

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
«ТОМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ
ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ОНКОЛОГИИ

На правах рукописи

Васильченко Дмитрий Владимирович

**ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ
GATA3, FOXA1, ELF5 ПРИ ЛЮМИНАЛЬНОМ ПОДТИПЕ
РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

14.03.02 – патологическая анатомия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, доцент
Вторушин Сергей Владимирович

Томск – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.	3
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.	14
1.1 Характеристика люминального рака молочной железы.	14
1.2 Роль молекулярных механизмов активации рецепторов эстрогена при люминальном раке молочной железы.	16
1.3 Механизмы приобретенной резистентности к проводимой гормонотерапии при люминальном раке молочной железы.	24
1.4 Характеристика транскрипционных факторов GATA3, FOXA1, ELF5 и их роль при раке молочной железы.	27
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.	42
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ.	61
3.1 Анализ экспрессии транскрипционных факторов GATA3, FOXA1, ELF5 и клинико-морфологических характеристик рака молочной железы.	61
3.2 Анализ экспрессии транскрипционных факторов при раке молочной железы в зависимости от морфологических характеристик опухоли.	68
3.3 Анализ экспрессии транскрипционных факторов в зависимости от рецепторов половых гормонов и параметров пролиферативной активности опухоли.	76
3.4 Анализ экспрессии транскрипционных факторов и частоты развития лимфогенных метастазов у больных раком молочной железы.	82
3.5 Анализ экспрессии транскрипционных факторов и частоты развития отдаленных метастазов у больных с раком молочной железы.	86
3.6 Прогнозирование вероятности развития отдаленных метастазов у больных люминальным подтипом рака молочной железы.	94
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.	101
ВЫВОДЫ.	111
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.	113
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.	115
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.	116
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.	139

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность избранной темы

Рак молочной железы (РМЖ) является не только гетерогенным как по своей биологической природе, но и по своему клиническому течению, что, несомненно, связано как с генетическими, так и эпигенетическими изменениями [32, 41, 56]. За последние 10 лет общий уровень заболеваемости РМЖ среди женского населения остается стабильно высоким, но при этом отмечается небольшое увеличение общей пятилетней выживаемости. Как в Российской Федерации, так и за рубежом РМЖ остается лидирующей онкологической патологией у женского населения и составляет 20,9 %, имея наибольший удельный вес в возрастной группе 30–59 лет [1].

Существующая межопухолевая гетерогенность лежит в основе молекулярной классификации рака молочной железы с делением его на различные подтипы в зависимости от экспрессии рецепторов эстрогена (ER), прогестерона (PR), эпидермального фактора роста (Her2/neu) и индекса пролиферативной активности (Ki67) [100]. Опухоли с позитивной экспрессией половых гормонов классифицируются как люминальный рак молочной железы, который занимает лидирующую позицию по частоте встречаемости среди всех случаев РМЖ [55, 192]. Подгруппа люминальных РМЖ в целом характеризуется более благоприятным прогнозом по сравнению с рецептор-негативными карциномами, что связано с более высокой степенью дифференцировки опухоли, а также с низким потенциалом к диссеминации и рецидивированию [199]. Однако основная причина смертности при люминальном РМЖ у женщин связана не с самой первичной опухолью, а с развитием в дальнейшем рецидива в виде метастатического поражения отдаленных органов и тканей [189]. Помимо метастатического потенциала, основной проблемой является приобретенная лекарственная устойчивость, которая в дальнейшем также приводит к смерти женщин с РМЖ [157].

Механизмы, которые играют роль в развитии лекарственной устойчивости

до конца остаются неясными. Проблемы эффективности лечения в той или иной степени связаны из-за ограниченного понимания молекулярной биологии рака и перекрестных механизмов реализуемых на уровне клеточных белков, которые так или иначе корегулируются, а иногда обладают антагонистическими свойствами [61, 103, 136].

Исследования, которые ведутся в последнее десятилетие направлены на поиск патогенетических механизмов, которые могут расширить понимание наступления неэффективности гормонотерапии у пациенток с РМЖ. Развитие резистентности с одной стороны обусловлено изменениями в самой структуре рецепторов эстрогена, а с другой определенными факторами, которые учувствуют в их активации [36, 69, 105, 147].

Активация рецепторов эстрогена реализуется по двум путям. Классический геномный путь протекает через непосредственное связывание эстрогена с рецепторами в цитоплазме с последующей их активацией, транслокацией в ядро, взаимодействием с элементами ответа эстрогена (EREs), расположенными рядом с промоторами генов-мишеней, а в дальнейшем активацией процессов пролиферации клетки [47]. Отличие неклассического геномного пути состоит в активации различных путей передачи сигналов, которые реализуются непосредственно в цитоплазме клетки. Наиболее изученными являются взаимодействие с мембранными рецепторами, такими как IGF-1R, EGFR, Her-2/neu, TGF- β , а также активация путей MAPK и PI3K/Akt/mTOR [9, 151]. В настоящее время известно, что регуляция процессов взаимодействия активированных рецепторов ER с ДНК происходит за счёт так называемых факторов транскрипции, наибольшее значение придают следующим: GATA3, FOXA1 и ELF5 [102, 170, 183].

GATA3 представляет собой фактор транскрипции, который координирует профили экспрессии генов в процессе эмбриогенеза разнообразных тканей организма человека, в том числе кроветворных клеток, кожи, почек, молочной железы и центральной нервной системы [161, 165]. В исследованиях *in vitro* было показано, что GATA3 выступает в качестве ключевого фактора в процессе

дифференциации люминальных клеток молочной железы. Имеются указания, что GATA3, регулирует определенный набор генов, участвующих в дифференцировке и пролиферации опухолевых клеток при раке молочной железы, а также коррелирует с экспрессией рецепторов эстрогена в опухолевых клетках [90]. Существует ряд исследований, по результатам которых GATA3 может быть использован в качестве клинического маркера для определения потенциального ответа на гормональную терапию [114].

FOXA1 является членом семейства ДНК-связывающих белков, известный также как гепатоцитарный ядерный фактор 3-альфа (HNF-3A), который у человека кодируется геном *FOXA1*. При раке молочной железы FOXA1 сильно коррелирует с позитивной экспрессией ER, GATA3 и PR, что свидетельствует об его участии в реализации эстроген-опосредованных сигналов в клетке [29]. У пациентов с рецептор-негативными опухолями (ER-) FOXA1 ассоциирован с низкой степенью злокачественности карциномы и лучшими показателями выживаемости [81]. Высокий уровень FOXA1 рассматривается как индикатор хорошего прогноза у пациенток с рецептор-позитивными опухолями. Однако на сегодняшний день особенности экспрессии FOXA1 и GATA3 в оценке чувствительности РМЖ при проведении антиэстрогеновой терапии изучены недостаточно, а имеющиеся в литературе данные немногочисленны и неоднозначны. Так, ряд авторов указывает, что экспрессия белков FOXA1 и GATA3 не коррелирует с эффективностью неoadъювантной гормонотерапии, однако уровень экспрессии FOXA1 в опухолевых клетках значительно снижается после её проведения [126].

Транскрипционный регулятор E74-подобный фактор 5 типа (ELF5) относится к семейству ETS-транскрипционных факторов (ET-26) и в норме связан с плацентацией, альвеологенезом, процессами дифференцировки ацинусов молочной железы во время беременности и лактации [32, 125]. Известно, что наибольший уровень экспрессии ELF5 обнаруживается в карциномах молочной железы базального типа, «нормально-подобном» субтипе и в нормальной ткани молочной железы, в то время как в других молекулярных подтипах РМЖ его

экспрессия была значительно ниже [59].

Данный транскрипционный фактор рассматривается как потенциальный модулятор молекулярного подтипа рака молочной железы. Поскольку в экспериментальных исследованиях на клеточных линиях базального подтипа РМЖ было показано, что нокдаун ELF5 приводил к изменениям молекулярного профиля в сторону подтипа с низкой экспрессией клаудина [59]. Клеточные линии люминального РМЖ с приобретенной резистентностью к тамоксифену имеют значительно повышенные уровни ELF5 и демонстрируют зависимость пролиферативной активности опухоли от данного транскрипционного фактора по сравнению с клетками предшественниками [53]. Показано, что принудительная активация транскрипционного фактора ELF5 в опухолевых клетках подавляет чувствительность к эстрогенам, в то время как сам эстроген может снизить экспрессию ELF5 [180]. В ряде исследований также было показано, что данный транскрипционный фактор сопряжен с процессами неоангиогенеза, эпителиально-мезенхимального перехода в опухоли, а также с процессами инвазии и метастазирования [55, 57, 178].

Несмотря на достаточное число исследований направленных на изучение роли транскрипционных факторов в развитии резистентности к антиэстрогеновой терапии РМЖ, имеющиеся результаты не позволяют использовать в клинической практике, поскольку в своем большинстве были получены на различных клеточных линиях. Остаются недостаточно изученными особенности экспрессии транскрипционных факторов ELF5, FOXA1 и GATA3 в зависимости от клинικο-морфологических параметров опухоли и возможность их использования в клинической практике для оценки прогноза течения болезни у пациенток с люминальным субтипом РМЖ.

Степень разработанности темы диссертации

Несмотря на более благоприятный прогноз люминального подтипа рака молочной железы, основной проблемой в настоящее время является развитие различных форм опухолевой прогрессии, в основе которой могут лежать как

молекулярные-биологические характеристики клеток карцином, так и развитие резистентности к проводимой гормонотерапии [157, 189]. Исследования, которые ведутся в последнее десятилетие направлены на поиск патогенетических механизмов, которые могут расширить понимание наступления неэффективности гормонотерапии у пациенток с РМЖ. Развитие резистентности с одной стороны обусловлено изменениями в самой структуре рецепторов эстрогена, а с другой определенными факторами, которые учувствуют в их активации [36, 69, 105, 147]. Актуальность молекулярно-генетических исследований, посвященных роли факторов транскрипции при раке молочной железы в настоящее время сомнений не вызывает, поскольку обнаруживаются противоречивые данные, при этом результаты не всегда охватывают клиническое значение в отношении течения и прогноза. Одними из наиболее пристально изучаемых факторов транскрипции РМЖ являются транскрипционные белки GATA3, FOXA1, ELF5. Несмотря на множество исследований в отношении данных белков, полученные данные часто противоречивы и неоднозначны [105, 130]. В одних исследованиях наличие экспрессии в опухоли изучаемых маркеров характеризуется более благоприятным прогнозом [98]. В других, характеризуется крайне неблагоприятным фактором в течение рака молочной железы, а также опухолей других локализаций, таких как рак предстательной железы или рак мочевого пузыря [51, 56, 62].

В настоящее время не получено достаточное количество данных об экспрессионных характеристиках и взаимодействии между транскрипционными факторами ELF5, FOXA1 и GATA3 у пациенток с раком молочной железы, в том числе при люминальных субтипах. Изучение параметров экспрессии и факторов транскрипции, а также их взаимосвязи с опухолевой прогрессией позволит повысить значимость иммуноморфологического исследования, с большей долей вероятности предполагать эффективность гормонотерапии, а, следовательно, планировать адекватную тактику лечения и прогнозировать исход заболевания при раке молочной железы.

Цель исследования

Изучить экспрессию транскрипционных факторов FOXA1, GATA3 и ELF5 в зависимости от клинико-морфологических характеристик опухоли, регионарного и гематогенного метастазирования у больных люминальным раком молочной железы.

Задачи исследования

1. Изучить параметры экспрессии транскрипционных факторов FOXA1, GATA3 и ELF5 в ткани опухоли у больных люминальным раком молочной железы и проанализировать их сопряженность с клинико-морфологическими характеристиками.
2. Сопоставить особенности экспрессии транскрипционных факторов FOXA1, GATA3, ELF5 с параметрами рецепторного статуса опухоли.
3. Оценить экспрессионные характеристики факторов транскрипции в зависимости от пролиферативной активности опухолевых клеток (Ki67), параметров стромального компонента и степени инфильтрации иммунокомпетентными клетками новообразования.
4. Проанализировать частоту развития лимфогенных и отдаленных метастазов в зависимости от уровня и характера экспрессии транскрипционных факторов FOXA1, GATA3, ELF5 в опухоли.
5. Определить значимость изучаемых параметров опухоли в отношении исхода заболевания и построить математическую модель для прогнозирования риска развития гематогенных метастазов у больных люминальным раком молочной железы.

Научная новизна

Впервые показано, что размер новообразования у больных люминальным раком молочной железы связан с экспрессионными характеристиками транскрипционных факторов FOXA1 и ELF5. Опухоли размером более 2 см ассоциированы с гетерогенным характером экспрессии FOXA1 и отсутствием

иммунного окрашивания к фактору ELF5. Обнаружена связь размера новообразования в зависимости от частоты встречаемости изученных факторов транскрипции в клетках карцином люминального подтипа РМЖ.

Впервые обнаружена связь клинико-морфологических характеристик опухоли с параметрами экспрессии FOXA1, GATA3, ELF5. Высокая степень гистологической злокачественности (grade) сопряжена с отсутствием экспрессии фактора FOXA1. Характер экспрессии GATA3 и ELF5 в опухоли связан с наличием феноменов ретракции и краудинга.

Впервые установлено, что развитие метастазов в регионарных лимфатических узлах у больных люминальным подтипом рака молочной железы сопряжено с гомогенным характером экспрессии FOXA1, GATA3, ELF5 в клетках первичной опухоли. Снижение процента экспрессии GATA3 и FOXA1 в новообразовании ассоциировано с метастатическим поражением регионарных лимфатических узлов.

Впервые выявлено, что отдаленные метастазы у больных люминальным РМЖ чаще наблюдаются при гетерогенной экспрессии факторов FOXA1 и ELF5 в первичной опухоли. Развитие гематогенных метастазов сопряжено с низким процентом экспрессии факторов FOXA1 и ELF5 и взаимосвязано со снижением уровня рецепторов ER и PR в карциноме молочной железы.

Теоретическая и практическая значимость работы

Определены дополнительные морфологические и иммуногистохимические критерии прогноза заболевания при люминальном молекулярном подтипе рака молочной железы. Полученные результаты могут использоваться при патоморфологическом исследовании опухоли для оценки прогноза и индивидуализации лечения больных с данным молекулярным подтипом РМЖ. Комплексная оценка изученных параметров опухоли позволила разработать модель логистической регрессии, которая позволяет с чувствительностью 97 % и специфичностью 79,4 % прогнозировать вероятность риска гематогенного метастазирования у больных с люминальным подтипом РМЖ.

Методология и методы диссертационного исследования

Методология настоящей диссертационной работы включает в себя современные практические методы в сочетании с актуальными теоретическими представлениями о роли транскрипционных факторов при люминальном раке молочной железы. Данная работа включала в себя последовательность проводимых этапов. Начальный этап заключался в отборе гистологических блоков (операционный и биопсийный материал) опухолей молочной железы с последующим изготовлением препаратов, окрашенных по стандартной методике, и их морфологической оценкой для подтверждения диагноза инвазивной карциномы неспецифического типа молочной. Кроме того, каждый препарат оценивался на степень злокачественности карциномы (grade) в совокупности с оценкой стромального и паренхиматозного компонентов и на наличие феномена ретракции и краудинга. Оценке подвергался и статус лимфатических узлов на предмет наличия или отсутствия метастазов. Следующий этап заключался в иммуногистохимическом исследовании операционного и биопсийного материала, по которым определялся пролиферативный индекс, рецепторный статус опухолевого узла и экспрессия ТФ. Последний этап заключался в оценке результатов комбинированного лечения на предмет развития гематогенных метастазов. Полученные данные были проанализированы и обработаны соответствующими статистическими методами.

Положения, выносимые на защиту

1. Экспрессия транскрипционных факторов FOXA1, GATA3, ELF5 по-разному сопряжена с клинико-морфологическими характеристиками люминального подтипа рака молочной железы.
2. Частота лимфогенного метастазирования у больных карциномой молочной железы люминального подтипа связана с характером экспрессии транскрипционных факторов в опухоли.
3. Экспрессия FOXA1, ELF5 взаимосвязана с параметрами рецепторного статуса первичной опухоли и развитием гематогенных метастазов у больных люминальным раком молочной железы.

Степень достоверности

Достоверность проведенного исследования подтверждается достаточным числом больных, высоким методологическим уровнем с применением современных информативных методов исследования: клинических, диагностических, морфологических, молекулярно-генетических. Обоснованность полученных результатов подтверждается корректной статистической обработкой материала.

Апробация работы

Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на: 2-й международной морфологической научно-практической конкурс-конференции студентов и молодых ученых «Морфологические науки – основа фундаментальной медицины», посвященной памяти профессора М. А. Самотейкина (Новосибирск, 2017); научной конференции с международным участием, посвящённой 170-летию кафедры патологической анатомии им. академика А. И. Струкова ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Москва, 2019); 12-й всероссийской конференции молодых ученых-онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н. В. Васильева (Томск, 2017); 3-й Всероссийской конференции по молекулярной онкологии Москва, 2017); конгрессе молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» (Томск, 2018); 23-м и 24-м Российских онкологических конгрессах (Москва, 2019, 2020).

Диссертационная работа апробирована на совместном заседании кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России и отделения общей и молекулярной патологии НИИ онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (Томск, 2020).

Диссертационная работа выполнена в соответствии с утвержденным направлением научно-исследовательской работы ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России по теме:

«Морфология органов, тканей и клеток в норме, при воздействии в эксперименте и в клинике», номер государственной регистрации АААА-А16-116021010223-5, при финансовой поддержке Гранта Президента НШ-2701.2020.7 «Разработка новых подходов к прогнозированию течения карцином молочной железы и легких с учетом морфологической и молекулярно-генетической гетерогенности опухоли»

Внедрение результатов исследования

Выявленные дополнительные молекулярно-биологические факторы прогнозирования течения заболевания при люминальном молекулярном подтипе рака молочной железы внедрены для практического применения в отделении общей и молекулярной патологии НИИ онкологии Томского НИМЦ и для преподавания раздела «Злокачественные опухоли эпителиального происхождения» на кафедре патологической анатомии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 научных работ, в том числе 3 статьи в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, из них 1 статья в журнале, входящем в международную реферативную базу данных и систем цитирования (Scopus).

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 145 страницах машинописного текста, включает введение, обзор литературы, главу о материалах и методах исследования, главу результатов собственных исследований и их обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации и список литературы. Список литературы представлен 200 источниками, из которых 198 в зарубежных изданиях. Полученные результаты проиллюстрированы с помощью 48 таблиц и 22 рисунков.

Личный вклад автора

Личный вклад автора в диссертационной работе состоит в разработке дизайна исследования, непосредственном участии в наборе морфологического материала (операционного и биопсионного), проведении гистологических и иммуногистохимических методов исследования. Автор анализировал клинические параметры и отдаленные результаты лечения пациентов, включенных в исследование. Диссертант лично принимал участие в планировании работы, формулировал цель и задачи, находил пути их реализации, проводил анализ литературных источников, статистическую обработку собственных результатов исследования и их интерпретацию, подготовку научных публикаций по теме исследования.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Характеристика люминального рака молочной железы

В настоящее время в онкологии актуальным является решение задач, которые помогут спрогнозировать течение рака молочной железы, оценить риск опухолевой прогрессии и чувствительность к проводимой лекарственной терапии [74]. Проводимые в последние годы исследования позволили лучше понять патогенез РМЖ на молекулярно-генетическом уровне, расширили представления о механизмах возникновения карциномы, что, в свою очередь, способствует возможности проспективно оценить прогрессирование злокачественного процесса и изучать потенциальные молекулярно-генетические прогностические маркеры [163].

Классификация рака молочной железы, предложенная Perou и соавторами в соответствии с молекулярным профилем моделей экспрессии генов, позволила лучше представить фундаментальное понимание и, соответственно, принимать рациональную стратегию дальнейшего исследования данной нозологии, а также лечения пациентов с раком молочной железы [137]. На данный момент РМЖ подразделяется на 5 субтипов: люминальный А, люминальный В, HER-2-позитивный, базально-подобный (базальноклеточный) и claudin-low (низко-клаудиновый) каждый из которых обладает своими биологическими свойствами и прогностическими признаками [149]. Наличие рецепторов гормонов в новообразовании молочной железы является хорошо известной и важной характеристикой РМЖ [159].

Люминальные или эстроген рецептор (ER) положительные опухоли занимают лидирующую позицию по частоте встречаемости, составляя от 60 % до 75 % случаев [26, 37]. При люминальном раке молочной железы выделяют три основных субтипа, классифицированных на основании иммуногистохимических характеристик половых гормонов и белка Her-2/neu, а именно люминальный А и люминальный В, который в свою очередь подразделяется на два типа,

отличающихся наличием или отсутствием экспрессии в опухоли белка Her-2/neu [86, 116, 142]. Для разделения данных субтипов РМЖ также используется маркер индекса пролиферативной активности Ki67. Индекс Ki67 при люминальном А подтипе составляет $< 20\%$, для люминального В/HER2-негативного Ki67 равен $\geq 20\%$. Опухоли люминального В/HER2-позитивного подтипа характеризуются гиперэкспрессией онкопротеина Her-2/neu независимо от пролиферативной активности [124, 148].

Люминальный рак молочной железы чаще всего представлен инвазивной карциномой неспецифического типа и составляет около 80 % случаев, в то время как дольковый РМЖ встречается гораздо реже [192]. При этом до 80 % случаев рака молочной железы в опухоли отмечается положительная экспрессия рецепторов эстрогена, а в 55–65 % положительная экспрессия рецепторов прогестерона [31, 50].

Люминальный А рак молочной железы отличается своими молекулярными особенностями и клиническим течением. Как известно, в первую очередь люминальный РМЖ характеризуется лучшим прогнозом и низкой частотой рецидивирования в виду своих особенностей. В частности, у данной карциномы отмечается высокий уровень экспрессии рецепторов эстрогена и/или рецепторов прогестерона, отрицательная экспрессия Her-2/neu, низкий уровень Ki67, а также высокая степень дифференцировки опухоли (ядерный grade 1-2) [100, 199]. По данным литературы, при проведенном профилировании и генной экспрессии при люминальном А РМЖ были выявлены ряд наиболее частых мутаций, играющих важную роль в патогенезе карциномы, а именно мутация PIK3CA, MAP3KI, ESR1, GATA3, FOXA1, увеличение числа копий 1q и 16q, либо уменьшение числа копий 16q, а также высокий уровень амплификаций 8p11-12 [193].

Люминальный В РМЖ встречается с частотой 20–30 % всех случаев инвазивного рака молочной железы. При профилировании генной экспрессии определяются преимущественно мутации TP53, мутации PIK3CA, амплификация Cyclin D1, повышенная нестабильность генома, очаговые амплификации в локусах 8p12 и 11q13. При морфологическом исследовании карцинома обычно

имеет низкую степень дифференцировки (ядерный grade 2-3), а кроме того, параллельно обнаруживается инвазивная микропапиллярная карцинома [193]. Данный субтип отличается агрессивным течением и гораздо худшим прогнозом по сравнению с люминальным А раком молочной железы [100, 184]. В частности, в первые 5 лет после установки диагноза, у пациенток развиваются рецидивы карциномы, а также у таких больных наблюдается большая частота гематогенных метастазов в кости по сравнению с люминальным А раком молочной железы [5, 177]. При этом, в зависимости от процента экспрессии как рецепторов прогестерона, так и уровня Ki67, пациентки отличаются прогнозом. Так, в опухолях молочной железы с позитивной экспрессией ER при Ki67 > 20 %, потеря PR рассматривается как неблагоприятный прогностический фактор [155]. В другом исследовании, люминальный В рак молочной железы с отрицательной экспрессией Her-2/neu, Ki67 > 20 % и PR < 20 %, отличался худшим прогнозом, чем опухоли с PR > 20 % [158].

1.2 Роль молекулярных механизмов активации рецепторов эстрогена при люминальном раке молочной железы

Эстроген является членом надсемейства рецепторов стероидных гормонов и лиганд-зависимый транскрипционный фактор, регулирующий различные процессы в развитии ткани молочной железы и др. Эстрадиол, преобладающая форма биологически активного эстрогена, который взаимодействует с ER для развития и регуляции репродуктивной системы, костного метаболизма, а также влияет на сердечно-сосудистую и центральную нервную системы [135]. Учитывая его основное участие в развитии ткани молочной железы, дисрегуляция гормональной оси эстрогена и связанные с этим изменения, а также эндогенный уровень эстрогена, так и продолжительность гормональной заместительной терапии, связаны с более высоким риском развития карциномы молочной железы, являясь в настоящее время основными детерминантами РМЖ [32, 33, 65].

Как известно, эффекты эстрогена опосредуются через два ядерных

рецептора – ER α и ER β , кодируемые соответствующими генами, которые расположены в длинном плече хромосомы 6 (локус q24-27) и 14 (локус q21-22) соответственно. Оба рецептора имеют около 97 % гомологичности в ДНК-связывающем домене с относительно низкой гомологией в других доменах, что указывает на то, что они могут обладать специфичностью для эстроген-реагирующих элементов (EREs) на промоторах или энхансерах-генов-мишеней [122]. С учетом высокой схожести структуры описанных рецепторов, они, вероятнее всего, активируются через общие механизмы, однако их программирование происходит различными генами. Роль ER β в нормальной ткани молочной железы до конца неизвестна, однако потеря экспрессии ER β при раке молочной железы связана с увеличением клеточной пролиферации [45].

При связывании 17 β -эстрадиола ядерные ER-мономеры формируют димер, связываются с EREs и в сотрудничестве с корегуляторами (коактиваторами и корепрессорами) активируют транскрипцию генов-мишеней, называемым классическим путём активации эстрогена. Ядерные корегуляторы модулируют транскрипцию через множественные механизмы, в частности, ремоделирование хромосом и посттрансляционную модификацию, которые включают косвенную геномную активность при связывании ER с другими факторами транскрипции, тем самым регулируют транскрипцию посредством их связывания с промоторами гена-мишени. Cyclin D1 является прямой ER-мишенью, которая может активировать CDK4 и CDK6 пути, запуская фосфорилирование через рецепторы тирозин киназы, что приводит к индукции пролиферативной активности клеточного цикла [30, 106].

В последние годы был предложен цитоплазматический/мембранный перекрестный механизм взаимодействия ER с HER2, EGFR, IGF1R, FGFR и другими факторами транскрипции, где выступающий в качестве триггера ER, способствует активации АКТ (протеин киназы) и сигнальных компонентов по пути PI3K. Данный механизм активации называется неклассическим [70, 131, 160].

Обобщив вышеописанное, механизм действия рецепторов эстрогена можно описать следующим образом. ER состоит из шести субдоменов, именуемых в алфавитном порядке от А до F, расположенных в 3 основных структурах, а именно в LBD (лиганд-связывающий домен), DBD (ДНК-связывающий домен) и N-концевой домен (NTD) (рисунок 1).

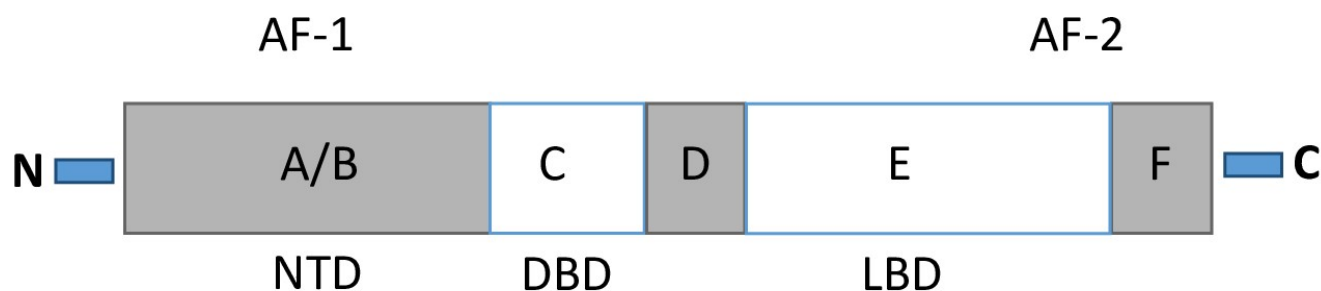


Рисунок 1 – Схема функционального строения доменов
в структуре рецепторов эстрогена

Лиганд-связывающий домен (LBD/E) представляет собой стабильный глобулярный белок с 12 спиралями (11 α -спиральных структур, называемых спиралями 1, 3-12), которые создают высокочувствительную область взаимодействия с эстрогенами. При связывании эстрогена с лигандом изменяется 12 спираль, которая считается составной второй функции активации транскрипции (AF-2). Затем AF-2 взаимодействует с медиаторами доступности хроматина и регулирует скорость транскрипции РНК и вступает в связь с различными природными и синтетическими стероидными и нестероидными молекулами [2, 111]. Концевой F-домен является специфическим только для рецепторов эстрогена и не определяется у других членов семейства ядерных рецепторов. Данный домен участвует во внутримолекулярном взаимодействии ER и стабильности его белка. Видовые различия в чувствительности к тамоксифену, по-видимому, обусловлены измененной последовательностью гомологии F-домена [19].

ДНК-связывающий домен/DBD является областью связывания с определенной последовательностью ДНК и содержит в себе структуры «цинковыми пальцами» стабилизированных α -спиралями [166]. Находящиеся в этой области аминокислоты называются проксимальным боксом или Р-боксом и имеют ведущее значение в распознавании специфической последовательности ДНК мотива EREs (GGTCAnnnTGACC) [108].

Аминотерминальный (N-концевой домен A/B) считается самым крупным доменом и несет в себе коактиваторную область, именуемую как субдомен активаторная функция (AF-1). Данный фрагмент рецептора участвует в механизмах регуляции белок-белковых взаимодействий и транскрипции гена-мишени независимо от связывания с лигандом [129].

Таким образом, рецепторы эстрогена запускаются как лиганд-зависимым путем, так и лиганд-независимым путем (рисунок 2).

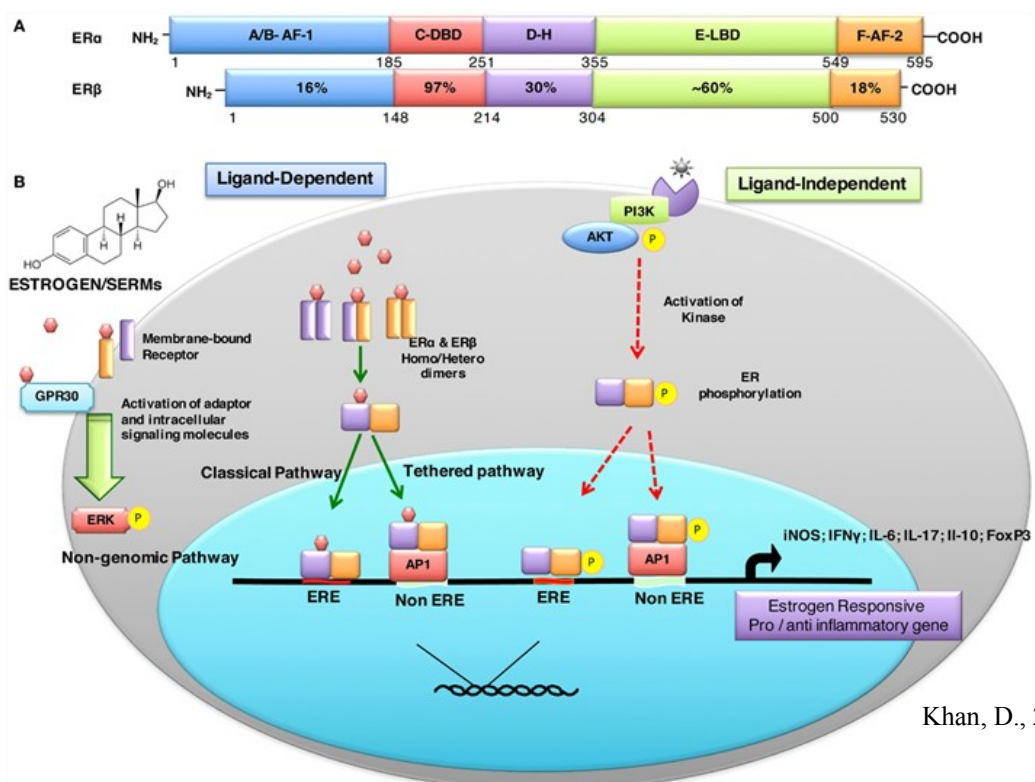
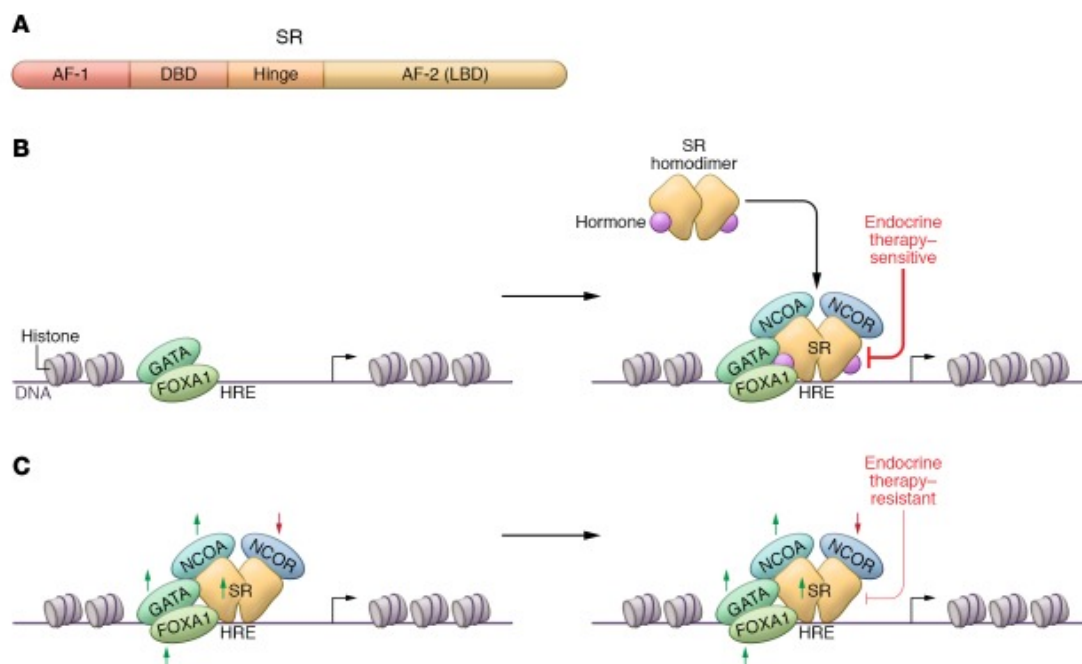


Рисунок 2 – Схема лиганд-зависимой и лиганд-независимой активации рецепторов эстрогенов

Классический геномный происходит за счет активации определенных рецепторов в цитоплазме под действием эстрадиола и, следовательно, его дальнейшей активации, доставке в ядро, связывания с ДНК со специфическими EREs (GGTCAnnnTGACC), что приводит к пролиферации клетки. Неклассический геномный путь развивается опосредованно через запуск каскада PI3K/Akt/mTOR) и воздействия на рецепторы эстрогенов факторов роста (EGF, Her-2/neu, TGF- α и др.) [47, 151].

Каскады активированной киназы, которые опосредуют рецептор-зависимую передачу сигналов фактора роста, часто проявляют повышенную активность во время прогрессирования рака и могут опосредовать фосфорилирование ER и их транскрипционных корегуляторов, способствуя тем самым гормон-независимой активации экспрессии генов [9, 76]. После их связывания с ДНК рекрутируются транскрипционные коактиваторы ядерных рецепторов 1,2,3 и корепрессоры ядерных рецепторов 1,2 (NCOA-1,2,3 и NCOR-1,2 соответственно), которые обеспечивают регуляцию гормон-чувствительных генов. Кроме того, сотрудничающие пионеры ТФ семейства FOXA1 и GATA обеспечивают создание программ экспрессии онкогенных генов при РМЖ и раке предстательной железы. Реактивация стероидных гормонов при резистентной эндокринной терапии, может быть обусловлена генетическими изменениями последних, а также нарушение работы транскрипционных корегуляторов и их первичных факторов, что приводит к измененной транскрипционной активности (рисунок 3).



AnnaC. Groner 2017

Рисунок 3 – Схема регуляции транскрипционной активности при развитии резистентности к эндокринной терапии РМЖ

По некоторым данным, примерно у 30 % женщин, получавших антигормональную терапию, возникали рецидивы РМЖ в течение 15 лет, что связано с механизмом приобретенной резистентности к гормонотерапии в виде дисрегулирования передачи сигналов рецептора эстрогена, либо с потерей экспрессии $ER\alpha$, либо с соматической мутацией в гене *ESR1*, кодирующем рецепторы $ER\alpha$ [189].

Соматические мутации в лиганд-связывающем домене (LBD или AF-2), а именно Glu380, Y537S и D538G, обеспечивают лиганд (эстроген) – независимую активацию гена-мишени и дальнейшую пролиферацию клеток в метастатических ER-позитивных образцах опухолевой ткани у пациенток с развившейся резистентностью к гормонотерапии, но при этом они не были выявлены в первичных карциномах молочной железы [64, 131, 143, 186].

Недавно проведенное проспективно-ретроспективное исследование SoFEA – Faslodex Versus Exemestane With or Without Arimidex, показало, что соматические мутации в гене *ESR1* в ER-положительном метастатическом РМЖ

обуславливают относительную устойчивость к экземестану и относительную чувствительность к фулвестранту. Полученные данные свидетельствуют о том, что мутации в гене *ESR1* являются причиной внутренней первичной эндокринной резистентности РМЖ [150].

Известно, что механизм активации рецепторов ER тесно связан с рецепторами PR, являющегося прямой мишенью ER α для связывания хроматина. Прогестероновый рецептор представлен в виде двух высоко информационных изоформ, PRA (94 кДа) и PRB (116 кДа) которые кодируются из одного гена и при связывании гормонов образуют гомо/гетеродимеры, которые отвечают за связывание PR (PREs) на участках промотора гена-мишени через ДНК-связывающий домен и тем самым модулируют транскрипционную активацию генов-мишеней. Обе изоформы одинаково экспрессируются в нормальной ткани молочной железы, но изменяются при раке молочной железы, при этом во многих случаях отмечался более высокий уровень PR [128]. В одном из исследований обнаружена интересная связь, было показано, что ER-положительные опухоли без экспрессии PR увеличивают количество измененных копий молекулярных профилей рецептора PR, исследуемых с помощью профилирования м-РНК, по сравнению с ER-позитивными/PR-позитивными опухолями. Пациентки, опухоли которых имели данные изменения, характеризовались резистентностью к тамоксифену, что, вероятнее всего, связано с повышенной активностью передачи сигналов фактора роста через PI3K/Akt/mTOR путь, который, как известно, играет ключевую роль в патогенезе РМЖ [138].

Таким образом, фактическое лечение пациентов с раком молочной железы основывается на классификации его субтипов [37]. Геномное исследование карцином на основании молекулярных тестов, таких как PAM-50, Mamma Print или Oncotype DX Assay формирует отдельные лечебно-ориентированные подгруппы пациенток, схожих с биологическими подтипами карциномы молочной железы, что позволяет оценивать эффективность, а соответственно и пользу от проводимой терапии [11, 40, 139].

Наиболее широко используемым методом лечения ER позитивного рака молочной железы является антиэстрогенная терапия. На выбор режима гормонотерапии зависит состояние функции яичников. Препаратом выбора на сегодняшний день является тамоксифен (трифенилэтилен), который является селективным модулятором эстрогеновых рецепторов (SERM). Данный препарат назначают пациенткам, как с сохраненной овариальной функцией, так и пациенткам в постменопаузальном состоянии. В течение более чем 25 лет, тамоксифен используется в практике как «золотой стандарт» для лечения ER+ опухолей молочной железы [123, 145]. Ингибиторы ароматазы противопоказаны при сохранной функции яичников и могут назначаться только больным, достигшим стойкой менопаузы, в том числе с помощью овариальной супрессии. Терапия ингибиторами ароматазы ассоциируется с меньшей частотой тромбозомболических осложнений и рака эндометрия и с большей частотой остеопороза и связанных с ним переломов костей, а также осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы по сравнению с тамоксифеном. Назначение гормонотерапии показано пациенткам с люминальным А РМЖ, включение в схему лечения химиотерапии (в дополнение к гормонотерапии) должно быть рассмотрено при наличии одного из следующих факторов, а именно большая степень распространения, больше 4 пораженных метастазами регионарных лимфатических узлов, больше, чем Т3 стадия процесса и III степень злокачественности. При люминальном В (HER-2/neu положительный) РМЖ назначается химиотерапия, анти-HER2 терапия (таргетным препаратом) и гормонотерапия [2].

Ингибиторы ароматазы (ИА) предотвращают превращение андростендиона в эстроген, снижая уровень циркулирующего эстрогена [60, 112]. ИА неэффективны в лечении пациентов с пременопаузальным раком молочной железы (у которых яичники являются основным источником эстрогена), хотя они используются у женщин в пременопаузе в целях получения фертильности (fertility purposes) [21]. Селективные ИА в свою очередь оказались подходящими препаратами для женщин в постменопаузе с гормонально-чувствительным раком

молочной железы [172]. Большинство больных в настоящее время получают ИА в течение 5 лет или в меньшие сроки, так как данных об эффективности в расширенной эндокринотерапии недостаточно, поэтому общая продолжительность применения ИА в течение 5 лет остается самой подходящей [3]. Назначение описанных лекарственных препаратов в качестве адъювантной терапии привело к значительному снижению смертности от РМЖ [15]. Однако не все пациентки с люминальным РМЖ отвечают на гормонотерапию, что в конечном итоге заканчивается гематогенной диссеминацией и наступлением летального исхода [132].

1.3 Механизмы приобретенной резистентности к проводимой гормонотерапии при люминальном раке молочной железы

Несмотря на проводимую гормональную терапию у 30 % пациенток с РМЖ возникает рецидив в течение первого десятилетия, что, несомненно, связано с развитием приобретенной резистентности, прогрессированием заболевания, которое в дальнейшем и становится основной причиной смерти [157]. В настоящее время в реальной клинической практике в оценке прогноза ответа на проводимую терапию, а также вероятности развития лекарственной устойчивости существует немного маркеров, за исключением рецепторов ER, которые только косвенно отражают наличие чувствительности к лечению [144]. Неэффективность проводимого лечения может быть обусловлена как внутренними механизмами резистентности, которые присутствуют у больных еще до начала терапии, а также приобретенными механизмами, которые включаются в ходе проводимого лечения [12, 136]. Наиболее значимые из механизмов приобретенной устойчивости изложены ниже.

Рецепторы эстрогена, как было сказано выше, имеют 2 основных подтипа ER α и ER β , каждый из которых регулирует определенные гены и изменяет работу различных сигнальных путей [190]. В случаях активации ER α опосредуются механизмы онкогенеза, связанные с пролиферацией и усилением инвазивных

свойств клеток карциномы молочной железы. Напротив, при активации ER β снижаются пролиферативные свойства опухолевых клеток, подавляются механизмы эпителиально-мезенхимального перехода, а также отмечается лучшая чувствительность злокачественных клеток к тамоксифену [68, 69]. Известно, что при выраженной экспрессии ER β в опухоли молочной железы отмечается лучшая выживаемость и хороший ответ на тамоксифен независимо от показателей экспрессии ER α , однако более низкая экспрессия ER β может способствовать устойчивости к эндокринной терапии [39, 77, 119]. Наличие в целом экспрессии ER β в опухоли, как предполагается, может независимо предсказывать более длительную выживаемость без признаков прогрессирования у пациенток, получавших гормонотерапию [66, 67]. Однако по некоторым данным, позитивная экспрессия в опухоли ER β чаще всего обнаруживается в низкодифференцированных карциномах молочной железы, что в последующем связано с худшей общей выживаемостью [38]. Имеющиеся в настоящее время противоречивые данные, в первую очередь, могут быть обусловлены наличием различных методологических аспектов в оценке рецепторного статуса по причине отсутствия высокочувствительных антител для дифференцировки изоформ ER α и ER β [104].

Наряду с внутриклеточными механизмами, важнейшую роль играет и мутация гена *ESR1* (estrogen receptor 1) в виде точечных миссенс-мутаций, транслокаций и усиления его функции. Точечные миссенс-мутации в гене *ESR1*, обнаруживаются нечасто именно в первичной опухоли, однако частота их встречаемости при метастатическом РМЖ кратно увеличивается [27]. При проведенном мета-анализе клинического значения мутаций ESR1 во внеклеточных ДНК, было обнаружено прогностическое значение этих мутаций при выборе гормонотерапии у пациенток с ER+ метастатическом РМЖ [36]. При наличии транслокаций основным моментом при этих изменениях является образование белков слияния, таких как SOX9, DAB2, GYG1 и YAP1, что в последующем приводит к эстроген-независимому росту опухоли, активации механизмов, связанных с метастатическим потенциалом или индукции клеточной

подвижности [87, 162].

Известным в настоящее время механизмом является так называемый перекрестный путь взаимодействия ER с сигнальными путями. Лиганд-независимая активация ER происходит из-за посттрансляционных модификаций белка ER с последующей его модификацией. Фосфорилирование ER осуществляется за счет различных тирозинкиназ, таких как Her2/neu, рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) и рецептор инсулиноподобного фактора роста (IGF1R) [103, 120]. Тем самым, происходит активация рецепторов ER, а, следовательно, опухолевые клетки становятся невосприимчивыми к действию тамоксифена. По такому же механизму происходит активация рецептора ER через сигнальные пути MAPK (mitogen-activated protein kinase) или PI3K/AKT [61]. Кофакторы связанного ER включают в себя комплекс ко-регуляторных белков (ко-активаторов/ко-репрессоров), а также факторов транскрипции. Активация факторов транскрипции, например, таких как активаторный белок (AP-1) или ССАТ/энхансер-связывающий белок бета (C/EBP β), как известно, приводит к устойчивости проводимой гормонотерапии [118]. В последние годы изучение транскрипционных факторов является крайне актуальным направлением, в частности особое внимание уделяется таким маркерам как GATA3, FOXA1 и ELF5 [102, 170, 183].

Накопленные в последние годы знания все большее число так называемых «маркеров-кандидатов», которые также занимают ведущую позицию в отношении механизмов, приводящих к эндокринной устойчивости карциномы молочной железы. Ряд таких исследований проводится в отношении роли м-РНК (микро-РНК). В одном из исследований на моделях мышей было показано, что наличие экспрессии м-РНК 221 и 222 у линии мышей MCF7, сопровождалось развитием резистентности, хотя изначально, карцинома молочной железы отвечала на гормонотерапию [134]. Особый интерес в последнее время вызывает так называемый развернутый белковый ответ (UPR – Unfolded Protein Response), который представляет собой механизмы взаимодействия с эндоплазматическим ретикулумом. Нарушение передачи сигналов в этой системе приводит к

повышенной выживаемости опухолевых клеток при раке молочной железы, а также приводит к развитию резистентности к терапии тамоксифеном у пациентов с ER + раком молочной железы [16, 17]. Эти механизмы непосредственно рассматриваются с параллельно идущим феноменом аутофагии, которая, как известно, тоже влияет на возможность ответа опухоли к проводимой гормонотерапии [113].

Все эти механизмы прямо или опосредованно могут привести не только к приобретению устойчивости к проводимой гормонотерапии, а также к повышению инвазивных свойств опухолевых клеток, миграции и повышению частоты развития отдаленных метастазов. Несмотря на множество имеющихся исследований, до сих пор резистентность к проводимой гормонотерапии является крайне актуальной и имеет множество спорных вопросов в виде поиска маркеров, которые могут не только предсказать развитие эндокринной резистентности, но также расширить понимание патогенеза РМЖ для поиска альтернативных агентов для лечения резистентных опухолей.

1.4 Характеристика транскрипционных факторов GATA3, FOXA1, ELF5 и их роль при раке молочной железы

Транскрипционные факторы являются ключевыми клеточными белками, имеющими в составе один или более ДНК-связывающий домен, функция которых заключается в непосредственной интерпретации генома посредством контроля процессов синтеза матричной РНК с матрицы ДНК, что происходит через механизмы связывания данных белковых молекул со строго определенными участками последовательности ДНК. Среди таких участков в молекуле ДНК выделяют энхансеры и сайленсеры. Энхансеры представляют собой участки ДНК, обеспечивающие связь с активирующими факторами транскрипции (белки-индукторы), сайленсеры – это участки, в которых происходит взаимодействие с факторами, осуществляющими функцию подавления процессов транскрипции (белки-репрессоры). Таким образом, факторы транскрипции

осуществляют координирование уровня экспрессии генов в ответ на различные сигналы, поступающие в клетку. Клеточная физиология диктует необходимость идентификации и соответствующей реакции на всевозможные и отличающиеся друг от друга как внутренние, так и внешние раздражители. В этом отношении, обеспечивая в самых разных ситуациях физиологически верную экспрессию специфических генов, транскрипционная регуляторная система имеет центральную роль в управлении и регуляции многих биологических процессов: клеточного цикла, внутриклеточного гомеостаза, дифференцировки клеток, различий в скорости их протекания, в том числе, контролирует механизмы иммунного ответа [4, 7, 48, 167, 182].

В экспериментальных условиях показано, что транскрипционные факторы могут определять не только клеточную дифференцировку в условиях физиологии, но и процессы дедифференцировки и трансдифференцировки клеток, что, в свою очередь, может приводить к развитию патологии, занимая ключевые позиции в патогенезе. Известно, что многочисленные заболевания возникают в результате нарушений в функционировании транскрипционной регуляторной системы, в частности, около трети разнообразных нарушений анатомического развития у людей связывают с дисфункцией данных белковых молекул, при этом факторы транскрипции в большом количестве представлены среди онкогенов. Основой таких изменений могут быть мутации как самих факторов транскрипции, так и мутации в участках их связывания с молекулой ДНК [4, 24, 176, 182]. Анализ литературы и представленные результаты исследований отчетливо демонстрируют возможность влияния на течение патологических процессов в организме за счет активации или ингибирования факторов транскрипции, определяя их в качестве одних из основных молекул при разработке новейших фармакологических стратегий для модуляции их функции [105, 147]. Учитывая разнообразные показатели в структуре заболеваемости и смертности населения, можно сказать, что особое значение представленные данные имеют, безусловно, в онкологии, по этой причине в настоящее время отмечается повышенный интерес к исследованиям, посвященным роли факторов транскрипции в регуляции

механизмов транскрипции при карциномах различной локализации.

Актуальность молекулярно-генетических исследований, посвященных роли факторов транскрипции при раке молочной железы, в настоящее время сомнений не вызывает, поскольку обнаруживаются противоречивые данные, при этом результаты не всегда охватывают значимые клинические параметры, которые могли бы иметь значение относительно течения и прогноза. Одними из наиболее пристально изучаемых факторов транскрипции при раке молочной железы являются транскрипционные белки GATA3, FOXA1 и ELF5.

В большинстве первичных и метастазирующих карцином молочной железы при иммуногистохимическом исследовании определяется экспрессия транскрипционного белка GATA3, который является одним из ведущих молекулярных маркеров при диагностике не только рака молочной железы, но и злокачественных опухолей других локализаций [25, 115].

GATA3 представляет собой связывающий белок транскрипционных факторов семейства GATA. Ядерные белки данного семейства содержат ДНК-связывающие домены цинкового пальца (zinc-finger), распознают нуклеотидные последовательности G-A-T-A в промоторах гена-мишени, активируя или подавляя определенные гены. GATA3 включает в себя 6 транскрипционных факторов (GATA 1-6), содержащих общий ДНК фрагмент (A/G) GATA (A/G) и концевой цинксодержащий домен (zinc-finger) [28, 34, 200]. GATA-белки можно разделить на гемопоэтические (GATA1, GATA2, GATA3) и негемопоэтические (GATA4, GATA5, GATA6). Известно, что дефекты белка GATA1 были обнаружены при острой мегакариоцитарной лейкемии, дефекты белка GATA2 – при апластической анемии и миелодиспластическом синдроме, удаление гена GATA3 у мышей в эксперименте приводило к гибели эмбриона в результате возникновения дефектов гемопоэза и центральной нервной системы [23, 89]. Факторы транскрипции GATA4, GATA5, а также GATA6 участвуют в развитии и формировании органов энтодермального происхождения и кишечной трубки зародыша [71].

Функция GATA3 важна для регуляции таких генов как *MUC1/EMA*,

принимающих участие в дифференцировке эпителиальных клеток молочной железы и регуляции генов, определяющих развитие Т-клеток [73, 94, 196]. Белок GATA3 играет роль в активации генов, регулирующих развитие кожи и ее придатков, в частности, волосяных фолликулов, а также имеет значение в формировании структур трофобласта и эндотелиальных клеток, преимущественно в крупных сосудах [43, 95, 99, 161, 165]. GATA3 является неотъемлемым компонентом пути активации ER, так как регулирует первичный фактор FOXA1 и обеспечивает связывание ER путем формирования доступности энхансера, что говорит о наличии перекрестных путей между коэкспрессируемыми генами ER и GATA3 [90].

Экспериментальные исследования особенностей экспрессии GATA3 на моделях животных, клеточных линиях и образцах опухолевой ткани показали, что потеря экспрессии GATA3 коррелирует с агрессивным фенотипом опухоли при раке молочной железы. Широко используемая в качестве модели ER+ люминального рака молочной железы клеточная линия MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) характеризуется наличием GATA3 D336Gfs*17 мутации. Направленная коррекция этой мутации в геноме методом CRISPR-Cas ассоциирована с уменьшением роста новообразования *in vivo*, а также с уменьшением размера опухоли в ксенотрансплантатах. Наоборот, введение мутации в клеточные линии люминального рака молочной железы G473 дикого типа (Wild-type) T47D или CAMA-1 или избыточная экспрессия укороченных мутантов GATA3 в клетках линии ZR-75-1 приводили *in vivo* к увеличению роста опухоли [92, 140]. Фактор транскрипции GATA3 регулирует определенный набор генов, участвующих в дифференцировке и пролиферации клеток при раке молочной железы и играет роль в регуляции рецепторов ER и PR [75]. Известно, что активация рецептора прогестерона (PR) сопровождается снижением экспрессии GATA3 на уровне транскрипции и посттрансляции в клетках карциномы молочной железы посредством механизма двойной регуляции, включая метилирование на промоторе GATA3 и фосфорилирование белка, что приводит к индуцированному действию прогестерона на рост злокачественно

трансформированных клеток в условиях *in vitro* и *in vivo* со снижением в дальнейшем функции GATA3 [154].

В исследовании Wei Yan с использованием клеточных линий рака молочной железы MDA-MB-231 (GATA3-негативные, инвазивные клетки) и MCF-7 (GATA3-позитивные, неинвазивные клетки) было показано, что эктопическая экспрессия белка GATA3 в опухолях линии MDA-MB-231 способствовала приобретению клетками эпителиального фенотипа, что сопровождалось уменьшением инвазивных свойств. В таких клетках регистрировалось увеличение экспрессии E-кадгерина и снижение экспрессии виментина, N-кадгерина и матриксной металлопротеиназы [9]. Было отмечено, что клетки линии MDA-MB-231, экспрессирующие маркер GATA3, характеризовались наименьшими размерами первичных опухолей и отсутствием метастазов. Блокада GATA3 в опухолях клеточной линии MCF-7 запускала фибропластическую трансформацию клеток с приобретением мезенхимального фенотипа и повышала их активность в отношении инвазии, приводя к появлению фокусов отдаленного метастазирования [93]. В своей работе W. Si et al. (2015) впервые установили, что при раке молочной железы белок GATA3 может принимать участие в подавлении механизмов транскрипции путем создания, так называемого NuRD-комплекса, в состав которого также входят G9A и метастазирующий опухолевый антиген MTA3 (комплекс GATA3/G9A/NuRD (MTA3)). Данный комплекс способен ингибировать инвазивный потенциал опухолевых клеток *in vitro* и подавлять процессы метастазирования рака молочной железы *in vivo*. И наоборот, исследование показало подавление экспрессии NuRD-комплекса при прогрессировании рака молочной железы вследствие реализации программ эпителиально-мезенхимального перехода при активном участии таких факторов транскрипции как Snail и Twist [49]. Фактор GATA3 может взаимодействовать с белком UTX, который представляет собой гистоновую деметилазу H3 (H3K27me2/H3K27me3), образуя комплекс GATA3-UTX, ингибирующий процессы эпителиально-мезенхимального перехода, а также инвазию и метастазирование рака молочной железы *in vitro* и подавляющего рост

опухолевого узла *in vivo* [97].

Мутация GATA3 является второй по частоте встречаемости при люминальном А подтипе (после PIK3CA) и третьей при люминальном В раке молочной железы (после PIK3CA и TP53) [40]. Потеря экспрессии этого гена-супрессора в опухоли ассоциирована с плохим прогнозом для пациенток с карциномой данной локализации [41, 189]. Большинство мутаций приводят к усечению белка, тогда как кластер мутаций в конце кодирующей области приводит к удлинению белка GATA3 вследствие дополнительных миссенс (бессмысленных) аминокислот [88]. Недавнее исследование M. Takaku et al. (2018) позволило определить ряд особенностей рака молочной железы с мутацией GATA3 ZnFn2 (zinc-finger). Так, в группе пациентов с подобной мутацией GATA3 в опухоли была зарегистрирована наибольшая 10-летняя выживаемость по сравнению с группой, у которой была выявлена мутация GATA3 дикого типа [98]. Известно, что высокая экспрессия GATA3 ассоциирована чаще всего с ER-положительными опухолями низкой степени злокачественности и более благоприятным прогнозом заболевания [91, 109, 110]. Группа исследователей во главе с R. Mehra показали, что низкий уровень экспрессии GATA3 регистрируется в случаях с высокой гистологической степенью злокачественности ткани новообразования, с наличием метастазов в лимфоузлах, с наибольшим размером первичной опухоли, а также в случаях с отрицательным гормональным статусом. У таких пациенток наблюдалась низкая общая и безрецидивная выживаемость по сравнению с больными, у которых опухоль имела высокий уровень экспрессии GATA3 [114].

В эксперименте на клеточной линии MCF-7, наличие изоформ белка GATA3 ассоциировано с резистентностью опухоли к тамоксифену [130]. В свою очередь, наличие мутаций гена фактора GATA3 коррелирует с лучшей общей безрецидивной выживаемостью у больных с раком молочной железы в целом, а также у пациенток с ER-положительными карциномами, получавшими адъювантную эндокринную терапию [96]. Кроме того, было показано, что мутации в GATA3 коррелируют с ответом опухоли на терапию ингибиторами

ароматазы [195]. Это говорит о том, что мутация белка GATA3 может выступать в качестве определяющего фактора ответа на гормональное лечение при раке молочной железы, однако имеющиеся на сегодняшний день данные о роли транскрипционного фактора GATA3 в прогнозировании ответа опухоли остаются неоднозначными.

Исследования молекулярных особенностей в отношении традиционных маркеров, в частности, GCDFP15 (gross cystic disease fluid protein 15) и MGB (маммаглобин), показывающих высокую специфичность для эпителиальной дифференцировки клеток рака молочной железы, остаются актуальными, но необходимо отметить, что данные маркеры не обладают высокой чувствительностью, особенно по отношению к карциномам молочной железы высокой степени злокачественности. В недавних исследованиях было показано, что экспрессия GATA3 является более чувствительной, чем экспрессия маркеров GCDFP15 и MGB [44, 185]. Аналогичного рода данные были получены в исследовании, в котором белок GATA3 демонстрировал умеренную чувствительность (30,4 %) и высокую специфичность (98,7 %) при дифференциальной диагностике трижды негативного рака молочной железы и в случаях TTF1-негативного рака легкого [175]. Поскольку транскрипционный фактор GATA3 ассоциирован с экспрессией ER при раке молочной железы, нельзя исключить, что данный маркер может отвечать за формирование гормон-реагирующего фенотипа опухоли и принимать участие в регуляции активации ER, определяя тем самым ответ на антиэстрогеновую терапию.

Соответственно, можно предположить, что ядерный фактор транскрипции GATA3 может быть использован в качестве молекулярно-биологического маркера для определения ответа на гормональную терапию и, в конечном итоге, служить фактором прогноза выживаемости пациентов с раком молочной железы.

FOXA1 (fork head box protein A1) или гепатоцитарный ядерный фактор 3-альфа (HNF-3 α) является членом семейства ДНК-связывающих белков, который кодируется у человека геном FOXA1. Данный гепатоцитарный ядерный фактор регулирует в эмбриогенезе процессы обмена веществ в поджелудочной железе и

способен активировать транскрипцию альбумина и транстиретина в ткани печени [107]. В литературе описана его роль в развитии и клеточной дифференцировке тканей других локализаций, в том числе, почек, легких, головного мозга, органов желудочно-кишечного тракта, молочной и предстательной железы [22]. Транскрипционные белки этого семейства часто называют «пионерскими» вследствие их способности формировать связи с гетерохроматином и делать таким образом определенные участки генома более доступными для других факторов транскрипции [164]. В частности, FOXA1 может связываться с промоторами более 100 генов, определяющих реализацию различных процессов метаболизма и регулирующих механизмы функционирования сигнальных путей и клеточного цикла [80]. Известно, что FOXA1 и GATA3 являются ER-ассоциированными кофакторами, обеспечивающими регуляцию транскрипции, передачу внутриклеточных сигналов и связывание стероидных рецепторов ER и AR с молекулярными структурами ДНК [29]. Экспрессия ядерных факторов транскрипции в тканях, и в частности экспрессия FOXA1, обусловлена способностью этих белков связываться со специфическими сайтами-мишенями на хроматине, что вызывает локальное раскручивание ДНК. В молочной железе такие изменения в молекуле ДНК позволяют хроматину становится доступным для связи с ядерными рецепторами ER и PR, при этом в наибольшей степени оказывается зависимой от FOXA1-опосредованной доступности регуляция функционирования ER [35, 81, 101]. Анализ литературы показал, что мутация гена FOXA1 встречается в около 2 % случаев рака молочной железы и примерно в 3 % случаев рака предстательной железы, при этом отмечается увеличение темпов роста первичной опухоли [72, 83].

Ядерный фактор транскрипции FOXA1 рассматривают как один из основных белков, имеющих ведущее значение в механизмах канцерогенеза рака предстательной железы, в частности в механизмах активации рецепторов AR [18, 198]. Nakshatri H. и Badve S. в своем исследовании получили данные о том, что низкий уровень экспрессии FOXA1 у пациентов с прогрессированием рака молочной железы был обусловлен повышением активности белков комплекса

поликомб (polycomb), роль которого заключается в подавлении генов *Нох* посредством модуляции структуры хроматина во время эмбрионального развития [141]. В работе N. Yamaguchi представлены данные о том, что транскрипционный фактор FOXA1 является маркером дифференцировки и созревания люминальных клеток в молочной железе, белок участвует в активации и пролиферации РНК опухолевых клеток, выступая в качестве онкоген-специфичного маркера [79].

Изучение роли транскрипционных факторов при раке молочной железы отчетливо демонстрируют данные о том, что белок FOXA1 при карциноме указанной локализации ассоциирован с экспрессией ER. При «нокдауне» экспрессии FOXA1 происходит блокировка взаимодействия ER и хроматина, а также эстроген-индуцированная экспрессия генов, что указывает и подтверждает необходимость участия изучаемого ядерного фактора транскрипции в реализации эстроген-опосредованных сигналов в клетке, пролиферации опухолевых клеток, а также в развитии резистентности к гормонотерапии при раке молочной железы [46, 168]. FOXA1 совместно с ER способствует транскрипции гена, индуцирующего дифференцировку люминальных клеток, и подавляет базально подобный фенотип опухоли. Отсутствие функциональных эффектов FOXA1 увеличивает миграционную активность и усиливает инвазивные свойства опухолевых клеток, обладающих характеристиками базального подтипа. Нельзя исключить, что FOXA1 контролирует пластичность между базальными и люминальными клетками рака молочной железы, не только путем индукции люминальных генов, но также путем подавления базального фенотипа и, следовательно, агрессивности [10, 85]. Высокая экспрессия FOXA1 при люминальном раке молочной железы ассоциирована с хорошим ответом опухоли на проводимую гормонотерапию [81]. Rangel N. et al. подтвердили данные этих исследований, показав, что высокий уровень мРНК FOXA1 при раке молочной железы зачастую ассоциирован с более высокими показателями экспрессии рецепторов к ER и AR. Напротив, карциномы с низким уровнем мРНК FOXA1 демонстрируют более низкие показатели экспрессии гормональных рецепторов, особенно AR [78]. В литературе имеются сведения о том, что более

благоприятное течение заболевания при раке молочной железы отмечается в случаях опухолей с AR+ гормональным статусом [188]. Высокий уровень позитивной экспрессии маркера FOXA1 рассматривают как индикатор хорошего прогноза при рецептор-позитивных карциномах, в том числе, благоприятный прогноз регистрировался и у пациенток, получавших в качестве терапии тамоксифен [20, 117].

Однако в литературе относительно транскрипционного фактора FOXA1 представлены неоднозначные данные. Группа исследователей во главе с Horimoto Y. в своей работе показали, что при люминальном подтипе рака молочной железы хороший ответ при неoadъювантной терапии был ассоциирован с низкой экспрессией изучаемого белка, при этом при карциномах с высокими показателями экспрессии FOXA1 в опухолевых клетках, как правило, в дальнейшем развивались поздние рецидивы [126]. При изучении люминального А рака молочной железы Sh. DeLara (2019) были представлены данные о том, что позитивная экспрессия FOXA1 и GATA3 при указанном молекулярно-генетическом субтипе присутствует более чем в 80 % карцином [187]. Кроме того, было высказано предположение, что фактор транскрипции FOXA1 может играть двойную роль и выступать как стимулятор опухолевого роста или как супрессор, в частности, на начальных стадиях он функционирует в качестве промотора, но при этом тормозит рост опухоли на более поздних стадиях. Отмечается, что гиперэкспрессия FOXA1, оказывая влияние на экспрессию белка p27 (ингибитор клеточного цикла, ассоциированного с BRCA1) и стимулируя экспрессию E-Cadherin, может проявлять супрессорное действие и блокировать процессы метастазирования [13].

Экспериментальные данные, полученные Yamaguchi N. et al., говорят о том, что снижение экспрессии FOXA1 может способствовать приобретению опухолевыми клетками свойств стволовых клеток, что приводит к возникновению резистентности новообразования к терапии тамоксифеном посредством индукции интерлейкина-6 (IL-6) [197]. Fu X. и коллектив исследователей также в эксперименте показали, что гиперэкспрессия FOXA1 в ER+ опухолях была

ассоциирована с более агрессивным течением рака молочной железы, что может быть показателем возникновения нарушений в функционировании сигнальных путей при активации эстрогена и развития в дальнейшем устойчивости новообразования к гормонотерапии. Наиболее вероятно, это обусловлено перепрограммированием пути транскрипции ER через альтернативный путь (лиганд-независимый – E2 путь) с участием других факторов роста [84]. Аналогичный механизм имеет место быть и при раке предстательной железы, где высокий уровень экспрессии FOXA1 в опухолевых клетках, чувствительных к андрогенам, облегчает связывание AR-хроматина в новых областях генома, не занятых AR, что, в свою очередь, способствует росту опухолевых клеток. Было показано, что гиперэкспрессия FOXA1 в опухоли ассоциирована с наименьшим временным периодом до регистрации биохимического рецидива после радикальной простатэктомии, с наличием положительных в отношении опухоли границ резекции и с более высокой стадией процесса при постановке диагноза [52].

В одном из исследований показано наличие сложных взаимодействий между AR, ER и FOXA1 в отношении развития эндокринной резистентности, что в первую очередь может быть связано с изменением активации рецепторов ER при транскрипции. Известно, что длительная адъювантная терапия рака молочной железы вызывает возникновение в опухолевых клетках резистентности к блокирующим эффектам эндокринной терапии [8]. Мутации в домене ESR1 способствуют формированию резистентности к гормональной терапии метастатического рака молочной железы [181]. Van Poznak C. (2015) в работе с коллегами описали случаи рака молочной железы, при которых экспрессия рецепторов ER в метастатических очагах была негативной, несмотря на то, что первичная опухоль была ER α -позитивной [191]. В исследовании W. Schrijver (2018) отмечен интересный факт, заключающийся в том, что показатель экспрессии маркера FOXA1 в плевральных метастазах был значимо ниже по сравнению с таковым в ткани первичной опухоли и отдаленных метастазов. Такая закономерность, по мнению авторов работы, указывает на потерю сигнальной оси

рецепторов ER, а, следовательно, может являться причиной резистентности рака молочной железы к гормональной терапии [82]. Описана роль транскрипционного фактора FOXA1 в качестве антагониста процессов эпителиально-мезенхимального перехода в злокачественных новообразованиях различной локализации, в том числе при раке молочной железы [6, 169, 174]. В одном из экспериментальных исследований с использованием клеточных линий рака молочной железы мезенхимального (MDA-MB-231) и эпителиального (MCF7) типов было проанализировано участие белка FOXA1 в прогрессировании эпителиально-мезенхимального перехода. Результаты работы подтверждают данные о том, что данный маркер преимущественно способствует экспрессии E-Cadherin на уровне белка путем подавления экспрессии Slug в клетках линии MCF7, соответственно, можно предположить, что ассоциация FOXA1-Slug регулирует прогрессирование эпителиально-мезенхимального перехода [54].

Необходимо отметить, что на сегодняшний день роль белка FOXA1 в оценке чувствительности рака молочной железы к антиэстрогеновой терапии изучена недостаточно, а имеющиеся в литературе данные немногочисленны и неоднозначны.

ELF5 (транскрипционный регулятор E74-подобный фактор 5 типа) относится к семейству ETS-транскрипционных факторов (ET-26) и физиологически в норме связан с плацентацией, альвеологенезом, процессами дифференцировки ацинусов молочной железы во время беременности и лактации [54, 125, 194]. Данный транскрипционный фактор рассматривается как потенциальный модулятор молекулярного подтипа рака молочной железы, поскольку в экспериментальных исследованиях на клеточных линиях базального подтипа рака молочной железы было показано, что блокировка ELF5 может приводить к изменениям молекулярного профиля карциномы данной локализации [59]. Отмечено, что функция ELF5 является крайне важной и первостепенной для клеток секреторного альвеолярного эпителия молочной железы, поскольку индуцирует процесс их дифференцировки во время альвеолярного морфогенеза. В ткани молочной железы с «нулевыми» мутациями рецептора пролактина, PR или

ELF5 обнаруживаются почти одинаковые дефекты в развитии долек и альвеолярного эпителия. Это сходство указывает на наличие рецепторного механизма взаимодействия, что играет важную роль в развитии клеточных структур молочной железы [180]. Известно, что пролактин обеспечивает регулирование влияния фактора ELF5 на развитие ткани молочной железы, поскольку является пролактин-регулируемым геном [36, 58, 121]. В одном из исследований показали, что у мышей с пролактин-рецепторной «нулевой» молочной железой в условиях *in vivo* экспрессия ELF5 была значительно снижена, при этом экспрессия рецепторов пролактина у мышей с выключенным геном ELF5 была не изменена [153].

Фактор транскрипции ELF5 является одним из ключевых в дифференцировке клеток-предшественников, участвуя изначально в развитии стволовых клеток молочной железы, а затем оказывая влияние на их дифференцировку в клетки-предшественники и далее в люминальные клетки [180]. Такие клетки-предшественники с определенным уровнем транскрипционного фактора ELF5 попадают под гормональный контроль и посредством механизмов взаимодействия с паракринными гормонами молочной железы, а также при участии мембранного белка RANKL (TNFSF11) активируют ELF5, который, в свою очередь, направляет дифференцировку в сторону ER-секреторной клеточной линии, отвечающей в норме за выработку люминальными клетками секрета [146, 152]. По данным исследования коллектива во главе с Harris J. известна альтернативная функция клеток-предшественников, заключающаяся в том, что чувствительная к гормонам ER клетка может сформироваться в случае, если уровень транскрипционного белка ELF5 в ней будет находиться под контролем эстрогена [173]. Результаты Oakes S. R. et al., показали, что *in vivo* у мышей с нокаутом ELF5 (Elf5-KO) блокировка транскрипционного фактора ELF5 приводит к нарушению физиологических процессов созревания ткани молочной железы, а также процессов альвеогенеза и лактации [180].

В литературе представлены данные о том, что изучаемый

транскрипционный фактор ассоциирован с процессами неоангиогенеза и эпителиально-мезенхимального перехода в ткани новообразования, соответственно, сопряжен с механизмами опухолевой инвазии и метастазирования. Экспериментально показано, что высокий уровень экспрессии фактора ELF5 в дифференцированной клеточной линии люминальных клеток ингибирует эпителиально-мезенхимальный переход посредством прямого угнетения транскрипции фактора Snail2/Slug, являющегося индуктором процесса эпителиально-мезенхимального перехода. В случаях потери описанными клетками экспрессии фактора ELF5 отмечается активация процессов эпителиально-мезенхимального перехода посредством увеличения функциональной активности мезенхимальных стволовых клеток, зависящую от состояния фактора Snail2. Соответственно, можно говорить, что ELF5 является ключевым регулятором механизмов не только в реализации клеточной дифференцировки во время нормального развития молочной железы, но и в процессах приобретения злокачественно трансформированными эпителиальными клетками мезенхимальных свойств, определяющих метастазирование при раке молочной железы [42, 57, 63, 171, 178]. Однако анализ литературы показал наличие сведений о том, что повышенная экспрессия ELF5 при люминальном А субтипе рака молочной железы ассоциирована с наиболее коротким периодом развития метастазов, с низкой общей выживаемостью, а также с худшим ответом опухоли на терапию [55]. В работе Kalyuga M. et al. представлены данные, указывающие на то, что изучаемый белок обеспечивает ключевую транскрипционную детерминанту молекулярного подтипа рака молочной железы. ELF5 может подавлять экспрессию ER и фактора транскрипции FOXA1, которые участвуют в дифференцировке люминальных клеток, при этом снижение уровня ELF5 способствует развитию клаудин-подобного рака молочной железы, характеризующегося приобретением люминальными клетками резистентности к антиэстрогенам [59]. В исследовании определенным образом отобранных случаев клеточной линии MCF-7, обработанных тамоксифеном в течение 6 месяцев, было показано, что метилирование гена ELF5 в линиях с PR-позитивной первичной опухолью, имеющих резистентный к антиэстрогенной терапии рецидив, может

иметь значение относительно возможности деления пациенток для индивидуального лечения на ранних стадиях заболевания [53]. Omata F. et al., показали, что уровень экспрессии ELF5 в инвазивном и неинвазивном трижды негативном раке молочной железы является неблагоприятным прогностическим фактором, независимым от других клинико-патологических характеристик. В частности, низкий уровень экспрессии ELF5, особенно в EGFR- и CK5/6- карциномах молочной железы, был ассоциирован с низкой общей и безрецидивной выживаемостью [51].

Необходимо сказать, что в литературе представлены работы, посвященные исследованию фактора транскрипции ELF5 при карциномах других локализаций. Имеются данные, что при раке предстательной железы ELF5 способен ингибировать трансформирующий эпителиально-мезенхимальный переход фактор роста TGF- β , блокируя фосфорилирование эффекторного белка TGF- β SMAD3 [56]. Результаты других исследователей указывают на тот факт, что функциональная активность белка ELF5 скорее определяет более злокачественный фенотип опухолевых клеток при раке простаты [14]. Карциномы мочевого пузыря и почек характеризуются потерей экспрессии фактора транскрипции ELF5 [62, 179]. Кроме того, известно, что при эндометриальной карциноме повышенная регуляция ELF5 связана с более высокой стадией заболевания [133].

Таким образом, отсутствие эффекта от гормонотерапии тамоксифеном может быть связано с активацией различных транскрипционных факторов. В настоящее время не получено достаточное количество данных об экспрессионных характеристиках и взаимодействии между транскрипционными факторами ELF5, FOXA1 и GATA3 у пациенток с раком молочной железы, в том числе при люминальных субтипах. Изучение параметров экспрессии факторов транскрипции, а также их взаимосвязи с механизмами опухолевой прогрессии позволит повысить информативность иммуноморфологического исследования, с большей долей вероятности предполагать эффективность гормонотерапии, а, следовательно, планировать адекватную тактику лечения и прогнозировать исход заболевания при раке молочной железы.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Группу исследования составили 101 пациентка с инвазивной карциномой неспецифического типа молочной железы $T_{1-4}N_{0-3}M_0$ в возрасте от 30 до 81 года, находившиеся на лечении в отделении общей онкологии НИИ онкологии Томского НИМЦ, в период с 2013 по 2015 гг.

Критерием включения в исследование явился морфологически верифицированный люминальный рак молочной железы. В качестве критериев исключения учитывалась IV стадия заболевания, предоперационное лечение.

При поступлении в стационар всем пациентам проводилось обследование, включающее в себя: клинический осмотр, УЗИ органов брюшной полости, общий и биохимический анализ крови, оценка состояния свертывающей системы, общий анализ мочи, КТ легких, ЭКГ, сцинтиграфия костей скелета. Под контролем УЗИ выполнялась core-биопсия опухоли молочной железы с целью верификации диагноза.

Средний возраст пациенток составил $(54,1 \pm 10,1)$ года. Большую часть – 64 случая представляли женщины старше 50 лет (63,4 %), меньшими по количеству оказались группы больных в возрасте от 35 до 50 лет – 36 (35,6 %), и до 35 лет – 1 (1 %) (таблица 1).

Таблица 1 – Распределение больных раком молочной железы в зависимости от возраста

Возраст	Количество больных	
	абс. ч.	%
До 35 лет	1	1
35–50 лет	36	35,6
Старше 50 лет	64	63,4
Всего	101	100
Средний возраст	$(54,1 \pm 10,1)$ года	

У 33 (32,7 %) пациенток на момент установления диагноза менструальная

функция была сохранена, у 68 (67,3 %) пациенток определялось состояние менопаузы.

Распространенность процесса определялась согласно международной классификации по системе TNM (7 издание, принято в 2010 году, рекомендовано к использованию с 2011 года). Чаще выявлялись I (у 52 (51,4 %) пациенток) и IIА (у 17 (16,8 %) пациенток) стадии заболевания, реже диагностировались IIВ (в 21 (20,8 %) случае), IIIА (в 6 (6 %) случаях), IIIВ (в 3 (3 %) случаях) и IIIC (в 2 (2 %) случаях) стадии процесса (таблица 2).

Таблица 2 – Распределение больных раком молочной железы в зависимости от стадии заболевания

Стадия заболевания	Количество больных	
	абс. ч.	%
I (T ₁ N ₀ M ₀)	52	51,4
IIА (T ₁ N ₁ M ₀ , T ₂ N ₀ M ₀)	17	16,8
IIВ (T ₂ N ₁ M ₀ , T ₂ N ₁ M ₀ , T ₃ N ₀ M ₀)	21	20,8
IIIА (T ₁ N ₂ M ₀ , T ₂ N ₂ M ₀ , T ₃ N ₁₋₂ M ₀)	6	6
IIIВ (T ₄ N ₀₋₂ M ₀)	3	3
IIIC (T ₁₋₄ N ₃ M ₀)	2	2
Всего	101	100

Первичные опухоли в 58 случаях (57,4 %) располагались в левой молочной железе, в 43 случаях (42,6 %) – в правой молочной железе. Локализация новообразований относительно квадрантов молочной железы была распределена следующим образом. Опухоли значимо чаще выявлялись в наружных квадрантах молочных желез – у 21 (40,4 %) пациентки, реже во внутренних квадрантах и на границе наружных и внутренних квадрантов – 13 (25 %) и 11 (21,2 %) пациенток соответственно. Центральная локализация новообразования молочной железы наблюдалась лишь в 7 случаях (13,4 %) (таблица 3).

Распределение пациенток в зависимости от размера первичной опухоли молочной железы представлено в таблице 4. Согласно представленным данным,

чаще всего размер новообразования составлял до 2 см – 52 (51,5 %) случая.

Таблица 3 – Распределение больных раком молочной железы в зависимости от локализации опухоли

Локализация опухоли	Количество больных	
	абс. ч.	%
Наружные квадранты	60	59,5
Внутренние квадранты	13	12,9
Граница квадрантов	21	20,7
Центральные отделы	7	6,9
Всего	101	100

Таблица 4 – Распределение больных раком молочной железы в зависимости от размера первичной опухоли

Размер первичной опухоли	Количество больных	
	абс. ч.	%
Менее 2 см	52	51,5
2–5 см	46	45,6
Более 5 см	3	2,9
Всего	101	100

В послеоперационном периоде все пациентки получали антиэстрогеновую терапию тамоксифеном в стандартной дозировке или ингибиторами ароматазы. Адъювантная химиотерапия и анти-HER2-терапия проводилась по показаниям в соответствии с клиническими рекомендациями. Сроки наблюдения за больными составили не менее 5 лет после завершения оперативного этапа лечения. Для оценки динамики заболевания анализировались первичные документы – амбулаторные карты и истории болезни пациентов.

Морфологическому исследованию подвергался операционный и биопсийный материал. После выполнения оперативного вмешательства или получения биоптата материал помещался в 10 % рН-нейтральный забуференный раствор формалина. Общая продолжительность фиксации операционного

материала и биоптата не превышала более 18–24 часов. Материал проводился по стандартной методике и заливался в парафин. Проводка тканевых образцов проводилась стандартным способом в автоматическом гистопроцессоре Leica ASP 6 025 с использованием раствора для гистологической обработки «Изопреп» (Состав: абсолютизированный изопропанол (концентрация не ниже 99,7 %) – тритон X15 (октилфеноксиполиэтоксиэтанол), производитель «Бiovитрум»). В последующем с парафиновых блоков готовили гистологические срезы толщиной 4–5 мкм. Микротомию проводили с помощью санного микротомы HM 430 (Thermo Fisher). Для окрашивания микропрепаратов применяли готовые растворы красителей гематоксилина и эозина. Окрашивание гистологических срезов проводили в аппарате Varistain™ Gemini (ThermoFisher).

Морфологическое исследование операционного материала на первом этапе включало в себя макроскопическую оценку удалённого сектора или молочной железы. Макроскопически осуществлялась оценка ткани первичной опухоли, ткани молочной железы вне новообразования и всех удалённых во время оперативного лечения лимфатических узлов.

Гистологическое исследование ткани первичной опухоли проводилось согласно следующему алгоритму:

- 1) определение гистологического типа опухоли;
- 2) оценка степени злокачественности карциномы (grade);
- 3) оценка характера роста опухоли (уницентрическая форма роста/ мультицентрическая форма роста);
- 4) оценка стромального компонента опухоли:
 - оценка степени выраженности стромы опухоли,
 - оценка наличия и выраженности гиалиноза стромы опухоли,
 - оценка наличия и выраженности инфильтрации стромы иммунными клетками;
- 5) определение наличия и выраженности феномена краудинга в структурах инфильтративного компонента опухоли;
- 6) определение наличия, выраженности ретракции стромы вокруг

структур инфильтративного компонента опухоли.

Гистологический тип опухоли устанавливался согласно классификации ВОЗ 4-го пересмотра (WHO, 2012). Все случаи были представлены инвазивной карциномой неспецифического типа (рисунок 4).

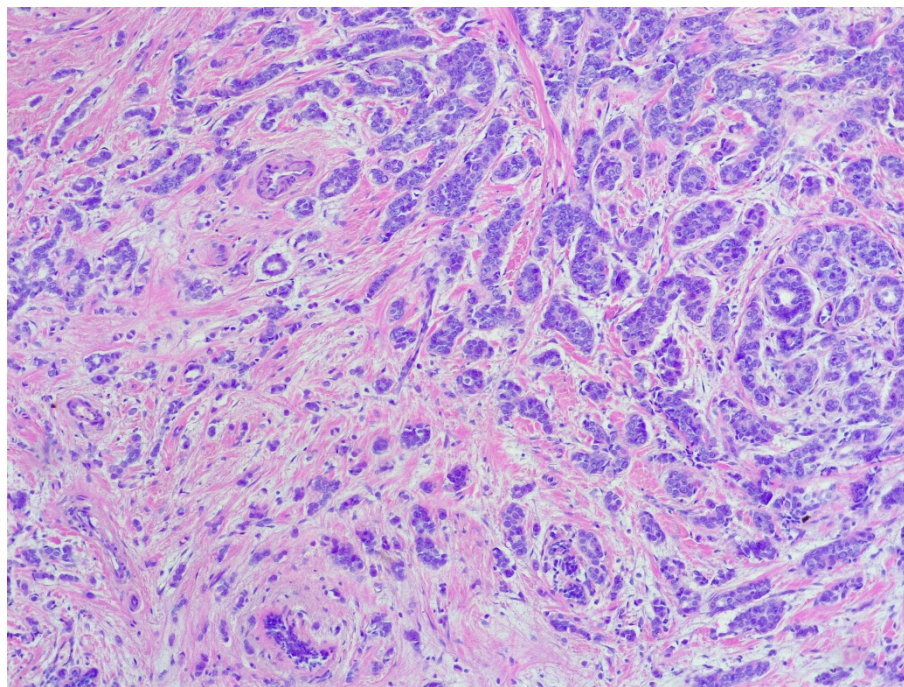


Рисунок 4 – Инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа.

Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$

Степень злокачественности опухоли определялась по модифицированной схеме P. Scarff, H. Bloom и W. Richardson-Nottingham Grading system. При оценке образцов полуколичественным способом учитывались следующие морфологические параметры: количество тубулярных структур (1 балл $> 75\%$; 2 балла $10\text{--}75\%$; 3 балла $< 10\%$), число митозов HPF и степень выраженности клеточного полиморфизма (от 1 до 3 баллов). На основании их суммарной оценки выставлялась степень злокачественности карциномы grade (3–5 баллов – grade 1; 6–7 баллов – grade 2; 8–9 баллов – grade 3).

Оценка характера роста опухоли проводилась в исследуемых фрагментах ткани удаленной молочной железы с учетом наличия одиночного опухолевого

узла или множественных, изолированных друг от друга фокусов злокачественного новообразования. В случаях, при которых первичная опухоль была представлена одиночным узлом, указанный характер роста учитывался как уницентрическая форма роста. При выявлении фокусов карциномы молочной железы за пределами первичного опухолевого узла, случай рассматривался как мультицентрическая форма роста новообразования.

В каждом случае анализировали соотношение стромального и паренхиматозного компонента по их процентному соотношению в первичной опухоли, при этом: 1 балл – более 70 % в опухоли представлено железистыми структурами (слабая выраженность стромы); 2 балла – железистый компонент занимает $< 70 \% \dots > 30 \%$ от объема опухолевого узла (умеренная выраженность стромы); 3 балла обозначали случаи, при которых железистый компонент составлял $< 30 \%$ от объема новообразования (резко выраженная строма).

Различные варианты соотношения стромального и паренхиматозного компонента новообразования продемонстрированы на рисунках 5, 6 и 7.

Инфильтрацию иммунными клетками оценивали в опухоли и в строменовой строме при увеличении $\times 400$ в 10 полях зрения. При учете степени выраженности инфильтрации учитывались все иммунные клетки как в опухолевой строме, так и между опухолевыми клетками, перитуморальная зона не учитывалась. Результаты количественной оценки переведены в балльную шкалу (1 балл – слабовыраженная инфильтрация, до 300 иммунных клеток; 2 балла – умеренно выраженная инфильтрация, 300–600 клеток; 3 балла – резко выраженная, более 600 клеток). Выраженная инфильтрация внутри опухоли представлена на рисунке 8.

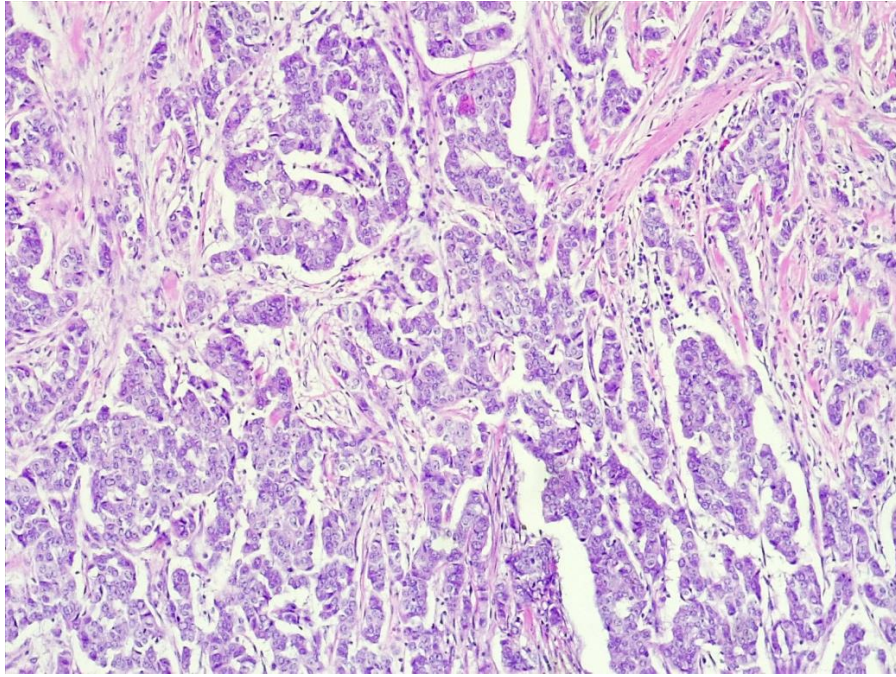


Рисунок 5 – Слабая степень выраженности стромального компонента (1 балл) инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа (grade 3). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$

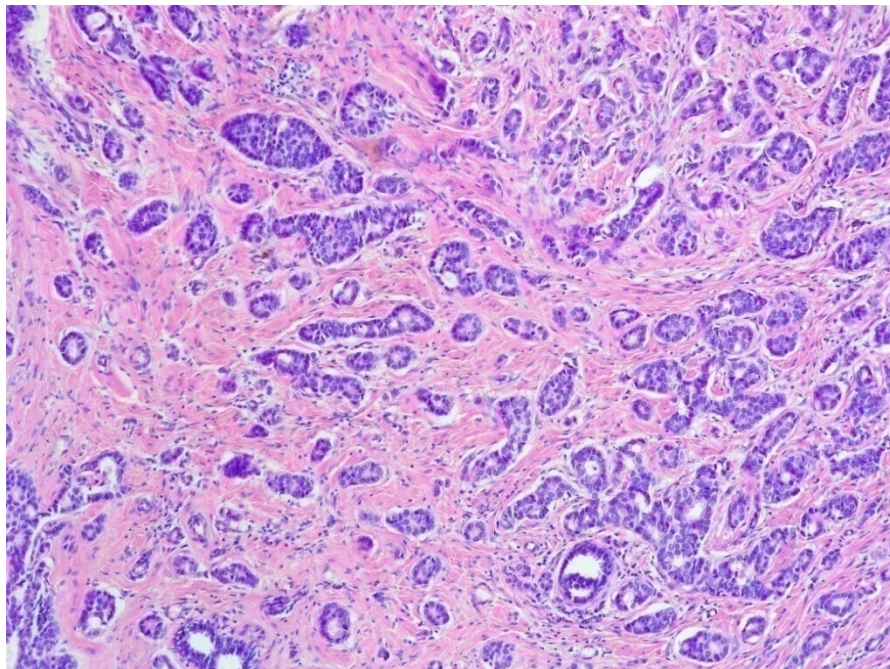


Рисунок 6 – Резко выраженный стромальный компонент (3 балла) инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$

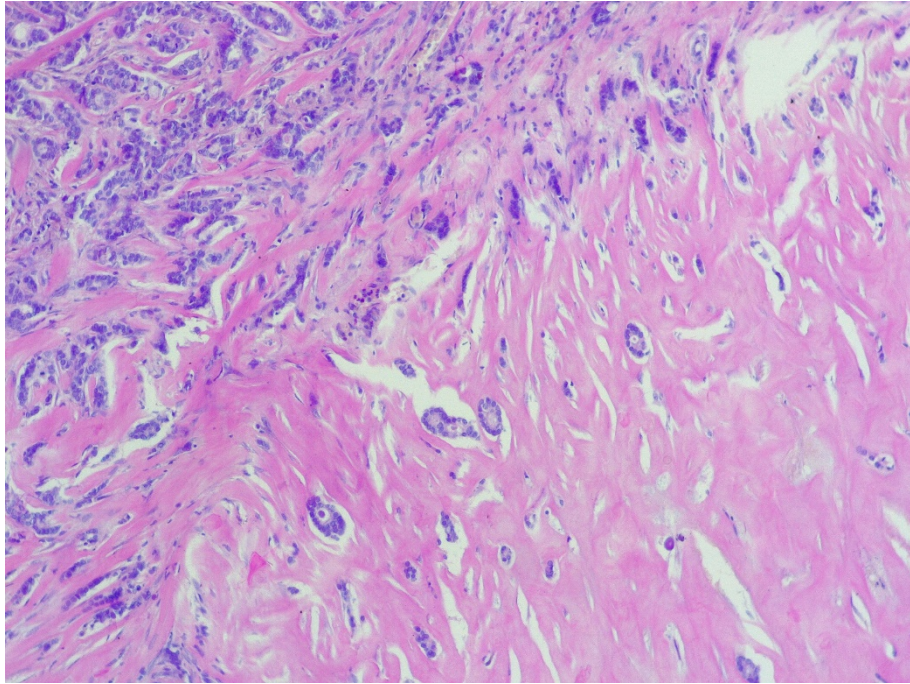


Рисунок 7 – Резко выраженный гиалиноз стромы (3 балла) инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа. Окраска гематоксилином и эозином.

Увеличение $\times 100$

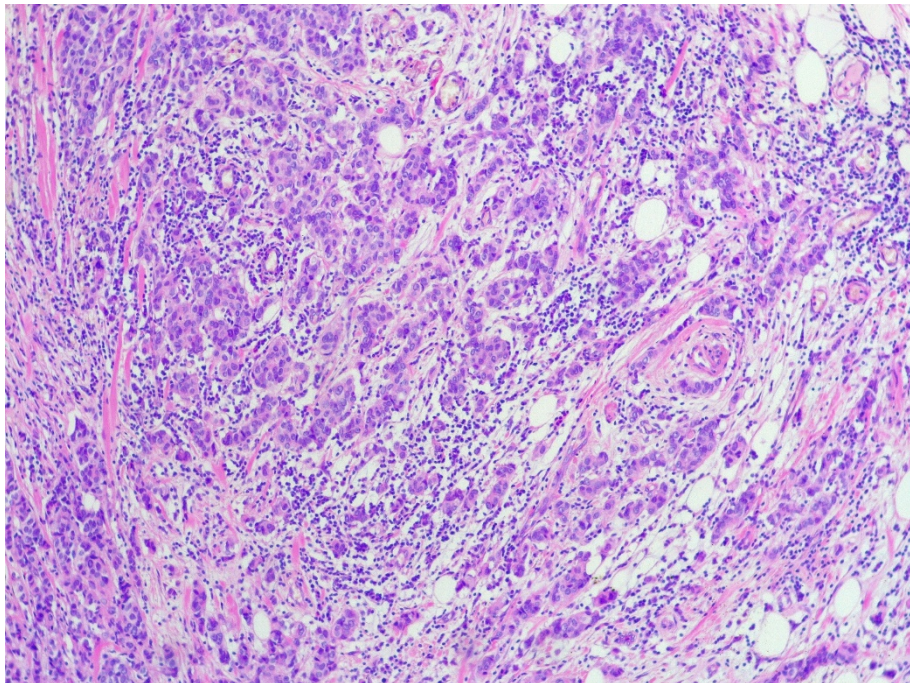


Рисунок 8 – Резко выраженная воспалительная инфильтрация стромы (3 балла) инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа.

Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$

В инфильтративном компоненте опухоли проводилась оценка наличия феномена краудинга, при котором отмечалось увеличение количества клеток в структурах опухоли вследствие преобладания процессов пролиферации над процессами апоптоза клеток. Наличие данного феномена в различных структурах инфильтративного компонента опухоли учитывалось по выявлению участков с более близким расположением клеток и, соответственно, ядер опухолевых клеток относительно друг друга (рисунок 9). Оценка выраженности данного феномена в гистологическом срезе опухоли проводилась полуколичественным методом по 3-балльной системе, в соответствии с которой 1 баллом (слабо выраженный краудинг) обозначали случаи с наличием краудинга $<$ чем в 30 % структур инфильтративного компонента, 2 баллами (умеренно выраженный краудинг) – от 30 до 70 % структур, в 3 балла (резко выраженный краудинг) учитывались случаи с наличием описываемого феномена $>$ чем в 70 % структур опухоли.

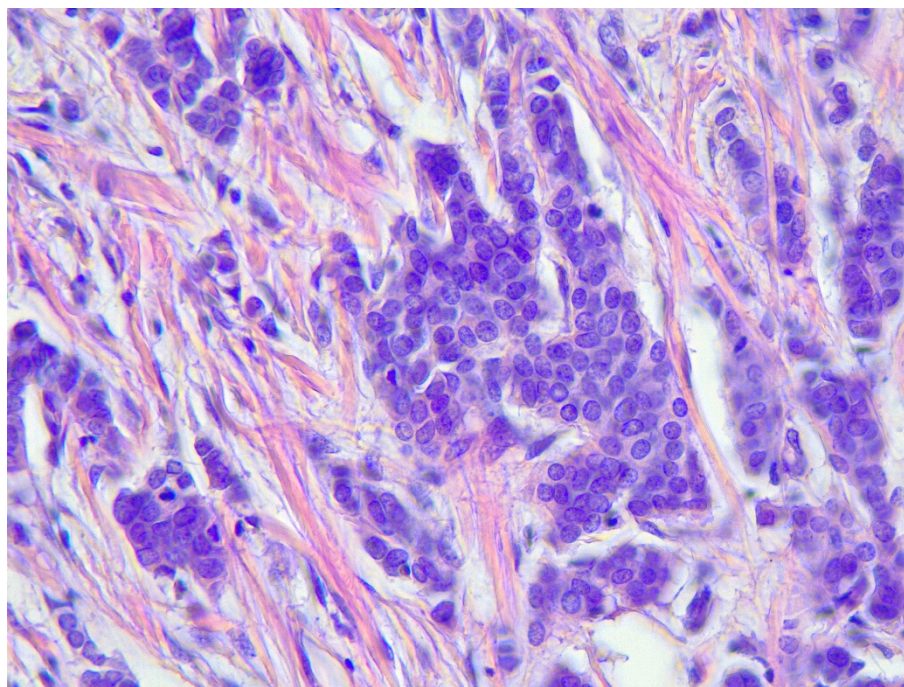


Рисунок 9 – Наличие феномена краудинга в структурах инфильтративного компонента инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа.

Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 630$

В каждом случае вокруг структур инфильтративного компонента инвазивной карциномы неспецифического типа определялось наличие феномена ретракции, который морфологически представляет собой участок просветления (артифициальное пространство) между опухолевыми структурами и окружающей стромой новообразования (рисунок 10). Выраженность ретракции оценивали по 3-балльной системе полуколичественным методом: 1 балл (слабо выраженная ретракция) – случаи, в которых ретракция определялась вокруг менее чем 30 % структур инфильтративного компонента новообразования, 2 балла (умеренно выраженная ретракция) – вокруг 30–70 % структур, 3 балла (резко выраженная ретракция) – описываемый паттерн присутствовал вокруг более чем 70 % от объема инфильтративного компонента.

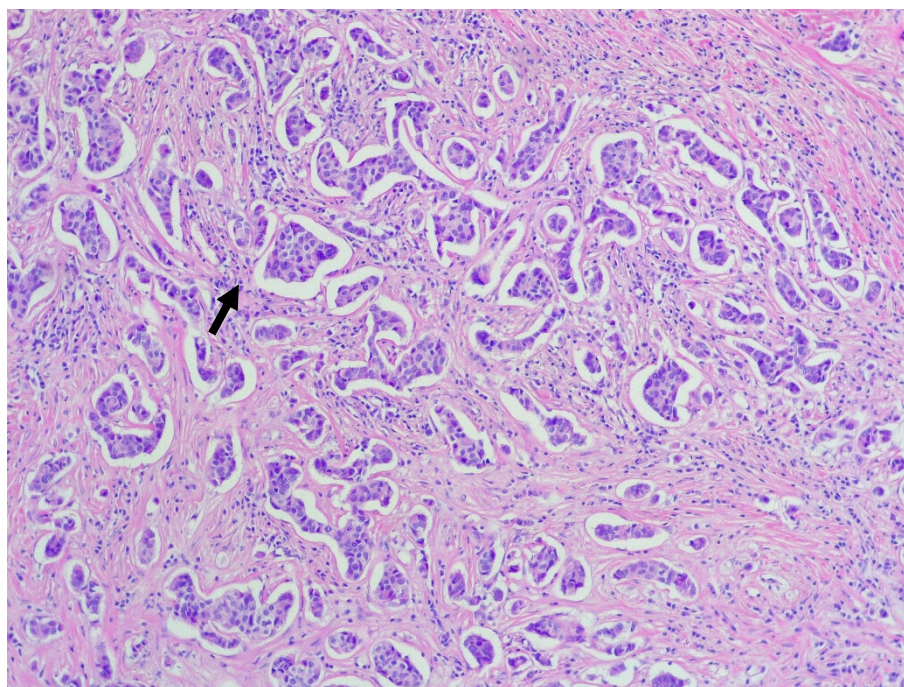


Рисунок 10 – Наличие феномена ретракции вокруг структур инфильтративного компонента инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа (3 балла). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$

В каждом случае гистологическому исследованию подвергались все удаленные аксиллярные лимфатические узлы. Подсчитывалось общее количество

лимфатических коллекторов и число узлов, пораженных метастазами.

Иммуногистохимическое исследование образцов тканей проводилось с помощью автоматизированной системы для иммуногистохимического окрашивания и *in situ* гибридизации Bond™- maX (Leica).

На первом этапе проводилась оценка рецепторного (экспрессия рецепторов к эстрогенам и к прогестерону), Her2/neu статуса и пролиферативной активности (экспрессия Ki67). Применялись антитела фирмы Dako к рецепторам эстрогена (клон 1D5, RTU, мышинные), к рецепторам прогестерона (клон PgR636, RTU, мышинные), к онкопротеину c-erbB-2 (Her2/neu статус) (рабочее разведение 1 : 500, кроличьи), к Ki67 (клон MIB-1, RTU, мышинные).

Оценка экспрессии рецепторов к половым гормонам проводилась количественным методом гисто-счета (Histo-Score). В каждом случае подсчитывался процент позитивных клеток и показатель экспрессии в баллах (Andersen J. et al., 1988). Гормон-позитивными считались опухоли, имеющие 1 % и более позитивно окрашенных клеток (рисунки 11 и 12).

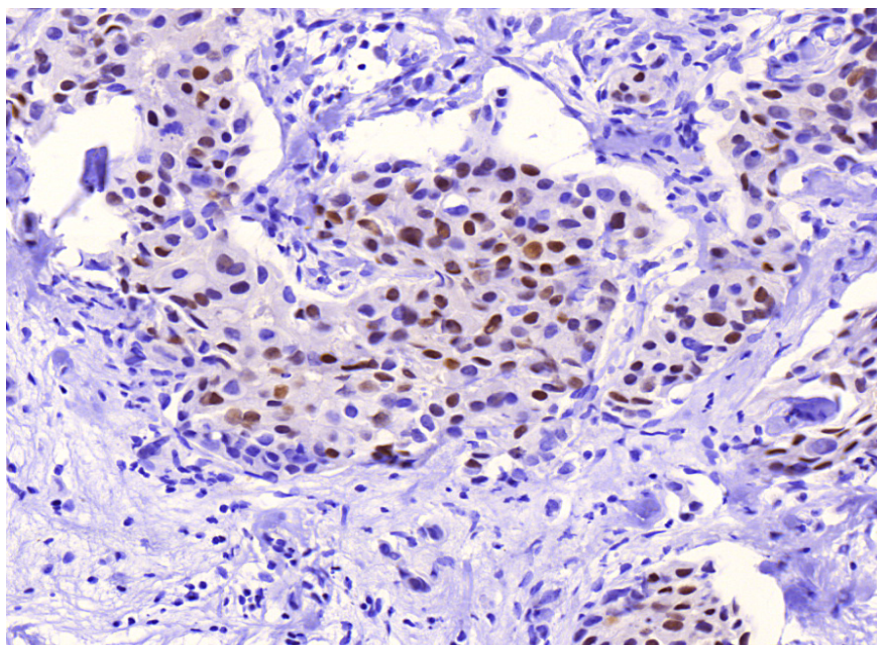


Рисунок 11 – Позитивная ядерная экспрессия рецепторов к эстрогенам в структурах инфильтративного компонента инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа. Увеличение $\times 400$

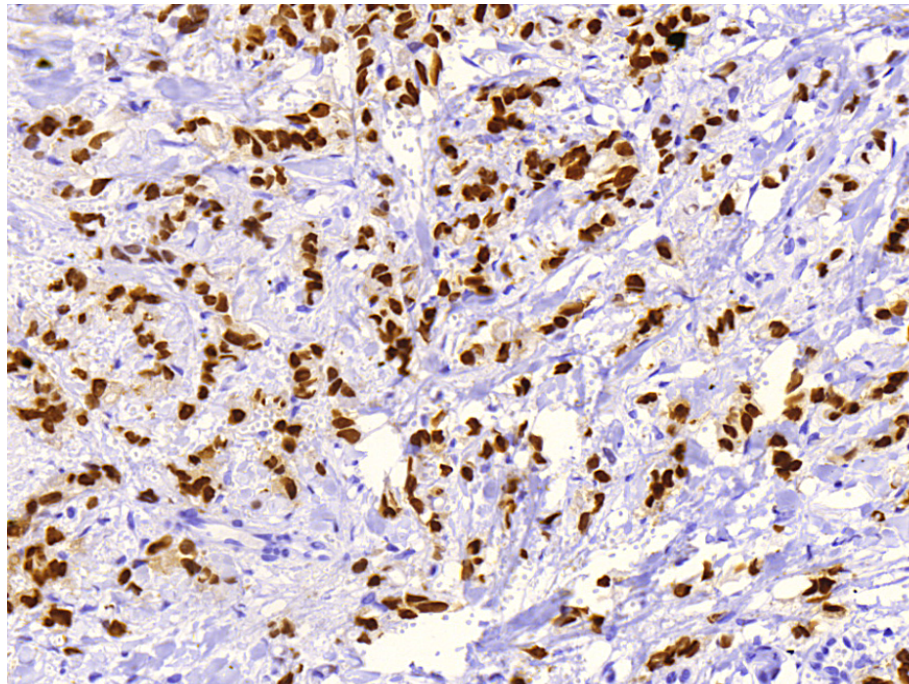


Рисунок 12 – Позитивная ядерная экспрессия рецепторов к прогестерону в инвазивной карциноме молочной железы неспецифического типа.

Увеличение $\times 400$

Her2/neu негативными считались случаи с отсутствием окрашивания или слабым прерывистым мембранным окрашиванием. К Her2/neu позитивным относили случаи с интенсивным (3+) непрерывным мембранным окрашиванием более чем в 10 % опухолевых клеток. Случаи с умеренным (2+) непрерывным мембранным окрашиванием более чем в 10 % клеток или интенсивным непрерывным мембранным окрашиванием менее чем в 10 % клеток, направлялись на исследование на наличие амплификации гена методом FISH.

Индекс пролиферативной активности опухоли оценивался по экспрессии Ki67 в процентном содержании позитивно окрашенных клеток структур инвазивного компонента первичной опухоли (в 10 полях зрения на 1 000 клеток при увеличении $\times 400$) (рисунок 13).

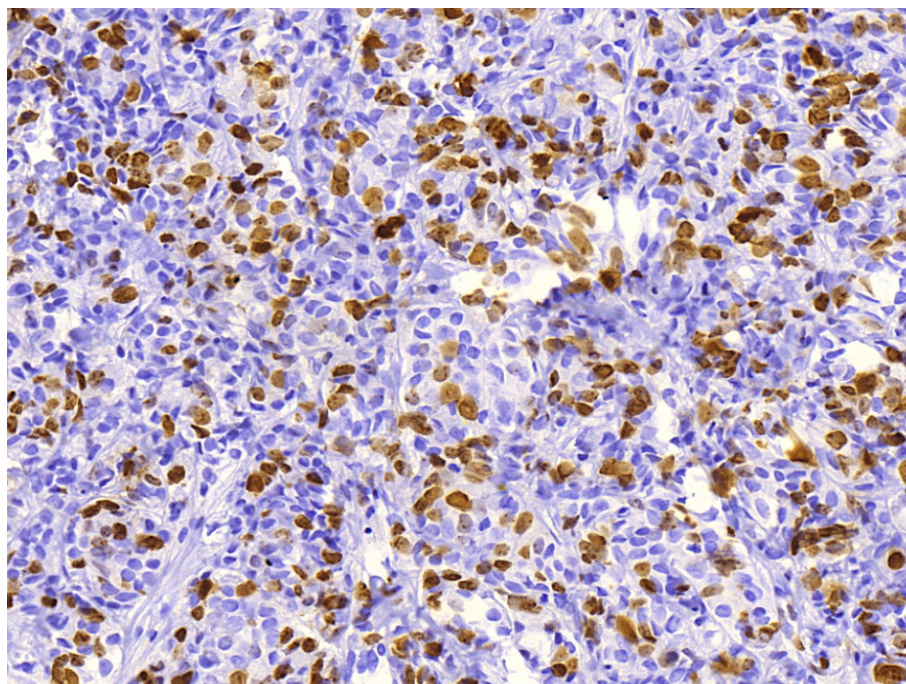


Рисунок 13 – Позитивное ядерное окрашивание с антителом к Ki67 в клетках инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа.

Увеличение $\times 400$

На основании сочетания экспрессии рецепторов к эстрогенам, прогестерону, Her2/neu статуса и Ki67 определяли 3 молекулярно-генетических подтипа опухоли РМЖ: люминальный А (позитивная экспрессия рецепторов к эстрогенам и/или к прогестерону, негативный Her2/neu статус, экспрессия Ki67 $< 20\%$), люминальный В/HER2-негативный (позитивная экспрессия рецепторов к эстрогенам и/или к прогестерону, негативный Her2/neu статус, экспрессия Ki67 $\geq 20\%$) и люминальный В/HER2-позитивный (позитивная экспрессия рецепторов к эстрогенам и/или к прогестерону, позитивный Her2/neu статус при любом уровне Ki67).

На следующем этапе по операционному материалу с помощью иммуногистохимического метода проводили исследование экспрессии транскрипционных факторов в ткани опухоли. С этой целью применяли следующие антитела: Anti-human transcription factor GATA3 Antibody (GATA3) (rabbit polyclonal; 1 : 20; Flarebio), Anti-human FOXA1 Antibody (rabbit polyclonal;

1 : 100; Flarebio), ELF5 Antibody (rabbit polyclonal; 1 : 150; Flarebio). Демаскировку тканевых образцов проводили в соответствии с рекомендациями производителя антител.

В каждом исследуемом случае экспрессия указанных факторов транскрипции в структурах инфильтративного компонента первичной опухоли инвазивной карциномы неспецифического типа молочной железы оценивалась по следующим параметрам: отсутствие или наличие экспрессии (1 – негативная экспрессия, 2 – позитивная экспрессия); наличие гетерогенности экспрессии маркера (1 – гомогенный характер экспрессии, 2 – гетерогенный характер экспрессии); интенсивность экспрессии (1 балл – слабо выражена, 2 балла – умеренно выражена, 3 балла – резко выражена); процент опухолевых клеток с позитивной экспрессией маркера (в 10 полях зрения на 1 000 клеток при увеличении $\times 400$).

Результаты и различные варианты иммунного окрашивания с антителами к факторам транскрипции GATA3, FOXA1 и ELF в карциномах молочной железы представлены на рисунках 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20.

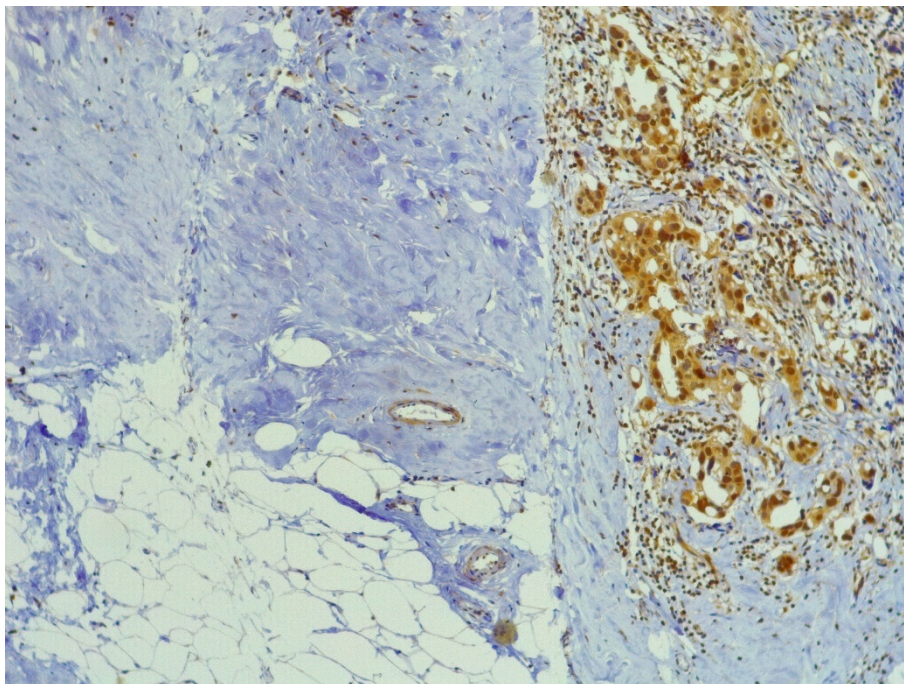


Рисунок 14 – Позитивная экспрессия фактора ELF5 (ядерная) в опухолевых клетках инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа.

Увеличение $\times 200$

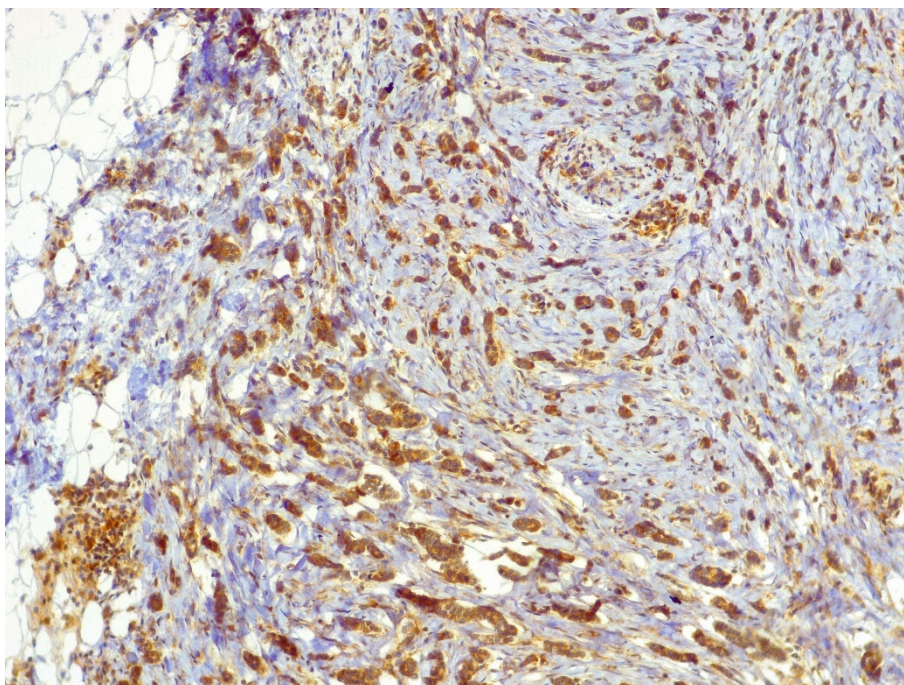


Рисунок 15 – Позитивная экспрессия фактора ELF5 (ядерная) в опухолевых клетках инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа.

Увеличение $\times 200$

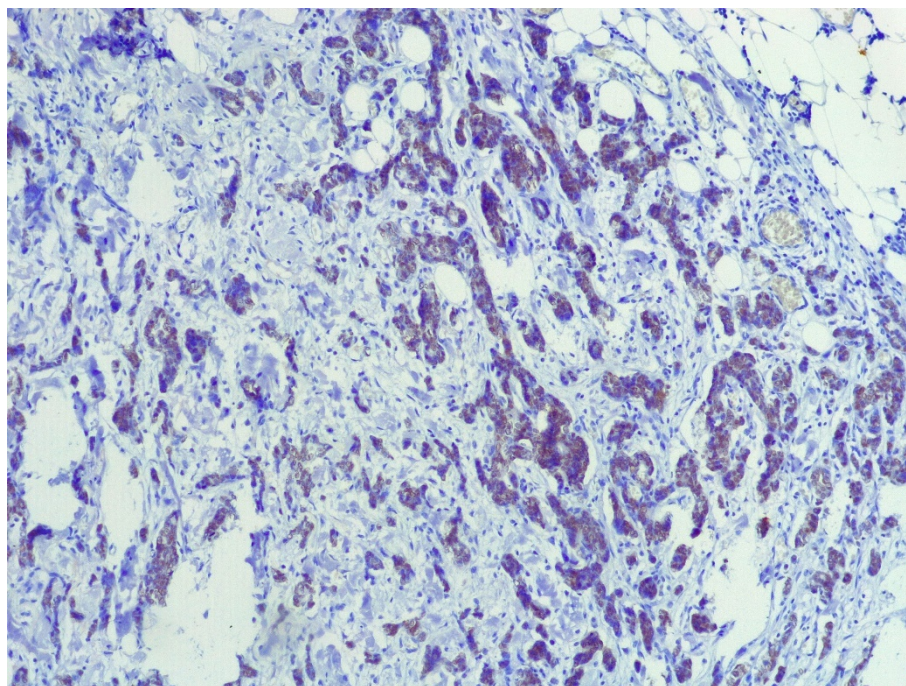


Рисунок 16 – Позитивная слабо интенсивная экспрессия фактора FOXA1 (ядерная) в опухолевых клетках инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа. Увеличение $\times 200$

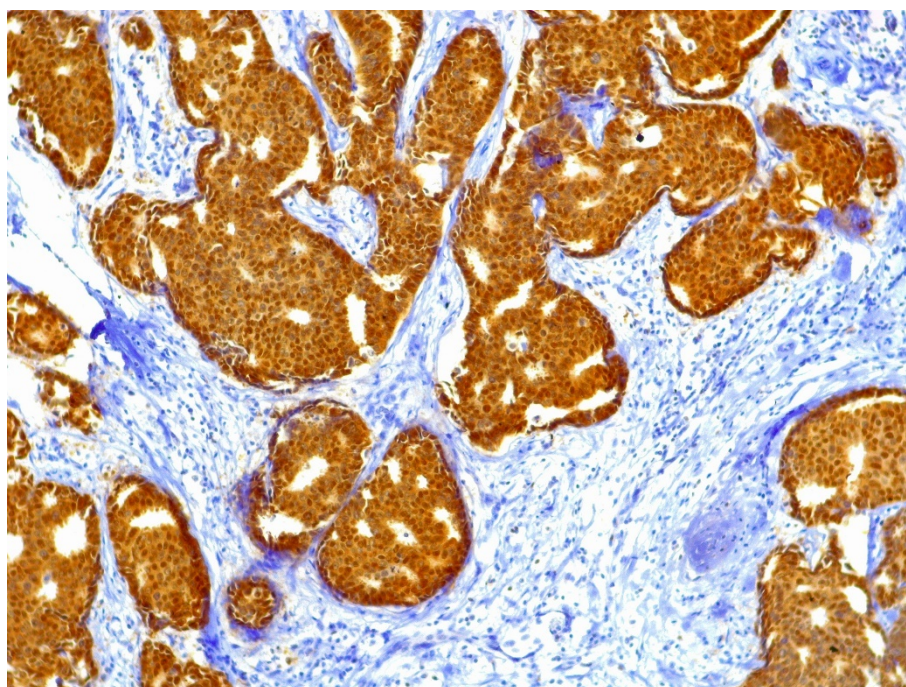


Рисунок 17 – Позитивная резко выраженная гомогенная экспрессия фактора GATA3 (ядерная) в опухолевых клетках инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа и фокусах DCIS. Увеличение $\times 200$

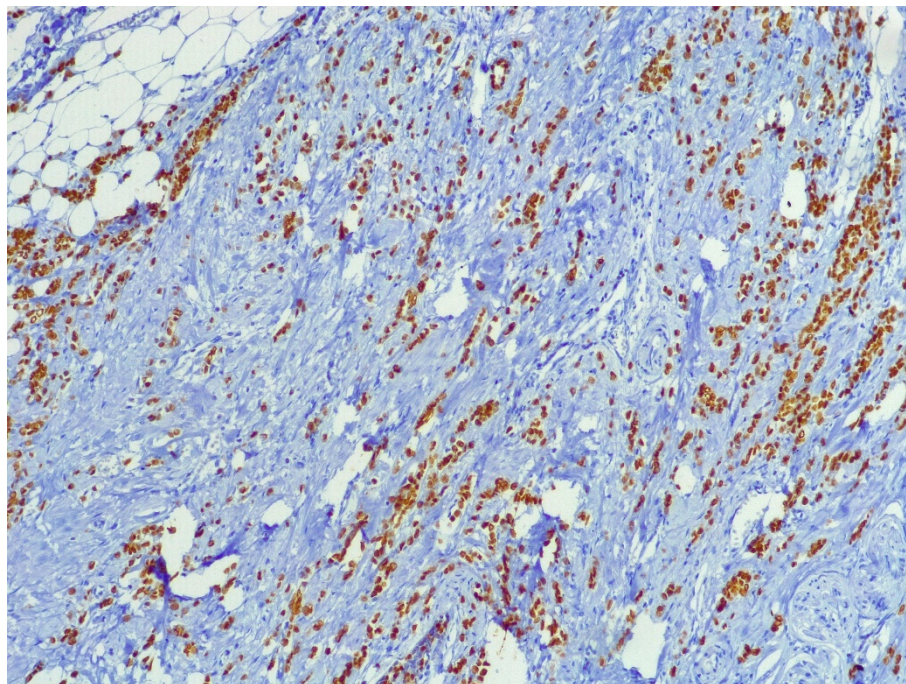


Рисунок 18 – Позитивная гомогенная экспрессия фактора GATA3 (ядерная) в опухолевых клетках инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа. Увеличение $\times 100$

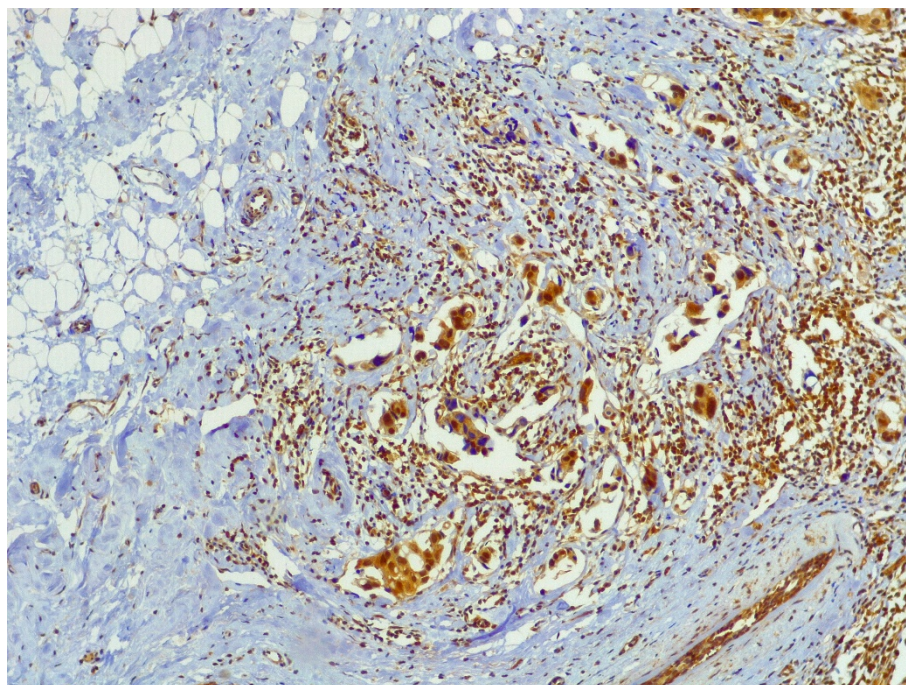


Рисунок 19 – Позитивная гетерогенная экспрессия фактора ELF5 (ядерная) в опухолевых клетках инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа. Увеличение $\times 100$

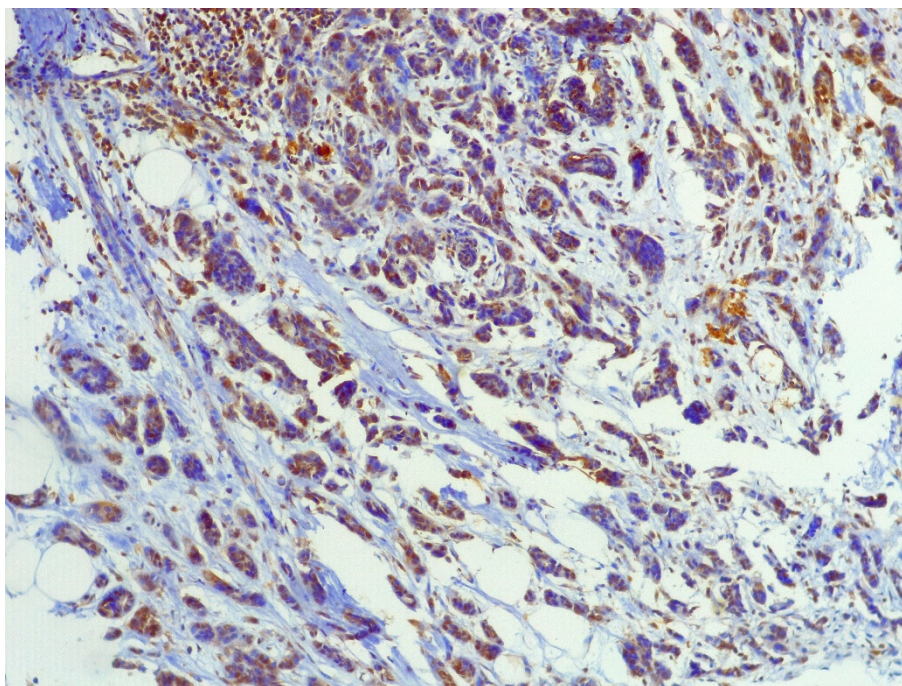


Рисунок 20 – Позитивная гетерогенная экспрессия фактора ELF5 (ядерная) в опухолевых клетках инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа. Увеличение $\times 100$

Морфологическое исследование проводилось с помощью светового микроскопа фирмы «AxioscopeA1» (Carl Zeiss). Фотографирование гистологических и иммуногистохимически окрашенных микропрепаратов выполняли с использованием цифровой камеры Axio Cam ICc5 с программой компьютерного анализа изображений AxioVision 4.6.3 (Carl Zeiss).

Статистическая обработка полученных данных выполнялась с использованием пакета программ «Statistica10.0». При проведении анализа применялся дисперсионный анализ, непараметрический критерий χ^2 , методы описательной статистики. Проверку нормальности распределения показателей осуществляли с помощью критерия Шапиро – Вилка. Для сравнения независимых выборок использовали критерий Манна – Уитни. Результаты отражали в виде медианы (Me), первого (Q1) и третьего (Q3) квартилей. Проверку равенства медиан нескольких выборок проводили с помощью критерия Краскела – Уоллиса. Оценку номинальных и ранговых переменных проводили с использованием

корреляционного анализа по Спирмену. Для построения математической модели с целью прогнозирования развития гематогенных метастазов использовали метод логистической регрессии. Обсуждались результаты с достоверностью различий при $p < 0,05$ и с тенденцией к различиям при $p \leq 0,1$.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Анализ экспрессии транскрипционных факторов GATA3, FOXA1, ELF5 и клинико-морфологических характеристик рака молочной железы

Экспрессия транскрипционных белков (GATA3, FOXA1 и ELF5) в карциноме молочной железы была исследована у 101 больной раком молочной железы.

На первом этапе исследования нами был проведен анализ экспрессии транскрипционных факторов в зависимости от основных клинических и морфологических параметров заболевания, таких как: возраст больных, менструальный статус, размер первичного опухолевого очага, характер роста новообразования и вариант люминального подтипа опухоли.

Каких-либо существенных корреляций между экспрессией транскрипционных факторов GATA3, FOXA1 и ELF5 и возрастом больных нами обнаружено не было (соответственно $r = 0,12$; $p = 0,22$; $r = 0,11$; $p = 0,24$; $-r = 0,006$; $p = 0,94$).

Частота положительной экспрессии в опухоли исследуемых факторов также не отличалась существенно в зависимости от состояния менструальной функции больных (GATA3 – $\chi^2 = 0,35$, $p = 0,8$; FOXA1 – $\chi^2 = 0,36$, $p = 0,8$; ELF5 – $\chi^2 = 0,5$, $p = 0,47$).

В случаях с наличием экспрессии факторов процент позитивно окрашенных опухолевых клеток, изученных транскрипционных факторов также не имел различий в группах больных, имеющих различный менструальный статус на момент постановки диагноза РМЖ.

Таблица 5 – Процент экспрессии GATA3, FOXA1 и ELF5 в клетках первичной опухоли в зависимости от состояния менструальной функции у больных люминальным подтипом РМЖ

Менструальная функция	Процент экспрессии в опухолевых клетках		
	M ± SD		
	GATA3	FOXA1	ELF5
Сохранена	98,34 ± 4,4 (n = 30)	82,37 ± 27,18 (n = 30)	93,7 ± 15,15 (n = 28)
Менопауза	95,38 ± 12 (n = 65)	87,31 ± 21,4 (n = 61)	92,5 ± 16,46 (n = 61)
Достоверность различий	F = 1,48; p = 0,22	F = 0,87; p = 0,32	F = 0,098; p = 0,75

Размер опухолевого узла является крайне важным фактором прогноза болезни при РМЖ. В связи с чем представляло интерес изучить связь данного клинико-морфологического параметра и экспрессии транскрипционных факторов в опухолевых клетках, а также оценить влияние характера распределения позитивного окрашивания в гистологическом срезе опухоли. Было показано, что размер первичного опухолевого узла существенно не отличался в зависимости от частоты и характера экспрессии GATA3 (соответственно $\chi^2 = 0,22$, $p = 0,89$ и $\chi^2 = 2,5$, $p = 2,7$). Аналогичные данные были получены в отношении частоты и характера экспрессии ELF5 (соответственно $\chi^2 = 4,5$, $p = 0,2$ и $\chi^2 = 2,1$, $p = 0,34$). Не обнаружено также какой-либо значимой корреляции между размером новообразования и выраженностью экспрессии GATA3 (соответственно $r = 0,02$; $p = 0,8$).

Однако при анализе экспрессии FOXA1 отмечена достоверная связь между размером первичной опухоли и характером экспрессии транскрипционного фактора FOXA1 в клетках (таблица 6).

Таблица 6 – Распределение больных РМЖ в зависимости от размера первичной опухоли и характера экспрессии FOXA1 клетками

Размер первичного опухолевого узла	Характер распределения позитивных опухолевых клеток с экспрессией FOXA1	
	гомогенный (n = 54)	гетерогенный (n = 37)
До 2 см	33 (61,1 %)	16 (43,3 %)
2–5 см	19 (35,2 %)	21 (56,7 %) $p_{1-2} = 0,022$
Более 5 см	2 (3,7 %)	0

Как видно из данных таблицы при гетерогенном характере распределения FOXA1 в опухоли достоверно чаще пациенты имели размер новообразования в диапазоне 2–5 см, в то время как при гомогенном распределении данного фактора чаще наблюдались случаи с размером опухоли до 2 см.

Также было обнаружено, что размеры образования статистически отличаются в зависимости от наличия или отсутствия экспрессии в опухоли транскрипционного фактора ELF5 ($U = 2,35$; $p = 0,017$, таблица 7).

Таблица 7 – Размер первичной опухоли в зависимости от наличия экспрессии опухолевыми клетками ELF5 у больных РМЖ

Экспрессия ELF5 в клетках опухоли	Размер первичной опухоли (см) (Me Q1 ÷ Q3)
Отсутствует (n = 12)	2,45 (1,75 ÷ 2,55)
Позитивная (n = 89)	1,86 (1,5 ÷ 2,1)

Как видно из данных таблицы при отсутствии иммунного окрашивания в опухоли клеток с антителом к ELF5 средний размер опухоли значительно выше, чем в группе больных, когда экспрессия данного фактора была позитивной. Данная зависимость также подтверждалась наличием корреляции между изученными параметрами ($r = -0,23$; $p = 0,016$).

Проведенный нами анализ сравнения количественной выраженности экспрессии транскрипционных факторов в зависимости от размера опухолевого узла показал статистические отличия в отношении экспрессии FOXA1 (таблица 8).

Таблица 8 – Показатели экспрессии транскрипционных факторов в зависимости от размера первичного опухолевого узла у больных люминальным раком молочной железы

Размер первичного опухолевого узла	Процент экспрессии в опухолевых клетках M ± SD		
	GATA3	FOXA1	ELF5
До 2 см	96,18 ± 10,2 (n = 49)	88,08 ± 13,4 (n = 49)	95,04 ± 12,6 (n = 49)
2–5 см	96,44 ± 12,2 (n = 43)	82,94 ± 11,4 (n = 40)	90,6 ± 9,3 (n = 38)
Более 5 см	96,5 ± 5,7 (n = 5)	41,5 ± 14,2 (n = 2)	86,5 ± 11,2 (n = 2)
Достоверность различий	F = 00,7; p = 0,99	F = 4,0; p = 0,02	F = 1,07; p = 0,34

Как представлено в таблице, средние величины процента позитивно окрашенных клеток в зависимости от размера новообразования имеют статистические отличия только в отношении фактора транскрипции FOXA1. При больших размерах новообразования отмечается снижение процента позитивно окрашенных опухолевых клеток. Различий в проценте экспрессии опухолевыми клетками при разных размерах опухолевого очага ELF5 и GATA3 обнаружено не было.

Нами была проведена оценка экспрессии изучаемых факторов транскрипции в зависимости от характера роста опухоли (уницентрический или мультицентрический). Множественный характер роста был отмечен у 19 пациенток (18,8 %), в остальных 82 (81,8 %) наблюдениях рост новообразования был представлен в виде одиночного опухолевого очага. Анализ

процента экспрессии изученных транскрипционных факторов не выявил значимых отличий в группах больных с уни – и мультицентрическим характера роста (GATA3 – $U = -0,76$; $p = 0,44$, FOXA1 – $U = 1,33$; $p = 0,18$ и ELF5 – $U = 0,02$; $p = 0,97$).

Оценка процента экспрессии изученных транскрипционных факторов не выявила каких-либо существенных различий в зависимости от варианта люминального типа РМЖ (таблица 9).

Таблица 9 – Процент экспрессии транскрипционных факторов в зависимости от молекулярного подтипа опухоли у больных инвазивным РМЖ

Молекулярный подтип опухоли	Процент экспрессии в опухолевых клетках $M \pm SD$		
	GATA3	FOXA1	ELF5
Люминальный А	$95,5 \pm 10,9$ (n = 47)	$84,64 \pm 13,6$ (n = 44)	$91,5 \pm 19,9$ (n = 44)
Люминальный В (HER2-негативный)	$95,7 \pm 14,1$ (n = 29)	$86,17 \pm 12,5$ (n = 26)	$94,6 \pm 10,8$ (n = 29)
Люминальный В (HER2-позитивный)	$98,4 \pm 3,15$ (n = 19)	$87,25 \pm 20,7$ (n = 21)	$93,6 \pm 15,4$ (n = 16)
Достоверность различий	$F = 0,67$; $p = 0,51$	$F = 0,9$; $p = 0,92$	$F = 0,34$; $p = 0,7$

Как видно из данных таблицы, проценты позитивно окрашенных опухолевых клеток, экспрессирующих GATA3, FOXA1, ELF5 не отличались в зависимости от варианта люминального подтипа новообразования. Однако размер новообразования имел статистические отличия при разных вариантах люминального подтипа РМЖ.

Таблица 10 – Размер первичной опухоли при разных вариантах люминального РМЖ

Молекулярный подтип опухоли		Размер первичной опухоли (см) (Me Q1 ÷ Q3)
1	Люминальный А (n = 49)	1,83 (1,5 ÷ 2,3)
2	Люминальный В/HER2-негативный (n = 30)	1,92 (1,5 ÷ 2,0)
3	Люминальный В/HER2-позитивный (n = 22)	2,18 (1,5 ÷ 2,5) p ₁₋₃ = 0,045 p ₂₋₃ = 0,17

Как видно из данных таблицы, отмечается различие в размере у новообразования при люминальном В (HER2-позитивном), по сравнению с люминальным подтипом А.

В исследованной группе больных был проведен анализ сочетания различных вариантов экспрессии изучаемых транскрипционных факторов (таблица 11).

Таблица 11 – Распределение больных люминальным подтипом рака молочной железы в зависимости от сочетания экспрессии транскрипционных факторов в первичной опухоли

Вариант сочетания экспрессии транскрипционных факторов	Количество больных (а.ч. %)	
GATA3+FOXA1+ELF5+	79	78,22 %
GATA3+FOXA1+ELF5–	8	7,92 %
GATA3+FOXA1–ELF5–	3	2,97 %
GATA3–FOXA1+ELF5 +	4	3,96 %
GATA3+FOXA1–ELF5+	5	4,95 %
GATA3–FOXA1–ELF5+	1	0,99 %
GATA3–FOXA1–ELF5–	1	0,99 %
Всего	101	100 %

Как видно из данных, представленных в таблице, наиболее часто

встречающимся является фенотип опухоли, при котором отмечалась положительная экспрессия всех трех изученных факторов транскрипции – GATA3+FOXA1+ELF5+, что составило более 78 % пациенток. В 17 случаях отмечалась позитивная экспрессия каких-либо двух факторов, что составляет 16,83 %. Остальные варианты сочетания были представлены единичными наблюдениями. Распределение пациентов без учета вышеописанного варианта сочетания экспрессии транскрипционных факторов представлено в таблице 12.

Таблица 12 – Распределение больных люминальным раком молочной железы в зависимости от количества транскрипционных факторов экспрессируемых в первичной опухоли

Количество экспрессируемых транскрипционных факторов в опухоли	Количество больных (а.ч. %)	
Три фактора	79	78,22 %
Два фактора	17	16,83 %
Один фактор	5	4,95 %
Всего	101	100

Был проведен анализ размера новообразования в зависимости от количества факторов транскрипции, экспрессируемых клетками опухоли. Оказалось, что наибольший размер опухолевого очага наблюдался в тех случаях, когда отмечалась экспрессия только одного из исследуемых транскрипционных факторов (таблица 13).

Таблица 13 – Зависимость размера первичной опухоли от количества факторов транскрипции, экспрессируемых в опухоли

Количество экспрессируемых транскрипционных факторов в опухоли	Размер первичной опухоли (см) (Me Q1 ÷ Q3)
Три фактора (n = 79)	1,86 (1,5 ÷ 2,1)
Два фактора (n = 17)	1,95 (1,5 ÷ 2,55)
Один фактор (n = 5)	2,9 (2,5 ÷ 3)
Всего (n = 101)	p = 0,03

Таким образом, проведенное исследование частоты, характера и выраженности экспрессии транскрипционных факторов позволило установить зависимости с рядом клинико-морфологических характеристик РМЖ. Так, было показано, что имеются достоверные статические связи с важным клиническим параметром как размером первичной опухоли. Наибольший размер первичной опухоли сопряжен с отсутствием экспрессии ELF5, гетерогенным распределением клеток с позитивной экспрессией FOXA1. Анализ сочетания различных фенотипов экспрессии, изученных транскрипционных факторов показал, что наиболее часто встречается фенотип (GATA3+FOXA1+ELF5+). Обнаружено, что снижение числа экспрессируемых факторов опухолевыми клетками было сопряжено с большим размером новообразования.

Частота и характер экспрессии исследованных факторов транскрипции не сопряжены существенно с возрастом пациенток, состоянием менструальной функции, характером роста опухоли и значимо не отличаются в зависимости от варианта люминального молекулярного подтипа новообразования.

3.2 Анализ экспрессии транскрипционных факторов при раке молочной железы в зависимости от морфологических характеристик

Степень гистологической злокачественности опухоли (grade) является интегральным морфологическим параметром, отражающим на светооптическом уровне глубину дедифференцировки опухолевых клеток. В связи с чем был

проведен анализ экспрессии изучаемых факторов транскрипции в зависимости от данного признака (таблица 14).

Таблица 14 – Процент экспрессии GATA3, FOXA1, ELF5 в зависимости от степени гистологической злокачественности опухоли у больных люминальным РМЖ

Степень гистологической злокачественности	Процент экспрессии в опухолевых клетках (Me Q1 ÷ Q3)		
	GATA3	FOXA1	ELF5
Grade 1	96,6 (95 ÷ 100) (n = 15)	89,7 (90 ÷ 100) (n = 17)	95,4 (42 ÷ 100) (n = 17)
Grade 2	97,1 (96 ÷ 100) (n = 77)	85,2 (81 ÷ 100) (n = 72)	92,6 (20 ÷ 100) (n = 68)
Grade 3	74,7 (24 ÷ 100) (n = 3)	66,1 (52,3 ÷ 80) (n = 2)	87,5 (70 ÷ 100) (n = 4)
Достоверность различий	p = 0,51	p = 0,34	p = 0,39

Как представлено в данных таблицы, отсутствуют статистические различия в проценте клеток, имеющих положительное иммунное окрашивание к транскрипционным факторам. Однако отмечается некоторая направленность к снижению процента экспрессии по всем трем факторам при нарастании степени злокачественности опухоли. Отсутствие статистических различий может быть обусловлено малым числом наблюдений, при которых опухоль имеет grade 3.

Однако было показано, что имеются отличия в частоте позитивной экспрессии транскрипционного фактора FOXA1 (таблица 15).

Таблица 15 – Зависимость наличия экспрессии FOXA1 от степени гистологической злокачественности опухоли у больных люминальным РМЖ

Степень гистологической злокачественности	Наличие экспрессии FOXA1 (а.ч. %)	
	нет	есть
Grade 1 (n = 17)	0	17 (100 %)
Grade 2 (n = 80)	8 (10 %)	72 (90 %)
Grade 3 (n = 4)	2 (50 %)	2 (50 %)
$\chi^2 = 9,07$ p = 0,01		

Как видно из данных таблицы, при нарастании степени злокачественности опухоли увеличивается число случаев с отрицательной экспрессией фактора FOXA1. Следует подчеркнуть, что при первой степени злокачественности опухолей с негативной экспрессией FOXA1 не выявлено.

Подобных отличий в отношении частоты экспрессии GATA3, ELF5 и степени злокачественности карциномы не обнаружено (соответственно: $\chi^2 = 4,3$, p = 0,12; $\chi^2 = 3,5$, p = 0,16).

Проведенное исследование частоты количества экспрессируемых транскрипционных факторов опухолевыми клетками в зависимости от степени злокачественности опухоли не показало статистических отличий (таблица 16).

Таблица 16 – Частота количества экспрессируемых факторов транскрипции в зависимости от степени гистологической злокачественности опухоли у больных люминальным молекулярным подтипом РМЖ

Степень гистологической злокачественности	Количество экспрессируемых транскрипционных факторов в опухоли (а.ч. %)		
	три	два	один
Grade 1(n = 17)	15 (88,2 %)	2 (11,8 %)	0
Grade 2(n = 80)	62 (77,5 %)	14 (17,5 %)	4 (5 %)
Grade 3(n = 4)	2 (50 %)	1 (25 %)	1 (25 %)
$\chi^2 = 5,1$ p = 0,27			

Нами был проведен анализ изучаемых факторов транскрипции в зависимости от соотношения стромального и паренхиматозного компонента в опухоли.

Таблица 17 – Процент экспрессии GATA3, FOXA1, ELF5 от степени выраженности стромального компонента в опухоли при люминальном РМЖ

Степень выраженности опухолевой стромы	Процент экспрессии в опухолевых клетках (Me Q1 ÷ Q3)		
	GATA3	FOXA1	ELF5
Слабая	92,8 (97 ÷ 100) (n = 31)	83,2 (70 ÷ 100) (n = 30)	96,6(100 ÷ 100) (n = 30)
Умеренная	98,7 (96 ÷ 100) (n = 41)	84,8 (77 ÷ 100) (n = 41)	92,2 (98 ÷ 100) (n = 37)
Выраженная	97,8 (98 ÷ 100) (n = 23)	90,9 (89,5 ÷ 100) (n = 20)	89,1 (89 ÷ 100) (n = 22)
Достоверность различий	p = 0,13	p = 0,6	p = 0,23

Таблица 18 – Процент экспрессии GATA3, FOXA1 и ELF5 от степени выраженности инфильтрации иммунными клетками в опухоли

Степень выраженности инфильтрации иммунными клетками	Процент экспрессии в опухолевых клетках (Me Q1 ÷ Q3)		
	GATA3	FOXA1	ELF5
Слабая	93,9 (98 ÷ 100) (n = 35)	80,9 (65 ÷ 100) (n = 33)	93,1 (100 ÷ 100) (n = 31)
Умеренная	97,6 (98 ÷ 100) (n = 39)	87 (81 ÷ 100) (n = 40)	94,3 (100 ÷ 100) (n = 38)
Выраженная	97,9 (100 ÷ 100) (n = 21)	91,3 (96 ÷ 100) (n = 18)	89,9 (86 ÷ 100) (n = 20)
Достоверность различий	p = 0,74	p = 0,33	p = 0,7

Как видно из данных таблиц 17 и 18 проценты экспрессии изученных транскрипционных факторов существенно не отличаются от соотношения стромального и паренхиматозного компонента опухоли. Также не было показано

отличий в данных показателях в зависимости от степени выраженности инфильтрации иммунными клетками стромы первичного новообразования.

Однако было обнаружено, что частота экспрессии FOXA1 отличается в зависимости от степени инфильтрации иммунными клетками стромы первичной опухоли. В случаях, когда в опухоли наблюдалась выраженная инфильтрация иммунными клетками, чаще отсутствовала экспрессия данного фактора транскрипции (таблица 19). В отношении факторов GATA3 и ELF5 подобных различий не выявлено (соответственно: $\chi^2 = 4,1$, $p = 0,13$ и $\chi^2 = 0,6$, $p = 0,65$).

Таблица 19 – Частота экспрессии FOXA1 в зависимости от степени выраженности инфильтрации иммунным клетками в опухоли при люминальном молекулярном подтипе РМЖ

Степень выраженности инфильтрации иммунными клетками	Экспрессия FOXA1 в опухоли (а.ч. %)	
	позитивная	негативная
Слабая (n = 35)	33 (94,3 %)	2 (5,7 %)
Умеренная (n = 42)	40 (95,2 %)	2 (4,8 %)
Выраженная (n = 24)	18 (75 %)	6 (25 %)
$\chi^2 = 8,4$, $p = 0,01$		

Следующим этапом нами был проведен анализ экспрессионных параметров факторов транскрипции в зависимости от наличия «феномена ретракции» и «феномена краудинга» в опухоли. Известно, что два этих феномена участвуют в механизмах эпителиально-мезенхимального перехода и поэтому были проанализированы с экспрессией транскрипционных факторов.

Было показано, что характер распределения GATA3 коррелировал с наличием феномена ретракции вокруг опухолевых структур (таблица 20).

Таблица 20 – Взаимосвязь характера экспрессии GATA3 от феномена ретракции у больных люминальным раком молочной железы

Феномен ретракции стромы	Характер экспрессии GATA3 (а.ч. %)	
	гомогенный	гетерогенный
Отсутствует (n = 28)	24 (86 %)	4 (14 %)
Присутствует (n = 67)	42 (63 %)	25 (27 %)
$\chi^2 = 4,9, p = 0,02$		

Как показано в таблице, при гетерогенном характере экспрессии GATA3 в опухолевых клетках, в новообразовании определялся феномен ретракции стромы.

При оценке наличия феномена ретракции и экспрессии FOXA1 и ELF5, статистически значимых изменений не обнаружено (таблицы 21 и 22).

Таблица 21 – Взаимосвязь характера экспрессии FOXA1 от феномена ретракции у больных инвазивным раком молочной железы

Феномен ретракции	Характер экспрессии (а.ч. %)	
	гомогенный	гетерогенный
Отсутствует (n = 28)	20 (71 %)	8 (29 %)
Присутствует (n = 63)	34 (54 %)	29 (46 %)
$\chi^2 = 2,4, p = 0,1$		

Характер экспрессии FOXA1 у пациенток с карциномой молочной железы не был связан с феноменом ретракции, а показатели были распределены относительно равномерно.

Таблица 22 – Взаимосвязь характера экспрессии ELF5 от феномена ретракции у больных инвазивным раком молочной железы

Феномен ретракции	Характер экспрессии ELF5 в опухоли (а.ч. %)	
	гомогенный	гетерогенный
Отсутствует (n = 28)	21 (75 %)	7 (15 %)
Присутствует (n = 61)	46 (75 %)	15 (15 %)
$\chi^2 = 0,001, p = 0,96$		

Из приведенных в таблице данных видно, что нет достоверных различий в частоте характера экспрессии ELF5 опухолевыми клетками в зависимости от феномена ретракции.

Было обнаружено, что наличие феномена краудинга опухолевых клеток было сопряжено с характером распределения позитивно окрашенных опухолевых клеток к фактору ELF5 (таблица 23).

Таблица 23 – Взаимосвязь характера экспрессии ELF5 от феномена краудинга в опухоли у больных инвазивным раком молочной железы

Наличие феномена краудинга	Характер экспрессии ELF5 в опухоли (а.ч. %)	
	гомогенный (n = 67)	гетерогенный (n = 22)
Отсутствует	7 (10,4 %)	6 (27 %)
Присутствует	60 (89,6 %)	16 (63 %)
$\chi^2 = 4,6, p = 0,03$		

Как видно из данных таблицы, при гетерогенном характере распределения позитивно окрашенных опухолевых клеток к фактору ELF5 чаще отсутствует феномен краудинга в опухоли. При аналогичном анализе в отношении факторов FOXA1 и GATA3 различий показано не было (FOXA1 – $\chi^2 = 0,23, p = 0,62$; GATA3 – $\chi^2 = 0,15, p = 0,69$).

При анализе процента позитивно окрашенных клеток с антителами к

изучаемым маркерам в зависимости от наличия феномена краудинга обнаружено не было. Отмечалась тенденция к меньшему проценту клеток экспрессирующих FOXA1 в новообразованиях с наличием феномена краудинга (таблица 24).

Таблица 24 – Взаимосвязь характера экспрессии ELF5 от феномена краудинга в опухоли у больных инвазивным раком молочной железы

Наличие феномена краудинга	Процент экспрессии в опухолевых клетках (Me Q1 ÷ Q3)		
	GATA3	FOXA1	ELF5
Отсутствует	99,8 (100 ÷ 100) (n = 12)	96,35 (99,6 ÷ 100) (n = 13)	92,4 (96 ÷ 100) (n = 12)
Присутствует	95,8 (98 ÷ 100) (n = 82)	83,7 (76 ÷ 100) (n = 77)	92,9 (100 ÷ 100) (n = 76)
Достоверность различий	p = 0,29	p = 0,07	p = 0,95

Таким образом, проведенное исследование параметров экспрессии изученных транскрипционных факторов в зависимости от гистологических характеристик инвазивной карциномы молочной железы позволило выявить ряд значимых особенностей. Так, было показано, наибольшую сопряженность со степенью гистологической злокачественности опухоли имеет транскрипционный фактор FOXA1. Экспрессия данного фактора также сопряжена со степенью выраженности инфильтрации иммунными клетками, при нарастании воспалительной инфильтрации увеличивается доля случаев с негативным иммунным окрашиванием. Характер экспрессии транскрипционных факторов сопряжен с рядом морфологических параметров опухоли. Так, гетерогенная экспрессия GATA3 чаще наблюдается при наличии феномена ретракции в опухоли. Аналогичная тенденция отмечена и для фактора FOXA1. Вариант распределения позитивных опухолевых клеток, экспрессирующих ELF5 был сопряжен с наличием феномена краудинга. Обнаружено, что при отсутствии данного феномена, чаще отмечается гетерогенный тип распределения данного фактора. Кроме того, нами была обнаружена отчетливая тенденция к снижению процента экспрессии FOXA1 при наличии феномена краудинга опухолевых

клеток. Однако следует подчеркнуть, что процент экспрессии изученных факторов не был сопряжен со степенью соотношения стромального и паренхиматозного компонента в опухоли, а также с выраженностью инфильтрации иммунными клетками.

3.3 Анализ экспрессии транскрипционных факторов в зависимости от рецепторов половых гормонов и параметров пролиферативной активности опухоли

В связи с тем, что изучаемые факторы тесно сопряжены с рецепторами половых гормонов, процессами транскрипции и пролиферации опухолевых клеток, а также могут играть роль в оценке потенциальной чувствительности к антиэстрогеновой терапии РМЖ было интересным провести совокупный анализ указанных параметров в исследуемой выборке пациенток.

Таблица 25 – Процент рецепторов эстрогена и прогестерона в зависимости от экспрессии транскрипционных факторов GATA3, FOXA1, ELF5 у больных люминальным РМЖ

Транскрипционный фактор	Наличие экспрессии	Процент экспрессии ER (Me Q1 ÷ Q3)	Процент экспрессии PR (Me Q1 ÷ Q3)
GATA3	есть	81,7 (21 ÷ 100) (n = 95)	70,8 (49 ÷ 97,5) (n = 80)
	нет	75,5 (54 ÷ 99) (n = 6)	78,2 (56,3 ÷ 97) (n = 5)
		p = 0,55	p = 0,68
FOXA1	есть	82,7 (69,3 ÷ 100) (n = 91)	72,3 (56,3 ÷ 97) (n = 79)
	нет	68,65 (39 ÷ 95) (n = 10)	57,14 (31,8 ÷ 100) (n = 6)
		p = 0,04	p = 0,42

Продолжение таблицы 25

Транскрипционный фактор	Наличие экспрессии	Процент экспрессии ER (Me Q1 ÷ Q3)	Процент экспрессии PR (Me Q1 ÷ Q3)
ELF5	есть	82,1 (68,4 ÷ 100) (n = 89)	70,8 (49 ÷ 98) (n = 75)
	нет	75,9 (46,5 ÷ 100) (n = 12)	74,2 (62,7 ÷ 93) (n = 10)
		p = 0,7	p = 0,87

Как видно из данных таблицы обнаружены статистические отличия в проценте экспрессии рецепторов эстрогена в зависимости от транскрипционного фактора FOXA1. В наблюдениях, при которых в опухоли отсутствовала экспрессия данного маркера, процент ER был значимо ниже.

Кроме того, были показаны существенные различия в экспрессии факторов транскрипции в зависимости от наличия или отсутствия рецепторов прогестерона в опухоли (таблицы 26 и 27).

Таблица 26 – Взаимосвязь наличия экспрессии рецепторов прогестерона в зависимости от процента экспрессии GATA3 у больных люминальным раком молочной железы

Экспрессия рецепторов прогестерона	Процент экспрессии GATA3 в опухолевых клетках M ± SD
PR+ (n = 80)	98,15 ± 6,14
PR– (n = 15)	87,2 ± 12,15
F = 14,3; p = 0,0002	

По результатам, представленным в таблице, отчетливо видна зависимость процента экспрессии GATA3 и отрицательной экспрессий рецепторов прогестерона.

Таблица 27 – Взаимосвязь наличия экспрессии рецепторов прогестерона в зависимости от процента экспрессии FOXA1 у больных люминальным раком молочной железы

Экспрессия рецепторов прогестерона	Процент экспрессии FOXA1 в опухолевых клетках
	M ± SD
PR+ (n = 79)	92,2 ± 9,04
PR– (n = 12)	77,65 ± 9,9
F = 5,14; p = 0,02	

По результатам, представленным в таблице, отчетливо видно снижение процента экспрессии FOXA1 при отсутствии рецепторов прогестерона в опухоли. В отношении фактора ELF5 подобных закономерностей не обнаружено (p = 0,2).

Характер экспрессии транскрипционных факторов по нашим данным также был сопряжен с процентом экспрессии рецепторов прогестерона в опухоли.

Таблица 28 – Процент рецепторов прогестерона в зависимости от характера экспрессии транскрипционных факторов GATA3, FOXA1, ELF5 у больных люминальным РМЖ

Характер экспрессии транскрипционного фактора в опухоли	Процент экспрессии PR (Me Q1 ÷ Q3)		
	GATA3	FOXA1	ELF5
Гомогенный	68,9 (50 ÷ 96) (n = 59)	66,67 (46,5 ÷ 95) (n = 49)	71,02 (49 ÷ 98) (n = 55)
Гетерогенный	76 (48 ÷ 100) (n = 21)	81,5 (71,9 ÷ 100) (n = 30)	70,37 (49 ÷ 94) (n = 20)
Достоверность различий	p = 0,18	p = 0,001	p = 0,78

Из данных, приведенных в таблице видно, что имеются отличия в проценте экспрессии PR в зависимости от характера экспрессии FOXA1. При гомогенном распределении данного фактора в опухоли процент экспрессии PR снижен.

Следует отметить, что в отношении процента экспрессии ER и характера

экспрессии изученных транскрипционных факторов подобных связей не обнаружено.

Пролиферативная активность опухолевых клеток при РМЖ является не только критерием для деления люминального РМЖ на подтипы, но и независимым фактором определяет прогноз заболевания. Поскольку действие изучаемых факторов сопряжено с рецепторами эстрогенов и, в конечном счете, с пролиферацией клеток было крайне важным изучить взаимосвязь данных параметров в исследованной группе пациенток.

В нашем исследовании медиана пролиферативной активности опухолевых клеток в исследованной группе больных составила 20,67 % (Q1 – 10 ÷ Q3 – 29, min – 1 %, max – 73,8 %; (SD ± 16,65) %). Как известно, пороговым значением при люминальном подтипе РМЖ является индекс пролиферации 20 %, Распределение больных в зависимости от уровня пролиферации представлено в таблице 29.

Таблица 29 – Распределение больных РМЖ в зависимости от уровня пролиферативной активности опухоли

Индекс пролиферативной активности Ki67	Количество больных (а.ч. %)
< 20 % позитивно окрашенных клеток	58 (57,4)
≥ 20 % позитивно окрашенных клеток	43 (42,6 %)

В зависимости от уровня пролиферативной активности был праведен анализ процента экспрессии изучаемых факторов транскрипции в опухоли.

Таблица 30 – Процент экспрессии GATA3, FOXA1, ELF5 в зависимости от уровня пролиферативной активности опухоли

Индекс пролиферативной активности опухоли	Процент экспрессии фактора транскрипции (Me Q1 ÷ Q3)		
	GATA3	FOXA1	ELF5
Ki67 < 20 %	95,8 (100 ÷ 100) (n = 55)	83,5 (75 ÷ 100) (n = 52)	91 (100 ÷ 100) (n = 51)
Ki67 ≥ 20 %	96,9 (99 ÷ 100) (n = 40)	88,5 (80 ÷ 100) (n = 39)	95,4 (100 ÷ 100) (n = 38)
Достоверность различий	p = 0,9	p = 0,7	p = 0,8

Как показано в таблице медианы процентов экспрессии изученных транскрипционных факторов не отличались в зависимости от порогового значения индекса пролиферации опухоли. Однако нами было показано, что при негативной экспрессии FOXA1 чаще встречаются случаи с индексом пролиферации более 20 % (таблица 31).

Таблица 31 – Распределение больных люминальным РМЖ в зависимости от уровня пролиферативной активности опухоли и наличия экспрессии FOXA1

Индекс пролиферативной активности опухоли	Экспрессия FOXA1 в опухоли (а.ч. %)	
	негативная (n = 10)	позитивная (n = 91)
Ki67 < 20 %	2 (20 %)	56 (61,5 %)
Ki67 ≥ 20 %	8 (80 %)	35 (38,5 %)
$\chi^2 = 5,0, p = 0,025$		

Как видно из данных таблицы при отсутствии в опухоли FOXA1, чаще наблюдаются случаи с уровнем пролиферации 20 % и более.

Проведенный анализ среднего уровня пролиферации в зависимости от количества позитивных факторов транскрипции в опухоли не показал статистических различий (таблица 32).

Таблица 32 – Индекс пролиферативной активности опухоли в зависимости от количества экспрессируемых факторов транскрипции опухолевыми клетками

Количество экспрессируемых транскрипционных факторов в опухоли	Индекс Ki67 (Me Q1 ÷ Q3)
Один (n = 79)	19,8 (10 ÷ 29)
Два (n = 17)	25,3 (11,2 ÷ 40)
Три (n = 5)	20,7 (3 ÷ 31)
Достоверность различий	p = 0,8

Несмотря на отсутствие статистической разницы исследуемого индекса, следует отметить, что в группах с одним и двумя факторами транскрипции отмечается большая вариативность анализируемого признака.

По нашим данным степень гистологической злокачественности опухоли инвазивной карциномы была связана с уровнем пролиферативной активности опухолевых клеток. Наибольшие показатели индекса пролиферации отмечались в группе больных, опухоли которых имели grade 3 (grade 1 – $(15,8 \pm 12,6) \%$, grade 2 – $(20,4 \pm 16,1) \%$, grade 3 – $(50,0 \pm 15,8) \%$, $F = 7,86$ $p = 0,0007$). Полученные данные согласуются с результатами других исследований и подтверждают связь данного гистологического критерия с пролиферацией опухолевых клеток при раке молочной железы.

Проведенная оценка уровня пролиферативной активности в опухоли не была связана с наличием феномена краудинга и присутствием ретракции в строме опухоли (соответственно: $p = 0,9$ и $p = 0,7$).

Таким образом, проведенный анализ пролиферативной активности, параметров рецепторного статуса опухоли в связи с экспрессией изученных транскрипционных факторов позволил выявить ряд значимых зависимостей. Так, нами было показано, что процент экспрессии рецепторов эстрогена сопряжен с наличием фактора FOXA1, поскольку при его отсутствии в опухолевых клетках снижается процент экспрессии ER. Обнаружено, что процент экспрессии FOXA1 и GATA3 связан с наличием или отсутствием рецепторов прогестерона в опухолевых клетках. В свою очередь процент экспрессии PR в опухоли был

сопряжен с характером распределения опухолевых клеток, имеющих позитивное окрашивание FOXA1. Полученные данные подтверждают тесную функциональную взаимосвязь данных ТФ с рецепторным статусом инвазивной карциномы молочной железы. Отсутствие экспрессии FOXA1 в опухоли связано с большей частотой случаев карцином молочной железы, имеющих индекс пролиферации Ki67 ≥ 20 %.

3.4 Анализ экспрессии транскрипционных факторов и частоты развития лимфогенных метастазов у больных раком молочной железы

Регионарное метастазирование при раке молочной железы является фактором, определяющим не только объем необходимого лечения, но и предиктором течения болезни.

Наличие регионарных метастазов на момент операции было диагностировано и подтверждено по результатам гистологического исследования операционного материала у 36 (35,6 %) пациенток. Среднее число поражённых метастазами лимфатических узлов составило – 4,91 ($Q1 = 11 \div Q3 = 6,5$, min – 1, max – 27 SD $\pm 5,7$).

Частота лимфогенного метастазирования не зависела существенно от степени злокачественности опухоли ($\chi^2 = 0,7$, $p = 0,7$), состояния менструальной функции пациенток ($p = 0,7$), характера роста новообразования ($p = 0,33$). Однако отмечалась корреляция размера опухоли и частоты регионарных метастазов ($r = 0,326$, $p = 0,0009$). Распределение больных в зависимости от частоты регионарного метастазирования и варианта люминального субтипа РМЖ представлено в таблице 33. Как видно из данных таблицы, частота развития данной формы прогрессирования не отличалась в зависимости от варианта люминального подтипа РМЖ.

Таблица 33 – Частота лимфогенного метастазирования в зависимости от варианта люминального подтипа опухоли у больных инвазивным раком молочной железы

Молекулярно-генетический тип	Статус регионарных лимфатических узлов (а.ч. %)	
	N0	N+
Люминальный A (n = 49)	30 (61,2 %)	19 (38,7 %)
Люминальный B/HER2-негативный (n = 30)	18 (60 %)	12 (40 %)
Люминальный B/HER2-позитивный (n = 22)	17 (77,8 %)	5 (22,8 %)
$\chi^2 = 2,05, p = 0,35$		

Среднее число метастатических лимфатических узлов также не имело отличий при разных вариантах люминального рака ($p = 0,2$).

Большой интерес представляла оценка экспрессии GATA3, FOXA1 и ELF5 в опухолевых клетках в зависимости от статуса регионарных лимфатических узлов. Нами проведен анализ экспрессии факторов транскрипции в зависимости от наличия либо отсутствия опухолевого поражения лимфатических коллекторов (таблица 34).

Таблица 34 – Экспрессия факторов транскрипции в зависимости от состояния регионарных лимфатических узлов у пациенток с люминальным молекулярным подтипом рака молочной железы

Статус регионарных лимфатических узлов	Процент GATA3 M $\pm$ SD	Процент FOXA1 M $\pm$ SD	Процент ELF5 M $\pm$ SD
N0	n = 62 (95,2 $\pm$ 13,1)	n = 61 (92,1 $\pm$ 11,1)	n = 62 (89,2 $\pm$ 12,1)
N+	n = 32 (87,6 $\pm$ 4,07)	n = 30 (88,6 $\pm$ 2,02)	n = 27 (92,2 $\pm$ 9,1)
Достоверность различий	p = 0,001	p = 0,045	p = 0,12

По результатам, представленных в данной таблице, нами была обнаружена зависимость процента экспрессии GATA3 и FOXA1 от наличия метастазов в

лимфатических узлах. Отмечается снижение процента экспрессии указанных факторов при развитии регионарного метастазирования.

Также нами была проанализирована связь характера экспрессии факторов транскрипции (гомогенная и гетерогенная) со статусом лимфатических узлов у больных карциномой молочной железы.

Таблица 35 – Частота лимфогенного метастазирования в зависимости от характера экспрессии FOXA1 у больных люминальным раком молочной железы

Характер экспрессии FOXA1	Состояние регионарных лимфатических узлов (а.ч. %)	
	N0	N+
Гомогенный (n = 54)	32 (59 %)	22 (41 %)
Гетерогенный (n = 37)	29 (78 %)	8 (22 %)
$\chi^2 = 3,6, p = 0,05$		

По данным таблицы видно, что отмечается тенденция зависимости характера экспрессии FOXA1 от наличия или отсутствия метастатического поражения, при этом гомогенный характер экспрессии данного транскрипционного фактора связан с большим процентом пациенток с наличием метастазов в лимфатических узлах.

Нами была обнаружена аналогичная связь и в отношении факторов GATA3 и ELF5, данные анализа которых представлены в таблицах 36 и 37.

Таблица 36 – Частота лимфогенного метастазирования в зависимости от характера экспрессии GATA3 у больных люминальным раком молочной железы

Характер экспрессии GATA3	Состояние регионарных лимфатических узлов (а.ч. %)	
	N0	N+
Гомогенный (n = 66)	38 (58 %)	28 (42 %)
Гетерогенный (n = 29)	24 (83 %)	5 (17 %)
$\chi^2 = 5,63, p = 0,017$		

Отмечается достоверная взаимосвязь характера экспрессии фактора GATA3 в опухолевой ткани карциномы молочной железы с наличием метастазов в лимфатических узлах, при этом видно, что в 42 % случаях, гомогенная экспрессия сопряжена с наличием метастазов.

Таблица 37 – Частота лимфогенного метастазирования в зависимости от характера экспрессии ELF5 у больных люминальным раком молочной железы

Характер экспрессии ELF5	Состояние регионарных лимфатических узлов (а.ч. %)	
	N0	N+
Гомогенный (n = 67)	39 (58 %)	28 (42 %)
Гетерогенный (n = 22)	18 (82 %)	4 (18 %)
$\chi^2 = 4,01, p = 0,045$		

Отмечается связь характера экспрессии фактора транскрипции ELF5 со статусом лимфатических узлов.

Нами также был проведен анализ зависимости интенсивности иммунного окрашивания исследуемых транскрипционных факторов с частотой лимфогенного метастазирования, по данным которого корреляции между этими параметрами обнаружено не было.

Полученные в ходе исследования результаты свидетельствуют о том, что процент и характер экспрессии транскрипционных белков GATA3, FOXA1 и ELF5 в опухолевых клетках связаны с увеличением риска метастатического поражения в лимфатических узлах. Снижение процента экспрессии FOXA1 и GATA3 было связано с наличием метастазов в лимфатических узлах. Кроме того, изучаемый нами параметр, а именно характер экспрессии, также был ассоциирован с более ранним развитием метастазов в лимфатических узлах, прослеживающийся во всех трех исследованных транскрипционных факторах.

Важным клиническим предиктором лимфогенной прогрессии является размер первичной опухоли (pT).

3.5 Анализ экспрессии транскрипционных факторов и частоты развития отдаленных метастазов у больных с раком молочной железы

За период наблюдения отдаленные метастазы были диагностированы у 15 из 101 (14,8 %) пациенток. Оценивалась локализация метастатических очагов и срок их возникновения после операции. Изолированные метастазы в кости были обнаружены в 9 из 15 случаев (60 %), в 6 случаях (40 %) отмечалось множественное опухолевое поражение костей и висцеральных органов.

Первоначально проведен анализ частоты развития отдаленных метастазов в зависимости от основных клинико-морфологических параметров РМЖ, таких как: размер первичной опухоли (pT), характер роста опухоли, степень гистологической злокачественности (grade), состояние регионарных лимфатических узлов, состояние менструальной функции на момент постановки диагноза.

Распределение пациенток в зависимости от наличия отдаленных метастазов и менструального статуса на момент постановки диагноза статистически не имело различий ($p = 0,9$). Наличие фокусов мультицентрического роста опухоли, по нашим данным, также не оказывало существенного влияния на частоту развития гематогенных метастазов ($\chi^2 = 0,8$, $p = 0,39$). Было показано, что размер первичной опухоли был существенно сопряжен с частотой развития гематогенной прогрессии (таблица 38).

Таблица 38 – Размер первичного опухолевого узла в зависимости от наличия отдаленных метастазов у больных люминальным РМЖ

Наличие отдаленных метастазов у больных РМЖ	Размер первичного опухолевого узла, см M ± SD
Нет (M0)	1,8 ± 0,77
Есть (M1)	2,5 ± 1,2
F = 9,3; p = 0,002	

Как видно из данных, представленных в таблице, возникновение

отдаленных метастазов наблюдалось при большем размере первичного опухолевого очага. Статистическая зависимость связи размера новообразования и наличия отдаленных метастазов, без учёта их локализации, подтверждалась также наличием корреляционной связи ($r = 0,22$; $p = 0,002$).

Степень гистологической злокачественности РМЖ является не только совокупным индикатором дифференцировки опухолевых клеток на морфологическом уровне, но и является значимым фактором прогноза течения болезни, сопряжённым с различными проявлениями опухолевой прогрессии. В нашем исследовании отмечена отчетливая статистическая тенденция к подобному роду зависимости (таблица 39).

Таблица 39 – Распределение больных раком молочной железы в зависимости от степени гистологической злокачественности опухоли и наличия гематогенных метастазов

Степень гистологической злокачественности опухоли (grade)	Наличие отдалённых метастазов (а.ч. %)	
	нет (M0) (n = 86)	есть (M1) (n = 15)
Grade 1	16 (18,6 %)	1 (6 %)
Grade 2	68 (79 %)	12 (80 %)
Grade 3	2 (2,4 %)	2 (14 %)
$\chi^2 = 4,9$, $p = 0,08$		

Как видно из данных таблицы доминирующими являлись опухоли со второй степенью злокачественности (grade 2), при этом отчётливо видно, что реже метастазы отмечены в группе больных с опухолью, имеющей grade 1.

По нашим данным частота развития отдаленных метастазов была сопряжена с наличием лимфогенных метастазов в регионарных лимфатических узлах

($\chi^2 = 10,9$, $p = 0,00095$). В 73 % наблюдений развитие гематогенных метастазов было сопряжено с наличием метастатического поражения регионарных лимфатических коллекторов, подтвержденного по результатам исследования операционного материала. В 27 % случаев развитие прогрессирования заболевания возникло при отсутствии поражения подмышечных лимфатических узлов (таблица 40).

Таблица 40 – Частота гематогенных метастазов в зависимости от состояния регионарных лимфатических узлов у больных люминальным РМЖ

Состояние регионарных лимфатических узлов	Наличие отдалённых метастазов (а.ч. %)	
	нет (M0) (n = 86)	есть (M1) (n = 15)
N0	61 (71 %)	4 (27 %)
N+	25 (29 %)	11 (73 %)
$\chi^2 = 10,9$, $p = 0,00095$		

Однако частота развития отдаленных метастазов статистически не различалась в зависимости от варианта люминального подтипа новообразования (таблица 41).

Таблица 41 – Частота гематогенных метастазов в зависимости от варианта люминального подтипа РМЖ

Вариант люминального подтипа РМЖ	Наличие отдалённых метастазов (а.ч. %)	
	нет (M0) (n = 86)	есть (M1) (n = 15)
Люминальный А (n = 49)	43 (87,7 %)	6 (12,3 %)
Люминальный В (HER2-негативный) (n = 30)	24 (80 %)	6 (20 %)
Люминальный В (HER2-позитивный) (n = 22)	19 (86 %)	3 (14 %)
$\chi^2 = 0,9$, $p = 0,6$		

Тем не менее, следует отметить, что наибольшая частота развития

отдаленных метастазов наблюдалась в подгруппе больных с фенотипом опухоли – люминальный В (HER2-негативный).

Уровень пролиферативной активности, оценённый по экспрессии Ki67 в опухолевых клетках, не был существенно сопряжен с развитием отдаленных метастазов (таблица 42).

Таблица 42 – Частота развития отдаленных метастазов в зависимости от уровня пролиферативной активности в опухоли у больных люминальным РМЖ

Уровень пролиферативной активности опухолевых клеток	Наличие отдалённых метастазов (а.ч. %)	
	нет (M0) (n = 86)	есть (M1) (n = 15)
< 20 % позитивных клеток (Ki67)	49 (57 %)	9 (60 %)
≥ 20 % позитивных клеток (Ki67)	37 (43 %)	6 (40 %)
$\chi^2 = 0,04, p = 0,82$		

Изучаемые нами транскрипционные факторы сопряжены со степенью дифференцировки эпителия молочной железы, а также тесно взаимосвязаны с экспрессией и активацией рецепторов эстрогена, которые, в свою очередь, связаны с одной стороны с более благоприятным прогнозом, с другой стороны отражают потенциальную чувствительность к гормонотерапии. Согласно нашим данным, были выявлены существенные различия в экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона у больных, имеющих различное течение опухолевой болезни. Так, в группе больных с наличием гематогенных метастазов процент экспрессии обоих типов рецепторов был значимо ниже (таблица 43).

Таблица 43 – Показатели экспрессии рецепторов половых гормонов в опухоли в зависимости от наличия отдаленных метастазов у больных люминальным РМЖ

Рецепторы половых гормонов в опухоли	Процент экспрессии в опухоли (Me Q1 ÷ Q3)	
	отсутствие гематогенных метастазов (M0)	наличие гематогенных метастазов (M1)
ER	94,7 (70 ÷ 100)	69,3 (51,5 ÷ 93) $p_{1-2} = 0,02$
PR	83 (59,5 ÷ 98)	49 (32 ÷ 74,4) $p_{1-2} = 0,038$

Анализ связи экспрессии изучаемых транскрипционных факторов в опухоли в группах больных в зависимости от наличия или отсутствия гематогенных метастазов выявил значимые различия в проценте экспрессии FOXA1 и ELF5. По нашим данным было обнаружено, что при развитии отдалённых метастазов процент экспрессии FOXA1 и ELF5 в клетках первичной опухоли достоверно был ниже в сравнении с теми случаями, у которых признаки прогрессии болезни отсутствовали. Подобных различий в отношении экспрессии маркера GATA3 получено не было (таблица 44).

Таблица 44 –Показатели экспрессии транскрипционных факторов в опухоли в зависимости от наличия отдаленных метастазов у больных люминальным РМЖ

Транскрипционные факторы	Процент экспрессии в опухоли (Me Q1 ÷ Q3)	
	отсутствие гематогенных метастазов (M0)	наличие гематогенных метастазов (M1)
GATA3	100 (98 ÷ 100)	100 (100 ÷ 100)
FOXA1	100 (90,3 ÷ 100)	70 (42 ÷ 76) $p_{1-2} = 0,000015$
ELF5	100 (100 ÷ 100)	76 (65 ÷ 100) $p_{1-2} = 0,000002$

Исследование показало наличие зависимости между характером распределения экспрессии изучаемых маркеров и частотой гематогенного метастазирования. Наиболее часто гематогенные метастазы наблюдались при гетерогенной экспрессии в опухоли факторов FOXA1 ($\chi^2 = 6,42$, $p = 0,01$) и ELF5 ($\chi^2 = 14,46$, $p = 0,0001$) (таблица 45).

Таблица 45 – Частота гематогенного метастазирования в зависимости от характера распределения экспрессии маркеров FOXA1 и ELF5 у больных люминальным раком молочной железы

Характер распределения экспрессии маркера в первичной опухоли	Гематогенные метастазы абс. число (%)	
	отсутствие гематогенных метастазов (M0)	наличие гематогенных метастазов (M1)
	FOXA1	
Гомогенный (n = 45)	44 (97 %)	1 (3 %)
Гетерогенный (n = 46)	36 (78,2 %)	10 (21,8 %)
	ELF5	
	отсутствие гематогенных метастазов (M0)	наличие гематогенных метастазов (M1)
	ELF5	
Гомогенный (n = 56)	54 (96,4 %)	2 (3,6 %)
Гетерогенный (n = 33)	21 (63,6 %)	12 (36,4 %)

При исследовании характера распределения экспрессии GATA3 в опухоли с частотой развития гематогенных метастазов не был выявлен уровень статистической значимости различий ($\chi^2 = 2,46$, $p = 0,7$).

Инфильтрация опухоли клетками иммунной системы является важным компонентом микроокружения, влияющим на процессы пролиферации, ангиогенеза, инвазии, и может определять особенности опухолевой прогрессии, поскольку вовлечена в механизмы метастатического каскада. Был проведен анализ экспрессии изучаемых факторов транскрипции в опухоли в зависимости от степени воспалительной инфильтрации в строме новообразования. Исследование показало, что экспрессия GATA3, FOXA1, ELF5 не отличается в опухолях с различной степенью инфильтрации иммунокомпетентными клетками, последняя,

в свою очередь, не была значимо сопряжена с частотой развития отдалённых метастазов (таблица 46).

Таблица 46 – Частота отдаленных метастазов у больных люминальным РМЖ в зависимости от степени инфильтрации иммунными клетками в опухоли

Степень выраженности инфильтрации иммунными клетками в строме опухоли	Наличие отдалённых метастазов (а.ч. %)	
	нет (M0) (n = 86)	есть (M1) (n = 15)
Слабая	30 (35 %)	4 (26 %)
Умеренная	37 (43 %)	6 (40 %)
Выраженная	19 (22 %)	5 (34 %)
$\chi^2 = 0,9, p = 0,6$		

Феномен краудинга опухолевых клеток на гистологическом уровне отражает отсутствие контактного торможения опухолевых клеток, как одного из факторов, лимитирующих безграничный репликативный потенциал. В связи с чем, было интересным проанализировать связь данного морфологического паттерна в опухоли с частотой развития гематогенной диссеминации. Полученные данные свидетельствуют об отчетливой тенденции к зависимости между анализируемыми признаками (таблица 47).

Таблица 47 – Частота развития отдаленных метастазов у больных люминальным РМЖ в зависимости от наличия феномена краудинга в опухоли

Наличие феномена краудинга опухолевых клеток	Наличие отдалённых метастазов (а.ч. %)	
	нет (M0) (n = 86)	есть (M1) (n = 15)
Отсутствует	14 (16,2 %)	0
Присутствует	72 (83,8 %)	15 (100 %)
$\chi^2 = 2,9, p = 0,09$		

Достоверная зависимость отмечена при анализе степени выраженности данного феномена и частоты гематогенного метастазирования (таблица 48).

Таблица 48 – Частота отдаленных метастазов у больных люминальным РМЖ в зависимости от выраженности феномена краудинга в опухоли

Степень выраженности краудинга	Наличие отдалённых метастазов (а.ч. %)	
	нет (M0) (n = 72)	есть (M1) (n = 15)
Слабая (n = 32)	28 (87,5 %)	4 (12,5 %)
Умеренная (n = 40)	35 (87,5 %)	5 (12,5 %)
Выраженная (n = 15)	9 (60 %)	6 (40 %)
$\chi^2 = 4,9, p = 0,04$		

Как видно из данных таблицы, при выраженной степени феномена краудинга отмечена наибольшая частота гематогенного метастазирования.

Однако частота гематогенных метастазов существенно не зависела от наличия или отсутствия феномена ретракции в опухоли ($\chi^2 = 0,8, p = 0,34$), а также от степени выраженности данного феномена в опухоли ($\chi^2 = 1,8, p = 0,4$).

Проведенное исследование транскрипционных факторов GATA3, FOXA1 и ELF5 в первичной опухоли у больных люминальным подтипом рака молочной железы позволило показать отчётливую зависимость с развитием такой формы опухолевой прогрессии как гематогенное метастазирование. Обнаруженные связи между низким уровнем экспрессии ELF5 и FOXA1 и частотой гематогенного метастазирования, можно объяснить с разных позиций. С одной стороны, выявленные закономерности могут быть обусловлены патогенетическим влиянием указанных факторов на процессы пролиферации опухолевых клеток и ангиогенез, являясь, в первую очередь, проявлением активации

эпителиально-мезенхимального перехода как ключевого механизма в развитии гематогенного прогрессирования. Известно, что факторы транскрипции ELF5 и FOXA1 оказывают супрессорное воздействие на ЭМП, в связи с этим снижение уровня их экспрессии в опухоли может способствовать активации важных факторов Twist1 и Slug. Однако данные аспекты требуют дальнейшего изучения. С другой стороны, гематогенное прогрессирование в группе больных с низким уровнем экспрессии факторов FOXA1 и ELF5 при гетерогенном характере их распределения в опухоли в совокупности с низким уровнем экспрессии ER и PR, могут определять развитие резистентности к проводимой гормональной терапии, а, следовательно, могут быть учтены при планировании тактики лечения.

3.6 Прогнозирование вероятности развития отдаленных метастазов у больных люминальным подтипом рака молочной железы

На основе результатов проведенного исследования с использованием метода нелинейной логистической регрессии была разработана математическая модель для прогнозирования вероятности риска развития гематогенных метастазов для больных раком молочной железы без предварительного предоперационного лечения.

Данная модель может быть использована для пациентов с РМЖ, имеющих следующие критерии: люминальный молекулярный подтип опухоли, отсутствие предоперационного лечения, антиэстрогеновая терапия в адъювантном режиме.

Разработанная модель основана на оценке совокупности морфологических и молекулярно-биологических характеристик первичной опухоли, статусе регионарных лимфатических узлов, оцененных по результатам патоморфологического исследования операционного материала.

В качестве независимых признаков в математическую модель вошли такие показатели, как: степень гистологической злокачественности опухоли (grade), состояние регионарных лимфатических узлов по результатам исследования операционного материала (наличие либо отсутствие метастазов в регионарных

лимфатических узлах), наличие феномена ретракции в опухоли, характер экспрессии в опухоли FOXA1, наличие экспрессии в опухоли ELF5, уровень пролиферативной активности опухолевых клеток, оцененный по экспрессии – Ki67. В качестве количественного признака при построении регрессии вошел такой признак как размер первичной опухоли.

Расчет вероятности риска гематогенного метастазирования при люминальном раке молочной железы проводят по следующей формуле:

$$Y = -47,3186 + 2,4630 \times X_1 + 2,34527 \times X_2 + 0,08 \times X_3 - 1,76 \times X_4 + 21 \times X_5 - 1,29 \times X_6$$

где Y – значение уравнения регрессии;

(–47,3186) – значение коэффициента регрессии свободного члена;

X_1 – степень гистологической злокачественности опухоли (1 балл – опухоль имеет grade 1; 2 балла – опухоль имеет grade 2; 3 балла – опухоль имеет grade 3);

(2,4630) – значение коэффициента регрессии признака X_1 ;

X_2 – наличие лимфогенных метастазов в регионарных лимфатических узлах (1 балл – нет метастазов, 2 балла – имеются метастазы в регионарных лимфатических узлах);

(2,34527) – значение коэффициента регрессии признака X_2 ;

X_3 – наличие в опухолевой ткани феномена ретракции (1 балл – ретракция отсутствует; 2 балла – феномен ретракции в ткани опухоли присутствует);

(0,08) – значение коэффициента регрессии признака X_3 ;

X_4 – характер экспрессии FOXA1 в опухоли (1 балл – гомогенная экспрессия; 2 балла – гетерогенная экспрессия);

(–1,76) – значение коэффициента регрессии признака X_4 ;

X_5 – наличие экспрессии ELF5 в опухоли (1 балл – нет, ELF5; 2 балла – есть);

(21) – значение коэффициента регрессии признака X_5 ;

X_6 – уровень пролиферативной экспрессии Ki67 (1 балл – экспрессия Ki67 в опухоли < 20 %; 2 балла – экспрессия Ki67 в опухоли ≥ 20 %);

(–1,29) – значение коэффициента регрессии признака X_6 .

Вероятность развития гематогенных метастазов определяют по следующей математической формуле:

$$P = e^Y / (1 + e^Y),$$

где P – значение вероятности развития признака;

Y – значение уравнения регрессии;

e – математическая константа, равная 2,72.

При вероятности $P \geq 50 \%$ определяют высокий риск развития отдаленного метастазирования, при вероятности $P < 50 \%$ определяют низкий риск развития отдаленных метастазов (степень достоверности математической модели $\chi^2 = 51,47$; $p = 0,0000$).

Чувствительность разработанной модели составила 97 %, специфичность – 79,4 %.

Проверка данной математической модели проводилась методом контрольной и обучающей выборки.

Сущность предлагаемого способа прогнозирования риска развития отдаленных метастазов у больных люминальным молекулярным подтипом РМЖ продемонстрирована следующими клиническими случаями.

Клинический пример № 1. Пациентка Т., 46 лет, находилась на лечении в отделении общей онкологии НИИ онкологии с впервые установленным местно-распространённым РМЖ, $T_2N_1M_0$ (IIВ стадия). При морфологическом исследовании core-биоптата гистологический тип новообразования был представлен инвазивной протоковой карциномой неспецифического типа, люминальный В/HER2-негативный (ER+/PR+Her2/neu 0). Степень гистологической злокачественности опухоли была посчитана как grade 3 (3 балла). Пациентке было выполнено оперативное лечение в объеме секторальной резекции с аксиллярной лимфаденоэктомией. При гистологическом исследовании операционного материала в опухоли присутствовал феномен ретракции вокруг опухолевых структур (2 балла), а также было диагностировано метастатическое поражение

регионарных лимфатических узлов, из 10 исследованных лимфатических узлов в 4 отмечалась опухолевое поражение (2 балла). При иммуногистохимическом исследовании в ткани новообразования отмечалась гетерогенная экспрессия FOXA1 (2 балла) (рисунок 21), и отсутствовала экспрессия ELF5 (1 балл). При оценке пролиферативной активности – уровень экспрессии Ki67 в опухолевых клетках составил 38 % (2 балла).

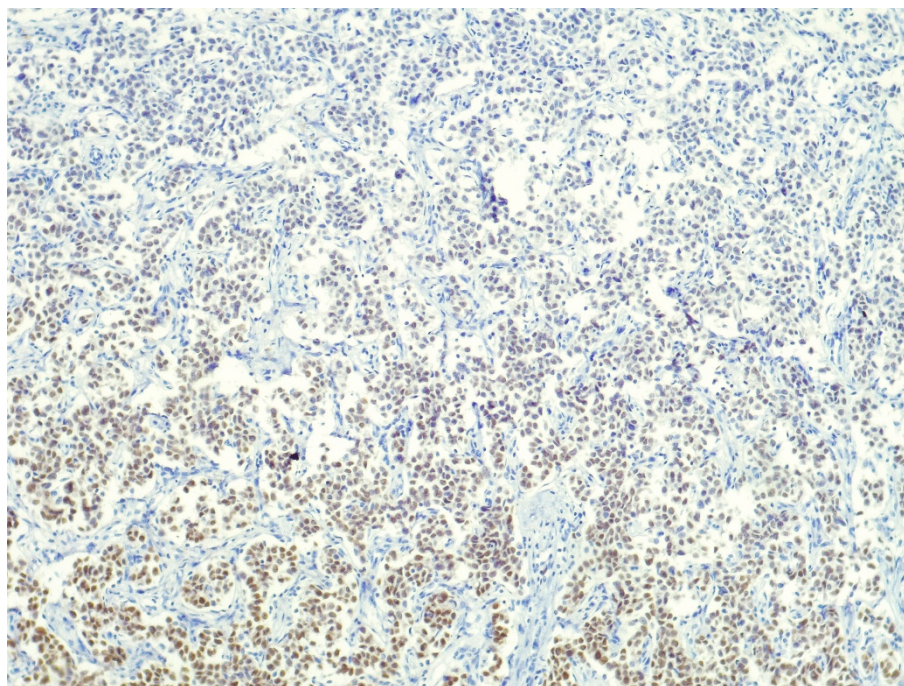


Рисунок 21 – Иммуногистохимическое исследование операционного материала, пациентка Т., 46 лет. Позитивная гетерогенная экспрессия фактора FOXA1 (ядерная) в опухолевых клетках инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа. Увеличение $\times 100$

Расчет степени риска отдаленного метастазирования проводили по формуле:

$$Y = -47,3186 + 2,4630 \times X_1 + 2,34527 \times X_2 + 0,08 \times X_3 - 1,76 \times X_4 + 21 \times X_5 - 1,29 \times X_6 =$$

$$= -47,3186 + 2,4630 \times 3 + 2,34527 \times 2 + 0,08 \times 2 - 1,76 \times 2 + 21 \times 1 - 1,29 \times 2 = -20,17$$

Вероятность развития гематогенных метастазов определялась по формуле:

$$P = e^{-20,17} / (1 + e^{-20,17}) = 2,72^{-20,17} / (1 + 2,72^{-20,17}) = \\ = 1,7389227928515948 / (1 + 1,7389227928515948) = 0,635 = 63,5 \, \%$$

Таким образом, у пациентки был определен высокий риск (63,5 %) развития гематогенных метастазов. На этапах динамического наблюдения (через 26 месяцев после завершения комбинированного лечения, на фоне приема тамоксифена в стандартной дозировке), при контрольном обследовании и проведении сцинтиграфии костей скелета было обнаружено множественное метастатическое поражение.

Клинический пример № 2. Пациентка Б., 66 лет, находилась на лечении в отделении общей онкологии НИИ онкологии с впервые установленным РМЖ, T₂N₀M₀ (IIA стадия). При исследовании биоптата гистологический тип опухоли был представлен инвазивной протоковой карциномой неспецифического типа, люминальный подтип А (ER+/PR+Her2/neu 0). Степень гистологической злокачественности опухоли была оценена как grade1 (1 балл). При морфологическом исследовании в опухоли отсутствовал феномен ретракции вокруг опухолевых структур (1 балл), при плановом гистологическом исследовании регионарных лимфатических узлов метастазов не обнаружено (1 балл). При иммуногистохимическом исследовании в ткани новообразования отмечалась гомогенная ярко выраженная экспрессия FOXA1 (1 балл) (рисунок 22) и отмечалась выраженная экспрессия фактора ELF5 (2 балла). При оценке пролиферативной активности – уровень экспрессии Ki67 в клетках карциномы составил 12 % (1 балл).

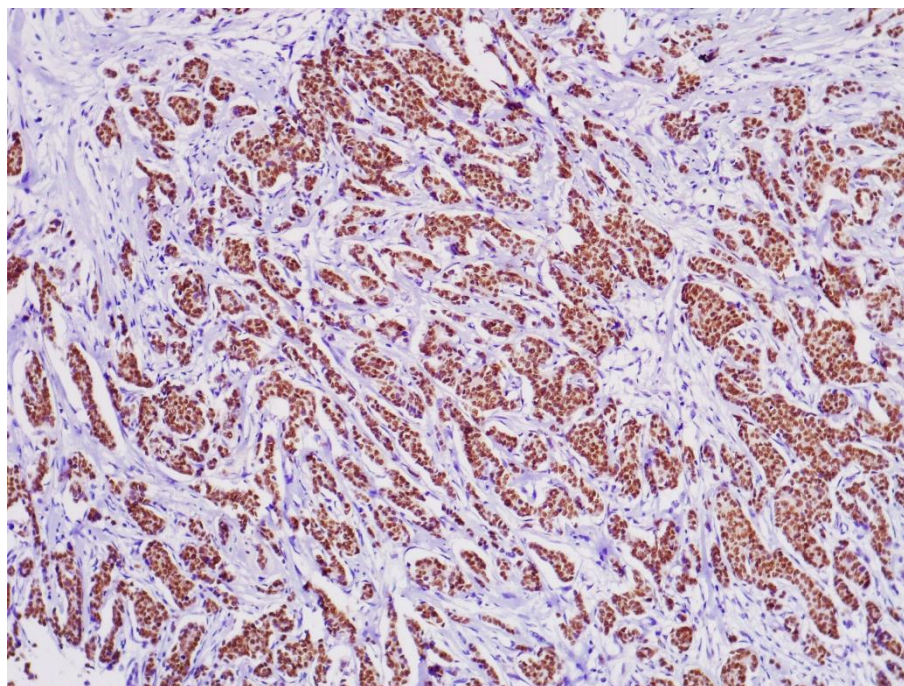


Рисунок 22 – Иммуногистохимическое исследование операционного материала, пациентка Б., 66 лет. Позитивная выраженная экспрессия фактора FOXA1 (ядерная) с гомогенным характером распределения в опухолевых клетках инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа.

Увеличение $\times 100$

Расчет степени риска гематогенного метастазирования для данной больной проводили по формуле модели:

$$Y = -47,3186 + 2,4630 \times X_1 + 2,34527 \times X_2 + 0,08 \times X_3 - 1,76 \times X_4 + 21 \times X_5 - 1,29 \times X_6 = \\ = -47,3186 + 2,4630 \times 1 + 2,34527 \times 1 + 0,08 \times 1 - 1,76 \times 1 + 21 \times 2 - 1,29 \times 1 = -3,48$$

Вероятность развития гематогенных метастазов определялось по формуле:

$$P = e^{-3,48} / (1 + e^{-3,48}) = 2,72^{-3,48} / (1 + 2,72^{-3,48}) = \\ = 0,030807411032751076 / (1 + 0,030807411032751076) = 0,0298 = 2,98 \, \%.$$

На основании проведенных расчетов, у пациентки был определен крайне низкий риск (2,98 %) развития гематогенных метастазов. На этапах динамического наблюдения метастатического поражения висцеральных органов и костей скелета не обнаружено. Срок наблюдения за больной составил 5 лет.

Таким образом, предлагаемый способ позволяет с высокой точностью и информативностью с учетом конкретных числовых показателей прогнозировать вероятность гематогенного метастазирования у пациенток с люминальным подтипом РМЖ, что позволяет персонализировать тактику ведения данной категории онкологических больных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Во всем мире рак молочной железы остается ведущей онкологической патологией у женского населения, затрагивая возрастную группу трудоспособного возраста, что, несомненно, является крайне большой проблемой здравоохранения [1]. С позиции молекулярной биологии и патоморфологии, карцинома молочной железы является гетерогенным заболеванием. Доминирующим молекулярным подтипом РМЖ являются люминальные опухоли, которые в сравнении с другими вариантами характеризуются более благоприятным прогнозом. Однако, в отдаленном периоде после завершения хирургического или комбинированного лечения в первый год у ряда пациенток отмечается прогрессирование заболевания, а в последующие годы эта цифра неуклонно растет, даже при I стадии [5, 155, 177]. В основе механизмов прогрессирования могут лежать совокупность параметров, связанных как с характеристиками самих опухолевых клеток карциномы молочной железы, так и развитием лекарственной устойчивости в процессе проведения гормонотерапии. В связи с тем, что прогрессирование люминального рака молочной железы в первую очередь связано с процессами взаимодействия эстрогенов с рецепторным аппаратом клетки, активацией транскрипционных механизмов и пролиферацией, актуальным является поиск дополнительных факторов, позволяющих оценивать данное взаимодействие и иметь прогностическое значение [102, 170, 183].

Данное исследование посвящено изучению транскрипционных факторов GATA3, FOXA1 и ELF5 у первично операбельных больных с люминальным РМЖ. Настоящая работа включала комплексный анализ клинических параметров и морфологического строения первичной опухоли, размер опухолевого узла, подтип новообразования, степень гистологической злокачественности (grade) по Ноттингемской системе, характеристику паренхиматозного и стромального компонентов карциномы, опухолевого микроокружения, феномен ретракции и краудинга. Описанные выше параметры сопоставлялись с экспрессионными характеристиками изучаемых транскрипционных факторов GATA3, FOXA1 и

ELF5 на основании проведенного иммуногистохимического исследования. Результаты исследования первичной опухоли были сопоставлены с двумя формами опухолевой прогрессии: лимфогенное и гематогенное метастазирование.

На первом этапе была проведена оценка экспрессии изучаемых ТФ в зависимости от основных клинико-морфологических характеристик заболевания. Нами было показано, что экспрессия транскрипционных факторов GATA3, FOXA1, ELF5 существенно не зависела от возраста и состояния менструальной функции. Полученный факт, вероятнее всего, свидетельствует о том, что экспрессия изученных маркеров не находится под существенным влиянием уровня эстрогенов в крови и не зависит от состояния репродуктивной функции женщин, поскольку не обнаружено достоверных отличий в частоте, выраженности и характере экспрессии в зависимости от состояния менструальной функции, имеющегося на момент постановки онкологического диагноза. Кроме того, характер роста опухоли (уницентрический или мультицентрический) также не оказывал существенного значения на параметры экспрессии ТФ.

Одним из важных прогностических критериев при любом молекулярном подтипе РМЖ является размер первичной опухоли. Данный параметр является не только клиническим предиктором течения болезни, но и косвенно может отражать процессы пролиферации опухолевых клеток. Кроме того, по данным литературы он высоко сопряжен с лимфогенным и гематогенным прогрессированием [26, 70, 114]. Нами была показана взаимосвязь ряда параметров экспрессии изученных ТФ с размером первичной опухоли. Новообразования, размер которых составлял 2 см и более, характеризовались гетерогенным распределением FOXA1 или же отсутствием экспрессии ELF5 в злокачественных клетках. По данным литературы, транскрипционный фактор ELF5 подавляет экспрессию ER и фактора транскрипции FOXA1, которые участвуют в дифференцировке люминальных клеток, при этом снижение уровня ELF5 сопровождается приобретением люминальными клетками резистентности к антиэстрогенам [59]. Проведенное нами исследование показало, что сочетание различных ТФ может наблюдаться в виде семи разнообразных комбинаций.

Превалирующий фенотип (78 %) опухолей экспрессировали все три исследуемых фактора. В 17 (16,83 %) случаях отмечалась экспрессия каких-либо двух факторов и лишь один случай характеризовался отсутствием всех трех изученных маркеров. Полученные результаты обнаружены нами впервые и свидетельствуют о том, что чаще всего в опухолях люминального типа РМЖ определяется коэкспрессия всех трех указанных маркеров. Отдельный интерес представил случай с отсутствием всех трех факторов в опухоли, при положительном внутреннем контроле в ткани железы. Для подтверждения принадлежности новообразования к молочной железе мы провели дополнительно ИГХ исследование с антителами к маммоглобину и GCDFP-15 (отмечалось позитивное окрашивание в части клеток). Данное наблюдение было представлено опухолью люминального подтипа В с экспрессией Her-2/neu, карцинома имела высокую степень злокачественности (grade 3) и высокую пролиферативную активность (индекс Ki67 – 43 %). По-видимому, нарастание степени анаплазии опухолевых клеток в сочетании с киназной активностью белка Her-2/neu привело к угнетению экспрессии данных факторов транскрипции в клетках опухоли.

Люминальный подтип РМЖ, как известно, является гетерогенным и в свою очередь делится на подгруппы [100]. В нашем исследовании были включены все варианты люминального рака. Превалирующим подтипом были опухоли люминального А РМЖ (49 больных). В 30 наблюдениях опухоли имели характеристики люминального подтипа В без гиперэкспрессии Her-2/neu и в 22 случаях больные имели опухоль люминального подтипа В с гиперэкспрессией Her-2/neu. Представленные группы пациенток были сопоставимы и репрезентативны для статистического анализа. Нами было показано, что процент экспрессии GATA3, FOXA1, ELF5 не отличался в зависимости от варианта люминального РМЖ. Полученный факт свидетельствует о том, что в большинстве случаев экспрессия изученных ТФ является «конституциональной» и характерной для любых вариантов люминального РМЖ. Однако нами были обнаружены достоверные статистические различия в размерах первичной опухоли у больных с люминальным В Her-2/neu/позитивным РМЖ. Опухоли с данными

молекулярными характеристиками имели наибольший размер новообразования по сравнению с карциномами люминального А и люминального В Her-2/neu отрицательного РМЖ. Полученные результаты согласуются с литературными данными и подтверждают неблагоприятное биологическое значение гиперэкспрессии онкопротеина Her-2/neu [124, 159]. В нашем исследовании все пациентки с данным подтипом получали терапию трастузумабом в адьювантном режиме.

При дальнейшем анализе мы разделили всех больных в зависимости от количества факторов транскрипции, определяемых в опухоли. Впервые нами была обнаружена корреляция размера новообразования с количеством экспрессируемых изученных ТФ в клетках опухоли молочной железы. При снижении числа позитивных маркеров отмечалось увеличение размера первичной опухоли. Полученные данные могут свидетельствовать о том, что потеря транскрипционной активности факторов FOXA1 и ELF5 детерминирует дифференцировку злокачественных клеток, что, вероятнее всего, и влечет за собой рост опухолевого узла, а в дальнейшем обуславливает неблагоприятный прогноз для больных, повышая риск развития лимфогенных и гематогенных метастазов. Аналогичная корреляция ранее была показана в отношении ТФ GATA3. При снижении уровня экспрессии данного маркера отмечался больший размер новообразования [114].

Определяющей клинико-морфологической характеристикой при оценке прогноза рака молочной железы является степень дифференцировки карциномы [100, 199, 130]. Нами было обнаружено, что частота экспрессии FOXA1 в опухолевых клетках связана со степенью злокачественности карциномы. При нарастании grade, увеличивалось число случаев с отсутствием окрашивания к данному ТФ. Обнаруженные изменения при люминальном РМЖ подтверждают функциональную биологическую роль данного фактора транскрипции в патогенезе. Согласно литературным данным FOXA1 обладает способностью регулировать дифференцировку люминальных клеток их пролиферативную активность и инвазивные свойства [10, 85].

В научной литературе активно обсуждается роль опухолевого микроокружения в патогенезе и прогнозе РМЖ [109]. В нашем исследовании мы проводили полуколичественный анализ соотношения паренхиматозного стромального компонентов опухоли, наличие феномена ретракции в опухоли, феномена краудинга в структурах инвазивной карциномы и оценивалась степень инфильтрации иммунокомпетентными клетками. Полученные значения соотношения стромального и паренхиматозного компонентов в зависимости от экспрессии изученных факторов в клетках первичной опухоли существенно не отличались. Однако нами была обнаружена связь частоты позитивного окрашивания FOXA1 со степенью выраженности инфильтрации иммунными клетками в строме опухоли. В случаях, когда наблюдалась выраженная воспалительная инфильтрация, чаще отмечалась негативная экспрессия FOXA1 в клетках карциномы молочной железы. Данный факт описан нами впервые и требует дальнейшего изучения в отношении возможного влияния внутриопухолевых инфильтрирующих иммунных клеток на экспрессию фактора FOXA1. В ряде исследований на клеточной линии мышей MCF-7 были получены данные, которые могут объяснять сложное взаимодействие ТФ FOXA1 с IL-6,8 по средствам регуляции транскрипционной программы FOXA1/ER [84, 197]. В отношении факторов GATA3 и ELF5 подобных зависимостей нами обнаружено не было. Однако, по данным литературы известно, что ТФ GATA3 определяет дифференцировку Т-клеток [73, 94, 196].

Важными морфологическими признаками в опухоли считаются феномен ретракции и краудинга, играющие роль в патогенезе не только РМЖ, но и опухолей других локализаций, в частности при колоректальном раке и раке предстательной железы. Известно, что оба этих феномена на морфологическом уровне могут отражать молекулярные механизмы, лежащие в основе ЭМП [97]. Высокий уровень экспрессии фактора ELF5 в клеточной линии люминальных клеток ингибирует эпителиально-мезенхимальный переход посредством прямого угнетения транскрипции фактора Snail2/Slug, являющегося индуктором процесса эпителиально-мезенхимального перехода. ELF5 является ключевым регулятором

механизмов не только в реализации клеточной дифференцировки во время нормального развития молочной железы, но и в процессах приобретения злокачественно трансформированными эпителиальными клетками мезенхимальных свойств, определяющих метастазирование при раке молочной железы [178, 63, 42, 57, 171]. В нашем исследовании была обнаружена связь характера экспрессии GATA3 и ELF5 в зависимости от описанных феноменов. В случаях, когда в опухолевых клетках отмечалась гетерогенная экспрессия GATA3, в опухоли был обнаружен феномен ретракции, а характер распределения ELF5 в опухолевых клетках карциномы молочной железы был ассоциирован с краудингом. Обнаруженная нами связь, говорит о важнейшей роли изучаемых ТФ в механизмах ЭМП, а, следовательно, и высоком риске развития как лимфогенных, так и гематогенных метастазов.

С учетом имеющихся данных о том, что FOXA1 и GATA3 являются ER-ассоциированными кофакторами, обеспечивающими регуляцию транскрипции, передачу внутриклеточных сигналов и связывание стероидных рецепторов ER и AR с молекулярными структурами ДНК для формирования устойчивого рецептор-чувствительного комплекса [29]. В свою очередь известно, что ER-положительные опухоли без экспрессии PR усиливают передачу сигналов факторов роста через PI3K/Akt/mTOR путь, который играет ключевую роль в патогенезе и прогрессии РМЖ [138]. Проведенный нами анализ отчетливо демонстрирует связь изученных транскрипционных факторов с параметрами рецепторного статуса первичной опухоли. Было обнаружено, что в опухолях с отсутствием экспрессии FOXA1 снижается уровень экспрессии ER, что может служить признаком не только худшего прогноза течения болезни. В нашем исследовании обнаружено, что в опухолях без экспрессии рецептора прогестерона достоверно ниже был процент экспрессии GATA3 и FOXA1 в злокачественных клетках. Характер распределения клеток, имеющих позитивное окрашивание к фактору FOXA1 также оказывал влияние на уровень экспрессии рецепторов прогестерона в опухоли. Полученные данные свидетельствуют о тесной взаимосвязи, в первую очередь, факторов FOXA1 и GATA3 с параметрами

рецепторного статуса люминального РМЖ и через экспрессию рецептора прогестерона функционально оказывать влияние на рецепторы эстрогенов, что в конечном итоге может предопределить потенциальную чувствительность к антиэстрогеновой терапии.

Конечным результатом воздействия эстрогена при люминальном РМЖ является запуск процессов транскрипции и пролиферации опухолевых клеток [122]. Показатель пролиферативной активности (Ki67) при люминальных подтипах РМЖ считается критерием деления люминального РМЖ на подтипы и служит фактором прогноза. В нашем исследовании индекс пролиферации был довольно вариабельным и варьировал в диапазоне от 1 % до 73,8 % опухолевых клеток. Однако большая часть новообразований имела Ki67 менее 20 %. Количественная оценка ТФ FOXA1, GATA3 и ELF5 не выявила существенных отличий в исследуемой группе больных в зависимости от индекса пролиферативной активности. Наиболее значимым фактором, сопряженным с высоким уровнем Ki67 опухолевых клеток, явилось отсутствие экспрессии FOXA1 в опухоли. Пациентки, в опухоли которых не обнаружена экспрессия FOXA1, статистически чаще имели индекс пролиферативной активности более 20 %. Проллиферативная активность опухолевых клеток в нашем исследовании отличалась в зависимости от степени злокачественности карциномы молочной железы. Наибольшие показатели Ki67 отмечались у больных с опухолями grade 2-3. Полученный факт согласуется с результатами других исследований [124].

Регионарное метастазирование при РМЖ является не только критерием при выборе объема проводимого комбинированного лечения, но и одним из важных прогностических критериев, сопряженных с развитием отдаленных метастазов, определяющих исход заболевания [2, 3]. Несмотря на то, что люминальный РМЖ характеризуется благоприятным течением, в нашем исследовании метастатическое поражение регионарных лимфатических узлов по результатам исследования операционного материала было выявлено в 35,6 % случаев. Важно подчеркнуть, что наиболее значимым параметром, ассоциированным с частотой лимфогенного метастазирования, явился размер первичной опухоли, что

подтверждалось наличием положительной корреляции. Другие клинико-морфологические параметры, такие как степень злокачественности, состояние менструальной функции, характер роста новообразования, вариант люминального РМЖ не были значимо связаны со статусом регионарных ЛУ. Проведенная оценка процента экспрессии ТФ в зависимости от состояния ЛУ, выявила статистические различия для GATA3 и FOXA1. При наличии регионарных метастазов, процент экспрессии GATA3 и FOXA1 был значимо ниже, в сравнении с группой больных без пораженных метастазами ЛУ. Следует отметить, что гомогенный характер экспрессии всех изученных ТФ, был значимо сопряжен с большей частотой метастатического поражения регионарных ЛУ.

Важной частью нашего исследования явился анализ изучаемых параметров первичной опухоли с частотой развития гематогенных метастазов, возникших при динамическом наблюдении пациенток с люминальным РМЖ. Развитие метастатических очагов в висцеральных органах или скелете является отражением прогрессии болезни, в основе которого могут лежать с одной стороны – агрессивные биологические потенции самих опухолевых клеток, с другой – возникшая вторичная резистентность к проводимому лечению [82]. В связи с этим, особый интерес вызывала оценка экспрессионных характеристик изучаемых транскрипционных факторов с данной формой опухолевой прогрессии.

Проанализировав частоту развития отдалённых метастазов в зависимости от основных клинико-морфологических параметров первичной опухоли, мы показали, что наибольшую сопряженность имели такие признаки как: размер новообразования, наличие регионарных метастазов. В исследованной группе больных отмечалась отчетливая тенденция к зависимости частоты гематогенной диссеминации от степени злокачественности карциномы. При этом, частота отдаленного метастазирования статистически не зависела от варианта люминального РМЖ и параметров пролиферативной активности опухолевых клеток.

Анализ связи транскрипционных факторов FOXA1 и ELF5 выявил

значимые различия в проценте экспрессии в группах больных, имеющих различное течение опухолевой болезни. Нами обнаружено, что развитие гематогенных метастазов сопряжено со снижением процента экспрессии указанных ТФ. Кроме того, было показано, что гетерогенный характер распределения опухолевых клеток с позитивным окрашиванием к ТФ FOXA1 и ELF5 сопряжен с большей частотой развития гематогенных метастазов.

Обнаруженный нами факт связи характера экспрессии (гомогенный или гетерогенный) по-разному был взаимосвязан с такими формами опухолевой прогрессии как лимфогенное и гематогенное метастазирование. Большая частота лимфогенного метастазирования связана с гомогенным окрашиванием опухолевых клеток, в то время как частота гематогенной диссеминации, была ассоциирована с гетерогенным распределением ТФ в опухолевых клетках. Полученный феномен может быть объяснен с позиции независимости форм опухолевой прогрессии. По-видимому, субпопуляции опухолевых клеток люминальных карцином молочной железы характеризуются различными потенциями и биологическими свойствами, сопряженными с тем или иным вариантом метастазирования. Это согласуется с результатами исследования *in vivo*, где было показано, что гематогенные и лимфогенные метастазы обладают разными уровнями генетического разнообразия. [127]. Основываясь на интерметастатической гетерогенности, авторы показали, что метастазы в лимфатических узлах полифилетичны и поликлональны и развиваются совершенно иным эволюционным путем, чем гематогенные метастазы. Имеющиеся наблюдения предполагают меньшую селекцию для опухолевых клеток способных мигрировать и пролиферировать в регионарных ЛУ. Отдаленные метастазы, напротив, менее поликлональны, чем метастазы в лимфатических узлах, и обычно образуют монофилетические группы, указывающие на наличие более строгой клональной экспансии. Следовательно, наши данные также могут подтверждать представление о том, что лимфатические узлы и гематогенные метастазы у больных люминальным РМЖ могут развиваться посредством принципиально разных эволюционных механизмов, по-видимому,

сопряженных с характером экспрессии изученных ТФ. Однако для подтверждения данных результатов необходимы дополнительные исследования, позволяющие сопоставить молекулярно-биологические характеристики, в том числе по профилю изученных ТФ, первичных опухолей и метастатических очагов.

Проведенное исследование позволило разработать математическую модель прогнозирования вероятности гематогенного метастазирования у пациенток с люминальным подтипом РМЖ. Прогнозирование риска развития гематогенной диссеминации основано на исследовании гистологических и молекулярно-биологических характеристик первичной опухоли, включающих анализ транскрипционных факторов FOXA1 и ELF5. Чувствительность разработанной модели составила 97 %, специфичность – 79,4 %.

ВЫВОДЫ

1. Размер первичной опухоли при люминальном раке молочной железы связан с характером экспрессии транскрипционного фактора FOXA1 и наличием экспрессии ELF5. Новообразования ≥ 2 см чаще наблюдаются при гетерогенном распределении FOXA1 ($p = 0,022$) и отсутствии экспрессии ELF5 в клетках опухоли ($p = 0,017$). Снижение количества экспрессируемых факторов транскрипции клетками карциномы взаимосвязано с увеличением размера новообразования ($p = 0,03$).

2. Экспрессия транскрипционных факторов FOXA1, GATA3, ELF5 не зависит от возраста пациенток, состояния менструальной функции, характера роста новообразования и варианта люминального субтипа рака молочной железы. 78,22 % люминальных опухолей имеют фенотип FOXA1+GATA3+ELF5+. Частота экспрессии FOXA1 связана со степенью злокачественности карциномы ($\chi^2 = 9,07$, $p = 0,01$) и выраженностью инфильтрации иммунными клетками в строме ($\chi^2 = 8,4$, $p = 0,01$). Характер экспрессии GATA3 и ELF5 в опухоли сопряжен с феноменом ретракции и краудинга ($\chi^2 = 4,9$, $p = 0,02$ и $\chi^2 = 4,6$, $p = 0,03$ соответственно).

3. Отсутствие в опухоли транскрипционного фактора FOXA1 ассоциировано с низким процентом экспрессии ER ($p = 0,04$) и высокой пролиферативной активностью клеток ($Ki67 \geq 20\%$; $p = 0,025$). Люминальный рак молочной железы с отрицательной экспрессией PR характеризуется снижением процента экспрессии GATA3 и FOXA1 в опухоли ($p = 0,0002$ и $p = 0,02$ соответственно). Характер экспрессии фактора FOXA1 сопряжен с процентом экспрессии PR в карциномах люминального подтипа ($p = 0,001$). Процент ER в опухолевых клетках не отличается в зависимости от наличия экспрессии GATA3 ($p = 0,55$).

4. Частота лимфогенного метастазирования у больных люминальным раком молочной железы связана с гомогенным характером экспрессии GATA3, FOXA1 и ELF5 клетками первичной опухоли. При развитии метастазов в

регионарных лимфатических узлах отмечается снижение процента экспрессии GATA3, FOXA1 в опухоли ($p = 0,001$ и $p = 0,045$ соответственно).

5. Отдаленные метастазы у больных люминальным раком молочной железы чаще наблюдаются при гетерогенной экспрессии в опухоли факторов FOXA1 ($\chi^2 = 6,42$, $p = 0,01$) и ELF5 ($\chi^2 = 14,46$, $p = 0,0001$). Развитие гематогенных метастазов сопряжено с низким процентом экспрессии факторов FOXA1 и ELF5 ($p = 0,000015$ и $p = 0,000002$ соответственно) и взаимосвязано со снижением экспрессии ER и PR в первичной опухоли ($p = 0,02$ и $p = 0,038$ соответственно).

6. Разработана математическая модель для прогнозирования вероятности риска гематогенного метастазирования у больных с люминальным подтипом рака молочной железы и включает морфологические и молекулярные параметры (grade опухоли, состояние лимфатических узлов, наличие феномена ретракции в опухоли, характер экспрессии FOXA1, наличие экспрессии ELF5, уровень пролиферативной активности – Ki67). Степень достоверности модели $\chi^2 = 51,47$; $p = 0,0000$. Чувствительность – 97 %, специфичность – 79,4 %.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для прогнозирования отдаленного метастазирования при люминальном РМЖ важно оценивать по операционному материалу комплекс параметров: степень гистологической злокачественности опухоли (grade), состояние регионарных лимфатических узлов, наличие феномена ретракции в опухоли, характер экспрессии в опухоли FOXA1, наличие экспрессии в опухоли ELF5, уровень – Ki67.

2. Расчет вероятности риска гематогенного метастазирования при люминальном раке молочной железы проводят по следующей формуле:

$$Y = -47,3186 + 2,4630 \times X_1 + 2,34527 \times X_2 + 0,08 \times X_3 - 1,76 \times X_4 + 21 \times X_5 - 1,29 \times X_6$$

где Y – значение уравнения регрессии;

(–47,3186) – значение коэффициента регрессии свободного члена;

X_1 – степень гистологической злокачественности опухоли (1 балл – опухоль имеет grade 1; 2 балла – опухоль имеет grade 2; 3 балла – опухоль имеет grade 3);

(2,4630) – значение коэффициента регрессии признака X_1 ;

X_2 – наличие лимфогенных метастазов в регионарных лимфатических узлах (1 балл – нет метастазов, 2 балла – имеются метастазы в регионарных лимфатических узлах);

(2,34527) – значение коэффициента регрессии признака X_2 ;

X_3 – наличие в опухолевой ткани феномена ретракции (1 балл – ретракция отсутствует; 2 балла – феномен ретракции в ткани опухоли присутствует);

(0,08) – значение коэффициента регрессии признака X_3 ;

X_4 – характер экспрессии FOXA1 в опухоли (1 балл – гомогенная экспрессия; 2 балла – гетерогенная экспрессия);

(–1,76) – значение коэффициента регрессии признака X_4 ;

X_5 – наличие экспрессии ELF5 в опухоли (1 балл – нет, ELF5; 2 балла – есть);

(21) – значение коэффициента регрессии признака X_5 ;

X_6 – уровень пролиферативной экспрессии Ki67 (1 балл – экспрессия Ki67 в опухолях $< 20\%$; 2 балла – экспрессия Ki67 в опухолях $\geq 20\%$);

$(-1,29)$ – значение коэффициента регрессии признака X_6 .

Вероятность развития гематогенных метастазов определяют по следующей математической формуле:

$$P = e^Y / (1 + e^Y),$$

где P – значение вероятности развития признака;

Y – значение уравнения регрессии;

e – математическая константа, равная 2,72.

При вероятности $P \geq 50\%$ определяют высокий риск развития отдаленного метастазирования, при вероятности $P < 50\%$ определяют низкий риск развития отдаленных метастазов (степень достоверности математической модели $\chi^2 = 51,47$; $p = 0,0000$). Чувствительность разработанной модели составила 97% , специфичность – $79,4\%$.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

абс. ч. – абсолютное число

ИГХ – иммуногистохимическое исследование

РМЖ – рак молочной железы

ТФ – транскрипционные факторы

ЛУ – лимфатические узлы

М – среднее значение показателя

p – критерий значимости различий

r – коэффициент корреляции

S.D. – стандартное отклонение

ER – рецепторы эстрогена

PR – рецепторы прогестерона

Her2/neu – эпидермальный фактор роста

Ki67 – индекс пролиферативной активности

EGFR (epidermal growth factor receptor 1) – рецептор эпидермального фактора роста 1

IGF1R (insulin-like growth factor 1 receptor) – рецептор инсулиноподобного фактора роста 1

PI3K-I (Phosphoinositide 3-kinases-I) – фосфоиназитол-3-киназа-1

AKT1 (RAC-alpha-serine / threonine-proteinkinase) – RAC-альфа-серин-треониновой протеинкиназа-1

MARK (mitogen-activated protein kinase) – митоген-активируемая протеинкиназа

GATA3 (transcription factor GATA3) – транскрипционный фактор GATA3

FOXA1 (forkhead box protein A1) – транскрипционный фактор FOXA1

ELF5 (ETS-related transcription factor Elf-5) – транскрипционный фактор ELF5

EREs (ERexit sites) – элементы ответа эстрогена

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каприн, А. Д. Статистика злокачественных новообразований в России в 2018 г. (заболеваемость и смертность) / ред. А. Д. Каприн, В. В. Старинский, Г. В. Петрова. – МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019.
2. Практические рекомендации по лекарственному лечению инвазивного рака молочной железы / М. Б. Стенина, Л. Г. Жукова, И. А. Королева [и др.] // Злокачественные опухоли : Практические рекомендации RUSSCO. – 2017. – Т. 7. – С. 105–134. doi: 10.18027 / 2224–5057–2017–7–3 s2–105–134.
3. 14th St. Gallen International Breast Cancer Conference 2015: Evidence, Controversies, Consensus – Primary Therapy of Early Breast Cancer: Opinions Expressed by German Experts / C. Jackisch, N. Harbeck, J. Huober [et al.] // Breast Care. – 2015. – Vol. 10, № 3. – P. 211–219. doi: 10.1159/000433590.
4. A census of human transcription factors: function, expression and evolution / J. M. Vaquerizas, S. K. Kummerfeld, S. A. Teichmann, N. M. Luscombe // Nat Rev Genet. – 2009. – Vol. 10, № 14. – P. 252–263. doi: 10.1038/nrg2538.
5. A meta-analysis of gene expression profiling studies identifies clinically relevant oncogenic pathways in basal-like breast cancer / M. Ignatiadis, P. Bedard, B. Haibe-Kains [et al.] // Cancer Re. – 2009. – Vol. 69, № 24. – P. 69. doi: 10.1158/0008-5472.SABCS-09-106.
6. A systematic approach identifies FOXA1 as a key factor in the loss of epithelial traits during the epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer / H. Wang, C. A. Meyer, T. Fei [et al.] // BMC Genomics. – 2013. – Vol. 14. – P. 680. doi: 10.1186/1471-2164-14-680.
7. Accili, D. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation / D. Accili, K. C. Arden // Cell. – 2004. – Vol. 117, № 4. – P. 421–426. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00452-0.
8. Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer / D. R. Robinson, Y. N. Wu, P. Vats [et al.] // Nat.Genet. – 2013. – Vol. 45, № 12. – P. 1446–1451. doi:10.1038/ng.2823.

9. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase / S. Kato, H. Endoh, Y. Masuhiro [et al.] // *Science*. – 1995. – Vol. 270, № 5241. – P. 1491–1494. doi: 10.1126/science.270.5241.1491.
10. Ademuyiwa, F. O. Expression of Forkhead-box protein A1, a marker of luminal A type breast cancer, parallels low Oncotype DX 21-gene recurrence scores / F. O. Ademuyiwa, M. A. Thorat, R. K. Jain. // *Mod Pathol*. – 2010. Vol. 23, № 2. – P. 270–275. doi: org/10.1038/modpathol.2009.172.
11. Adjuvant radiotherapy of regional lymph nodes in breast cancer – a meta-analysis of randomized trials / W. Budach, K. Kammers, E. Boelke, C. Matuschek // *Radiat Oncol*. – 2013. – Vol. 8. – P. 267. doi: 10.1186/1748-717X-8-267.
12. Ali, S. Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance / S. Ali, R. C. Coombes // *Nat Rev Cancer*. – 2002. – № 2. – P. 101– 112. doi: 10.1038/nrc721.
13. Analyses of an epigenetic switch involved in the activation of pioneer factor FOXA1 leading to the prognostic value of estrogen receptor and FOXA1 co-expression in breast cancer / X. Jing, H. Liang, C. Hao [et al.] // *Aging*. – 2019. – Vol. 11, № 18. – P. 7442–7456. doi: 10.18632/aging.102250.
14. Analysis of differentially expressed genes in LNCaP prostate cancer progression model / B. X. Xie, H. Zhang, J. Wang [et al.] // *Androl*. – 2011. – Vol. 32, № 2. – P. 170–182. doi: 10.2164/jandrol.109.008748.
15. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomized trial / M. Baum, A. U. Budzar, J. Cuzick [et al.] // *Lancet*. – 2002. – Vol. 359, № 9324. – P. 2131–2139. doi: 10.1016/S0140-6736(02)09088-8.
16. Anticipatory estrogen activation of the unfolded protein response is linked to cell proliferation and poor survival in estrogen receptor alpha-positive breast cancer / N. Andruska, X. Zheng, X. Yang [et al.] // *Oncogene*. – 2015. – Vol. 34, № 29. – P. 3760–3769. doi: 10.1038/onc.2014.292.

17. Anticipatory UPR activation: a protective pathway and target in cancer / D. J. Shapiro, M. Livezey, L. Yu [et al.] // Trends Endocrinol Metab. – 2016. – Vol. 27, № 10. – P. 731–741.
18. Antiproliferative actions of the synthetic androgen, mibolerone, in breast cancer cells are mediated by both androgen and progesterone receptors / E. J. Cops, T. Bianco-Miotto, N. L. Moore [et al.] // J Steroid Biochem Mol Biol. – 2008. – Vol. 110, № 3-5. – P. 236–243. doi: 10.1016/j.jsbmb.2007.10.014.
19. Arao, Y. The F domain of estrogen receptor α is involved in species-specific, tamoxifen-mediated transactivation / Y. Arao, K. S. Korach // J Biol Chem. – 2018. – Vol. 293, № 22. – P. 8495–8507. doi: 10.1074/jbc.RA117.001212.
20. Association of double-positive FOXA1 and FOXP1 immunoreactivities with favorable prognosis of tamoxifen-treated breast cancer patients / N. Ijichi, T. Shigekawa, K. Ikeda [et al.] // Hormones & cancer. – 2012. – Vol. 3, № 4. – P. 147–159. doi: 10.1007/s12672-012-0111-0.
21. Badawy, A. Randomized controlled trial of three doses of letrozole for ovulation induction in patients with unexplained infertility / A. Badawy, M. Metwally, M. Fawzy // Reprod Biomed Online. – 2007. – Vol. 14, № 5. – P. 559–562. doi: 10.1016/s1472-6483(10)61046-2.
22. Bernardo, G. M. FOXA1: a transcription factor with parallel functions in development and cancer / G. M. Bernardo, R. A. Keri // Biosci. Rep. – 2012. – Vol. 32, № 2. – P. 113–130. doi: 10.1042/BSR20110046.
23. Bettelli, E. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF- κ B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells / E. Bettelli, M. Dastrange, M. Oukka // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2005. – Vol. 102, № 14. – P. 5138–5143. doi: 10.1073/pnas.0501675102.
24. Boyadjiev, S. A. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) as a knowledgebase for human developmental disorders / S. A. Boyadjiev, E. W. Jabs // Clin Genet. – 2000. – Vol. 57, № 4. – P. 253–266. doi: 10.1034/j.1399-0004.2000.570403.x.
25. Braxton, D. R. Utility of GATA3 immunohistochemistry for diagnosis of metastatic breast carcinoma in cytology specimens / D. R. Braxton, C. Cohen,

M. T. Siddiqui // Diagn Cytopathol. – 2015. – Vol. 43, № 4. – P. 271–277. doi: 10.1002/dc.23206.

26. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology / Z. Tao, A. Shi, C. Lu [et al.] // Cell Biochemistry and Biophysics. – 2015. – Vol. 72, № 2. – P. 333–338. doi: 10.1007/s12013-014-0459-6.

27. Capturing intra-tumor genetic heterogeneity by de novo mutation profiling of circulating cell-free tumor DNA: a proof-of-principle / L. D. Mattos-Arruda, B. Weigelt, J. Cortes [et al.] // Ann Oncol. – 2014. – Vol. 25, № 9. – P. 1729–1735. doi: 10.1093/annonc/mdu239.

28. Caramori, G. Expression of GATA family of transcription factors in T-cells, monocytes and bronchial biopsies / G. Caramori, S. Lim, K. Ito [et al.] // Eur. Respir. J. – 2001. – Vol. 18, № 3. – P. 466–473. doi: 10.1183/09031936.01.00040701.

29. Carroll, J. S. Mechanisms of oestrogen receptor (ER) gene regulation in breast cancer / J. S. Carroll // Eur. J. Endocrinol. – 2016. – Vol. 75, № 1. – P. 41–49. doi: 10.1530/EJE-16-0124.

30. CDK4/6 inhibition in breast cancer: current practice and future directions / S. Pernas, S. M. Tolaney, E. P. Winer, S. Goel // Ther Adv Med Oncol. – 2018. – Vol. 17. – P. 10. doi: 10.1177/1758835918786451.

31. Chen, S. An “Omics” Approach to Determine the Mechanisms of Acquired Aromatase Inhibitor Resistance / S. Chen // OMICS. – 2011. – Vol. 15, № 6. – P. 347–352. doi: 10.1089/omi.2010.0097.

32. Chen, W. Y. Exogenous and endogenous hormones and breast cancer / W. Y. Chen // Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. – 2008. – Vol. 22, № 4. – P. 573–585. doi: 10.1016/j.beem.2008.08.001.

33. Chlebowski, R. T. Menopausal hormone therapy and cancer: changing clinical observations of target site specificity / R. T. Chlebowski, G. L. Anderson // Steroids. – 2014. – Vol. 90. – P. 53–59. doi: 10.1016/j.steroids.2014.06.001.

34. Chou, J. GATA3 in development and cancer differentiation: cells GATA have it! / J. Chou, S. Provot, Z. Werb // J Cell Physiol. – 2010. – Vol. 222, № 1. – P. 42–49. doi: 10.1002/jcp.21943.

35. Clarke, C. L. Non-overlapping progesterone receptor cistromes contribute to cell-specific transcriptional outcomes / C. L. Clarke, J. D. Graham // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7, № 4. – P. e35859. doi: org/10.1371/journal.pone.0035859.
36. Clinical value of circulating ESR1 mutations for patients with metastatic breast cancer: a meta-analysis / K. Zhang, R. Hong, F. Xu [et al.] // Cancer Manag Res. – 2018. – Vol. 10. – P. 2573–2580. doi: 10.2147/CMAR.S173193.
37. Coates, A. S. Evolution of the St. Gallen Consensus process for the optimal treatment of women with breast cancer / A. S. Coates // The Breast. – 2015. – Vol. 24, № 1. – P. S1. doi.org/10.1016/S0960-9776(15)70003-2.
38. Co-expression of ER-beta and HER2 associated with poorer prognosis in primary breast cancer / W. S. Qui, L. Yue, A. P. Ding [et al.] // Clin Invest Med. – 2009. – Vol. 32, № 3. – P. E250–E260. doi: 10.25011/cim.v32i3.6114.
39. Coexpression of estrogen receptor alpha and beta: poor prognostic factors in human breast cancer? / V. Speirs, A. T. Parkes, M. J. Kerin [et al.] // Cancer Res. – 1999. – Vol. 59, № 3 – P. 525–528.
40. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours / D. C. Koboldt, R. Fulton, M. McLellan, H. Schmidt // Nature. – 2012. – Vol. 490. – P. 61–70. doi: org/10.1038/nature11412.
41. Comprehensive molecular portraits of invasive lobular breast Cancer / G. Ciriello, M. L. Gatza, A. H. Beck [et al.] // Cell. – 2015. – Vol. – 163, № 2. – P. 506–519. doi: 10.1016/j.cell.2015.09.033.
42. Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes / J. H. Taube, J. I. Herschkowitz, K. Komurov [et al.] // Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 2010. – Vol. 107, № 35. – P. 15449–15454. doi: 10.1073/pnas.1004900107.
43. Critical role for GATA3 in mediating Tie2 expression and function in large vessel endothelial cells / H. Song, J. Suehiro, Y. Kanki [et al.] // J Biol Chem. – 2009. – Vol. 284, № 42. – P. 29109–29124. doi: 10.1074/jbc.M109.041145.
44. Diagnostic utility and sensitivities of GATA3 antibodies in triple-negative breast cancer / G. Krings, M. Nystrom, I. Mehdi [et al.] // Hum Pathol. – 2014. –

Vol. 45, № 11. – P. 2225–2232. doi: org/10.1016/j.humpath.2014.06.022.

45. Differential expression of estrogen receptor α , β 1, and β 2 in lobular and ductal breast cancer / B. Huang, Y. Omoto, H. Iwase [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2014. – Vol. 111, № 5. – P. 1933–1938. doi: 10.1073/pnas.1323719111.

46. Differential oestrogen receptor binding is associated with clinical outcome in breast cancer / C. S. Ross-Innes, R. Stark, F. E. Teschendorff [et al.] // *Nature*. – 2012. – Vol. 481. – P. 389–393. doi: org/10.1038/nature10730.

47. Differential Regulation of Native Estrogen Receptor-Regulatory Elements by Estradiol, Tamoxifen, and Raloxifene / N. Levy, D. Tatomer, C. B. Herber [et al.] // *Mol. Endocrinol.* – 2008. – Vol. 22, № 2. – P. 287–303. doi: 10.1210/me.2007-0340.

48. Distinct breast cancer subtypes in women with early-onset disease across races / M. Singh, Y. Ding, L. Y. Zhang [et al.] // *Am J Cancer Res.* – 2014. – Vol. 4, № 4. – P. 337–352.

49. Dysfunction of the reciprocal feedback loop between GATA3- and ZEB2-nucleated repression programs contributes to breast cancer metastasis / W. Si, W. Huang, Y. Zheng [et al.] // *Cancer Cell*. – 2015. – Vol. 27, № 6. – P. 822–836. doi: 10.1016/j.ccell.2015.04.011.

50. Ebru, S. Clinical Aspects of Estrogen and Progesterone Receptors and ERBB2 Testing / S. Ebru, E. Sari, S. Yalcin // *Breast Disease*. – 2016. – P. 161–185. doi: org/10.1007/978-3-319-22843-3_9.

51. Effect of the normal mammary differentiation regulator ELF5 upon clinical outcomes of triple negative breast cancers patients / F. Omata, K. M. McNamara, K. Suzuki [et al.] // *Breast Cancer*. – 2018. – Vol. 25, № 4. – P. 489–496. doi: 10.1007/s12282-018-0842-z.

52. Elevated levels of FOXA1 facilitate androgen receptor chromatin binding resulting in a CRPC-like phenotype / J. L. Robinson, T. E. Hickey, A. Y. Warren [et al.] // *Oncogene*. – 2014. – Vol. 33, № 50. – P. 5666–5674. doi: 10.1038/onc.2013.508.

53. ELF5 and DOK7 regulation in anti-estrogen treated cells and tumors / L. M. Fitzgerald, E. P. Browne, K. D. Christie [et al.] // *Cancer Cell Int.* – 2016. – Vol. 16, № 8. – P. 1–11. doi: 10.1186/s12935-016-0282-9.

54. Elf5 conditional knockout mice reveal its role as a master regulator in mammary alveolar development: failure of Stat5 activation and functional differentiation in the absence of Elf5 / Y. S. Choi, R. Chakrabarti, R. Escamilla-Hernandez [et al.] // *Dev Biol.* – 2009. – Vol. 329, № 2. – P. 227–241. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.02.032.
55. ELF5 Drives Lung Metastasis in Luminal Breast Cancer through Recruitment of Gr1⁺ CD11b⁺ Myeloid-Derived Suppressor Cells / D. Gallego-Ortega, A. Ledger, D. L. Roden [et al.] // *PLoS Biol.* – 2015. – Vol. 13, № 12. – P. e1002330. doi: 10.1371/journal.pbio.1002330.
56. Elf5 inhibits TGF- β -driven epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer by repressing SMAD3 activation / B. Yao, J. Zhao, Y. Li [et al.] // *Prostate.* – 2015. – Vol. 75, № 8. – P. 872–882. doi: 10.1002/pros.22970.
57. Elf5 inhibits the epithelial-mesenchymal transition in mammary gland development and breast cancer metastasis by transcriptionally repressing Snail2 / R. Chakrabarti, J. Hwang, F. M. Blanco [et al.] // *Nat Cell Biol.* – 2012. – Vol. 14, № 11. – P. 1212–1222. doi: 10.1038/ncb2607.
58. Elf5 is essential for early embryogenesis and mammary gland development during pregnancy and lactation / J. Zhou, R. Chehab, J. Tkalcovic [et al.] // *EMBO J.* – 2005. – Vol. 24, № 3. – P. 635–644. doi: 10.1038/sj.emboj.7600538.
59. ELF5 suppresses estrogen sensitivity and underpins the acquisition of antiestrogen resistance in luminal breast cancer / M. Kalyuga, D. Gallego-Ortega, H. J. Lee [et al.] // *PLoS Biol.* – 2012. – Vol. 10, № 12. – P. e1001461. doi: 10.1371/journal.pbio.1001461.
60. Endocrine function of the postmenopausal ovary: concentration of androgens and estrogens in ovarian and peripheral vein blood / H. L. Judd, G. E. Judd, W. E. Lucas, S. S. Yen // *J Clin Endocrinol Metab.* – 1974. – Vol. 39, № 6. – P. 1020–1024. doi: 10.1210/jcem-39-6-1020.
61. Endocrine resistance in breast cancer: focus on the phosphatidylinositol 3-kinase/akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway / S. P. Hasson, T. Rubinek, L. Ryvo, I. Wolf // *Breast Care.* – 2013. – Vol. 8, № 4. – P. 248–255.

doi: 10.1159/000354757.

62. Epigenetic regulation of Elf5 is associated with epithelial-mesenchymal transition in urothelial cancer / B. Wu, X. Cao, X. Liang [et al.] // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, № 1. – P. e0117510. doi: 10.1371/journal.pone.0117510.

63. Epithelial-mesenchymal transition-derived cells exhibit multilineage differentiation potential similar to mesenchymal stem cells / V. L. Battula, K. W. Evans, B. G. Hollier [et al.] // Stem Cells. – 2010. – Vol. 28, № 8. – P. 1435–1445. doi: 10.1002/stem.467.

64. ESR1 ligand-binding domain mutations in hormoneresistant breast cancer / W. Toy, Y. Shen, H. Won [et al.] // Nat Genet. – 2013. – Vol. 45. – P. 1439–1445. doi.org/10.1038/ng.2822.

65. Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in postmenopausal women / R. T. Chlebowski, G. L. Anderson, M. Gass [et al.] // JAMA. – 2010. – Vol. 304, № 15. – P. 1684–1692. doi: 10.1001/jama.2010.1500.

66. Estrogen receptor alpha/beta ratio and estrogen receptor beta as predictors of endocrine therapy responsiveness-a randomized neoadjuvant trial comparison between anastrozole and tamoxifen for the treatment of postmenopausal breast cancer / M. Madeira, F. Mattar, F. F. Logullo [et al.] / BMC Cancer. – 2013. – Vol. 13. – P. 425. doi: 10.1186/1471-2407-13-425.

67. Estrogen receptor beta increases the efficacy of antiestrogens by effects on apoptosis and cell cycling in breast cancer cells / L. Hodges-Gallagher, C. D. Valentine, S. E. Bader, P. J. Kushner // Breast Cancer Res Treat. – 2008. – Vol. 109, № 2. – P. 241–250. doi: 10.1007/s10549-007-9640-6.

68. Estrogen receptor beta inhibits 17 beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D / A. Strom, J. Hartman, J. S. Foster [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. – 2004. – Vol. 101, № 6. – P. 1566–1571. doi: 10.1073/pnas.0308319100.

69. Estrogen receptor beta inhibits angiogenesis and growth of T47D breast cancer xenografts / J. Hartman, K. Lindberg, A. Morani [et al.] // Cancer Res. – 2006. – Vol. 66, № 23. – P. 11207–11213. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0017.

70. Estrogen receptor, progesterone receptor, human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), and epidermal growth factor receptor expression and benefit from lapatinib in a randomized trial of paclitaxel with lapatinib or placebo as first-line treatment in HER2-negative or unknown metastatic breast cancer / R. S. Finn, M. F. Press, J. Dering [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2009. – Vol. 27, № 24. – P. 3908–3915. doi: 10.1200/JCO.2008.18.1925.
71. Evans, T. Regulation of Cardiac Gene Expression by GATA-4/5/6 / T. Evans // *Trends in Cardiovascular Medicine.* – 1997. – Vol. 7, № 3. – P. 75–83. doi: org/10.1016/S1050-1738(97)00010-8.
72. Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer / C. E. Barbieri, S. C. Baca, M. S. Lawrence [et al.] // *Nat Genet.* – 2012. – Vol. 44, № 6. – P. 685–689. doi: 10.1038/ng.2279.
73. Expression of GATA-3 during lymphocyte differentiation and mouse embryogenesis / M. Oosterwegel, J. Timmerman, J. Leiden, H. Clevers // *Dev Immunol.* – 1992. – Vol. 3, № 1. – P. 1–11. doi: 10.1155/1992/27903.
74. Fan, W. Endocrine therapy resistance in breast cancer: current status, possible mechanisms and overcoming strategies / W. Fan, J. Chang, P. Fu // *Future Med Chem.* – 2015. – Vol. 7, № 12. – P. 1511–1519. doi: 10.4155/fmc.15.93
75. Fang, S. H. GATA-3 as a Marker of Hormone Response in Breast Cancer / S. H. Fang, Y. Chen, R. J. Weigel // *J Surg Res.* – 2009. – Vol. 157, № 2. – P. 290–295. doi: 10.1016/j.jss.2008.07.015.
76. Font de Mora, J. AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor / J. Font de Mora, M. Brown // *Mol Cell Biol.* – 2000. – Vol. 20, № 14. – P. 5041–5047. doi: 10.1128/MCB.20.14.5041-5047.2000.
77. Fox, E. M. ER beta in breast cancer – onlooker, passive player, or active protector? / E. M. Fox, R. J. Davis, M. A. Shupnik // *Steroids.* – 2008. – Vol. 73, № 11. – P. 1039–1051. doi: 10.1016/j.steroids.2008.04.006.
78. FOXA1 and AR in invasive breast cancer: new findings on their co-expression and impact on prognosis in ER-positive patients / N. Rangel, N. Fortunati, S. Osella-Abate [et al.] // *BMC Cancer.* – 2018. – Vol. 18, № 1. – P. 703. doi:

10.1186/s12885-018-4624-y.

79. FoxA1 as a lineage-specific oncogene in luminal type breast cancer / N. Yamaguchi, E. Ito, S. Azuma [et al.] // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2008. – Vol. 365, № 4. – P. 711–717. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.11.064.
80. FOXA1 defines cancer cell specificity / G. Zhang, Y. Zhao, Y. Liu [et al.] // Sci Adv. – 2016. – Vol. 2, № 3. – P. e1501473. doi: 10.1126/sciadv.1501473.
81. FOXA1 is a key determinant of estrogen receptor function and endocrine response / A. Hurtado, K. A. Holmes, C. S. Ross-Innes [et al.] // Nat. Genet. – 2011. – Vol. 43, № 1. – P. 27–33. doi: 10.1038/ng.730.
82. FOXA1 levels are decreased in pleural breast cancer metastases after adjuvant endocrine therapy, and this is associated with poor outcome / W. Schrijver, K. Schuurman, A. van Rossum [et al.] // Mol Oncol. – 2018. – Vol. 12, № 11. – P. 1884–1894. doi: 10.1002/1878-0261.12353.
83. FOXA1 mutations alter pioneering activity, differentiation, and prostate cancer phenotypes / E. J. Adams, W. R. Karthaus, E. Hoover [et al.] // Nature. – 2019. – Vol. 571, № 7765. – P. 408–412.
84. FOXA1 overexpression mediates endocrine resistance by altering the ER transcriptome and IL-8 expression in ER-positive breast cancer / X. Fu, R. Jeselsohn, R. Pereira [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2016. – Vol. 113, № 43. – P. 6600–6609. doi: 10.1073/pnas.1612835113.
85. FOXA1 represses the molecular phenotype of basal breast cancer cells / G. M. Bernardo, G. Bebek, C. L. Ginther [et al.] // Oncogene. – 2013. – Vol. 32, № 5. – P. 554–563. doi: 10.1038/onc.2012.62.
86. Fragomeni, S. M. Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer / S. M. Fragomeni, A. Sciallis, J. S. Jeruss // Surg Oncol Clin N Am. – 2019. – Vol. 27, № 1. – P. 95–120. doi: 10.1016/j.soc.2017.08.005.
87. Functional annotation of ESR1 gene fusions in estrogen receptor-positive breast cancer / J. T. Lei, J. Shao, J. Zhang [et al.] // Cell Rep. – 2018. – Vol. 24, № 6. – P. 1434–1444.

88. Gain- and loss-of-function mutations in the breast Cancer gene GATA3 result in differential drug sensitivity / B. Mair, T. Konopka, C. Kerzendorfer [et al.] // PLoS Genet. – 2016. – Vol. 12, № 19. – P. 1–26. doi: 10.1371/journal.pgen.1006279.
89. GATA-1 and GATA-2 gene expression is related to the severity of dysplasia in myelodysplastic syndrome / S. A. Fadilah, S. K. Cheong, H. Roslan [et al.] // Leukemia. – 2002. – Vol. 16, № 8. – P. 1563–1565. doi: 10.1038/sj.leu.2402517.
90. GATA3 acts upstream of FOXA1 in mediating ESR1 binding by shaping enhancer accessibility / V. Theodorou, R. Stark, S. Menon, J. S. Carroll // Genome Res. – 2013. – Vol. 23, № 1. – P. 12–22. doi: 10.1101/gr.139469.112.
91. GATA-3 expression in male and female breast cancers: comparison of clinicopathologic parameters and prognostic relevance / R. S. Gonzalez, J. Wang, T. Kraus [et al.] // Hum Pathol. – 2012. – Vol. – 44, № 6. – P. 1065–1070. doi: 10.1016/j.humpath.2012.09.010.
92. GATA3 frameshift mutation promotes tumor growth in human luminal breast cancer cells and induces transcriptional changes seen in primary GATA3 mutant breast cancers / J. P. Gustin, J. Miller, M. Farag [et al.] // Oncotarget. – 2017. – Vol. 8, № 61. – P. 103415–103427. doi: 10.18632/oncotarget.21910.
93. GATA3 inhibits breast cancer metastasis through the reversal of epithelial-mesenchymal transition / W. Yan, Q. J. Cao, R. B. Arenas [et al.] // J Biol Chem. – 2010. – Vol. – 285, № 18. – P. 14042–14051. doi: 10.1074/jbc.M110.105262.
94. Gata-3 is an essential regulator of mammarygland morphogenesis and luminal-cell differentiation / M. L. Asselin-Labat, K. D. Sutherland, H. Barker [et al.] // Nat Cell Biol. – 2007. – Vol. 9, № 2. – P. 201–209. doi: 10.1038/ncb1530.
95. GATA3 is selectively expressed in the trophectoderm of periimplantation embryo and directly regulates Cdx2 gene expression / P. Home, S. Ray, D. Dutta [et al.] // J Biol Chem. – 2009. – 284, № 42. – P. 28729–28737. doi: 10.1074/jbc.M109.016840.
96. GATA3 mutations define a unique subtype of luminal-like breast cancer with improved survival / Y. Z. Jiang, K. D. Yu, W. J. Zuo [et al.] // Cancer. – 2014. – Vol. 120, № 9. – P. 1329–1337. doi: 10.1002/cncr.28566.

97. GATA3 recruits UTX for gene transcriptional activation to suppress metastasis of breast cancer / W. Yu, W. Huang, Y. Yang [et al.] // *Cell Death & Disease*. – 2019. – Vol. 832, № 10. – P. 1–16. doi: [org/10.1038/s41419-019-2062-7](https://doi.org/10.1038/s41419-019-2062-7).
98. GATA3 zinc finger 2 mutations reprogram the breast cancer transcriptional network / M. Takaku, S. A. Grimm, J. D. Roberts [et al.] // *Nat Commun*. – 2018. – Vol. 9, № 01059. – P. 1–14. doi: [10.1038/s41467-018-03478-4](https://doi.org/10.1038/s41467-018-03478-4).
99. GATA-3: an unexpected regulator of cell lineage determination in skin / C. K. Kaufman, P. Zhou, H. Amalia Pasolli [et al.] // *Genes Dev*. – 2003. – Vol. 17, № 17. – P. 2108–2122. doi: [10.1101/gad.1115203](https://doi.org/10.1101/gad.1115203).
100. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications / T. Sørlie, C. M. Perou, R. Tibshirani [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2001. – Vol. 98, № 19. – P. 10869–10874. doi: [10.1073/pnas.191367098](https://doi.org/10.1073/pnas.191367098).
101. Genome-wide progesterone receptor binding: cell type-specific and shared mechanisms in T47D breast cancer cells and primary leiomyoma cells / P. Yin, D. Roqueiro, L. Huang [et al.] // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7, № 1. – P. e29021. doi: [10.1371/journal.pone.0029021](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029021).
102. Germline Genetic Variants in GATA3 and Breast Cancer Treatment Outcomes in SWOG S8897 Trial and the Pathways Study / V. Larsen, W. E. Barlow J. J. Yang [et al.] // *Clinical Breast Cancer*. – 2019. – Vol. 19, № 4. – P. 225–235. doi: [10.1016/j.clbc.2019.02.010](https://doi.org/10.1016/j.clbc.2019.02.010).
103. Growth factor signalling in endocrine and anti-growth factor resistant breast cancer / R. I. Nicholson, I. R. Hutcheson, H. E. Jones [et al.] // *Rev Endocr Metab Disord*. – 2007. – Vol. 8, № 3. – P. 241–53. doi: [10.1007/s11154-007-9033-5](https://doi.org/10.1007/s11154-007-9033-5).
104. Guillette, T. C. Duality of estrogen receptor beta action in cancer progression / T. C. Guillette, T. W. Jackson, S. M. Belcher // *Curr Opin Pharmacol*. – 2018. – Vol. 41. – P. 66–73. doi: [10.1016/j.coph.2018.05.001](https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.05.001).
105. Hagenbuchner, J. Targeting transcription factors by small compounds – Current strategies and future implications / J. Hagenbuchner, M. J. Ausserlechner // *Biochem Pharmacol*. – 2016. – Vol. 107. – P. 1–13. doi: [10.1016/j.bcp.2015.12.006](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.12.006).

106. Hamilton, E. Targeting CDK4/6 in patients with cancer / E. Hamilton, J. R. Infante // *Cancer Treatment Reviews*. – 2016. – Vol. 45. – P. 129–138. doi: [org/10.1016/j.ctrv.2016.03.002](https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.03.002).
107. Hannenhalli, S. The evolution of Fox genes and their role in development and disease / S. Hannenhalli, K. H. Kaestner // *Nat Rev Genet*. – 2009. – Vol. 10, № 4. – P. 233–240. doi: [10.1038/nrg2523](https://doi.org/10.1038/nrg2523).
108. Helsen, C. Structural basis for nuclear hormone receptor DNA binding / C. Helsen, S. Kerkhofs, L. Clinckemali // *Mol Cell Endocrinol*. – 2012. – Vol. – 348, № 2. – P. 411–417. doi: [org/10.1016/j.mce.2011.07.025](https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.07.025).
109. Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer / S. Y. Park, H. E. Lee, H. Li [et al.] // *Clin Cancer Res*. – 2010. – Vol. 16, № 3. – P. 876–887. doi: [10.1158/1078-0432.CCR-09-1532](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1532).
110. Higher levels of GATA3 predict better survival in women with breast cancer / N. K. Yoon, E. L. Maresh, D. Shen [et al.] // *Hum Pathol*. – 2010. – Vol. 41, № 12. – P. 1794–1801. doi: [10.1016/j.humpath.2010.06.010](https://doi.org/10.1016/j.humpath.2010.06.010).
111. Hilser, V. J. Structural dynamics, intrinsic disorder, and allostery in nuclear receptors as transcription factors / V. J. Hilser, E. B. Thompson // *J Biol Chem*. – 2011. – Vol. 286, № 46. – P. 39675–39682. doi: [10.1074/jbc.R111.278929](https://doi.org/10.1074/jbc.R111.278929).
112. Hormonal regulation of estradiol biosynthesis, aromatase activity, and aromatase mRNA in rat ovarian follicles and corpora lutea / J. S. Richards, G. J. Hickey, S. Chen [et al.] // *Steroids*. – 1987. – Vol. 50, № 4-6. – P. 393–409. doi: [org/10.1016/0039-128X\(87\)90027-4](https://doi.org/10.1016/0039-128X(87)90027-4).
113. Hydroxychloroquine inhibits autophagy to potentiate antiestrogen responsiveness in ER + breast cancer / K. L. Cook, A. Wärr, D. R. Soto-Pantoja [et al.] // *Clin Cancer Res*. – 2014. – Vol. 20, № 12. – P. 3222–3232. doi: [10.1158/1078-0432.CCR-13-3227](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-3227).
114. Identification of GATA3 as a breast cancer prognostic marker by global gene expression meta-analysis / R. Mehra, S. Varambally, L. Ding [et al.] // *Cancer Res*. – 2005. – Vol. – 65, № 24. – P. 11259–11264. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-05-2495](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2495).

115. Immunohistochemical evaluation of GATA3 expression in tumors and normal tissues: a useful immunomarker for breast and urothelial carcinomas / H. Liu, J. Shi, M. L. Wilkerson, F. Lin // *Am J Clin Pathol.* – 2012. – Vol. 138, № 1. – P. 57–64. doi: 10.1309/AJCP5UAFMSA9ZQBZ.

116. Immunohistochemically defined subtypes and outcome in occult breast carcinoma with axillary presentation / E. Montagna, V. Bagnardi, N. Rotmensz [et al.] // *Breast Cancer Res Treat.* – 2011. – Vol. 129, № 3. – P. 867–875. doi: 10.1007/s10549-011-1697-6.

117. Impact of GATA-3 and FOXA1 expression in patients with hormone receptor-positive/HER2-negative breast cancer / Y. Hisamatsu, E. Tokunaga, N. Yamashita [et al.] // *Breast cancer.* – 2015. – Vol. 22, № 5. – P. 520–528. doi: 10.1007/s12282-013-0515-x.

118. Increased activator protein-1 DNA binding and c-Jun NH2-terminal kinase activity in human breast tumors with acquired tamoxifen resistance / S. R. Johnston, B. Lu, G. K. Scott [et al.] // *Clin Cancer Res.* – 1999. – Vol. 5, № 2. – P. 251–256.

119. Increased expression of estrogen receptor beta mRNA in tamoxifen-resistant breast cancer patients / V. Speirs, C. Malone, D. S. Walton [et al.] // *Cancer Res.* – 1999. – Vol. 59. – P. 5421–5424.

120. Insulin-like growth factor-I receptor signaling in tamoxifen-resistant breast cancer: a supporting role to the epidermal growth factor receptor / J. M. Knowlden, I. R. Hutcheson, D. Barrow [et al.] // *Endocrinology.* – 2005. – Vol. 146. – P. 4609–4618. doi: 10.1210/en.2005-0247.

121. Investigation of the transcriptional changes underlying functional defects in the mammary glands of prolactin receptor knockout mice / C. J. Ormandy, M. Naylor, J. Harris [et al.] // *Recent Prog Horm Res.* – 2003. – Vol. 58. – P. 297–323. doi: 10.1210/rp.58.1.297.

122. Jordan, V. C. Selective estrogen-receptor modulators and antihormonal resistance in breast cancer / V. C. Jordan, B. W. O'Malley // *J Clin Oncol.* – 2007. – Vol. 25, № 36. – P. 5815–5824. doi: 10.1200/JCO.2007.11.3886.27

123. Jordan, V. C. Tamoxifen: catalyst for the change to targeted therapy / V. C. Jordan // *Eur. J. Cancer.* – 2008. – Vol. 44, № 1. – P. 30–38. doi: 10.1016/j.ejca.2007.11.002.
124. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer / M. C. U. Cheang, S. K. Chia, D. Voduc [et al.] // *J Natl Cancer Inst.* – 2009. – Vol. 101, № 10. – P. 736–750. doi: 10.1093/jnci/djp082.
125. Loss of the extraembryonic ectoderm in *Elf5* mutants leads to defects in embryonic patterning / M. Donnison, A. Beaton, H. W. Davey [et al.] // *Development.* – 2005. – Vol. 132. – P. 2299–2308. doi: 10.1242/dev.01819.
126. Low *FOXA1* expression predicts good response to neo-adjuvant chemotherapy resulting in good outcomes for luminal HER2-negative breast cancer cases / Y. Horimoto, F. Arakawa, N. Harada-Shoji [et al.] // *Br J Cancer.* – 2015. – Vol. 112, № 2. – P. 345–351. doi: 10.1038/bjc.2014.595.
127. Lymph node metastases develop through a wider evolutionary bottleneck than distant metastases / J. G. Reiter, W. T. Hung, I. H. Lee [et al.] // *Nat Genet.* – 2020. – Vol. 2, № 7. – P. 692–700. doi: 10.1038/s41588-020-0633-2.
128. McGowan, E. M. Effect of overexpression of progesterone receptor A on endogenous progestin-sensitive endpoint in breast cancer cells / E. M. McGowan, C. L. Clarke // *Mol Endocrinol.* – 1999. – Vol. 13, № 10. – P. 1657–1671. doi: org/10.1210/mend.13.10.0356.
129. McInerney, E. M. Different regions in activation function-1 of the human estrogen receptor required for antiestrogen- and estradiol-dependent transcription activation / E. M. McInerney, B. S. Katzenellenbogen // *J. Biol. Chem.* – 1996. – Vol. 271, № 39. – P. 24172–24178. doi: 10.1074/jbc.271.39.24172.
130. Mechanisms associated with resistance to tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer / R. Viedma-Rodríguez, L. Baiza-Gutman, L. Salamanca-Gómez [et al.] // *Oncol Rep.* – 2014. – Vol. 32, № 1. – P. 3–159. doi: 10.3892/or.2014.3190.
131. Mechanisms of aromatase inhibitor resistance / C. X. Ma, T. Reinert, I. Chmielewska, M. J. Ellis // *Ellis Nat Rev Cancer.* – 2015. – Vol. 15, № 5. – P. 261–275. doi: 10.1038/nrc3920.

132. Mechanisms of tumor regression and resistance to estrogen deprivation and fulvestrant in a model of estrogen receptor-positive, HER-2/neu-positive breast cancer / S. Massarweh, C. K. Osborne, S. Jiang [et al.] // *Cancer Res.* – 2006. – Vol. 66, № 16. – P. 8266–8273. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4045.

133. Microarray analysis reveals distinct gene expression profiles among different histologic types of endometrial cancer / J. I. Risinger, G. L. Maxwell, G. V. Chandramouli [et al.] // *Cancer Res.* – 2003. – Vol. 63, № 1. – P. 6–11. doi: Published January 2003.

134. MicroRNA-221/222 negatively regulates estrogen receptor alpha and is associated with tamoxifen resistance in breast cancer / J. J. Zhao, J. Lin, H. Yang [et al.] // *Biol Chem.* – 2008. – Vol. 283, № 45. – P. 31079–31086. doi: 10.1074/jbc.M806041200.

135. Miller, V. M. Vascular actions of estrogens: functional implications / V. M. Miller, S. P. Duckles // *Pharmacol Rev.* – 2008. – Vol. 60, № 2. – P. 210–241. doi: 10.1124/pr.107.08002.

136. Molecular mechanisms of endocrine resistance and their implication in the therapy of breast cancer / M. Zilli, A. Grassadonia, N. Tinari [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA).* – 2009. – Vol. 1795, № 1. – P. 62–81. doi: 10.1016/j.bbcan.2008.08.003.

137. Molecular portraits of human breast tumours / C. M. Perou, T. Sørli, M. B. Eisen [et al.] // *Nature.* – 2000. – Vol. 406. – P. 747–752. doi: org/10.1038/35021093.

138. Molecular profiles of progesterone receptor loss in human breast tumors / C. J. Creighton, C. K. Osborne, M. J. Vijver [et al.] // *Breast Cancer Res Treat.* – 2009. – Vol. 114, № 2. – P. 114, 287–299. doi: 10.1007/s10549-008-0017-2.

139. Molecular subtyping predict pathologic tumor response in early-stage breast cancer treated with neoadjuvant docetaxel plus capecitabine with or without trastuzumab / S. Bayraktar, M. Royce, L. Stork-Sloots [et al.] // *Med Oncol.* – 2014. – Vol. 31, № 10. – P. 163–173. doi: 10.1007/s12032-014-0163-9.52.

140. Mutant GATA3 actively promotes the growth of Normal and Malignant mammary cells / N. Emmanuel, K. F. Lofgren, E. A. Peterson [et al.] // *Anticancer Res.* – 2018. – Vol. 38, № 8. – P. 4435–4441. doi: 10.21873/anticancerres.12745.

141. Nakshatri, H. FOXA1 in breast cancer / H. Nakshatri, S. Badve // *Expert Rev Mol Med.* – 2009. – Vol. 5. – P. 11. doi: 10.1017/S1462399409001008.
142. Negative progesterone receptor status is an adverse prognostic factor for luminal B breast cancer / F. Wu, W. Huang, K. Chen [et al.] // *Int J Clin Exp Pathol.* – 2017. – Vol. 10, № 2. – P. 901–911.
143. Oesterreich, S. The search for ESR1 mutations in breast cancer / S. Oesterreich, N. E. Davidson // *Nat Genet.* – 2013. – Vol. 45, № 12. – P. 1415–1416. doi: 10.1038/ng.2831.
144. Osborne, C. K. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer / C. K. Osborne, R. Schiff // *Annu Rev Med.* – 2011. – Vol. 62. – P. 233–247. doi: 10.1146/annurev-med-070909-182917.
145. Osborne, C. K. Tamoxifen in the treatment of breast cancer / C. K. Osborne // *N. Engl. J. Med.* – 1998. – Vol. 339, № 22. – P. 1609–1618. doi: 10.1056/NEJM199811263392207.
146. Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progestin-driven mammary cancer / D. Schramek, A. Leibbrandt, V. Sigl [et al.] // *Nature.* – 2010. – Vol. 468, № 7320. – P. 98–102. doi: 10.1038/nature09387.
147. Papavassiliou, K. A. Transcription factor drug targets / K. A. Papavassiliou, A. G. Papavassiliou // *J. Cell Biochem.* – 2016. – Vol. 117, № 12. – P. 2693–2696. doi: 10.1002/jcb.25605.
148. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013 / A. Goldhirsch, E. P. Winer, A. S. Coates [et al.] // *Ann Oncol.* – 2013. – Vol. 24, № 9. – P. 2206–2223. doi: 10.1093/annonc/mdt303.
149. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer / A. Prat, J. S. Parker, O. Karginova [et al.] // *Breast Cancer Research.* – 2010. – Vol. 12. – P. R68. doi: 10.1186/bcr2635.
150. Plasma ESR1 mutations and the treatment of estrogen receptor-positive advanced breast cancer / C. Fribbens, B. O'Leary, L. Kilburn [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2016. – Vol. 34, № 25. – P. 2961–2968. doi: 10.1200/JCO.2016.67.3061.

151. Preclinical modeling of combined phosphatidylinositol-3-kinase inhibition with endocrine therapy for estrogen receptor-positive breast cancer / C. G. Sanchez, C. X. Ma, R. J. Crowder [et al.] // *Breast. Cancer Res.* – 2011. – Vol. 13, № 2. – P. 13–30. doi: 10.1186/bcr2833.

152. Progesterone drives mammary secretory differentiation via RankL-mediated induction of Elf5 in luminal progenitor cells / H. J. Lee, D. Gallego-Ortega, A. Ledger [et al.] // *Development.* – 2013. – Vol. 140, № 7. – P. 1397–1401. doi: 10.1242/dev.088948.

153. Progesterone induces adult mammary stem cell expansion / P. A. Joshi, H. W. Jackson, A. G. Beristain [et al.] // *Nature.* – 2010. – Vol. 465, № 7299. – P. 803–807. doi: 10.1038/nature09091 PMID: 20445538.

154. Progesterone receptor activation down regulates GATA3 by transcriptional repression and increased protein turnover promoting breast tumor growth / G. Izzo, G. Mercogliano, L. Venturutti [et al.] // *Breast Cancer Res.* – 2014. – Vol. 16. – P. 491. doi: 10.1186/s13058-014-0491-x.

155. Progesterone receptor loss identifies luminal B breast cancer subgroups at higher risk of relapse / G. Cancelli, P. Maisonneuve, N. Rotmensz [et al.] // *Ann Oncol.* – 2013. – Vol. 24, № 3. – P. 661–668. doi: 10.1093/annonc/mds430.

156. Progesterone/RANKL is a major regulatory axis in the human breast / T. Tanos, G. Sflomos, P. C. Echeverria [et al.] // *Sci Transl Med.* – 2013. – Vol. 5, № 182. – P. 182ra55. doi: 10.1126/scitranslmed.3005654.

157. Prognostic implications of receptor discordance between primary and recurrent breast cancer / A. Matsumoto, H. Jinno, T. Murata [et al.] // *Int J Clin Oncol.* – 2015. – Vol. 20, № 4. – P. 701–708. doi: 10.1007/s10147-014-0759-2.

158. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer / A. Prat, M. C. U. Cheang, M. Martin [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2013. – Vol. 31, № 2. – P. 203–209. doi: 10.1200/JCO.2012.43.4134.

159. Prognostic value of proliferation assay in the luminal, HER2-positive, and triple-negative biologic classes of breast cancer / M. A. Aleskandarany, A. R. Green,

A. A. Benhasouna [et al.] // *Breast Cancer Res.* – 2012. – Vol. 14, № 1. – P. R3. doi: 10.1186/bcr3084.

160. Quantitative ER and PgR assessment as predictors of benefit from lapatinib in postmenopausal women with hormone receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer / R. S. Finn, M. F. Press, J. Dering [et al.] // *Clin Cancer Res.* – 2014. – Vol. 20, № 3. – P. 736–743. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1260.

161. Ralston, A. Gata3 regulates trophoblast development downstream of Tead4 and in parallel to Cdx2 / A. Ralston, B. J. Cox, N. Nishioka / *Development.* – 2010. – Vol. 137, № 3. – P. 395–403. doi: 10.1242/dev.038828.

162. Recurrent hyperactive ESR1 fusion proteins in endocrine therapy-resistant breast cancer / R. J. Hartmaier, S. E. Trabucco, N. Friedigkeit [et al.] // *Ann Oncol.* – 2018. – Vol. 29, № 4. – P. 872–880. doi: 10.1093/annonc/mdy025.

163. Revealing clonality and subclonality of driver genes for clinical survival benefits in breast cancer / Y. Lan, E. Zhao, S. Luo [et al.] // *Breast Cancer Res Treat.* – 2019. – Vol. 175, № 1. – P. 91–104. doi: 10.1007/s10549-019-05153-8.

164. Robinson, J. L. FOXA1 mutations in hormone-dependent cancers / J. L. Robinson, K. A. Holmes, J. S. Carroll // *Front Oncol.* – 2013. – Vol. 3. – P. 20. doi: 10.3389/fonc.2013.00020.

165. Sellheyer, K. Expression pattern of GATA-3 in embryonic and fetal human skin suggests a role in epidermal and follicular morphogenesis / K. Sellheyer, D. Krahel // *J Cutan Pathol.* – 2010. – Vol. 37, № 3. – P. 357–361. doi: 10.1111/j.1600-0560.2009.01416.x.

166. Seol, W. An orphan nuclear hormone receptor that lacks a DNA binding domain and heterodimerizes with other receptors / W. Seol, H. S. Choi, D. D Moore // *Science.* – 1996. – Vol. 272, № 5266. – P. 1336–1339. doi: 10.1126/science.272.5266.1336.

167. Serial regulation of transcriptional regulators in the yeast cell cycle / I. Simon, J. Barnett, N. Hannett [et al.] // *Cell.* – 2001. – Vol. 106, № 6. – P. 697–708. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00494-9.

168. Shigekawa, T. FOXP1, an estrogen-inducible transcription factor, modulates cell proliferation in breast cancer cells and 5-year recurrence-free survival of

patients with tamoxifen-treated breast cancer / T. Shigekawa, N. Ijichi, K. Ikeda // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2011. – Vol. 2, № 5. – P. 286–297. doi: 10.1007/s12672-011-0082-6.

169. Significance of the NOR1-FOXA1/HDAC2-Slug regulatory network in epithelial-mesenchymal transition of tumor cells / W. Wang, M. Yi, S. Chen [et al.] // Oncotarget. – 2016. – Vol. 7, № 13. – P. 16745–16759. doi: 10.18632/oncotarget.7778.

170. Slepicka, P. F. Pregnancy and Breast Cancer: Pathways to Understand Risk and Prevention / P. F. Slepicka, S. L. Cyrill, C. D. Santos // Trends Mol Med. – 2019. – Vol. 25, № 10. – P. 866–881. doi: 10.1016/j.molmed.2019.06.003. 2.

171. Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state / W. Guo, Z. Keckesova, J. L. Donaher [et al.] // Cell. – 2012. – Vol. 148, № 5. – P. 1015–1028. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.008.

172. Smith, I. E. Aromatase inhibitors in breast cancer / I. E. Smith, M. Dowsett // N Engl J Med. – 2003. – Vol. 348, № 24. – P. 2431–2442. doi: 10.1056/NEJMra023246.

173. Socs2 and elf5 mediate prolactin-induced mammary gland development / J. Harris, P. M. Stanford, K. Sutherland [et al.] // Molecular endocrinology. – 2006. – Vol. 20, № 5. – P. 1177–1187. doi: 10.1210/me.2005-0473.

174. Song, Y. Loss of FOXA1/2 is essential for the epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer / Y. Song, M. K. Washington, H. C. Crawford // Cancer Res. – 2010. – Vol. 70, № 5. – P. 2115–2125. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2979.

175. SOX10, GATA3, GCDFP15, Androgen Receptor, and Mammaglobin for the Differential Diagnosis Between Triple-negative Breast Cancer and TTF1-negative Lung Adenocarcinoma / E. Laurent, H. Begueret, B. Bonhomme [et al.] // Am J Surg Pathol. – 2019. – Vol. – 43, № 3. – P. 293–302. doi: 10.1097/PAS.0000000000001216.

176. Structural and functional properties of genes involved in human cancer / S. J. Furney, D. G. Higgins, C. A. Ouzounis, N. López-Bigas // BMC Genomics. – 2006. – Vol. 7, № 3. doi: 10.1186/1471-2164-7-3.

177. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse / M. Smid, Y. Wang, Y. Zhang [et al.] // Cancer Res. – 2008. – Vol. 68, № 9. – P. 3108–3114. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5644.

178. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells / S. A. Mani, W. Guo, M. G. Liao [et al.] // *Cell*. – 2008. – Vol. 133, № 4. – P. 704–715.

179. The Ets transcription factor ELF5 functions as a tumor suppressor in the kidney / E. J. Lapinskas, S. Svobodova, I. D. Davis [et al.] // *Twin Res Hum Genet*. – 2011. – Vol. 14, № 4. – P. 316–322. doi: 10.1375/twin.14.4.316.

180. The Ets transcription factor Elf5 specifies mammary alveolar cell fate / S. R. Oakes, M. J. Naylor, M. L. Asselin-Labat [et al.] // *Genes Dev*. – 2008. – Vol. 22, № 5. – P. 581–586. doi: 10.1101/gad.1614608.

181. The Evolving Role of the Estrogen Receptor Mutations in Endocrine Therapy-Resistant Breast Cancer / R. Jeselsohn, C. De Angelis, M. Brown, R. Schiff // *Curr Oncol Rep*. – 2017. – Vol. 19, № 5. – P. 35. doi: 10.1007/s11912-017-0591-8.

182. The Human Transcription Factors / S. A. Lambert, A. Jolma, L. F. Campitelli [et al.] // *Cell*. – 2018. – Vol. 172, № 4. – P. 650–665. doi: 10.1016/j.cell.2018.01.029.

183. The Lineage Determining Factor GRHL2 Collaborates with FOXA1 to Establish a Targetable Pathway in Endocrine Therapy-Resistant Breast Cancer / K. J. Cocce, J. S. Jasper, T. K. Desautels [et al.] // *Cell Reports*. – 2019. – Vol. 29, № 4. – P. 889–903. doi: org/10.1016/j.celrep.2019.09.032.

184. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms / Z. Hu, C. Fan, D. S Oh [et al.] // *BMC Genomics*. – 2006. – № 7. – P. 96. doi: 10.1186/1471-2164-7-96.

185. The Novel Marker GATA3 is Significantly More Sensitive Than Traditional Markers Mammaglobin and GCDFP15 for Identifying Breast Cancer in Surgical and Cytology Specimens of Metastatic and Matched Primary Tumors / A. R. Sangoi, B. Shrestha, G. Yang [et al.] // *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. – 2016. – Vol. 24, № 4. – P. 229–237. doi: 10.1097/PAI.0000000000000186.

186. The prevalence of estrogen receptor-1 mutation in advanced breast cancer: The estrogen receptor one study (EROS1) / O. Najim, M. Huizing, K. Papadimitriou [et al.] // *Cancer Treat Res Commun*. – 2019. – Vol. 19. – P. 100123. doi:

10.1016/j.ctarc.2019.100123.

187. The prognostic relevance of FOXA1 and Nestin expression in breast cancer metastases: a retrospective study of 164 cases during a 10-year period (2004-2014) / S. De Lara, J. Nyqvist, E. Werner Rönnerman [et al.] // *BMC Cancer*. – 2019. – Vol. 19, № 1. – P. 187. doi: 10.1186/s12885-019-5373-2.

188. The prognostic role of androgen receptor in patients with early-stage breast cancer: a meta-analysis of clinical and gene expression data / I. Bozovic-Spasojevic, D. Zardavas, S. Brohee [et al.] // *Clin Cancer Res*. – 2017. – Vol. 23, № 11. – P. 2702–2712. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0979.

189. The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines their genomic and transcriptomic landscapes / B. Pereira, S. F. Chin, O. M. Rueda [et al.] // *Nat Commun*. – 2016. – Vol. 7. – 11479 p. doi: 10.1038/ncomms11479.

190. Thomas, C. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy / C. Thomas, J. A. Gustafsson // *Nat Rev Cancer*. – 2011. – Vol. 11, № 8. – P. 597–608. doi:10.1038/nrc3093.

191. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Systemic Therapy for Women with Metastatic Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline / C. Van Poznak, M. R. Somerfield, R. C. Bast [et al.] // *J Clin Oncol*. – 2015. – Vol. 33, № 24. – P. 2695–2704. doi: 10.1200/JCO.2015.61.1459.

192. Various types and management of breast cancer: an overview / G. N. Sharma, R. Dave, J. Sanadya [et al.] // *J Adv. Pharm. Technol. Res*. – 2010. – Vol. 1, № 2. – P. 109–126.

193. Vuong, D. Molecular classification of breast cancer / D. Vuong, P. T. Simpson, B. Green // *Virchows Arch*. – 2014. – Vol. 465, № 1. – P. 1–14. doi: 10.1007/s00428-014-1593-7.

194. Watson, C. J. Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment / C. J. Watson, W. T. Khaled // *Development*. – 2008. – Vol. 135. – P. 995–1003. doi: 10.1242/dev.005439.

195. Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition / M. J. Ellis, L. Ding, D. Shen [et al.] // *Nature*. – 2012. – Vol. 486, № 7403.

– P. 353–360. doi: 10.1038/nature11143.

196. Yagi, R. An updated view on transcription factor GATA3-mediated regulation of Th1 and Th2 cell differentiation / R. Yagi, J. Zhu, W. E. Paul // *Int Immunol.* – 2011. – Vol. 23, № 7. – P. 415–420. doi: 10.1093/intimm/dxr029.

197. Yamaguchi, N. Down-regulation of Forkhead box protein A1 (FOXA1) leads to cancer stem cell-like properties in tamoxifen-resistant breast cancer cells through induction of interleukin-6 / N. Yamaguchi, Y. Nakayama, N. Yamaguchi // *J Biol Chem.* – 2017. – Vol. 292, № 20. – P. 8136–8148. doi: 10.1074/jbc.M116.763276.

198. Yeqing, A. Y. Current perspectives on FOXA1 regulation of androgen receptor signaling and prostate cancer / A. Y. Yeqing, J. Yu. // *Genes Dis.* – 2015. – Vol. 2, № 2. – P. 144–151. doi.org/10.1016/j.gendis.2015.01.003.

199. Yersal, O. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications / O. Yersal. S. Barutca // *World J of Clin Oncol.* – 2014. – Vol. 5, № 3. – P. 413–414. doi: 10.5306/wjco.v5.i3.412.

200. Zheng, R. GATA Transcription Factors and Cancer / R. Zheng, G. A. Blobel // *Genes Cancer.* – 2010 – Vol. 1, № 12. – P. 1178–1188. doi: 10.1177/1947601911404223.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

1. Рисунок 1 – Схема функционального строения доменов в структуре рецепторов эстрогена. С. 18
2. Рисунок 2 – Схема лиганд-зависимой и лиганд-независимой активации рецепторов эстрогенов. С. 19
3. Рисунок 3 – Схема регуляции транскрипционной активности при развитии резистентности к эндокринной терапии РМЖ. С. 21
4. Рисунок 4 – Инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$ С. 46
5. Рисунок 5 – Слабая степень выраженности стромального компонента (1 балл) инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа (grade 3). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$ С. 48
6. Рисунок 6 – Резко выраженный стромальный компонент (3 балла) инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$ С. 48
7. Рисунок 7 – Резко выраженный гиалиноз стромы (3 балла) инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$ С. 49
8. Рисунок 8 – Резко выраженная воспалительная инфильтрация стромы (3 балла) инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$ С. 49
9. Рисунок 9 – Наличие феномена краудинга в структурах инфильтративного компонента инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 630$ С. 50
10. Рисунок 10 – Наличие феномена ретракции вокруг структур

- инфильтративного компонента инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа (3 балла). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$ С. 51
11. Рисунок 11 – Позитивная ядерная экспрессия рецепторов к эстрогенам в структурах инфильтративного компонента инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа. Увеличение $\times 400$ С. 52
12. Рисунок 12 – Позитивная ядерная экспрессия рецепторов к прогестерону в инвазивной карциноме молочной железы неспецифического типа. Увеличение $\times 400$ С. 53
13. Рисунок 13 – Позитивное ядерное окрашивание с антителом к Ki67 в клетках инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа. Увеличение $\times 400$ С. 54
14. Рисунок 14 – Позитивная экспрессия фактора ELF5 (ядерная) в опухолевых клетках инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа. Увеличение $\times 200$ С. 56
15. Рисунок 15 – Позитивная экспрессия фактора ELF5 (ядерная) в опухолевых клетках инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа. Увеличение $\times 200$ С. 56
16. Рисунок 16 – Позитивная слабо интенсивная экспрессия фактора FOXA1 (ядерная) в опухолевых клетках инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа. Увеличение $\times 200$ С. 57
17. Рисунок 17 – Позитивная резко выраженная гомогенная экспрессия фактора GATA3 (ядерная) в опухолевых клетках инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа и фокусах DCIS. Увеличение $\times 200$ С. 57
18. Рисунок 18 – Позитивная гомогенная экспрессия фактора GATA3 (ядерная) в опухолевых клетках инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа. Увеличение $\times 100$ С. 58
19. Рисунок 19 – Позитивная гетерогенная экспрессия фактора ELF5

- (ядерная) в опухолевых клетках инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа. Увеличение $\times 100$ С. 58
20. Рисунок 20 – Позитивная гетерогенная экспрессия фактора ELF5 (ядерная) в опухолевых клетках инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа. Увеличение $\times 100$ С. 59
21. Рисунок 21 – Иммуногистохимическое исследование операционного материала, пациентка Т., 46 лет. Позитивная гетерогенная экспрессия фактора FOXA1 (ядерная) в опухолевых клетках инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа. Увеличение $\times 100$ С. 97
22. Рисунок 22 – Иммуногистохимическое исследование операционного материала, пациентка Б., 66 лет. Позитивная выраженная экспрессия фактора FOXA1 (ядерная) с гомогенным характером распределения в опухолевых клетках инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа. Увеличение $\times 100$ С. 99
23. Таблица 1 – Распределение больных раком молочной железы в зависимости от возраста. С. 42
24. Таблица 2 – Распределение больных раком молочной железы в зависимости от стадии заболевания. С. 43
25. Таблица 3 – Распределение больных раком молочной железы в зависимости от локализации опухоли. С. 44
26. Таблица 4 – Распределение больных раком молочной железы в зависимости от размера первичной опухоли. С. 44
27. Таблица 5 – Процент экспрессии GATA3, FOXA1 и ELF5 в клетках первичной опухоли в зависимости от состояния менструальной функции у больных люминальным подтипом РМЖ. С. 62
28. Таблица 6 – Распределение больных РМЖ в зависимости от размера первичной опухоли и характера экспрессии FOXA1 клетками. С. 63

29. Таблица 7 – Размер первичной опухоли в зависимости от наличия экспрессии опухолевыми клетками ELF5 у больных РМЖ. С. 63
30. Таблица 8 – Показатели экспрессии транскрипционных факторов в зависимости от размера первичного опухолевого узла у больных люминальным раком молочной железы. С. 64
31. Таблица 9 – Процент экспрессии транскрипционных факторов в зависимости от молекулярного подтипа опухоли у больных инвазивным РМЖ. С. 65
32. Таблица 10 – Размер первичной опухоли при разных вариантах люминального РМЖ. С. 66
33. Таблица 11 – Распределение больных люминальным подтипом рака молочной железы в зависимости от сочетания экспрессии транскрипционных факторов в первичной опухоли. С. 66
34. Таблица 12 – Распределение больных люминальным раком молочной железы в зависимости от количества транскрипционных факторов экспрессируемых в первичной опухоли. С. 67
35. Таблица 13 – Зависимость размера первичной опухоли от количества факторов транскрипции, экспрессируемых в опухоли. . . С. 68
36. Таблица 14 – Процент экспрессии GATA3, FOXA1, ELF5 в зависимости от степени гистологической злокачественности опухоли у больных люминальным РМЖ. С. 69
37. Таблица 15 – Зависимость наличия экспрессии FOXA1 от степени гистологической злокачественности опухоли у больных люминальным РМЖ. С. 70
38. Таблица 16 – Частота количества экспрессируемых факторов транскрипции в зависимости от степени гистологической злокачественности опухоли у больных люминальным молекулярным подтипом РМЖ. С. 70
39. Таблица 17 – Процент экспрессии GATA3, FOXA1, ELF5 от степени выраженности стромального компонента в опухоли при

люминальном РМЖ.	C. 71
40. Таблица 18 – Процент экспрессии GATA3, FOXA1 и ELF5 от степени выраженности инфильтрации иммунными клетками в опухоли.	C. 71
41. Таблица 19 – Частота экспрессии FOXA1 в зависимости от степени выраженности инфильтрации иммунным клетками в опухоли при люминальном молекулярном подтипе РМЖ.	C. 72
42. Таблица 20 – Взаимосвязь характера экспрессии GATA3 от феномена ретракции у больных люминальным раком молочной железы.	C. 73
43. Таблица 21 – Взаимосвязь характера экспрессии FOXA1 от феномена ретракции у больных инвазивным раком молочной железы.	C. 73
44. Таблица 22 – Взаимосвязь характера экспрессии ELF5 от феномена ретракции у больных инвазивным раком молочной железы.	C. 74
45. Таблица 23 – Взаимосвязь характера экспрессии ELF5 от феномена краудинга в опухоли у больных инвазивным раком молочной железы.	C. 74
46. Таблица 24 – Взаимосвязь характера экспрессии ELF5 от феномена краудинга в опухоли у больных инвазивным раком молочной железы.	C. 75
47. Таблица 25 – Процент рецепторов эстрогена и прогестерона в зависимости от экспрессии транскрипционных факторов GATA3, FOXA1, ELF5 у больных люминальным РМЖ.	C. 76
48. Таблица 26 – Взаимосвязь наличия экспрессии рецепторов прогестерона в зависимости от процента экспрессии GATA3 у больных люминальным раком молочной железы.	C. 77
49. Таблица 27 – Взаимосвязь наличия экспрессии рецепторов прогестерона в зависимости от процента экспрессии FOXA1 у больных люминальным раком молочной железы.	C. 78

50. Таблица 28 – Процент рецепторов прогестерона в зависимости от характера экспрессии транскрипционных факторов GATA3, FOXA1, ELF5 у больных люминальным РМЖ. С. 78
51. Таблица 29 – Распределение больных РМЖ в зависимости от уровня пролиферативной активности опухоли. С. 79
52. Таблица 30 – Процент экспрессии GATA3, FOXA1, ELF5 в зависимости от уровня пролиферативной активности опухоли. С. 80
53. Таблица 31 – Распределение больных люминальным РМЖ в зависимости от уровня пролиферативной активности опухоли и наличия экспрессии FOXA1. С. 80
54. Таблица 32 – Индекс пролиферативной активности опухоли в зависимости от количества экспрессируемых факторов транскрипции опухолевыми клетками. С. 81
55. Таблица 33 – Частота лимфогенного метастазирования в зависимости от варианта люминального подтипа опухоли у больных инвазивным раком молочной железы. С. 83
56. Таблица 34 – Экспрессия факторов транскрипции в зависимости от состояния регионарных лимфатических узлов у пациенток с люминальныммолекулярным подтипом рака молочной железы. С. 83
57. Таблица 35 – Частота лимфогенного метастазирования в зависимости от характера экспрессии FOXA1 у больных люминальным раком молочной железы. С. 84
58. Таблица 36 – Частота лимфогенного метастазирования в зависимости от характера экспрессии GATA3 у больных люминальным раком молочной железы. С. 84
59. Таблица 37 – Частота лимфогенного метастазирования в зависимости от характера экспрессии ELF5 у больных люминальным раком молочной железы. С. 85
60. Таблица 38 – Размер первичного опухолевого узла в зависимости от наличия отдаленных метастазов у больных люминальным РМЖ. С. 86

61. Таблица 39 – Распределение больных раком молочной железы в зависимости от степени гистологической злокачественности опухоли и наличия гематогенных метастазов. С. 87
62. Таблица 40 – Частота гематогенных метастазов в зависимости от состояния регионарных лимфатических узлов больных люминальным РМЖ. С. 88
63. Таблица 41 – Частота гематогенных метастазов в зависимости от варианта люминального подтипа РМЖ. С. 88
64. Таблица 42 – Частота развития отдаленных метастазов в зависимости от уровня пролиферативной активности в опухоли у больных люминальным РМЖ. С. 89
65. Таблица 43 – Показатели экспрессии рецепторов половых гормонов в опухоли в зависимости от наличия отдаленных метастазов у больных люминальным РМЖ. С. 90
66. Таблица 44 – Показатели экспрессии транскрипционных факторов в опухоли в зависимости от наличия отдаленных метастазов у больных люминальным РМЖ. С. 90
67. Таблица 45 – Частота гематогенного метастазирования в зависимости от характера распределения экспрессии маркеров FOXA1 и ELF5 у больных люминальным раком молочной железы. . С. 91
68. Таблица 46 – Частота отдаленных метастазов у больных люминальным РМЖ в зависимости от степени инфильтрации иммунными клетками в опухоли. С. 92
69. Таблица 47 – Частота развития отдаленных метастазов у больных люминальным РМЖ в зависимости от наличия феномена краудинга в опухоли. С. 92
70. Таблица 48 – Частота отдаленных метастазов у больных люминальным РМЖ в зависимости от выраженности феномена краудинга в опухоли. С. 93