = 0,000; Рисунок 11 А). Аналогично, число VEGFR2-позитивных клеток до лечения составляло 81,2% с последующим снижением их количества после терапии до 44,9%; содержание клеток с негативной экспрессией VEGFR2 втроекратно возрастало в процессе НАХТ с 18,8% до 55,1% (p = 0,000; Рисунок 11 В).

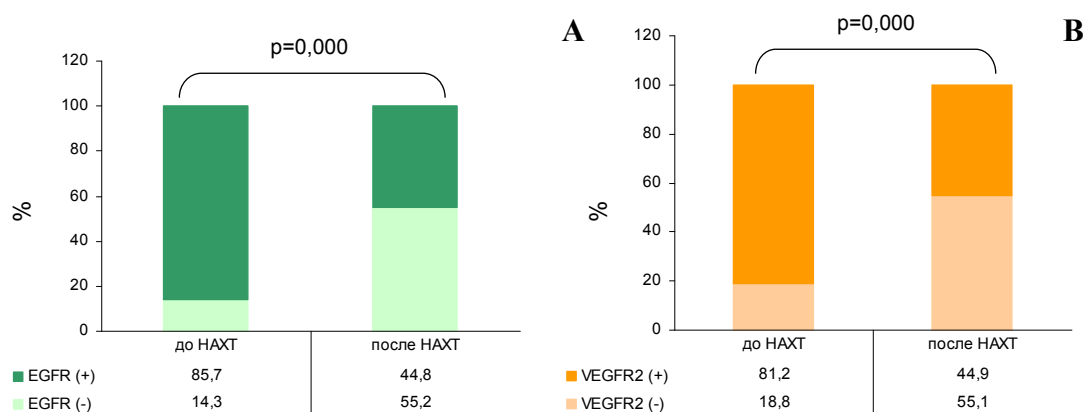


Рисунок 11 – Наличие экспрессии (позитивная/негативная) EGFR (А) и VEGFR2 (В) в образцах опухоли до и после проведения неoadъювантной химиотерапии (НАХТ)

Проанализировав число клеток, экспрессирующих исследуемые белки до лечебного воздействия, мы обнаружили высокий процент VEGFR2-позитивных клеток в опухолях с объективным клиническим и полным патоморфологическим ответом, однако только в отношении полных морфологических регрессий различия были статистически значимы ($p = 0,023$; Рисунок 12 А).

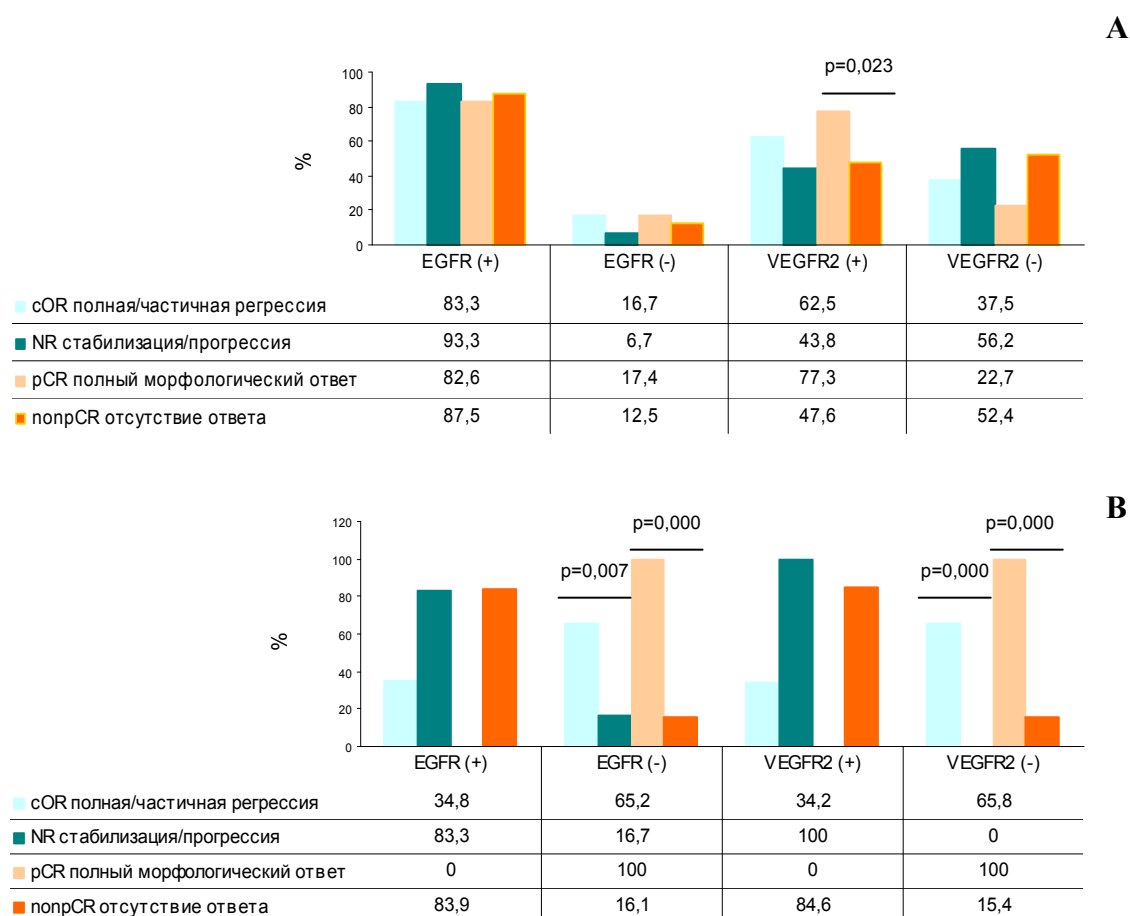


Рисунок 12 – Связь экспрессии (позитивная/негативная) EGFR и VEGFR2 в опухоли до (А) и после лечения (В) с эффективностью НАХТ

После НАХТ наблюдалось снижение числа клеток с позитивной экспрессией как EGFR, так и VEGFR2, тогда как число EGFR- и VEGFR2- негативных клеток возрастало, что было значимо ассоциировано с клиническим и патоморфологическим ответом опухоли (Рисунок 12 В). Таким образом, изначально высокий уровень в опухоли VEGFR2-позитивных клеток может являться показателем чувствительности опухоли к НАХТ. Помимо этого, негативный уровень или отсутствие экспрессии как EGFR, так и VEGFR2 после проведенного лечения может также являться предиктором эффективности НАХТ.

При анализе полиморфных вариантов генов *EGFR* и *KDR* обнаружена значимая ассоциация высокой частоты встречаемости мутантного генотипа *EGFR*CC в локусе rs1468727 с неэффективным ответом опухоли ($p = 0,042$; Таблица 2).

Таблица 2 – Связь полиморфизмов генов *EGFR* и *KDR* с эффективностью НАХТ

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

Показано, что гетерозиготный генотип *KDR*1192GA и мутантный аллель *KDR*1192A гена *KDR* (rs2305948) на уровне тенденции чаще встречались в группе больных, не отвечающих на предоперационную химиотерапию, по сравнению с пациентками, достигшими полного патоморфологического ответа опухоли ($p = 0,058$ и $p = 0,086$ соответственно; Таблица 2). Другие полиморфизмы не показали существенной связи с чувствительностью/резистентностью к НАХТ.

Полиморфный вариант rs1468727 затрагивает интронную область гена *EGFR* и напрямую не изменяет аминокислотную последовательность белка. Однако мутации внутри интронов могут оказывать существенное влияние на уровень процесса транскрипции и стабильность РНК. Предполагается, что мутантный вариант *EGFR*CC локуса rs1468727 связан с увеличением активности рецептора, его экспрессии или стабильности, что ведет к активации EGFR-опосредованных сигналов и значительному увеличению пролиферативного потенциала опухоли [Li et al., 2016]. Эта гипотеза находит подтверждение в нашей работе, поскольку *EGFR*CC мутантный генотип связан с отсутствием ответа опухоли на НАХТ. Исследованный нами полиморфизм гена *EGFR* практически не описан в литературе, продемонстрирована лишь связь мутации rs1468727 с прогнозом клинического течения глиом [Wang et al., 2015].

Другим наиболее информативным генетическим маркером, ассоциированным с эффективностью НАХТ у больных тройным негативным РМЖ, явился полиморфизм в промоторном участке гена *KDR*-604T>C rs2071559. Показано, что наличие мутантного варианта *KDR*-604CC связано с подавлением транскрипционной активности контролируемого гена и изменением экспрессии или активности VEGFR2 [Wang et al., 2007]. В нашей работе данный генотип определяет отсутствие эффективного ответа на предоперационную химиотерапию. Однако снижение экспрессионной активности *KDR* видимо не приводит к снижению активности белкового продукта, что определяет высокую функциональность VEGFR2-опосредованных факторов, способствующую прогрессированию заболевания. Следует особо подчеркнуть отсутствие доступных в литературе данных о влиянии SNP rs2071559 на эффективность лечения у пациентов с тройным негативным РМЖ.

При сравнении показателей выживаемости у больных ТНРМЖ с негативным и позитивным уровнем экспрессии в опухоли EGFR, выявленным до предоперационной химиотерапии, значимых различий получено не было ($p = 0,151$; Рисунок 13 А). Однако у больных с EGFR-негативной экспрессией, наблюдаемой после проведения неoadъювантного лечения, выживаемость без прогрессирования была значительно выше, чем у больных с EGFR-позитивной экспрессией; при этом различия приближались к границе значимости ($p = 0,066$; Рисунок 13 В). Известно, что избыточная экспрессия EGFR может способствовать активации большого количества внутриклеточных мессенджеров, в том числе PI3K/Akt, Ras/MAPK, STAT, что приводит к стимуляции пролиферативных процессов и увеличению инвазивности

опухоли. Совокупность этих процессов определяет платформу для прогрессии опухоли и, как следствие, ведет к сокращению времени до прогрессирования больных.

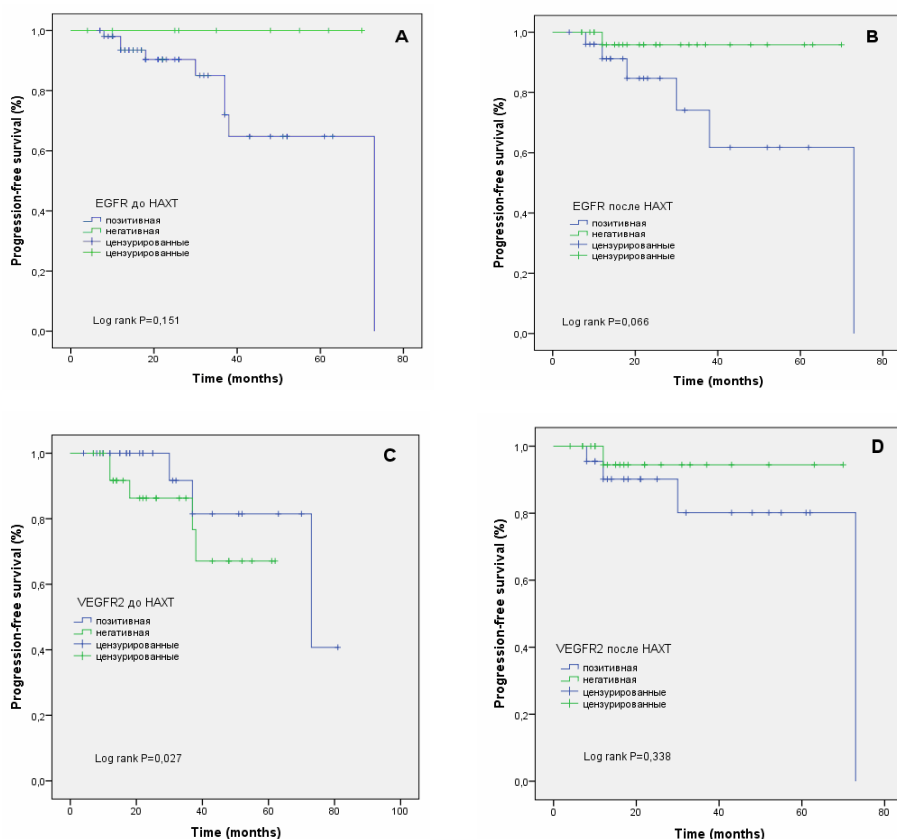


Рисунок 13 – Показатели безметастатической выживаемости у больных тройным негативным РМЖ в зависимости от экспрессии EGFR и VEGFR2 до (A,C) и после HAXT (B,D)

Пациенты с позитивной экспрессией в опухоли VEGFR2 до HAXT демонстрировали высокие показатели безметастатической выживаемости по сравнению с VEGFR2-негативными ($p = 0,027$; Рисунок 13 C). Зависимости между содержанием VEGFR2-экспрессирующих клеток в опухоли после проведенной терапии и показателями безметастатической выживаемости у больных ТНРМЖ получено не было ($p = 0,338$; Рисунок 13 D). Носительство того или иного генотипа исследуемого гена не было связано с показателями безметастатической выживаемости больных ТНРМЖ.

Для предсказания ожидаемой эффективности неoadъювантной химиотерапии у больных тройным негативным раком молочной железы были использованы методы математического моделирования. Установлено, что в многофакторном регрессионном анализе предикторами эффективности HAXT являются возраст пациенток на момент диагноза ($OR=1,545$; $95\%CI=0,448-2,643$; $p=0,005$) и уровень экспрессия VEGFR2 до лечения ($OR=1,102$; $95\%CI=0,009-2,196$; $p=0,048$). Чувствительность математической модели 90%, специфичность 65%. Валидация полученных результатов с

использованием бутстреп метода (Bootstrap method) подтвердила статистическую значимость выявленных маркеров как независимых предикторов ответа на НАХТ.

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

В основе предложенной нами методологии лежит комплексный системный подход с учетом не только основных клинико-морфологических факторов заболевания и состояния рецепторного аппарата опухоли, но и её молекулярно-генетических особенностей. Основные этапы методологии представлены на рисунке 14.



Рисунок 14 – Этапы методологии системного анализа маркеров прогноза и предсказания эффективности терапии РМЖ

Реализация этого подхода осуществлялась посредством одновременного анализа индивидуальных генетических особенностей, генной и белковой экспрессии основных компонентов интегрального для опухолевых клеток PI3K/Akt/mTOR сигнального пути. Для анализа маркеров на уровне генотипических особенностей были выбраны не только гены основных эффекторов PI3K/Akt/mTOR каскада, но и ключевые гены, вовлеченные в процессы пролиферации и апоптоза опухоли. На втором этапе исследования проведена оценка транскрипционной составляющей на уровне мРНК основных исследуемых генов, что дало возможность сопоставить индивидуально наследуемую генетическую компоненту с функциональной активностью гена. Далее были проанализированы особенности экспрессии рецепторных тирозинкиназ, внутриклеточных регуляторов PI3K/Akt/mTOR каскада и субпопуляций стволовых опухолевых клеток с целью понимания насколько функциональный потенциал генов реализуется в конечный белковый продукт. Использование методов описательной статистики, логистического регрессионного анализа и математического моделирования позволило выделить наиболее информативные маркеры, связанные с эффективностью терапии различных молекулярных подтипов РМЖ и создать модели прогнозирования исхода заболевания у больных эстроген-зависимым РМЖ (люминальный А и В подтипы) и предсказания эффективности неoadъювантной терапии у пациентов эстроген-независимым РМЖ (тройной негативный подтип).

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

Так, формирование тамоксифен-чувствительного фенотипа опухоли у больных эстроген-зависимым РМЖ возможно при участии белков семейства трансформирующего и сосудистого эндотелиального факторов роста. Наличие точечных мутаций гена *TGF-βR1* в локусе rs334354, по-видимому, приводит к высокой транскрипционной активности гена и, соответственно, высокой экспрессии кодируемого продукта, что может коррелировать со снижением активности Akt(pS473) и усилением TGF-β1/Smad-ассоциированных антипролиферативных сигналов в опухолях, преимущественно, люминального В подтипа рака молочной железы. Отсутствие мутаций *ESR1* и гомогенный характер распределения эстрогеновых рецепторов, ассоциированный с позитивной экспрессией TGF-βR1 в опухоли и высоким процентом клеток CD24⁻/TGF-βR1⁺, в значительной степени могут способствовать эффективному ответу опухоли на терапию тамоксифеном. Вклад белков семейства сосудистого эндотелиального фактора роста может быть опосредован точечной заменой rs2305948 гена *KDR*, которая определяет низкую эффективность связывания лиганда с рецептором и, соответственно, низкую активность VEGFR2-опосредованных сигнальных каскадов, в том числе и

PI3K/Akt/mTOR, в опухолях люминального А варианта РМЖ. Отсутствие активации PI3K/Akt/mTOR может частично быть обусловлено незначительным содержанием популяции опухолевых клеток с фенотипом VEGFR2⁺/Akt(pS473)⁺ (Рисунок 15).

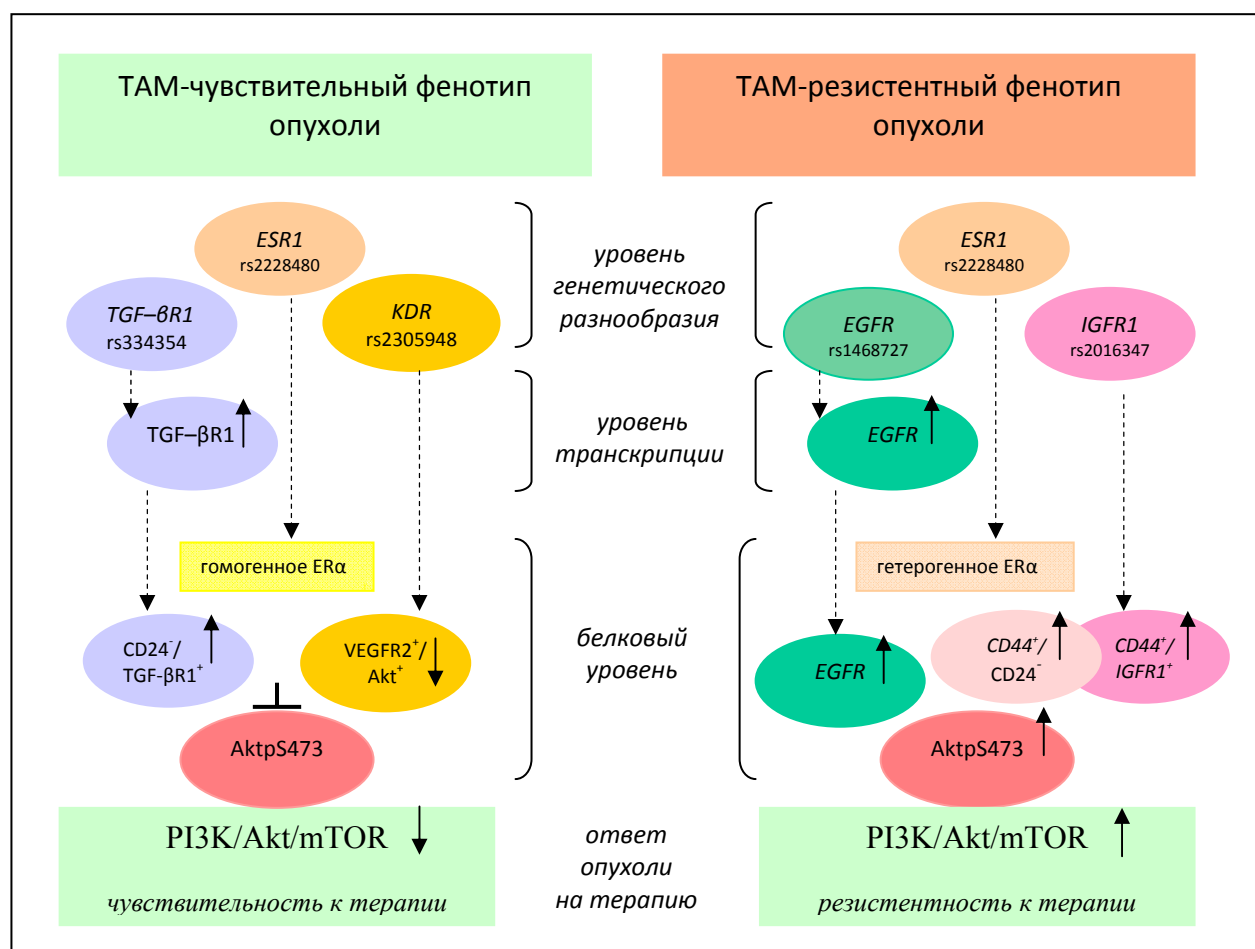


Рисунок 15 – Схема вовлечения молекулярно-генетических маркеров в механизмы формирования чувствительности/резистентности к тамоксифену в эстроген-зависимых опухолях

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

CD44⁺/IGF1R⁺ и CD44⁺/CD24⁻ популяций клеток, имеющих потенциал агрессивного фенотипа. Мутантный вариант гена *EGFR* локуса rs1468727 может оказывать существенное влияние на процессы транскрипции, приводя к увеличению экспрессии, как гена, так и белка, и запуску PI3K/Akt/mTOR сигнального пути через EGFR как вышестоящий эффектор.

Примечательно, что активация пролиферативных процессов посредством сигнальной системы EGFR, является преимущественным механизмом неэффективного ответа на неоадьювантную химиотерапию в эстроген-независимых опухолях (Рисунок 16).

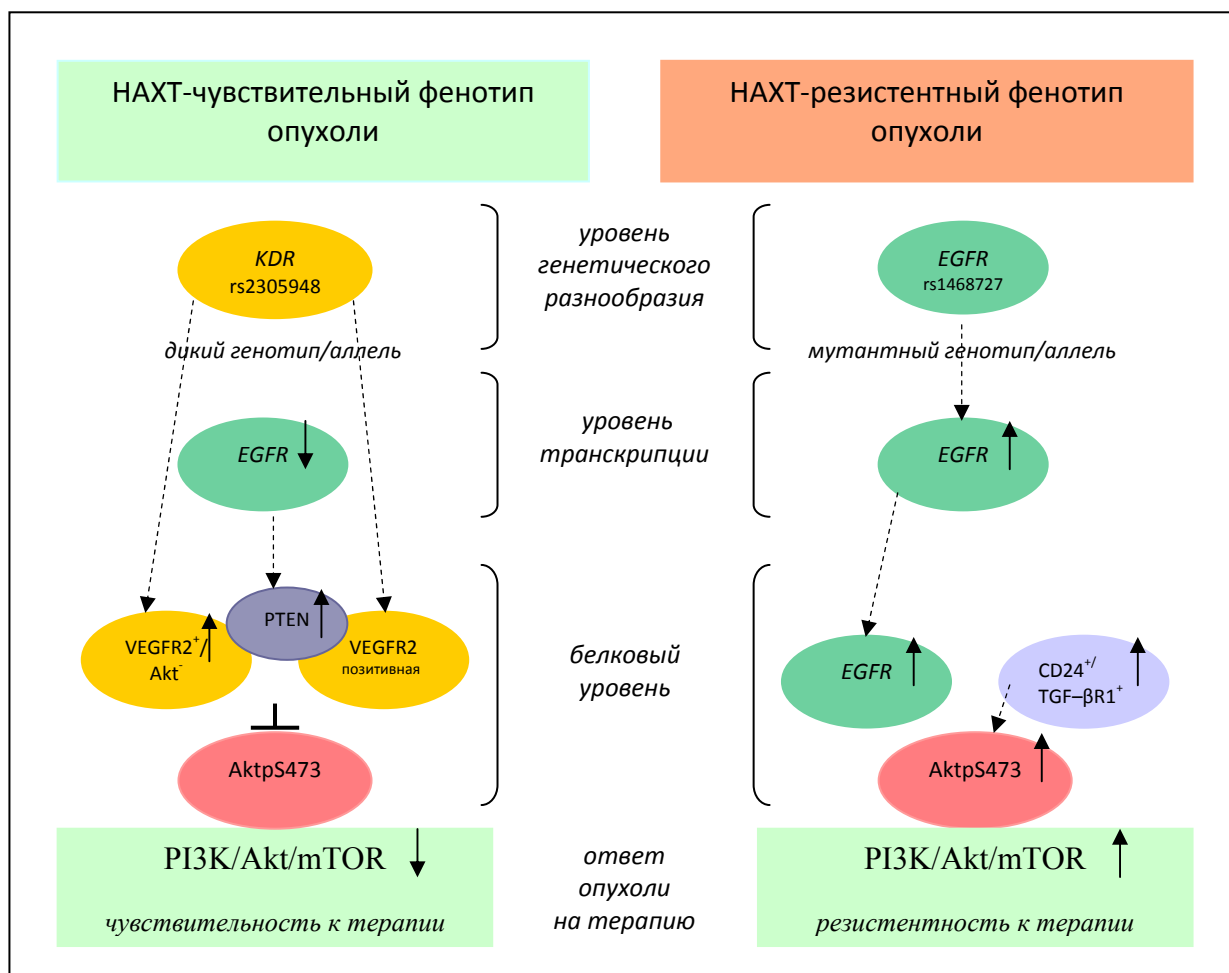


Рисунок 16 – Схема вовлечения молекулярно-генетических маркеров в механизмы формирования чувствительности/резистентности к НАХТ в эстроген-независимых опухолях

Мутации гена *EGFR*, определяемые в большинстве EGFR-позитивных опухолей в настоящем исследовании, могут обуславливать высокую активность EGFR, обеспечивающую устойчивость к предоперационному лечению. Потенциальным фенотипически агрессивным маркером исхода лечения заболевания может быть коэкспрессия опухолевыми клетками CD24⁺/TGF-βR1⁺. Видимо, высока вероятность активации TGF-β1-опосредованных внутриклеточных каскадов и стимуляции экспрессии мезенхимальных маркеров, что запускает процессы

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

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

ВЫВОДЫ

1. Выявлены особенности распределения частот встречаемости аллелей и генотипов исследуемых генов у больных РМЖ в зависимости от молекулярного подтипа. Мутантные варианты гена *FGFR2* rs1219648 ассоциированы с эстроген-зависимым РМЖ, вариантные генотипы *TGF-βRI* rs334354 и *KDR* rs2071559 – с опухолями люминального А подтипа, точечные мутации гена *ESR1* rs2228480 – с опухолями люминального В подтипа. С эстроген-независимым РМЖ связаны мутантные генотипы *EGFR* rs1468727.
2. В опухолях люминального А типа высоко экспрессированы гены *EGFR* и *TGF-βRI* по отношению к опухолям люминального В варианта (p=0,038 и p=0,050; соответственно). Люминальный А и В подтипы РМЖ характеризуются высоким уровнем экспрессии белка TGF-βRI по сравнению с эстроген-негативным РМЖ (p=0,063 и p=0,000; соответственно). Для опухолей с тройным негативным фенотипом отмечено преобладание опухолевых клеток с высокой экспрессией EGFR и VEGFR2 по сравнению с люминальным А РМЖ (p=0,001 и p=0,046; соответственно).
3. Эстроген-зависимые опухоли содержат значительное количество клеток, экспрессирующих фосфорилированную форму Akt1 – Akt(pS473), а также высокий

процент клеток с фенотипами, позитивными по экспрессии Akt1 и негативными по экспрессии рецепторов факторов роста (VEGFR2⁻/Akt(pS473)⁺/IGF1R⁻/Akt(pS473)⁺). Тройные негативные опухоли характеризуются высоким количеством PTEN-позитивных клеток и высоким процентом клеток, позитивных по экспрессии рецептора сосудистого эндотелиального фактора роста 2-го типа и негативных – по Akt1 (VEGFR2⁺/Akt(pS473)⁻).

4. Эстроген-зависимый (люминальный А и В) РМЖ ассоциирован с высоким уровнем экспрессии маркера CD24 в комплексе с рецептором трансформирующего фактора роста β I типа (CD24⁺/TGF- β RI⁺); эстроген-независимый РМЖ связан с высоким процентом клеточных фенотипов трижды позитивных по экспрессии гликопротеинов CD44/CD24 и фосфатазы PTEN (CD44⁺/CD24⁺/PTEN⁺).

5. Молекулярными маркерами, ассоциированными с резистентностью к тамоксифену у больных эстроген-зависимым РМЖ, являются высокий уровень экспрессии фосфорилированного белка Akt1, высокий процент клеток, коэкспрессирующих гликопротеин CD44 в комбинации с рецептором инсулиноподобного фактора роста 1-го типа (CD44⁺/IGF1R⁺) и гетерогенное распределение ER α в опухоли. Неэффективность ответа на тамоксифен у больных люминальным А подтипом связана с наличием мутантного аллеля G гена *IGFR1* rs2016347, высоким уровнем экспрессии EGFR и клеток с фенотипом стволовых CD44⁺/CD24^{-/low}. Носительство мутантных генотипов гена *ESR1* rs2228480 определяет резистентность к тамоксифену у больных люминальным В РМЖ.

6. Чувствительность опухолевых клеток к тамоксифену независимо от молекулярного подтипа РМЖ, ассоциирована с наличием мутантных аллелей гена *KDR* rs2305948, высоким уровнем генной и белковой экспрессии TGF- β RI, высоким процентом клеток с отсутствием коэкспрессии гликопротеина CD44 и рецептора инсулиноподобного фактора роста 1-го типа (CD44⁻/IGF1R⁻) и гомогенным распределением ER α в опухоли.

7. Отсутствие эффективного ответа на предоперационную химиотерапию у больных тройным негативным РМЖ связано с носительством мутантных генотипов *EGFR* локуса rs1468727. Среди пациентов, несущих мутантный вариант гена *EGFR*CC чаще встречаются опухоли с высокой экспрессией EGFR по сравнению с больными, имеющими дикий вариант *EGFR*TT (p=0,047). Взаимосвязь с резистентностью к НАХТ с включением капецитабина показана для мутантного варианта гена *KDR* rs2071559. Показатели экспрессии белков EGFR/VEGFR2 значимо снижаются в процессе лечения, причем высокий уровень VEGFR2-позитивных клеток до предоперационной терапии и низкий уровень экспрессии EGFR/VEGFR2 после НАХТ связаны с объективным клиническим и полным патоморфологическим ответом опухоли.

8. Генетические маркеры (мутации *ESR1* rs2228480), белковые маркеры (высокое содержание EGFR- и AktpS473-позитивных клеток), гетерогенный характер

распределения ERα в опухоли и сочетание двух маркеров одновременно (гетерогенное распределение ERα/мутации гена *ESR1* rs2228480, гетерогенное распределение ERα/позитивный уровень экспрессии EGFR) ассоциированы с низкими показателями безметастатической выживаемости больных эстроген-зависимым РМЖ.

9. Высокие показатели безметастатической выживаемости ассоциированы с наличием VEGFR2-позитивных клеток в опухоли до предоперационной терапии у больных тройным негативным РМЖ. Низкий уровень экспрессии EGFR в опухоли после применения FАC схемы НАХТ значительно увеличивает время до прогрессирования у больных эстроген-независимым РМЖ.

10. Математическая модель прогнозирования риска прогрессирования РМЖ на фоне адъювантной терапии тамоксифеном для эстроген-позитивных опухолей включает полиморфизм гена *ESR1* в локусе rs2228480 и характер распределения ERα в опухоли (чувствительность модели 98%, специфичность 30%). Независимыми факторами прогноза, составляющими модель для опухолей люминального А типа, являются три маркера – наличие/отсутствие метастазов в лимфоузлы, характер распределения ERα и уровень экспрессии EGFR (чувствительность модели 80%, специфичность 76%). Для люминального В РМЖ адекватной модели не получено.

11. Факторами, предсказывающими ожидаемую эффективность неоадъювантной химиотерапии у больных тройным негативным РМЖ в математической модели с чувствительностью 90% и специфичностью 65%, являются возраст пациенток и статус белковой экспрессии VEGFR2 до предоперационного лечения.

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

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При оценке риска прогрессирования РМЖ на фоне адъювантной терапии тамоксифеном для эстроген-позитивных опухолей показано использование математической модели, включающей полиморфизм гена *ESR1* в локусе rs2228480 и характер распределения ERα в опухоли. Для прогнозирования эффективности адъювантной терапии тамоксифеном в опухолях люминального А подтипа РМЖ целесообразно учитывать состояние регионарных лимфатических узлов, характер распределения ERα и уровень экспрессии EGFR в опухоли.

2. Оценка непосредственной эффективности неоадьювантной химиотерапии у больных тройным негативным РМЖ должна проводиться с использованием математической модели, включающей возраст и уровень белковой экспрессии VEGFR2 в опухоли до предоперационного лечения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Бабышкина, Н.Н. Генетические и клинико-патологические особенности рака молочной железы у больных с сохраненной менструальной функцией и в менопаузе [Текст] / В.М. Перельмутер, М.В. Завьялова, С.В. Вторушин, Е.М. Слонимская, Н.Г. Крицкая, Е.Ю. Гарбуков, Н.В. Литвяков, М.Н. Стахеева, Н.Н. Бабышкина, Е.А. Малиновская, Е.В. Денисов, Е.С. Григорьева, М.С. Назаренко, С.В. Сенников, Е.П. Горева, В.А. Козлов, М.И. Воевода, В.Н. Максимов, В.А. Белявская, Н.В. Чердынцева // Успехи геронтологии. – 2008. – Том 21, № 4. – С.643-653.
2. Бабышкина, Н.Н. Исследование связи параметров иммунной системы с эффективностью неоадьювантной химиотерапии у больных раком молочной железы [Текст] / М.Н. Стахеева, Я.В. Кухарев, Е.Ю. Гарбуков, Н.В. Литвяков, Н.Н. Бабышкина, А.А. Медюхина, А.В. Дорошенко, Ю.Л. Кокорина, Е.Н. Кологривова, Е.М. Слонимская, Н.В. Чердынцева // Сибирский медицинский журнал. – 2008. – Т.23, № 3.– С.39-44.
3. Бабышкина, Н.Н. Мутации в гене–супрессоре TP53 и их связь с особенностями клинического течения рака молочной железы [Текст] / Е.В. Денисов, Н.В. Литвяков, М.Н. Стахеева, Е.Ю. Гарбуков, Е.М. Слонимская, Е.А. Малиновская, Н.Н. Бабышкина, В.Н. Стегний, Н.В. Чердынцева // Сибирский онкологический журнал. – 2008. – Т.26, № 2.– С.32-36.
4. Бабышкина, Н.Н. Влияние полиморфизма генов апоптоза и репарации на эффективность неоадьювантной химиотерапии злокачественных новообразований [Текст] / П.А. Гервас, Н.В. Литвяков, М.Н. Стахеева, С.В. Миллер, А.Ю. Добродеев, Е.Ю. Гарбуков, Н.Н. Бабышкина, Я.В. Кухарев, М.В. Васильева, Е.М. Слонимская, В.А. Белявская, С.А. Тузиков, Н.В. Чердынцева // Сибирский онкологический журнал. – 2009. – № 4. – С.41-47.
5. Бабышкина, Н.Н. Полиморфизм генов и ИЛ-1 β у больных раком молочной железы [Текст] / А.Н. Силков, Е.П. Горева, А.С. Жовмер, Ф.Д. Киреев, В.Н. Максимов, И.В. Пилипенко, Е.А. Малиновская, Н.Н. Бабышкина, Н.В. Литвяков, С.В. Сенников, В.А. Козлов // Российский иммунологический журнал. – 2009. – Т.3, № 3-4. – С.259-266.
6. Бабышкина, Н.Н. Изучение взаимосвязи Arg72Pro полиморфизма и соматических мутаций гена TP53 у больных раком молочной железы [Текст] / Е.В. Денисов, Н.В. Литвяков, Е.М. Слонимская, Е.А. Малиновская, Н.Н. Бабышкина, В.Н. Стегний, В.А. Белявская, М.И. Воевода, Н.В. Чердынцева // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. Под ред. А.Б. Масленникова. – Вып. 13. – Новосибирск: Альфа Виста, 2009. – С.66-74.
7. Бабышкина, Н.Н. Роль трансформирующего ростового фактора TGF- β 1 в патогенезе рака молочной железы [Текст] / Н.Н. Бабышкина, Е.А. Малиновская, М.Н.

- Стахеева, В.В. Волкоморов, А.А. Уфандеев, Е.М. Слонимская // Сибирский медицинский журнал. – 2010. – Т.42, № 6. – С.63-70.
8. Бабышкина, Н.Н. Взаимосвязь состояния иммунной системы как интегрированного целого с клиническим течением рака молочной железы [Текст] / М.Н. Стахеева, Д. Эйдензон, Е.М. Слонимская, Я.В. Кухарев, Е.Ю. Гарбуков, Н.Н. Бабышкина, Н.В. Чердынцева // Сибирский онкологический журнал. – 2011. – № 2. – С.11-19.
9. Babyshkina, N.N. Association of functional –509C>T polymorphism in the TGF- β 1 gene with infiltrating ductal breast carcinoma risk in a Russian Western Siberian population [Текст] / N. Babyshkina, E. Malinovskaya, M. Stakheyeva, V. Volkomorov, E. Slonimskaya, V. Maximov, N. Cherdyntseva // Cancer Epidemiology. – 2011. – Vol. 35. – P.560-563.
10. Babyshkina, N.N. Crosstalk between the FGFR2 and TP53 genes in breast cancer: data from an association study and epistatic interaction analysis [Текст] / N.V. Cherdyntseva, E.V. Denisov, N.V. Litviakov, V.N. Maksimov, E.A. Malinovskaya, N.N. Babyshkina, E.M. Slonimskaya, M.I. Voevoda, E.L. Choinzonov // DNA Cell Biol. – 2012. – Vol. 31(3). – P.306-316.
11. Бабышкина, Н.Н. Анализ ассоциаций полиморфизма гена VEGF-A в позициях -2578A/C и +936C/T с разным рецепторным статусом у больных раком молочной железы [Текст] / А.В. Шевченко, В.И. Коненков, Н.Н. Бабышкина, О.В. Савенкова, Е.М. Слонимская // Сибирский онкологический журнал. – 2013. – № 1. – С.32-37.
12. Бабышкина, Н.Н. Связь иммунологических показателей с эффективностью неoadъювантной химиотерапии у больных раком молочной железы [Текст] / Я.В. Кухарев, М.Н. Стахеева, А.В. Дорошенко, Н.В. Литвяков, Н.Н. Бабышкина, Е.М. Слонимская, Н.В. Чердынцева // Сибирский онкологический журнал. – 2013. – № 2. – С.50-57.
13. Babyshkina, N.N. The effect of folate-related SNPs on clinicopathological features, response to neoadjuvant treatment and survival in pre- and postmenopausal breast cancer patients [Текст] / N. Babyshkina, E. Malinovskaya, M. Nazarenko, M. Koval, P. Gervas, O. Potapova, E. Slonimskaya, N. Cherdyntseva // Gene. – 2013. – Vol. 518(2). – P.397-404.
14. Бабышкина, Н.Н. Влияние характера распределения рецепторов эстрогенов альфа и их индивидуальных генетических особенностей на эффективность эндокринотерапии тамоксифеном у пациенток с люминальным типом рака молочной железы [Текст] / С.В. Паталяк, Е.М. Слонимская, С.В. Вторушин, Н.Н. Бабышкина, В.М. Перельмутер, М.В. Завьялова, Л.А. Чурилова, С.Ю. Бахарев // Врач-аспирант. – 2014. – Т.62, № 1.3. – С.423-427.
15. Бабышкина, Н.Н. Роль морфологических и генетических особенностей строения рецепторов эстрогенов альфа в развитии резистентности к эндокринотерапии тамоксифеном у пациенток с люминальным раком молочной железы [Текст] / Е.М. Слонимская, С.В. Вторушин, Н.Н. Бабышкина, С.В. Паталяк // Сибирский онкологический журнал. – 2014. – № 3. – С.39-44.
16. Babyshkina, N.N. Neoadjuvant chemotherapy for different molecular breast cancer subtypes: a retrospective study in Russian population [Текст] / N. Babyshkina, E. Malinovskaya, S. Patalyak, O. Bragina, N. Tarabanovskaya, A. Doroshenko, E. Slonimskaya, V. Perelmuter, N. Cherdyntseva // Med Oncol. – 2014. – Vol. 31(9). – P.165.

17. Бабышкина, Н.Н. Клеточные и молекулярные маркеры эффективности терапии злокачественных новообразований: популяционные и этнические аспекты [Текст] / П.А. Гервас, М.Н. Стахеева, А.А. Иванова, Е.А. Малиновская, Н.Н. Бабышкина // Сибирский онкологический журнал. – 2015. – № S2. – С.23-26.
18. Бабышкина, Н.Н. Оценка предсказательной значимости рецептора сосудистого эндотелиального фактора роста VEGFR-2 у больных тройным негативным раком молочной железы [Текст] / Н.Н. Бабышкина, М.В. Завьялова, О.Д. Брагина, Т.А. Дронова, Е.М. Слонимская, Н.В. Чердынцева // Сибирский онкологический журнал. – 2016. – №.15 (5). – С.9-17.
19. Babyshkina, N.N. Non-Smad TGF- β signaling components are possible biomarkers of tamoxifen resistance [Электронный ресурс] / N. Babyshkina, M. Zavyalova, S. Patalyak, T. Dronova, E. Slonimskaya, N. Cherdyntseva // AIP Conference Proceedings. – 2017. – P. 1882, 020003.
20. Бабышкина, Н.Н. Роль рецептора трансформирующего фактора роста VI типа (TGF-BRI) в прогрессировании люминального подтипа рака молочной железы [Текст] / Н.Н. Бабышкина, С.В. Вторушин, Т.А. Дронова, Н.В. Крахмаль, М.В. Завьялова, М.М. Цыганов, С.В. Паталяк, Е.М. Слонимская, Н.В. Чердынцева // Сибирский онкологический журнал. – 2017. – Т. 16, № 2. – С.27-35.
21. Babyshkina, N.N. The distribution pattern of ER α expression, ESR1 genetic variation and expression of growth factor receptors: association with breast cancer prognosis in Russian patients treated with adjuvant tamoxifen [Текст] / N. Babyshkina, S. Vtorushin, M. Zavyalova, S. Patalyak, T. Dronova, N. Litviakov, E. Slonimskaya, J. Kzhyshkowska, N. Cherdyntseva, E. Choynzonov // Clinical and Experimental Medicine. – 2017. – Vol. 17(3). – P.383-393.
22. Babyshkina, N.N. Predictive value of vascular endothelial growth factor receptor type 2 in triple-negative breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy [Текст] / N. Babyshkina, M. Zavyalova, N. Tarabanovskaya, T. Dronova, N. Krakhmal, E. Slonimskaya, J. Kzhyshkowska, E. Choynzonov, N. Cherdyntseva // Mol Cell Biochem. – 2018. – Vol. 444 (1-2). – P.197-206.
23. Бабышкина, Н.Н. Взаимосвязь компонентов EGFR/PI3K/AKT-сигнального пути с эффективностью терапии тамоксифеном у больных эстрогензависимым раком молочной железы [Текст] / Т.А. Дронова, Н.Н. Бабышкина, М.В. Завьялова, С.В. Паталяк, Е.М. Слонимская, Н.В. Чердынцева, Ю.Г. Кзышкова // Успехи молекулярной онкологии. – 2018. – Т.5, № 3. – С.40-50.
24. Babyshkina, N.N. Selective inactivation of TP53 ARG72PRO alleles in breast cancer [Текст] / E.V. Denisov, N.N. Babyshkina, E.A. Malinovskaya, N.V. Litviakov, V.N. Stegnyy, N.V. Cherdyntseva // International Conference on Molecular Oncology. – Novosibirsk, Russia, October 1-3, 2008. – P.13-14.
25. Бабышкина, Н.Н. Неоадьювантная химиотерапия как фактор модуляции активности иммунной системы у больных раком молочной железы при прогрессировании заболевания [Текст] / М.Н. Стахеева, Я.В. Кухарев, Е.Ю. Гарбуков, Е.М. Слонимская, Н.Н. Бабышкина, Ю.Л. Кокорина, А.В. Дорошенко, Н.В. Чердынцева // Сибирский онкологический журнал. – 2008. – № S2. – С.82-83.

26. Бабышкина, Н.Н. Генетические полиморфизмы у больных раком молочной железы с разным менструальным статусом [Текст] / Н.В. Чердынцева, Е.А. Малиновская, Н.Н. Бабышкина, Н.В. Литвяков, М.В. Завьялова, С.В. Вторушин, Е.М. Слонимская, И.Н. Лебедев, М.С. Назаренко, С.В. Сенников, Е.П. Горева, В.А. Козлов, М.И. Воевода, В.Н. Максимов, В.А. Белявская, В.М. Перельмутер // Сибирский онкологический журнал. – 2008. – № S2. – С.91-92.
27. Бабышкина, Н.Н. Ассоциативный анализ полиморфизмов генов P53 и C-FMS с развитием рака молочной железы у русских женщин [Текст] / И.В. Пилипенко, О.В. Горчакова, В.Ф. Кобзев, М.И. Воевода, Н.Н. Бабышкина, Н.В. Чугунова, А.В. Дорошенко, А.Г. Ромащенко // Сибирский онкологический журнал. – 2008. – № S1. – С.106-107.
28. Бабышкина, Н.Н. Связь параметров иммунной системы с клинико-морфологическими характеристиками опухоли у больных раком молочной железы [Текст] / Я.В. Кухарев, М.Н. Стахеева, Е.Н. Кологривова, Н.В. Литвяков, Н.Н. Бабышкина, Е.Ю. Гарбуков, А.В. Дорошенко, Ю.А. Кокорина, А.Л. Медюхина // Сибирский медицинский журнал: материалы научной конференции с международным участием «Дни иммунологии в Сибири». – Томск. – 2008. – № 3. – С.101.
29. Бабышкина, Н.Н. Иммунная система у больных раком молочной железы: связь с прогрессией и эффективностью цитостатической терапии [Текст] / Н.В. Чердынцева, М.Н. Стахеева, Н.В. Литвяков, Н.Н. Бабышкина, Е.А. Малиновская, Я.В. Кухарев, Е.Ю. Гарбуков, Е.М. Слонимская // Сибирский медицинский журнал: материалы научной конференции с международным участием «Дни иммунологии в Сибири». – Томск. – 2008. – № 3. – С.123-124.
30. Бабышкина, Н.Н. Иммунная система вносит вклад в эффективность цитостатической терапии рака [Текст] / Н.В. Чердынцева, М.Н. Стахеева, Н.В. Литвяков, Н.Н. Бабышкина, Е.М. Слонимская, Е.А. Малиновская, Е.В. Денисов, Я.В. Кухарев, Е.Ю. Гарбуков // Российский иммунологический журнал: материалы Объединенного иммунологического форума. – Санкт-Петербург. – 2008. – Том 2(11), №2-3. – С.316.
31. Babyshkina, N.N. Association of TP53 (Arg72Pro), CCR5 (del32) and TGFB1-509C>T gene polymorphism and their combinations with breast cancer risk and pathologic response after neoadjuvant chemotherapy [Текст] / N.N. Babyshkina, E.A. Malinovskaya, M.N. Stakheyeva, N.V. Cherdyntseva, E.M. Slonimskaya // Annals of Oncology. – 2009. – Vol. 20(2). – P.1139.
32. Babyshkina, N.N. TP53 gene mutations and Pro72Arg polymorphism in breast cancer patient's tumour [Текст] / E.V. Denisov, N.N. Babyshkina, N.V. Litvyakov, E.A. Malinovskaya E.M. Slonimskaya, V.N. Stegnyy, N.V. Cherdyntseva // Annals of Oncology. – 2009. – Vol. 20(2). – P. 1138.
33. Babyshkina, N.N. Association of polymorphisms of angiogenesis genes with infiltrating ductal breast carcinoma [Текст] / N.N. Babyshkina, V.N. Maximov, M.I. Voevoda, M.Yu. Salakhutdinova, V.I. Konenkov, E.A. Malinovskaya, M.N. Stakheyeva, N.V. Cherdyntseva, E.M. Slonimskaya // Tomsk Region and Taiwan: Experience of Scientific-Technical and Innovation Cooperation. Proceeding of Siberian-Taiwan Forum 16-17 September. – Tomsk. – 2009. – P.97-99.
34. Babyshkina, N.N. Relationship of expression of multidrug resistance genes in tumor tissues from breast cancer patients with the efficacy to neoadjuvant chemotherapy [Текст] / N.V. Litvyakov, E.Yu. Garbukov, N.N. Babyshkina, M.M. Tsyganov, M.V. Merzlyakova, M.V. Zav'ialova, V.M. Perel'muter, E.M. Slonimskaya, N.V. Cherdyntseva // Tomsk Region and

Taiwan: Experience of Scientific-Technical and Innovation Cooperation. Proceeding of Siberian-Taiwan Forum 16-17 September. – Tomsk. – 2009. – P.116-118.

35. Babyshkina, N.N. Germ line polymorphism in breast cancer risk and progression in Siberian population of Russia [Текст] / N.V. Cherdyntseva, E.M. Slonimskaya, V.M. Perel'muter, M.V. Zav'ialova S.V. Vtorushin, E.Yu. Garbukov, L.F. Guljaeva, V.O. Pustyl'njak, N.V. Litvyakov, M.N. Stakheyeva N.N. Babyshkina, E.A. Malinovskaya, E.V. Denisov, E.S. Grigorjeva, I.V. Pilipenko, A.G. Romaschenko, A.A. Ponomaryova, I.N. Lebedev, M.S. Nazarenko, S.V. Sennikov, E.P. Goreva, A.N. Silkov, A.S. Jgovmer, A.Yu. Grichanova, O.B. Goreva, T.A. Seredina, V.O. Talaban, V.V. Lyakhovich, O.V. Golovanova, A.V. Shevchenko, M.Yu. Salakhutdinova, V.N. Maximov, M.I. Voevoda, V.I. Konenkov, V.P. Puzyrev, V.A. Kozlov // Tomsk Region and Taiwan: Experience of Scientific-Technical and Innovation Cooperation. Proceeding of Siberian-Taiwan Forum 16-17 September. – Tomsk. – 2009. – P.19-25.

36. Бабышкина, Н.Н. Исследование сочетаний полиморфных вариантов генов TP53 и TGFB1 у больных с инфильтрирующим протоковым раком молочной железы [Текст] / Н.Н. Бабышкина, Е.А. Малиновская, В.В. Волкоморов, А.А. Уфандеев, М.Н. Стахеева, Н.В. Чердынцева, Е.М. Слонимская // Сибирский онкологический журнал. – 2009. – Прил. № 2. – С.20-21.

37. Бабышкина, Н.Н. Динамика состояния иммунной системы у больных раком молочной железы при проведении противоопухолевого лечения как показатель его эффективности [Текст] / М.Н. Стахеева, Я.В. Кухарев, Н.В. Чердынцева, Е.М. Слонимская, Е.Ю. Гарбуков, Н.Н. Бабышкина, Ю.Л. Кокорина, А.В. Дорошенко, Н.А. Тарабановская, М.Р. Патышева // Сибирский онкологический журнал. – 2009. – Прил. № 2. – С.184-185.

38. Бабышкина, Н.Н. Частота гаплотипов по гену TP53 в крови и опухоли больных раком молочной железы [Текст] / Е.В. Денисов, Н.В. Литвяков, Н.Н. Бабышкина, Е.А. Малиновская // Сибирский онкологический журнал. – 2009. – Прил. № 1. – С.61-62.

39. Babyshkina, N.N. TGFB1–509C>T and IL10–92C>A polymorphic variants in relationship to breast cancer progression and response to neoadjuvant chemotherapy [Текст] / N. Babyshkina, A. Shevchenko, N. Cherdyntseva, E. Slonimskaya // European Journal of Cancer. – 2009. – Vol. 7(4). – P.11-12.

40. Бабышкина, Н.Н. Цитокины в патогенезе злокачественных новообразований [Текст] / Н.В. Чердынцева, М.Н. Стахеева, Н.В. Литвяков, Н.Н. Бабышкина, Е.А. Малиновская, Е.М. Слонимская // Цитокины и воспаление: материалы Всероссийской научной конференции «Молекулярно-генетические основы функционирования цитокиновой сети в норме и при патологии. – Новосибирск. – 2010. – Т. 9, № 3. – С.74.

41. Бабышкина, Н.Н. Ассоциированные с возрастом молекулярно-генетические и клинико-патологические особенности злокачественных новообразований [Текст] / Н.В. Чердынцева, М.В. Завьялова, С.В. Вторушин, Е.М. Слонимская, Е.Ю. Гарбуков, Н.В. Литвяков, М.Н. Стахеева, Н.Н. Бабышкина, Е.А. Малиновская, Е.В. Денисов, И.Н. Лебедев, М.С. Назаренко, В.Н. Максимов, М.И. Воевода, Е.Л. Чойнзонов, В.М. Перельмутер // Материалы XVI Российского онкологического конгресса. – Москва. – 2010. – С.110-119.

42. Babyshkina, N.N. Estrogen metabolism genes and transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms in estrogen receptor-positive and –negative infiltrating ductal breast carcinoma [Текст] / N.N. Babyshkina, L.F. Gulyaeva, E.A. Malinovskaya, M.N. Stakheyeva, N.V. Cherdyntseva, E.M. Slonimskaya // Annals of Oncology. – 2010. – Vol. 21(4). – P.54.

43. Babyshkina, N.N. The prognostic value of angiogenesis genes polymorphisms in women with infiltrating ductal breast carcinoma [Текст] / N.N. Babyshkina, A.V. Shevchenko, M.Yu. Salakhutdinova, V.N. Maximov, N.V. Cherdyntseva, E.M. Slonimskaya // European Journal of Cancer Supplements. – 2010. – Vol. 8(34). – P.108.
44. Babyshkina, N.N. Genetic polymorphisms of transforming growth factor-beta1 and estrogen metabolizing enzyme in estrogen receptor-positive and -negative infiltrating ductal breast carcinoma [Текст] / N.N. Babyshkina, L.F. Gulyaeva, E.A. Malinovskaya, A.A. Ivanova, N.V. Cherdyntseva, E.M. Slonimskaya // European Journal of Cancer Supplements. – 2010. – Vol. 8(7). – P.197.
45. Babyshkina, N.N. Molecular breast cancer subtypes: relationship with clinicopathological characteristics, efficacy of neoadjuvant chemotherapy and survival [Текст] / N. Babyshkina, E. Malinovskaya, M. Zavyalova, N. Cherdyntseva, E. Slonimskaya // The Breast. – 2011. – Vol. 20, Supplement 1. – P.S41.
46. Babyshkina, N.N. FGFR2 and TP53 work together in breast cancer [Текст] / E.V. Denisov, N.N. Babyshkina, M.I. Voevoda, N.V. Cherdyntseva // The Breast. – 2011. – Vol. 20, Supplement 1. – P.S18.
47. Babyshkina, N.N. Impact of ER α expression status and ESR1 genetic variation on progression in tamoxifen-treated breast cancer patients [Текст] / N. Babyshkina, S. Vtorushin, S. Patalyak, T. Dronova, E. Slonimskaya, N. Cherdyntseva // Cancer Research. – 2014. – Vol.74 (19). – P.562.
48. Babyshkina, N.N. Prognostic significance of immunohistochemical and genetic markers in Russian breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen [Текст] / N. Babyshkina, S. Vtorushin, S. Patalyak, T. Dronova, E. Slonimskaya, N. Cherdyntseva // EJC SUPPLEMENTS. – 2015. – Vol.13. – P.2-3.
49. Babyshkina, N.N. The distribution pattern of ER α expression, VEGFR2 expression level and its genetic variation as potential biomarkers for tamoxifen resistance [Текст] / N. Babyshkina, S. Vtorushin, S. Patalyak, T. Dronova, E. Slonimskaya, N. Cherdyntseva // Mol Cancer Ther. – 2015. – Vol. 14(12 Suppl 2). – P.A26.
50. Бабышкина, Н.Н. Роль молекулярно-генетических факторов в формировании резистентности к терапии тамоксифеном у больных люминальным раком молочной железы [Текст] / Н.Н. Бабышкина, М.В. Завьялова, Т.А. Дронова, Е.М. Слонимская, Н.В. Чердынцева // Успехи молекулярной онкологии. – 2016. – №.13. – С.91.
51. Бабышкина, Н.Н. Роль компонентов сигнального пути TGF- β 1 в прогрессировании люминального рака молочной железы [Текст] /Т.А. Дронова, Н.Н. Бабышкина, С.В. Паталяк, М.В. Завьялова, Е.М. Слонимская, Н.В. Чердынцева // Успехи молекулярной онкологии. – 2017. – Т.4, № 4. – С.68.
52. Babyshkina, N.N. Prognostic significance of TGF- β -associated proteins in breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen [Текст] / Т.А. Дронова, N.N. Babyshkina, S.V. Patalyak, N.V. Cherdyntseva // The 22nd International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research: Proceedings of the International Symposium. – Tomsk. – 2018. – P.25-26.
53. Бабышкина, Н.Н. Вклад эстрогенового рецептора альфа в механизмы резистентности к эндокринной терапии тамоксифеном у больных раком молочной железы [Текст] /Т.А. Дронова, С.В. Паталяк, Н.Н. Бабышкина // Перспективы развития фундаментальных наук. Под ред. И.А. Курзиной. – Томск. – 2018. – С.36-38.

54. Бабышкина, Н.Н. Роль трансформирующего ростового фактора $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) в формировании резистентности к терапии тамоксифеном у больных люминальным раком молочной железы [Текст] / Т.А. Дронова, Н.Н. Бабышкина, С.В. Паталяк, Е.С. Григорьева, Н.В. Чердынцева, Ю.Г. Кжышковска // В поисках моделей персонализированной медицины. Сборник научных трудов V Международной конференции «ПОСТГЕНОМ'2018» – Казань. – 2018. – С.270.

55. Бабышкина, Н.Н. Взаимосвязь компонентов VEGF/PI3K/AKT-сигнального пути с эффективностью терапии тамоксифеном у больных эстрогензависимым раком молочной железы [Текст] / Т.А. Дронова, Н.Н. Бабышкина, С.В. Паталяк, М.В. Завьялова, Е.М. Слонимская, Н.В. Чердынцева, Ю.Г. Кжышковска // Успехи молекулярной онкологии. – 2018. – Т.5, №4. – С.51.

ПАТЕНТЫ

Пат. № 2558857 Российская Федерация. Способ прогнозирования эффективности антиэстрогенной терапии тамоксифеном у больных с люминальным типом рака молочной железы / Слонимская Е.М., Бабышкина Н.Н., Паталяк С.В., Завьялова М.В., Вторушин С.В.; зарегистрировано 04.02.2014.

БАЗЫ ДАННЫХ

1. База данных клинико-морфологических и молекулярно-генетических параметров пациентов с диагнозом люминальный рак молочной железы / Бабышкина Н.Н., Паталяк С.В., Дронова Т.А., Слонимская Е.М., Чердынцева Н.В., Вторушин С.В.; Свидетельство о государственной регистрации базы данных, № 2016620791 от 15 июня 2016 г.

2. База данных молекулярно-генетических параметров пациентов с диагнозом трижды негативный рак молочной железы, получавших неoadъювантную химиотерапию / Бабышкина Н.Н., Завьялова М.В., Брагина О.Д., Дронова Т.А., Слонимская Е.М., Чердынцева Н.В.; Свидетельство о государственной регистрации базы данных, № 2017621052 от 18 июля 2017 г.

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

Люм А – люминальный А РМЖ
Люм В – люминальный В РМЖ
НАХТ – неoadъювантная химиотерапия
РМЖ – рак молочной железы
ТАМ-Р – тамоксифен-резистентная группа
ТАМ-Ч – тамоксифен-чувствительная группа
ТНРМЖ – тройной негативный рак молочной железы
СAХ – cyclophosphamide, adriamycin, capecitabine
EGFR – epidermal growth factor receptor
ER α – estrogen receptor alpha
FAC – 5-fluorouracil, adriamycin, cyclophosphamide
IGF1R – insulin like growth factor 1 receptor
PR – progesterone receptor
RECIST – Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
SNP – single nucleotide polymorphism
SOPs – Standard Operation Procedures
TGF- β 1 – transforming growth factor beta 1
TGF- β R2 – transforming growth factor, beta receptor II
VEGFR2 – vascular endothelial growth factor receptor 2

Научное издание

Бабышкина Наталия Николаевна

**Прогностическая и предсказательная значимость молекулярно-генетических
маркеров, ассоциированных с PI3K/Akt/mTOR- сигнальным путем
при раке молочной железы**

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
доктора медицинских наук

Подписано в печать ____ Формат 60×90/16.

Усл. печ. ____ Уч.-изд. ____

Тираж 100 экз. Заказ № ____

Название типографии
Контакты типографии:
Адрес
Телефон
Ел почта
Сайт (при наличии)