

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РЕСПУБЛИКАНСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР
ОНКОЛОГИИ И МЕДИЦИНСКОЙ РАДИОЛОГИИ
ИМ. Н.Н. АЛЕКСАНДРОВА»**

УДК 618.19-006.55:616-08-07(476)

ШЛЯХТУНОВ
Евгений Александрович

**МИНИМАЛЬНАЯ ОСТАТОЧНАЯ БОЛЕЗНЬ ПРИ РАКЕ
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ – ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ**

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

по специальности 14.01.12 – онкология

Минск, 2022

Научная работа выполнена в учреждении образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Научный консультант: Семенов Валерий Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки Республики Беларусь, заведующий кафедрой инфекционных болезней учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Официальные оппоненты: Шмак Андрей Иванович, доктор медицинских наук, доцент, заведующий лабораторией абдоминальной онкопатологии государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»

Смолякова Раиса Михайловна, доктор биологических наук, профессор, заведующий клинико-диагностической лабораторией государственного учреждения «Республиканский клинический госпиталь инвалидов Великой Отечественной войны им. П.М. Машерова»

Титов Леонид Петрович, доктор медицинских наук, профессор, академик Национальной академии наук Беларуси, заведующий лабораторией клинической и экспериментальной микробиологии государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

Оппонирующая организация: Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет»

Защита состоится «26» октября 2022 г. в 14 ч. на заседании совета по защите диссертаций Д 03.12.01 при государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова» (223040, Минский р-н, агр. Лесной, E-mail: N.Artemova@omr.by, тел. +375173899561).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова».

Автореферат разослан «17» августа 2022 г.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций
доктор медицинских наук, доцент

Н.А. Артемова

ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы (РМЖ) – одна из самых частых онкологических патологий. В течение последних десятилетий отмечается неуклонный рост заболеваемости данной патологией. РМЖ занимает первое место среди злокачественных новообразований у женщин (не принимается во внимание рак кожи) [Семеглазов В. Ф., 2016]. В Республике Беларусь в 2019 году было зарегистрировано более 4946 новых случаев РМЖ [Океанов А. Е. и соавт., 2020].

В большинстве западных стран в последние годы снизились показатели смертности от РМЖ, особенно в более молодых возрастных группах, благодаря улучшению лечения и раннему выявлению заболевания [Семеглазов В. Ф., 2016]. Тем не менее РМЖ все еще остается ведущей причиной смерти среди всех причин онкологической смертности женщин, проживающих в Европе.

Опыт показывает, что при резектабельном раннем неметастатическом РМЖ после радикального проведенного лечения метастазирование наступает почти у половины пациентов в течение первых пяти лет, независимо от поражения регионарных лимфатических узлов [Cheng L. et al., 2012; Senkus E. et al., 2015]. В данном контексте на первый план выходит проблема возможного рецидива и, в свою очередь, подчеркивается важность минимальной остаточной болезни (МОБ).

В настоящее время представляет большой интерес область исследований, направленная на изучение характеристик клеток, которые способны выходить из первичной опухоли и выживать в периферической крови, таких как циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК), а также изучение механизмов, с помощью которых реализуются эти процессы. Следует обратить внимание, что уровни ЦОК являются критерием такого состояния, как МОБ. Поиск опухолевых клеток в крови, изучение их характеристик и анализ влияния на течение такого заболевания, как РМЖ, являются сегодня объектом интенсивных исследований в разных странах [Seyfried T. N., 2013; Lamouille S., Xu J., Derynck R., 2014; Pantel K., Alix-Panabières C., 2015]. РМЖ – это изначально диссеминированный опухолевый процесс, даже на доклинической стадии, который не может быть диагностирован традиционными методами обследования, а ЦОК являются непосредственным субстратом отдаленных метастазов [Onstenk W. et al., 2013]. Учитывая тот факт, что ЦОК могут сохраняться после радикального хирургического лечения, актуален вопрос адьювантной системной противоопухолевой терапии, направленной на эти клетки [Viale G., 2015]. Принципиально значима разработка метода эффективной терапии МОБ при РМЖ с учетом гетерогенности и чувствительности к применяемым лекарственным средствам ЦОК. В связи с этим создание эффективных, недорогих диагностикумов и видов лечения является важным приоритетом современной онкологии [Coates A. S., 2015].

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами (проектами), темами

Работа выполнена в рамках темы БРФФИ «Молекулярно-генетическая диагностика минимальной остаточной болезни при раке молочной железы» (апрель 2015 – март 2017), № гос. регистрации 20151454, а также в рамках государственной программы научных исследований «Фундаментальные и прикладные науки – медицине» задания 2.30 «Оценить экспрессию генов опухолевой прогрессии с целью выявления минимальной остаточной болезни при раке молочной железы» (январь 2016 – декабрь 2017), № гос. регистрации 20160541.

Тема диссертации соответствует приоритетным направлениям научно-технической деятельности в Республике Беларусь на 2016–2020 годы, утвержденным Указом Президента Республики Беларусь от 22.04.2015 г. № 166 (пункт 4. Медицина, фармация, медицинская техника: технологии профилактики, диагностики и лечения заболеваний), и приоритетным направлениям научных исследований Республики Беларусь на 2016–2020 годы, утвержденным Постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 12.03.2015 г. № 190 (медицина и фармация), а также приоритетным направлениям научно-технической и инновационной деятельности на 2021–2025 годы, утвержденным Указом Президента Республики Беларусь от 07.05.2020 г. № 156 (пункт 2. Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производства: диагностика, медицинская профилактика и лечение инфекционных, включая вирусной этиологии, и неинфекционных заболеваний, экспертиза качества медицинской помощи).

Цель и задачи исследования

Цель исследования

Улучшить результаты терапии пациентов, страдающих раком молочной железы, путем разработки методов диагностики и лечения минимальной остаточной болезни.

Задачи исследования:

1. Разработать, провести клинические испытания, зарегистрировать и организовать промышленное производство тест-систем для количественного определения *BIRC5* сурвивин транскриптов, *HER-2/neu* транскриптов и *c-ABL*

транскриптов методом ОТ–ПЦР в режиме реального времени в опухолевой ткани и циркулирующих опухолевых клетках.

2. Изучить экспрессию генов *BIRC5*, *HER-2/neu*, генов химиорезистентности семейства *ABC-транспортеров*, генов маркеров эпителиально-мезенхимального перехода *TWIST*, *PI3K*, *AKT2* и маркера стволовой опухолевой клетки рака молочной железы *ALDH1* в циркулирующих опухолевых клетках у пациентов, страдающих раком молочной железы I–III стадий, до начала лечения.

3. Изучить частоту выявления циркулирующих опухолевых клеток, экспрессирующих гены *BIRC5* и *HER-2/neu*, у пациентов, страдающих раком молочной железы, на этапе хирургического лечения.

4. Изучить частоту выявления циркулирующих опухолевых клеток и оценить динамику уровня нормализованной экспрессии генов *BIRC5* и *HER-2/neu* в них у пациентов, страдающих раком молочной железы и получающих адъювантную лекарственную терапию по схемам: 4 курса доксорубицин/эпирубицин + циклофосфан; 6 курсов циклофосфан + доксорубицин/эпирубицин + фторурацил; 4 курса доксорубицин/эпирубицин + циклофосфан с последующими 4 курсами паклитаксела; 4 курса паклитаксел + 12 курсов трастузумаб, а также гормонотерапию тамоксифеном и послеоперационную лучевую терапию.

5. Оценить прогностическое значение циркулирующих опухолевых клеток, экспрессирующих гены *BIRC5*, *HER-2/neu*, гены семейства *ABC-транспортеров*, гены эпителиально-мезенхимального перехода и стволовой опухолевой клетки рака молочной железы *ALDH1*, в отношении скорректированной и безрецидивной выживаемости пациентов, страдающих раком молочной железы.

6. Разработать, обосновать и внедрить в клиническую практику метод контроля эффективности адъювантной цитостатической химиотерапии пациентов, страдающих раком молочной железы, на основе оценки экспрессии генов *BIRC5* и *HER-2/neu* в циркулирующих опухолевых клетках.

7. Разработать, обосновать и внедрить в клиническую практику метод адъювантной цитостатической химиотерапии, позволяющий достичь максимальной эрадикации циркулирующих опухолевых клеток и обеспечить контроль над минимальной остаточной болезнью у пациентов, страдающих раком молочной железы.

Научная новизна

Впервые созданы диагностические наборы для определения экспрессии генов *BIRC5* сурвивин, *HER-2/neu*, *c-ABL* методом ОТ–ПЦР в режиме реального

времени в опухолевой ткани и циркулирующих опухолевых клетках, обладающие аналитической чувствительностью больше либо равно 5 копиям в пробе и аналитической специфичностью 100%.

Впервые установлено, что циркулирующие опухолевые клетки у пациентов, страдающих раком молочной железы со стадиями I–IIIС, до начала специального лечения характеризуются разнообразным транскрипционным фенотипом, проявляющимся в экспрессии генов, отвечающих за активный клеточный рост, активацию эпителиально-мезенхимального перехода, а также несут фенотип стволовых опухолевых клеток (*ALDH1*), причем последние появляются только в случае метастатического поражения регионарных лимфатических узлов (N+), а активация эпителиально-мезенхимального перехода в циркулирующих опухолевых клетках наблюдается значительно чаще при сверхэкспрессии онкопротеина *HER-2/neu* в первичной карциноме.

Впервые выявлено, что при раке молочной железы I–IIIС стадий при всех молекулярно-биологических подтипах у пациентов в периферической крови обнаруживаются циркулирующие опухолевые клетки, экспрессирующие гены *BIRC5* и *HER-2/neu*, как до начала специального противоопухолевого лечения, так и могут сохраняться после хирургического, особенно в случае дольковой карциномы, а также после адъювантного лечения, что позволяет рассматривать циркулирующие опухолевые клетки, экспрессирующие данные гены, после завершения противоопухолевого лечения как маркер минимальной остаточной болезни.

Впервые установлено, что под воздействием проводимой адъювантной химиотерапии, в том числе и таргетной, независимо от стадии опухолевого процесса и молекулярно-биологического подтипа карциномы молочной железы происходит изменение транскрипционного фенотипа циркулирующих клеток в сторону преобладания *BIRC5* и *HER-2/neu* положительных клонов, что позволяет рассматривать данные гены, а именно их экспрессию в ЦОК, как дополнительные маркеры эффективности проводимой адъювантной лекарственной терапии. При этом впервые выявлено, что адъювантная химиотерапия по схеме 4 курса доксорубицин/эпирубицин + циклофосфан с последующим проведением 4-х курсов паклитаксела статистически значимо приводит к снижению частоты обнаружения циркулирующих опухолевых клеток, экспрессирующих гены *BIRC5* и *HER-2/neu*.

Впервые определено, что циркулирующие опухолевые клетки, экспрессирующие гены *BIRC5* и *HER-2/neu* и несущие ген стволовой опухолевой клетки *ALDH1*, обнаруженные до начала специального лечения пациентов, страдающих неметастатическим раком молочной железы I–IIIС стадий, являются независимым прогностическим фактором риска возврата заболевания, так же как и сохранение циркулирующих опухолевых клеток, экспрессирующих гены *BIRC5* и

HER-2/neu, после завершения адъювантной терапии, что позволяет рассматривать циркулирующие опухолевые клетки как прогностический и предиктивный маркер с целью коррекции адъювантной терапии и улучшения показателей выживаемости.

Впервые установлено, что у пациентов, страдающих раком молочной железы и получающих адъювантную полихимиотерапию, ранний переход с антрациклинсодержащих схем, при установлении факта их неэффективности путем оценки экспрессии генов *BIRC5*, *HER-2/neu* в циркулирующих опухолевых клетках, после 2 курсов химиотерапии, на таксаны, а при их неэффективности с последующим переходом на гемцитабин, позволяет добиться максимальной эрадикации циркулирующих опухолевых клеток и осуществлять контроль над минимальной остаточной болезнью.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработан метод идентификации циркулирующих опухолевых клеток рака молочной железы при помощи обнаружения транскриптов генов *BIRC5*, *HER-2/neu* и *c-ABL* на основе ОТ–ПЦР в режиме реального времени, позволяющий определять экспрессию данных генов с аналитической чувствительностью больше либо равно 5 копиям в пробе и аналитической специфичностью 100%.

2. У пациентов, страдающих раком молочной железы со стадиями I–III, циркулирующие опухолевые клетки до начала специального лечения характеризуются разнообразным транскрипционным фенотипом, включающим как растущие, так и стволовые опухолевые клетки, а также клетки на этапе эпителиально-мезенхимального перехода. Наличие циркулирующих опухолевых клеток, экспрессирующих ген стволовой опухолевой клетки *ALDH1*, до начала специального лечения, а также стадия опухолевого процесса с поражением регионарных лимфатических узлов IIВ–IIIС (N+) и индексом пролиферативной активности опухоли $Ki\ 67 >20\%$ являются независимыми прогностическими факторами риска возврата заболевания.

3. У пациентов, страдающих раком молочной железы I–III стадий, сохранение циркулирующих опухолевых клеток, экспрессирующих гены *BIRC5* и *HER-2/neu*, при всех молекулярно-биологических подтипах рака молочной железы, после завершения адъювантного лечения, включающего лучевую терапию, химиотерапию и гормонотерапию, является независимым фактором риска возврата заболевания, что позволяет использовать данные циркулирующие опухолевые клетки как критерий в оценке минимальной остаточной болезни.

4. У пациентов, страдающих раком молочной железы, на фоне проводимой адъювантной химиотерапии, в том числе и таргетной, имеет место изменение транскрипционного фенотипа циркулирующих опухолевых клеток

по экспрессии генов *BIRC5* и *HER-2/neu*. При этом преобладают *BIRC5* положительные клоны, а также изменение клонов с *HER-2/neu* отрицательных в *HER-2/neu* положительные, независимо от стадии опухолевого процесса и молекулярно-биологического подтипа карциномы молочной железы, что может служить дополнительным маркером эффективности проводимой адъювантной лекарственной терапии. При этом адъювантная химиотерапия по схеме 4 курса доксорубицин/эпирубицин + циклофосфан с последующим проведением 4-х курсов паклитаксела статистически значимо ($p=0,006$) приводит к снижению частоты обнаружения циркулирующих опухолевых клеток, экспрессирующих гены *BIRC5* и *HER-2/neu*.

5. У пациентов, страдающих раком молочной железы I–III стадий, при анализе скорректированной и безрецидивной выживаемости циркулирующие опухолевые клетки, экспрессирующие гены *BIRC5* и *HER-2/neu*, после завершения специального противоопухолевого лечения обнаруживались статистически значимо чаще ($p=0,001$) при неблагоприятном исходе, что позволяет рассматривать данные циркулирующие опухолевые клетки как прогностический и предиктивный маркер с целью коррекции адъювантной терапии и улучшения показателей выживаемости.

6. Разработанный новый метод контроля эффективности адъювантной цитостатической химиотерапии пациентов, страдающих раком молочной железы, на основе оценки экспрессии генов *BIRC5* и *HER-2/neu* в циркулирующих опухолевых клетках, а также новый метод адъювантной цитостатической химиотерапии, включающий ранний переход с антрациклинсодержащих схем, при установлении факта их неэффективности после 2 курсов химиотерапии, на таксаны (4 курса лекарственного средства паклитаксел), с последующим переходом на гемцитабин при сохранении циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови, дает возможность статистически значимо увеличить скорректированную 5-летнюю выживаемость на 11,6% ($p=0,036$) до $90,3\pm 3,8\%$ (95% ДИ: 86,5–94,1), а безрецидивную выживаемость на 7,4% ($p=0,023$) до $88,0\pm 4,4\%$ (95% ДИ: 83,6–92,4) с экономической эффективностью 11,82.

Личный вклад соискателя ученой степени

Автором самостоятельно обоснована тема исследования, определены цели, задачи, объем исследования, разработаны его дизайн и этапы. Автор – научный руководитель и исполнитель тем научно-исследовательских работ, в рамках которых выполнена диссертация. Автор лично являлся лечащим врачом на этапе хирургического и химиотерапевтического лечения практически всех пациентов, включенных в исследование, а также курировал и осуществлял контроль и

диспансерное наблюдение на этапе поликлинического отделения с 2015 по 2018 г. Автором обработана медицинская документация (истории болезни, амбулаторные карты) и создана электронная база данных с характеристиками 230 пациентов, включенных в исследование; лично оценены лечебные эффекты при проведении специальной противоопухолевой терапии пациентов, страдающих раком молочной железы и включенных в исследование. Автор лично принимал участие в разработке тест-систем на основе ПЦР-анализа, а также выполнял ряд этапов ПЦР-исследования (забор биопсийного материала, пробоподготовка). Написание текста диссертации, аналитического обзора литературы, публикации по теме диссертации, написание монографии, а также доклады на научных конференциях, съездах, конгрессах, в том числе и за рубежом, выполнены лично. Согласно полученным в диссертации данным разработаны, прошли клинические исследования, зарегистрированы 3 тест-системы и налажен их промышленный выпуск. Изданы 2 инструкции по применению, а также разработанные методы внедрены в клиническую практику и учебный процесс. Получено два патента на изобретения. Работа специалистов, которые участвовали в исследовании, отражена в совместных публикациях [7, 11, 13, 15, 16, 22, 24, 25, 26, 28, 32, 37, 38, 39].

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов

Результаты диссертации доложены на следующих научных мероприятиях: конференция «Молекулярная онкология: итоги и перспективы» (16–17 декабря 2015 г.), г. Москва (Российская Федерация); европейская конференция «10th European Breast Cancer Conference» (09–11 марта 2016 г.), г. Амстердам (Нидерланды); европейский конгресс «ЕССО 2016» (16–19 марта 2016 г.), г. Амстердам (Нидерланды); европейский конгресс «24th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research» (09–12 июля 2016 г.), г. Манчестер (Великобритания); европейский конгресс «ESMO 2016» (07–11 октября 2016 г.), г. Копенгаген (Дания); конференция «II Всероссийская конференция по молекулярной онкологии» (6–8 декабря 2016 г.), г. Москва (Российская Федерация); научно-практическая сессия сотрудников ВГМУ «Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации» (25–26 января 2017 г.), г. Витебск (Беларусь); европейский конгресс «ЕССО 2017» (27–30 января 2017 г.), г. Амстердам (Нидерланды); европейский конгресс «ESMO 2017» (08–12 сентября 2017 г.), г. Мадрид (Испания); научно-практическая сессия сотрудников ВГМУ «Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации» (29–30 января 2018 г.), г. Витебск (Беларусь); европейская конференция «11th European Breast Cancer Conference» (29–31 марта 2018 г.), г. Барселона (Испания); европейский конгресс «38th ESSO» (10–12 октября 2018 г.),

г. Будапешт (Венгрия); республиканская научно-практическая конференция «Современные аспекты диагностики и лечения рака молочной железы» (14 октября 2021 г.), г. Минск (Беларусь).

Материалы диссертационной работы внедрены в работу УЗ «Витебский областной клинический онкологический диспансер», УЗ «Гомельский областной клинический онкологический диспансер», УЗ «Гродненская областная клиническая больница», ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова». Материалы диссертации включены в лекционный курс учебной программы кафедры онкологии с курсами лучевой диагностики и лучевой терапии, ФПК и ПК, кафедры персонализированной и доказательной медицины, ФПК и ПК УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», в лекционный курс учебной программы кафедры онкологии УО «Гродненский государственный медицинский университет».

Опубликованность результатов диссертации

По теме диссертационного исследования опубликовано 47 научных работ. Из них две монографии объемом 23,4 авторского листа, 15 статей в научных журналах, входящих в перечень ВАК Республики Беларусь, и 7 зарубежных статей общим объемом 8,9 авторского листа. В сборниках научно-практических конференций опубликовано 19 статей, в том числе 11 англоязычных. Утверждены и изданы 2 инструкции по применению. Получено 2 патента на изобретение, а также 3 регистрационных удостоверения. Единолично опубликованы 22 научные работы.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из оглавления, перечня сокращений и условных обозначений, введения, общей характеристики работы, аналитического обзора литературы по теме диссертации, материалов и методов, восьми глав, заключения, библиографического списка, приложений.

Диссертация изложена на русском языке, иллюстрирована 95 таблицами (52 страницы), 57 рисунками (34 страницы) и приложениями (42 страницы). Библиографический список состоит из 432 использованных источников, список публикаций соискателя включает 43 работы. Полный объем диссертации составляет 304 страницы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Дизайн исследования

- 1-й этап – разработка и клиническая оценка тест-систем для определения транскриптов генов и идентификации циркулирующих опухолевых клеток при раке молочной железы;
- 2-й этап – проспективное сплошное нерандомизированное исследование с целью изучения транскрипционного фенотипа ЦОК, их клинического и прогностического значения, а также изучения эффективности методов терапии РМЖ (хирургическая операция, ПХТ, ЛТ, ГТ) в отношении эрадикации ЦОК и контроля МОБ (n=162) с оценкой СВ и БРВ;
- 3-й этап – проспективное контролируемое исследование, организованное по принципу адаптивной рандомизации по модели максимальной полезности (Maximum Utility Model) при оптимизации адъювантной терапии РМЖ с учетом МОБ и оценкой СВ и БРВ тестируемой группы (n=68) и группы контроля (n=68).

Таким образом, под наблюдением находились 230 пациентов с первичным резектабельным РМЖ I–IIIc (pT1–4N0–3bM0) стадий, включенных в соответствии с критериями в исследование и получавших специальное противоопухолевое лечение (хирургическая операция, адъювантная лучевая, химио- и гормонотерапия) в УЗ «Витебский областной клинический онкологический диспансер» с 2015 по 2017 год.

Средний возраст пациентов, включенных в проспективное сплошное нерандомизированное исследование (2-й этап), составил (M±SD) 58,0±12,7. У пациентов преимущественно встречались опухоли категорий T1 и T2 (53,7% и 43,2% соответственно). В 48,1% случаев регионарные лимфатические узлы оставались не вовлеченными в опухолевый процесс. В 38,9% случаев отмечалось метастатическое поражение лимфатических узлов I уровня в количестве от 1 до 3. Поражение регионарного лимфатического коллектора, соответствующее категориям N2–N3, встречалось реже (4,3% и 8,6% соответственно). Подавляющее большинство пациентов опытной подгруппы составляли женщины с РМЖ I и IIa стадий (66,7%), доля местно-распространенных форм IIb–IIIc – 33,3%. В 74,7% случаев была диагностирована инвазивная неспецифицированная (протоковая) карцинома, более чем в три раза реже – дольковая карцинома (20,9%). Другие типы рака (тубулярная, медуллярная, муцинозная карциномы) встречались значительно реже и в сумме составили 4,3%. Опухоль, как правило, была высокой (G3) или средней (G2) степени злокачественности (53,1% и 43,8% соответственно) и имела

лимфовенозную стромальную инвазию (LVSI+ – 83,9%). Люминальный А рак был обнаружен в 48,8% случаев, люминальный Б HER2 неэкспрессирующий – в 25,3%, люминальный Б HER2 экспрессирующий – в 5,6%, гиперэкспрессирующий HER2 – в 6,8% и трижды негативный подтип был диагностирован в 13,6% случаев.

Все женщины подлежали радикальному лечению, первым этапом которого была радикальная операция в объеме радикальной мастэктомии по Маддену либо в объеме радикальной резекции молочной железы различных модификаций.

В опытной подгруппе радикальная мастэктомия по Маддену была выполнена 113 женщинам (69,8%), органосохранная операция – 49 пациентам (30,2%). Дальнейшая программа лечения и системная адъювантная терапия пациентов опытной подгруппы (n=162) планировались и проводились с учетом стадии опухолевого процесса, а также в соответствии с рекомендациями Международного консенсуса по лечению первичного РМЖ.

Послеоперационная ЛТ после радикальной резекции молочной железы по поводу РМЖ при pT1N0M0 была проведена 26 женщинам (16,0%). Лучевая терапия как этап комплексного лечения после адъювантной ПХТ при наличии метастатических регионарных лимфоузлов проведена 46 пациентам (28,4%). Адъювантная лекарственная терапия (химиотерапия и/или гормонотерапия) была проведена всем 162 пациентам. Наиболее часто применялась схема, содержащая антрациклины САФ (СЕФ) и АС (ЕС) – 41 (25,3%) и 40 (24,7%) соответственно. Схема, включающая последовательное назначение антрациклинов и таксанов (АС–Т), назначалась 25 женщинам (15,4%). Таргетная терапия трастузумабом вместе с таксанами проведена 20 пациентам (12,3%). Гормонотерапия в самостоятельном адъювантном режиме тамоксифеном проводилась в 35 случаях (21,6%).

В данной группе пациентов на каждом этапе лечения проводилось исследование периферической крови на предмет наличия ЦОК и их транскрипционного фенотипа.

3-й этап диссертационного исследования представлял собой клиническое проспективное контролируемое исследование, целью которого являлась оптимизация адъювантной терапии РМЖ с учетом МОБ с достижением лучших показателей скорректированной выживаемости (СВ) и безрецидивной выживаемости (БРВ).

Тестируемая подгруппа в количестве 68 женщин была сформирована по принципу метода отклик-адаптивной рандомизации по модели максимальной полезности (Maximum Utility Model).

Таким образом, из 230 пациентов после проспективного сплошного нерандомизированного исследования было отобрано 68 женщин. Пациенты тестируемой группы получали лечение в 2016–2017 годах с учетом разработанного метода оценки эффективности химиотерапии путем определения экспрессии генов

ErbB-2/HER-2/neu и *Survivin (BIRC5)* в ЦОК при злокачественных солидных новообразованиях и метода адьювантной цитостатической терапии минимальной остаточной болезни у пациентов, страдающих РМЖ.

Контрольная группа (n=68) была сформирована из пациентов проспективного сплошного нерандомизированного исследования. Чтобы минимизировать различия в группах, было выполнено сопоставление оценки склонности (propensity score matching, PSM) с помощью дополнительного модуля psmatching v3.03 программы SPSS v20 по критериям сопоставления стадии опухолевого процесса (TNM) и молекулярно-биологических характеристик опухоли. Контрольная группа получала лечение в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 258 от 11.03.2012 «Об утверждении некоторых клинических протоколов», с клиническими протоколами «Алгоритмы диагностики и лечения злокачественных новообразований». Конечной точкой проспективного контролируемого исследования являлась оценка показателей СВ и БРВ тестируемой и контрольной групп.

Средний возраст пациентов тестируемой группы составил (M±SD) 58,9±8,8 лет. В тестируемой группе преимущественно встречались опухоли до 5 см категорий T1 и T2 – 50,0% и 44,1% соответственно. В 44,1% случаев метастазов в регионарных лимфатических узлах не определялось, что соответствовало категории N0. Метастатическое поражение лимфоузлов I–III уровней метастазирования, характерное для категорий N2–N3, встречалось в 5,9% и 11,8% случаев соответственно. Подавляющее большинство пациентов тестируемой группы составляли женщины с РМЖ I и IIА стадий (64,7%), доля местно-распространенных форм IIВ–IIIС – 35,3%. В 73,5% случаев была диагностирована инвазивная неспецифицированная (протоковая) карцинома, дольковая карцинома – 22,1%. Другие типы злокачественной опухоли (тубулярная, медуллярная, муцинозная карциномы) в сумме составили 4,4%. Опухоль так же, как и в опытной группе, была высокой (G3) или средней (G2) степени злокачественности (58,8% и 39,7% соответственно) и имела лимфовенозную стромальную инвазию в 83,2% случаев.

Молекулярно-биологические характеристики опухоли были следующие: люминальный А рак определен в 44,1% случаев, люминальный Б HER2 неэкспрессирующий – в 26,5%, люминальный Б HER2 экспрессирующий – в 7,4%, гиперэкспрессирующий HER2 – в 5,9% и трижды негативный подтип диагностирован в 16,8% случаев.

В тестируемой группе в количестве 68 человек лечение начиналось с оперативного вмешательства. В данной группе соотношение оперативных вмешательств в зависимости от объема было следующим: 44 (64,7%) – радикальные мастэктомии по Маддену и 24 (35,3%) – радикальные резекции.

Протокол адъювантной терапии также определяется в соответствии с категориями риска, для установления которых необходимо использовать рекомендации Международного консенсуса по лечению первичного РМЖ. Однако во время проведения адъювантной ПХТ проводились мониторинг ЦОК, экспрессирующих таргетные гены *HER-2/neu* и *BIRC5*, с целью оценки эффективности терапии по разработанному авторскому методу, и смена схемы адъювантной химиотерапии для достижения максимальной (полной) эрадикации ЦОК и контроля МОБ по авторскому методу.

Сущность разработанных методов заключается в том, что изначально определяется исходное состояние по ЦОК (диагностика МОБ) после хирургического этапа лечения РМЖ, а в последующем на этапах адъювантной ПХТ контролируется состояние по МОБ с коррекцией схемы ПХТ с учетом полученных данных и сменой антрациклинсодержащих схем на таксаны, а затем (при необходимости) на антиметаболиты.

Все пациенты были обследованы в соответствии с клиническими протоколами «Алгоритмы диагностики и лечения злокачественных новообразований».

Обогащение и выделение ЦОК проводилось с использованием технологии экспресс-выделения опухолевых клеток из цельной крови на основе ковалентно-связанных моноклональных антител для CD326 на немагнитную полимерную матрицу крупных микросфер с последующей изоляцией ЦОК по размеру (S-pluriBead Maxi Reagent Kit and anti-human CD326 S-pluriBead, Германия). Для анализа экспрессии таргетных генов применяли методику ОТ–ПЦР в режиме реального времени на оборудовании «Bio Rad» (США).

У всех пациентов на этапах лечения забирался образец периферической крови из локтевой вены утром натощак в объеме 5 мл в стерильную вакуумную пробирку с K2ЭДТА для последующего обогащения и выделения ЦОК и хранился при 4°C до исследования. Образцы обрабатывались немедленно или не позднее чем через четыре часа после забора крови.

Выделение мРНК из лизированных, обогащенных клеток проводилось в соответствии с инструкциями производителя наборов для выделения РНК (ООО «СИВитал», Беларусь). Для анализа экспрессии генов *HER-2/neu* и *BIRC5* использовали оригинальные разработанные тест-системы. Для анализа экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости применяли специально подобранный набор праймеров и зондов Platinum PCR SuperMix (Invitrogen, США). Были выбраны следующие таргетные гены лекарственной устойчивости: *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC5*, *ABCC10* и *ABCG2*. Для анализа эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) и наличия маркера стволовых клеток РМЖ использовали набор AdnaTest EMT-1/StemCell (Adna Gen AG, Langenhagen, Germany), включающий в себя один маркер стволовых клеток РМЖ *ALDH1* и 3 маркера ЭМП – *AKT2*, *PI3K*

и *TWIST*. В качестве референсного гена во всех случаях применялся ген «домашнего хозяйства» *c-ABL*. Наряду со стандартным иммуногистохимическим исследованием (ИГХ) была изучена экспрессия антиапоптотического белка сурвивина в биоптатах РМЖ (n=67) с использованием антитела Survivin Antibody (Pierce, Франция).

Статистическая обработка полученных данных проводилась в соответствии с современными требованиями, предъявляемыми к медико-биологическим исследованиям, с применением программы SPSS Statistics v20.

Результаты исследования

Разработка и клиническая оценка тест-систем для определения транскриптов генов и идентификации циркулирующих опухолевых клеток при раке молочной железы

Разработку праймеров и зондов для ОТ–ПЦР проводили с использованием *in silico* анализа. Информацию о первичной структуре генов получали с применением данных международных баз геномов. Оценку конформации образуемых олигонуклеотидов и силы связи, температуры плавления вторичных структур осуществляли с использованием онлайн-программ. Праймеры и зонды для ПЦР были подобраны с учетом структур экзонов и интронов. В результате работы впервые в Республике Беларусь были созданы тест-системы для определения количественной суммарной оценки транскриптов сурвивина *BIRC5* и *HER-2/neu*, включая все известные варианты сплайсинга в образцах РНК/мРНК.

Клинические испытания разработанных тест-систем были проведены в соответствии с разработанным Республиканским унитарным предприятием «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении» Министерства здравоохранения Республики Беларусь и утвержденным на клинических базах протоколом клинических исследований. Клинические испытания тест-систем были проведены в государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова» и государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии».

В результате испытаний были подтверждены воспроизводимость работы тест-систем, а также их аналитическая чувствительность больше либо равно 5 копиям в пробе и аналитическая специфичность 100%.

Созданные тест-системы зарегистрированы в установленном порядке в Республике Беларусь, организовано их производство в ООО «СИВитал».

Транскрипционный фенотип циркулирующих опухолевых клеток при первичном неметастатическом раке молочной железы

Изучение экспрессии генов рецептора эпидермального фактора роста *HER-2/neu*, ингибитора апоптоза *BIRC5*, генов маркеров эпителиально-мезенхимального перехода *TWIST*, *PI3K*, *AKT2*, гена маркера стволовой опухолевой клетки РМЖ *ALDH1*, а также генов семейства *ABC-транспортёров* *ABCB1 (PGP/MDR1)*, *ABCC1 (MRP1)*, *ABCC5 (MRP5)*, *ABCC10 (MRP7)* и *ABCG2 (BCRP/MXR)* было выполнено в образцах периферической крови 102 пациентов, с верифицированным РМЖ, до начала специального противоопухолевого лечения.

Позитивными на наличие ЦОК являлись образцы, в которых после обогащения и изоляции при помощи S-pluriBead Maxi Reagent Kit and anti-human CD326 S-pluriBead (Германия) обязательно определялись экспрессия референсного гена «домашнего хозяйства» *c-ABL* и экспрессия как минимум одного опухолюассоциированного гена идентификатора ЦОК *HER-2/neu* и/или *BIRC5*. Данная методика исключает вероятность попадания в исследование цитокератин-позитивных ЦЭК (СК+).

При исследовании периферической крови пациентов с верифицированным первичным неметастатическим РМЖ утром перед оперативным вмешательством экспрессия гена *c-Abl* и хотя бы одного маркерного гена в ЦОК была выявлена у 69 женщин из 102 обследованных, что составило 67,6%.

Экспрессия гена рецептора эпидермального фактора роста *HER-2/neu* в ЦОК определялась у 64 из 69 ЦОК-позитивных пациентов (92,8%). Экспрессия гена антиапоптотического протеина сурвивина *BIRC5* идентифицировалась у 49 из 69 ЦОК-позитивных пациентов (71%).

Группа из 51 женщины из 69 ЦОК-позитивных пациентов (74%) была положительной по меньшей мере для одного из маркеров ЭМП, а 32 из 69 пациентов (46,4%) являлись положительными для *ALDH1* соответственно.

В 59 образцах из 69 ЦОК-позитивных проб (86%) определялась экспрессия как минимум одного таргетного гена лекарственной устойчивости.

Экспрессия генов *HER-2/neu* и *BIRC5* в ЦОК при первичном РМЖ

В периферической крови пациентов, страдающих РМЖ, утром перед оперативным вмешательством экспрессия хотя бы одного таргетного гена в ЦОК была выявлена у 115 женщин из 162 обследованных, что составило 70,9%. Чаще всего отмечалась экспрессия одновременно двух генов *HER-2/neu* и *BIRC5* в ЦОК у 68 пациентов (41,91%). Экспрессия только гена *BIRC5* сурвивина определялась у 10 женщин (6,17%), только гена *HER-2/neu* – у 37 (22,83%).

Статистически значимой зависимости частоты выявления таргетных ЦОК от стадии опухолевого процесса, морфологических и молекулярно-биологических характеристик опухоли не было получено.

Уровень нормализованной экспрессии таргетных генов варьировал в широких пределах со средними значениями $0,603 \pm 0,141$ для гена *BIRC5* и $0,893 \pm 0,181$ для гена *HER-2/neu*. Была установлена статистически значимая корреляция между уровнями нормализованной экспрессии таргетных генов *BIRC5* и *HER-2/neu* ($r=0,58$; $p<0,01$). Кроме того, определена положительная слабая взаимосвязь между экспрессией *HER-2/neu* и метастатическим поражением регионарных лимфатических узлов ($r=0,14$; $p<0,05$).

Экспрессия генетических маркеров эпителиально-мезенхимального перехода и маркера стволовой опухолевой клетки в ЦОК при первичном РМЖ

Изучение при помощи ОТ–ПЦР экспрессии генетических маркеров эпителиально-мезенхимального перехода *TWIST*, *PI3K*, *AKT2* и маркера опухолевой стволовой клетки *ALDH1* в ЦОК было выполнено у 102 пациентов с верифицированным первичным неметастатическим РМЖ. Общая частота обнаружения ЦОК (по референсному гену) составила 67,6% (69 из 102 пациентов).

Группа из 51 женщины из 69 ЦОК-позитивных пациентов (74%) была положительной по меньшей мере для одного из маркеров ЭМП, а 32 из 69 пациентов (46,4%) были положительными для *ALDH1* соответственно.

Установлены статистически значимые различия в большей частоте идентификации ЦОК по таргетным генам ЭМП при сверхэкспрессирующих онкопротеин *HER-2/neu* раках – люминальный Б *HER2+* и гиперэкспрессирующий *HER2* ($p=0,001$).

ЦОК, экспрессирующие ген стволовой опухолевой клетки *ALDH1*, идентифицировались только у пациентов с наличием метастазов в регионарные лимфатические узлы (N+), а соответственно в «продвинутых» стадиях опухолевого процесса (IIВ–IIС) со статистически значимым уровнем $p=0,001$.

Экспрессия генов множественной лекарственной устойчивости ABC-транспортёров в ЦОК при первичном РМЖ

Изучение экспрессии генетических маркеров лекарственной устойчивости суперсемейства ABC-транспортёров *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC5*, *ABCC10* и *ABCG2* в ЦОК было выполнено у 102 пациентов, страдающих неметастатическим РМЖ.

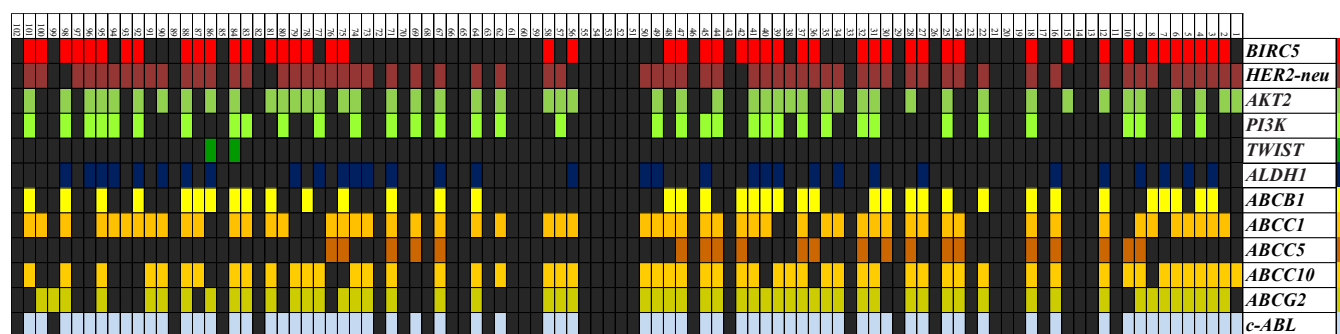
Общая частота обнаружения ЦОК составила 67,6% (69 из 102 пациентов).

В 59 образцах из 69 ЦОК-положительных проб (86%) определялась экспрессия как минимум одного таргетного гена лекарственной устойчивости. Экспрессия четырех генов была обнаружена у 17 пациентов (25%), трех генов – у 20 женщин (29%), два и один ген экспрессировались у 10 и 12 человек соответственно (14% и 17%). Ген *ABCG2* идентифицировался в 56% образцов. С одинаковой частотой (54%) экспрессировались гены *ABCC1* и *ABCC10*. Частота экспрессии генов *ABCB1* и *ABCC5* составила 35% и 21% соответственно.

Статистически значимой зависимости частоты экспрессии генов семейства *ABC-транспортеров* от морфологических и молекулярно-биологических характеристик первичной опухоли не выявлено.

Транскрипционный фенотип ЦОК при первичном нематастатическом РМЖ

Транскрипционный фенотип ЦОК до начала специального лечения характеризуется выраженным разнообразием. Выявлена сильная статистически значимая корреляция между *AKT2* и *PI3K* ($r=0,78$; $p<0,01$). Установлена умеренная статистически значимая корреляция между уровнями нормализованной экспрессии генов *BIRC5* и *HER-2/neu* ($r=0,53$; $p<0,01$), а также между *HER-2/neu* и *PI3K* ($r=0,31$; $p<0,01$). Выявлена положительная слабая корреляция между экспрессией гена *BIRC5* и генами-маркерами ЭМП *TWIST* и генами *ABCB1* и *ABCC1*. Экспрессия гена *HER-2/neu* слабо коррелировала с экспрессией генов ЭМП и *ALDH1*. Слабая корреляционная связь обнаружена между генами лекарственной устойчивости семейства *ABC-транспортеров* (рисунок 1).



Цветной маркер – наличие экспрессии, серый маркер – отсутствие экспрессии

Рисунок 1. – Транскрипционный фенотип ЦОК пациентов с первичным РМЖ (n=102)

Кластерный анализ позволил установить определенные закономерности. Так, при двухходовом объединении связи наличия экспрессии и уровня нормализованной экспрессии генов в ЦОК был установлен достаточно однородный кластер (n=20), характеризующийся высокими показателями уровней

нормализованной экспрессии генов *BIRC5*, *HER-2/neu*, а также генов *ABC-транспортеров* (рисунок 2).

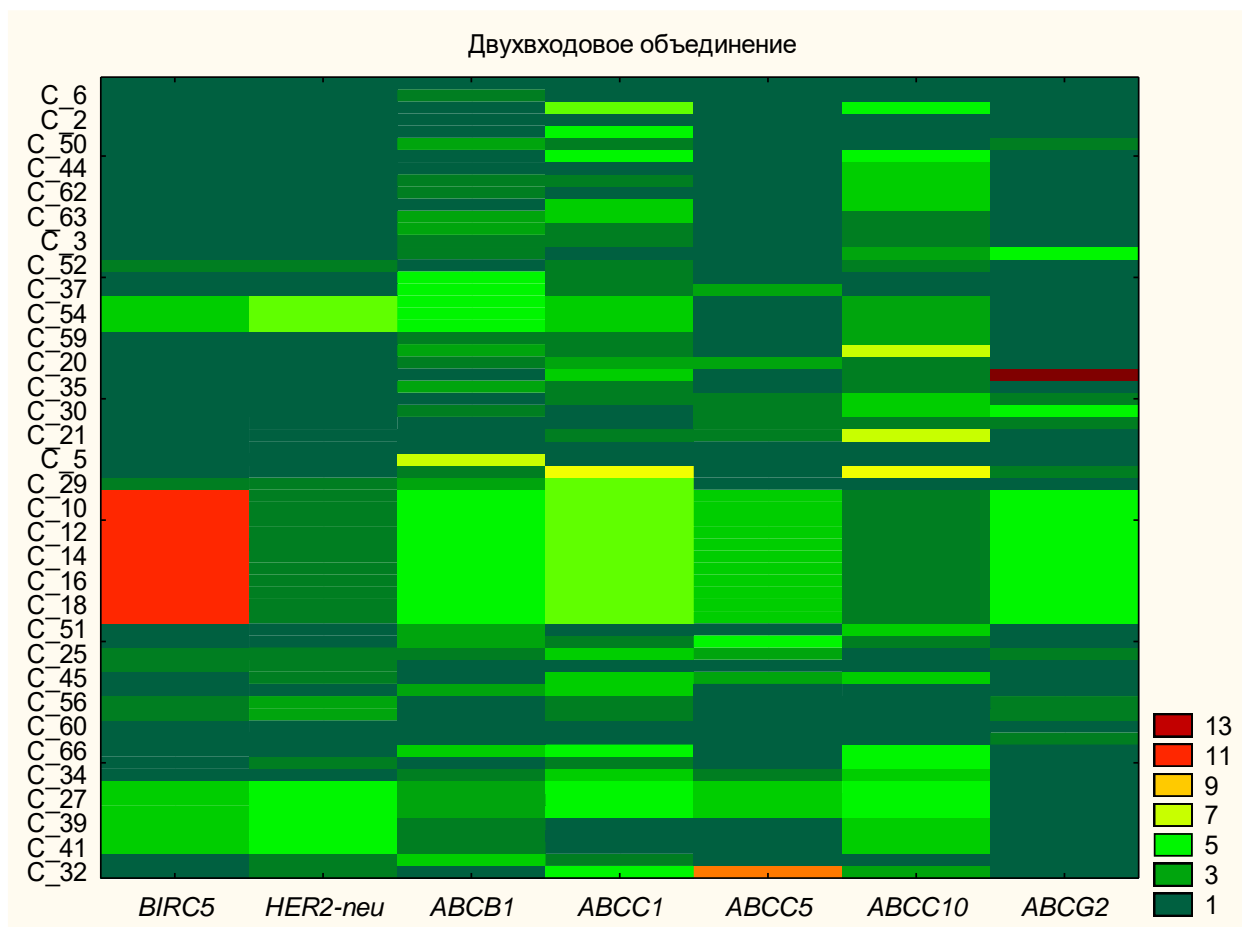


Рисунок 2. – Кластерный анализ двухвходового объединения наличия экспрессии и уровней нормализованной экспрессии целевых генов в ЦОК (n=68)

Клиническое значение экспрессии генов *BIRC5* и *HER-2/neu* в ЦОК как маркеров МОБ при хирургическом лечении РМЖ

Таргетные ЦОК до оперативного вмешательства были обнаружены у 115 (71%) из 162. После операции мРНК *BIRC5* положительные и мРНК *HER-2/neu* положительные ЦОК исчезли у 47 (40,9%) пациентов, у которых они изначально определялись. Более чем в половине случаев – 59 (51,3%) – идентифицируемые ЦОК сохранились в периферической крови. Более того, у 9 пациентов (7,8%) после операции ЦОК стали идентифицироваться в обогащенных образцах венозной крови. После радикальной мастэктомии по Маддену частота сохранения ЦОК была статистически значимо ниже, чем после радикальной резекции молочной железы, и составила 46,9% против 61,8% ($p=0,039$). При качественном анализе уровней нормализованной экспрессии таргетных генов в ЦОК на этапе хирургического лечения значимых различий в уровне экспрессии не было установлено.

Клиническое значение циркулирующих опухолевых клеток, экспрессирующих гены *BIRC5* и *HER-2/neu*, как маркеров минимальной остаточной болезни при адъювантном лечении рака молочной железы

Адъювантная полихимиотерапия РМЖ в режиме САФ (CEF) и минимальная остаточная болезнь

Данная схема была применена у 41 пациента (25,3%). Сочетание радикальной операции с последующей АПХТ по схеме САФ позволило статистически значимо ($p=0,0096$) снизить частоту выявления мРНК *BIRC5* и *HER-2/neu* положительных ЦОК в периферической крови пациентов относительно исходного уровня, полученного до начала специальной терапии, т.е. перед операцией, на 26,9% – с 37 до 23 случаев. Однако АПХТ в данном режиме как таковая не привела к снижению частоты выявления таргетных ЦОК, и, что более существенно, после 6 курсов АПХТ частота ЦОК-положительных образцов была выше ($p>0,05$).

При анализе данных нормализованной экспрессии таргетных генов в ЦОК относительно уровня референсного гена было установлено, что имеет место статистически значимое ($p=0,01$) увеличение уровня нормализованной экспрессии гена *BIRC5* в ЦОК после 6 курсов САФ (CEF) относительно уровня нормализованной экспрессии данного гена в ЦОК после 2 курсов САФ (CEF).

Адъювантная полихимиотерапия РМЖ в режиме АС (EC) и минимальная остаточная болезнь

Данная схема была применена у 40 пациентов (24,7%). Сочетание радикальной операции с последующей АПХТ по схеме АС (EC) позволило добиться статистически значимого ($p=0,0087$) снижения частоты идентификации мРНК *BIRC5* и мРНК *HER-2/neu* положительных ЦОК в периферической крови пациентов, страдающих РМЖ, на 26,7% – с 33 случаев до операции до 21 случая после 4 курсов АПХТ по схеме АС. Однако, как и в случае применения АПХТ по схеме САФ, 4 курса АПХТ по схеме АС не привели к статистически значимому снижению частоты выявления таргетных ЦОК. Интересным является и тот факт, что после 2 курсов АС частота выявления ЦОК была существенно выше, чем в послеоперационном периоде, и снизилась после 4 курсов ПХТ. Было установлено, что имеет место статистически значимое ($p=0,005$) увеличение уровня нормализованной экспрессии гена *BIRC5* в ЦОК после 4 курсов АС относительно уровня нормализованной экспрессии данного гена в ЦОК после 2 курсов АС.

Адьювантная полихимиотерапия РМЖ в режиме АС–Т и минимальная остаточная болезнь

Схема адьювантной ПХТ с включением таксанов (АС–Т) была использована у 25 пациентов (15,4%). Сочетание радикальной операции с последующим проведением курсов адьювантной ПХТ (АС–Т) статистически значимо ($p=0,0077$) снижало частоту идентификации мРНК *BIRC5* и мРНК *HER-2/neu* положительных ЦОК в периферической крови пациентов, страдающих РМЖ, на 68,0% – с 21 случая до операции до 4 случаев после 8 курсов АПХТ по схеме АС–Т. Следует отметить, что статистически значимого уменьшения частоты идентификации таргетных ЦОК после 2 и 4 курсов АС не было. После 2 курсов Т и, главным образом, после 4 курсов Т было достигнуто статистически значимое снижение частоты выявления мРНК *BIRC5* и мРНК *HER-2/neu* положительных ЦОК в периферической крови пациентов, страдающих РМЖ. При анализе данных нормализованной экспрессии таргетных генов в ЦОК относительно уровня референсного гена статистически значимого различия по мере проведения курсов ПХТ по схеме АС–Т в уровне нормализованной экспрессии не было получено.

Адьювантная полихимиотерапия РМЖ в режиме Т–Траст и минимальная остаточная болезнь

В данном исследовании адьювантная терапия сочетания таксанов (паклитаксел) с трастузумабом была показана 20 пациентам (12,3%). Терапия моноклональным антителом проводилась с паклитакселом в количестве 4 курсов и далее продолжалась в адьювантном режиме до 1 года.

Сочетание радикальной хирургической операции с последующей адьювантной лекарственной терапией в режиме Т–Траст позволило добиться статистически значимого снижения частоты идентификации мРНК *BIRC5* и мРНК *HER-2/neu* положительных ЦОК в периферической крови пациентов, страдающих РМЖ, с 13 до 5 ЦОК-положительных случаев, т.е. с 65,0% до 25,0% относительно общего числа пролеченных по данному протоколу пациентов ($p=0,047$). Однако относительно уровня частоты ЦОК положительных случаев, полученных после операции, статистически значимого снижения частоты таргетных ЦОК не было получено ($p=0,120$).

Суммируя данные по эффективности адьювантной терапии по схеме Т–Траст, следует отметить, что она была эффективна у 15 из 20 (75,0%) пациентов без учета мРНК *BIRC5* и *HER-2/neu* положительных ЦОК. Однако, принимая во внимание данные по наличию ЦОК в периферической крови, необходимо обозначить, что опухолевые клетки исчезли только у 8 из 13 положительных на мРНК *BIRC5* и *HER-2/neu* ЦОК женщин, что составляет лишь 40,0%.

При анализе данных нормализованной экспрессии таргетных генов в ЦОК относительно уровня референсного гена было установлено статистически значимое ($p=0,011$) увеличение уровня нормализованной экспрессии гена *HER-2/neu* по мере проведения курсов трастузумаба, а также увеличение уровня нормализованной экспрессии гена *BIRC5* после завершения терапии паклитакселом ($p=0,027$).

Адьювантная лучевая терапия рака молочной железы и минимальная остаточная болезнь

По завершении послеоперационной ЛТ как этапа органосохраняющего лечения при I стадии РМЖ после радикальной резекции молочной железы ($n=21$) было зафиксировано статистически значимое снижение частоты выявления ЦОК, экспрессирующих гены *BIRC5* и *HER-2/neu*, на 52,4% относительно исходного уровня ($p=0,035$) с 15 до 4, а также относительно уровня, полученного после операции, на 33,4% ($p=0,049$) с 11 до 4 ЦОК-положительных случаев.

По завершении ЛТ как этапа комплексного лечения при местно-распространенных формах РМЖ после адьювантной ПХТ ($n=59$) не было зафиксировано статистически значимого снижения частоты выявления таргетных ЦОК как по сравнению с исходным уровнем до начала специального лечения, так и после курсов ПХТ ($p>0,05$). Таким образом, ЛТ после ПХТ не позволяет осуществлять контроль над МОБ.

Адьювантная гормонотерапия рака молочной железы и минимальная остаточная болезнь

Гормональная терапия в самостоятельном адьювантном режиме проводилась 34 пациентам (21,0%). По мере проведения терапии наблюдалось снижение частоты идентификации мРНК *BIRC5* и мРНК *HER-2/neu* положительных ЦОК в периферической крови пациентов, страдающих РМЖ, с 22 случаев до операции до 15 случаев после 8 месяцев ГТ (на 20,0%). Однако следует отметить, что снижение, достигнутое к 8 месяцу ГТ, не является статистически значимым ($p=0,0752$).

Гормональная терапия в адьювантном режиме после органосохраняющего лечения (радикальная резекция молочной железы + ЛТ) проводилась у пациентов с люминальными А и Б молекулярно-биологическими подтипами РМЖ при низком риске возврата болезни в 15 случаях (9,3%). Данный протокол органосохраняющего лечения статистически значимо не снижал частоты выявления ЦОК, экспрессирующих гены *BIRC5* и *HER-2/neu*, как по сравнению с исходным уровнем до операции, так и после операции.

Гормональная терапия в составе комплексного лечения после завершения адъювантной ПХТ и ЛТ была назначена 25 женщинам (15,4%). Таргетные ЦОК выявлялись в периферической крови пациентов одинаково часто. Так, например, после ЛТ таргетные ЦОК были выделены у 12 женщин (48,0%), после 8 месяцев приема тамоксифена у этих же 12 пациентов выявлялись ЦОК, экспрессирующие гены *BIRC5* и *HER-2/neu*.

Гормональная терапия в составе комплексного лечения после завершения адъювантной ПХТ была назначена 11 женщинам (6,8%). Установлено, что таргетные ЦОК выявлялись в периферической крови пациентов также одинаково часто ($p>0,05$).

Статистически значимого изменения уровня нормализованной экспрессии таргетных генов на этапе гормонального лечения не было получено ($p>0,05$).

Эффективность адъювантной лекарственной терапии в отношении эрадикации циркулирующих опухолевых клеток и контроля над минимальной остаточной болезнью

Как показал анализ динамического мониторинга ЦОК, экспрессирующих гены *BIRC5* и *HER-2/neu*, во время непосредственного проведения лекарственного лечения относительно частоты выявления ЦОК после оперативного вмешательства статистически значимого снижения частоты идентификации таргетных ЦОК позволяет добиться лишь схема последовательного назначения антрациклинов и паклитаксела (АС–Т), способствующая снижению частоты МОБ по сравнению с другими схемами с 68,0% до 16,0% ($p=0,006$) (таблица 1).

Таблица 1. – Эффективность различных схем системной адъювантной терапии РМЖ в отношении эрадикации ЦОК

Схема адъювантной системной терапии РМЖ	Частота выявления мРНК <i>BIRC5</i> и мРНК <i>HER-2/neu</i> положительных ЦОК						p
	до операции		после операции		после системной терапии		
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	
АС (n=40)	33	82,5	22	55,0	21	52,5	>0,05
CAF (n=41)	37	90,2	21	51,2	23	56,1	>0,05
АС–Т (n=25)	21	84,6	17	68,0	4	16,0	0,006
Т–Траст (n=20)	13	65,0	8	40,0	5	25,0	>0,05
ГТ (n=34)	22	64,7	21	61,8	15	44,1	>0,05

Эффективность протоколов терапии в отношении эрадикации циркулирующих опухолевых клеток и контроля над минимальной остаточной болезнью

Из 162 пациентов 113 женщин (69,75%) были отнесены в группы промежуточного и высокого риска возврата болезни, которым в адъювантном режиме была показана ХТ в сочетании с ЛТ, с ГТ или без. 49 женщин (30,25%) были отнесены к категории низкого риска возврата болезни, которым в зависимости от объема оперативного вмешательства в адъювантном режиме была назначена терапия тамоксифеном самостоятельно либо после ЛТ.

На момент установления диагноза РМЖ до начала терапии у 115 пациентов, что составило 70,9%, имело место установление ранней диссеминации опухолевых клеток, подтвержденное наличием таргетных ЦОК. Хирургический этап позволил уменьшить количество диагностируемых ЦОК-положительных случаев до 68 (41,9%). Дополнительная адъювантная терапия снизила частоту МОБ до 66 случаев (40,7%).

Прогностическое значение циркулирующих опухолевых клеток в отношении выживаемости пациентов, страдающих раком молочной железы

Скорректированная и безрецидивная выживаемость пациентов проспективного сплошного нерандомизированного исследования

Средний срок наблюдения пациентов в проспективном сплошном нерандомизированном исследовании (n=162) составил 61,6 месяца. К концу пяти лет наблюдения прогрессирование заболевания было диагностировано у 40 женщин, из них умерло 28.

Скорректированная 5-летняя выживаемость (СВ) группы проспективного исследования достигла 82,7±2,9%. Безрецидивная 5-летняя выживаемость (БРВ) указанной категории пациентов составила 80,6±3,3% (таблица 2).

Таблица 2. – Скорректированная и безрецидивная выживаемость пациентов группы проспективного исследования (n=162)

Категория	Показатель выживаемости, %, 95% ДИ		
	1-летняя	3-летняя	5-летняя
Скорректированная выживаемость	96,6 (95,2–98,0)	87,3 (84,8–89,9)	82,7 (82,7–85,6)
Безрецидивная выживаемость	92,5 (90,5–94,5)	83,0 (80,1–85,9)	80,6 (77,3–83,9)

При сравнении показателей СВ групп пациентов с наличием ЦОК, экспрессирующих гены *BIRC5* и *HER-2/neu*, до начала специального лечения и с их отсутствием значимых отличий ($p=0,85$) не было установлено (таблица 3).

Таблица 3. – СВ пациентов в зависимости от наличия ЦОК до начала специального лечения ($n=162$)

Категория	Показатель выживаемости, %, 95% ДИ		
	1-летняя	3-летняя	5-летняя
Наличие ЦОК до лечения	96,4 (94,2–98,6)	88,6 (84,9–92,3)	73,7 (62,2–85,2)
Отсутствие ЦОК до лечения	96,8 (94,2–99,4)	80,1 (73,2–87,0)	75,0 (67,3–82,7)

При оценке БРВ также не было получено статистически значимых отличий в показателях выживаемости ($p=0,96$) (таблица 4).

Таблица 4. – БРВ пациентов в зависимости от наличия ЦОК до начала специального лечения ($n=162$)

Категория	Показатель выживаемости, %, 95% ДИ		
	1-летняя	3-летняя	5-летняя
Наличие ЦОК до лечения	92,7 (89,6–95,8)	86,8 (82,7–90,9)	75,0 (63,0,6–87,0)
Отсутствие ЦОК до лечения	95,3 (91,7–98,9)	85,9 (78,9–92,5)	75,3 (62,1–88,5)

При сравнении показателей СВ групп пациентов с сохранением ЦОК, экспрессирующих гены *BIRC5* и *HER-2/neu*, после завершения специального лечения и их отсутствием были установлены статистически значимые отличия ($p=0,00007$) (таблица 5).

Таблица 5. – СВ пациентов в зависимости от сохранения ЦОК после специального лечения ($n=162$)

Категория	Показатель выживаемости, %, 95% ДИ		
	1-летняя	3-летняя	5-летняя
Сохранение ЦОК после лечения	94,8 (91,7–97,9)	76,2 (70,1–82,3)	71,1 (64,4–77,8)
Отсутствие ЦОК после лечения	98,1 (96,3–99,9)	94,5 (91,5–97,5)	85,6 (77,0–94,2)

При оценке БРВ также были получены статистически значимые отличия ($p=0,00004$) увеличения показателей выживаемости в группе пациентов, у которых не было обнаружено ЦОК после лечения (таблица 6).

Таблица 6. – БРВ пациентов в зависимости от сохранения ЦОК после специального лечения (n=162)

Категория	Показатель выживаемости, %, 95% ДИ		
	1-летняя	3-летняя	5-летняя
Сохранение ЦОК после лечения	87,3 (82,5–92,1)	71,5 (64,8–78,2)	66,1 (58,5–73,7)
Отсутствие ЦОК после лечения	98,1 (96,3–99,9)	94,4 (91,4–97,4)	85,5 (79,8–91,2)

В группе пациентов (n=102), у которых исследовался транскрипционный фенотип ЦОК, был проведен корреляционный и многофакторный анализ с использованием регрессионной модели пропорциональных рисков Кокса и определением отношения рисков.

В результате монофакторного анализа было установлено, что на БРВ оказывают влияние такие факторы, как метастатическое поражение регионарных лимфатических узлов, т.е. категория N по TNM, а соответственно, стадия опухолевого процесса, степень дифференцировки опухоли, наличие ЦОК до начала лечения, а также их сохранение после завершения всего комплекса терапии. Что касается экспрессии генов в ЦОК, то на БРВ также оказывали влияние ЦОК, экспрессирующие ген стволовой опухолевой клетки РМЖ *ALDH1*, а также гены семейства *ABC-транспортеров*. Таким образом, показатели со статистически значимым уровнем связи были включены в регрессионную модель многофакторного анализа Кокса, результаты которого представлены в таблице 7.

Таблица 7. – Результаты многофакторного анализа

Показатель	Статистические данные					
	β	SE	Wald-стат	P	Exp(β)	95% ДИ Exp(β)
Стадия IB–IIIС/IV–IIА	1,349	0,454	8,830	0,003	3,853	1,59–9,34
N1–3/N0	0,978	0,643	2,314	0,128	2,660	0,76–9,32
G3–4/G1–2	0,668	0,567	1,387	0,239	1,950	0,64–5,89
Ki 67 >20% / <20%	0,979	0,481	4,151	0,042	2,663	1,04–6,82
Экспрессия гена <i>ALDH1</i> в ЦОК до лечения	0,871	0,597	6,078	0,014	1,230	1,07–7,73
Экспрессия генов <i>ABC-транспортеров</i> в ЦОК до лечения	16,044	257,875	0,004	0,950	9286371,00	3,80–2,27
Сохранение ЦОК после лечения	1,289	0,519	6,154	0,013	3,628	1,32–9,99

В результате многофакторного анализа было установлено, что независимое влияние на БРВ пациентов, страдающих РМЖ, оказывают такие факторы, как наличие в периферической крови ЦОК до начала специального лечения, экспрессирующих ген стволовой опухолевой клетки *ALDH1*, стадия опухолевого процесса (с поражением или без регионарных лимфатических узлов), индекс пролиферативной активности первичной карциномы Ki 67, а также сохранение ЦОК (МОБ) после завершения противоопухолевой терапии.

Для стадии опухолевого процесса $OR = \exp(\beta) = \exp(1,349) = 3,853$. Таким образом, отношение рисков для стадий IIВ–IIIС в сравнении I–IIА равно 3,8 (95% ДИ 1,59–9,34).

Для индекса пролиферативной активности опухоли меньше и больше 20% составило $OR = \exp(\beta) = \exp(0,979) = 2,664$. Таким образом, отношение рисков для Ki 67 >20% в сравнении Ki 67 <20% равно 2,7 (95% ДИ 1,04–6,82).

Для ЦОК, экспрессирующих ген стволовой опухолевой клетки РМЖ *ALDH1*, $OR = \exp(\beta) = \exp(0,871) = 1,230$. Следовательно, отношение рисков для наличия ЦОК мРНК *ALDH1*+ в сравнении с их отсутствием до начала лечения равно 1,2 (95% ДИ 1,07–7,73).

Для ЦОК, сохранившихся после специальной противоопухолевой терапии (минимальная остаточная болезнь), по сравнению с достигнутой эрадикацией ЦОК, $OR = \exp(\beta) = \exp(1,289) = 3,628$. Таким образом, отношение рисков для МОБ в сравнении с достигнутой эрадикацией ЦОК 3,6 (95% ДИ 1,32–9,99).

У пациентов, страдающих РМЖ I–IIIС стадий, факторами благоприятного прогноза являются ранняя стадия опухолевого процесса без поражения регионарных лимфатических узлов (I–IIА) с Ki 67 <20% и достигнутая полная эрадикация ЦОК в результате специальной противоопухолевой терапии.

Неблагоприятные факторы риска развития прогрессирования и возврата болезни – стадия опухолевого процесса с поражением регионарных лимфатических узлов IIВ–IIIС (N+), которая увеличивает риск прогрессирования в 3,8 раза, Ki 67 >20%, увеличивающий риск в 2,7 раза, наличие ЦОК, экспрессирующих ген стволовой опухолевой клетки *ALDH1* до начала специального лечения, увеличивающее риск в 1,2 раза, и сохранение ЦОК (МОБ) после завершенного противоопухолевого лечения, что увеличивает риск рецидива болезни в 3,6 раза.

Таким образом, у пациентов, имеющих все четыре неблагоприятных фактора, условная вероятность смерти в 44,3 выше, чем у пациентов, у которых эти факторы отсутствуют.

Адьювантная ЦОК-ориентированная терапия пациентов с неметастатическим раком молочной железы

Исследование было организовано по принципу проспективного контролируемого исследования. Тестируемая подгруппа в количестве 68 женщин была сформирована по принципу метода отклик-адаптивной рандомизации по модели максимальной полезности (Maximum Utility Model), которая предполагает, что каждый следующий пациент всегда распределяется в ту группу, где наблюдается (или на основании модели допускается, как в данном случае) более высокая эффективность лечения.

Контрольная группа (n=68) была сформирована из пациентов проспективного сплошного нерандомизированного исследования. Чтобы минимизировать различия в группах, было выполнено сопоставление оценки склонности (propensity score matching, PSM) с помощью дополнительного модуля psmatching v3.03 программы SPSS v20 по критериям сопоставления стадии опухолевого процесса (TNM) и молекулярно-биологических характеристик опухоли.

Пациенты контрольной группы получали терапию в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 258 от 11.03.2012 «Об утверждении некоторых клинических протоколов», с клиническими протоколами «Алгоритмы диагностики и лечения злокачественных новообразований».

Пациенты тестируемой группы получали лечение согласно предложенным оригинальным методам оценки эффективности химиотерапии путем определения экспрессии генов *ErbB-2/HER-2/neu* и *Survivin (BIRC5)* в ЦОК при злокачественных солидных новообразованиях и адьювантной цитостатической терапии минимальной остаточной болезни у пациентов, страдающих раком молочной железы.

При анализе состояния периферической крови данной подгруппы пациентов было установлено, что у 43 из 68 (63,2%) имело место наличие ЦОК, которые экспрессировали гены *BIRC5* и *HER-2/neu*.

После проведенных радикальных оперативных вмешательств (радикальная мастэктомия по Маддену – 44 (64,7%), радикальная резекция молочной железы – 24 (35,3%)) таргетные ЦОК, а соответственно, диагностирована МОБ, были идентифицированы у 31 пациента, что составило 45,6%.

47 пациентов (69,11%) были отнесены в группы промежуточного и высокого риска возврата болезни, а соответственно, им в адьювантном режиме была показана химиотерапия.

После 2 курсов адьювантной ПХТ, а также после 2 месяцев приема тамоксифена (самостоятельно либо после ЛТ) была проведена диагностика МОБ путем поиска ЦОК, экспрессирующих гены *BIRC5* и *HER-2/neu*. Было установлено,

что у 21 пациента (30,9%), отнесенного к группам промежуточного и высокого риска возврата болезни, получавшего химиотерапию в адъювантном режиме по одной из схем (CAF, AC или AC-T), имело место подтверждение МОБ. В 17 образцах определилась экспрессия гена *BIRC5*, а в 15 образцах отмечалась экспрессия *HER-2/neu*. Одновременная экспрессия таргетных генов определялась в образцах периферической крови 11 женщин. У пациентов из группы низкого риска возврата болезни, получавших ГТ тамоксифеном, таргетные ЦОК не были идентифицированы.

Согласно разработанному методу, этой 21 женщине была произведена смена схемы терапии на таксаны, в частности, на паклитаксел. После проведения 2 курсов паклитаксела также проведена диагностика МОБ. Было отмечено уменьшение частоты МОБ до 15 случаев. Таким образом, удалось достичь эрадикации таргетных ЦОК у 6 пациентов.

После еще двух курсов монокимиотерапии паклитаксела (всего 4 курса) было установлено, что в периферической крови 8 пациентов сохранились таргетные ЦОК, экспрессирующие как ген *BIRC5*, так и ген *HER-2/neu*. Следует обратить внимание, что у 3 женщин, изначально не имевших ЦОК, после операции впервые появились ЦОК, экспрессирующие *BIRC5*, на фоне терапии по схеме AC-T. Таким образом, МОБ была диагностирована у 11 пациентов тестируемой подгруппы.

На фоне приема тамоксифена таргетные ЦОК, экспрессирующие гены *BIRC5* и *HER-2/neu*, не были обнаружены.

После 4 курсов паклитаксела у 11 пациентов тестируемой подгруппы имело место сохранение мРНК *BIRC5* и мРНК *HER-2/neu* положительных ЦОК в обогащенных образцах периферической крови, т.е. сохранялась МОБ. Для эрадикации таргетных ЦОК данной категории пациентов были проведены еще 4 еженедельных курса монокимиотерапии гемцитабином в режиме 800–1000 мг/м² внутривенно. После 4 курсов монокимиотерапии гемцитабином ни у одного пациента ЦОК в периферической крови не определялось. Таким образом, была достигнута 100% эрадикация опухолевых клеток в периферической крови.

Выживаемость пациентов при оптимизации протокола адъювантного лечения рака молочной железы

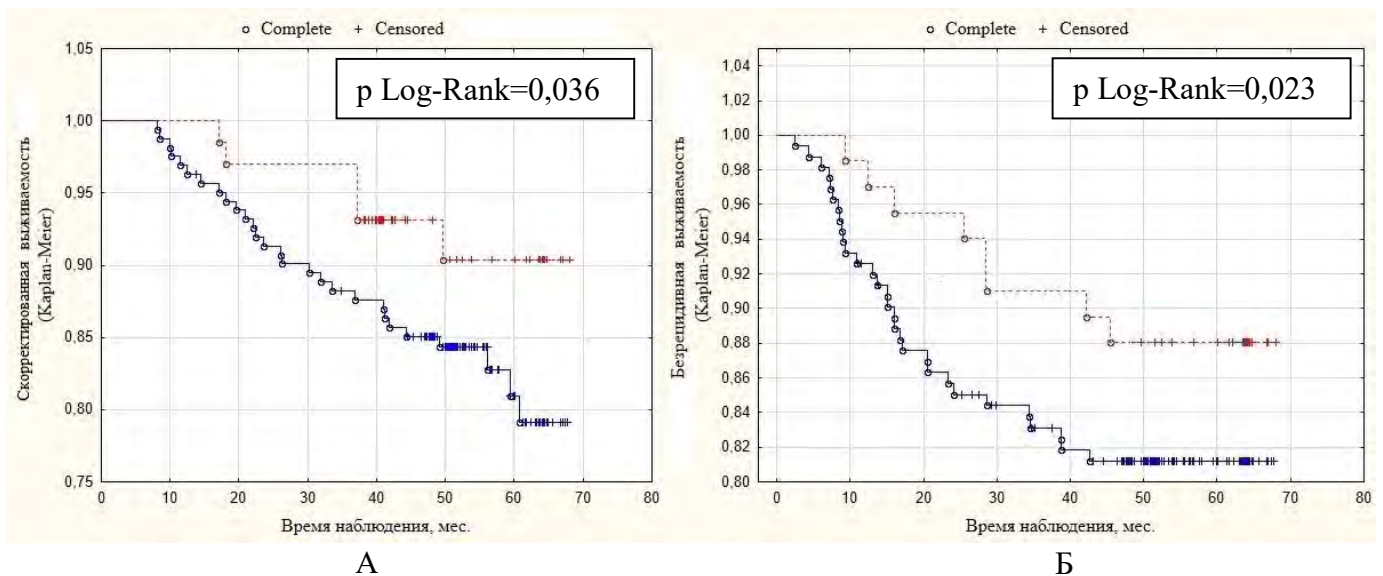
Период наблюдения пациентов тестируемой подгруппы составил 60,1 месяца. В тестируемой группе оптимизации адъювантной терапии с учетом ЦОК (n=68) пятилетняя СВ достигла 90,3±3,8%, что было статистически значимо выше показателя в контрольной группе 78,7±3,9% (p Log-Rank=0,036). Пятилетняя БРВ в тестируемой группе составила 88,0±4,4%, и это было статистически значимо выше показателей контрольной группы 80,6±3,3% (p Log-Rank=0,023). Сводные данные представлены в таблицах 8–9 и на рисунке 3.

Таблица 8. – СВ пациентов тестируемой и контрольной групп исследования

Скорректированная выживаемость	Показатель выживаемости, %, 95% ДИ		
	1-летняя	3-летняя	5-летняя
Контрольная группа (n=68)	96,6 (95,2–98,0)	87,3 (85,7–88,9)	78,7 (74,8–82,6)
Тестируемая группа (n=68)	98,5 (97,0–100)	93,4 (90,4–97,4)	90,3 (86,5–94,1)

Таблица 9. – БРВ пациентов тестируемой и контрольной групп исследования

Безрецидивная выживаемость	Показатель выживаемости, %, 95% ДИ		
	1-летняя	3-летняя	5-летняя
Контрольная группа (n=68)	94,5 (92,4–96,6)	83,1 (80,2–86,0)	80,6 (77,3–83,9)
Тестируемая группа (n=68)	97,7 (95,9–99,5)	91,9 (88,1–95,7)	88,0 (83,6–92,4)



----- тестируемая группа ----- контрольная группа

Рисунок 3. – Сравнение СВ (А) и БРВ (Б) в тестируемой и контрольной группах

Экономическая эффективность предлагаемой разработки с учетом предотвращенного экономического ущерба составила 11,82. Таким образом, на один потраченный доллар экономия составляет около 12 долларов, без учета затрат на пребывание в стационаре, оплату листка временной нетрудоспособности и в связи с отсутствием эффективной работы пациента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Созданы, прошли клинические испытания и зарегистрированы в установленном порядке оригинальные тест-системы отечественного производства для выявления количественной суммарной оценки транскриптов *сурвивина*, *HER-2/neu* и *c-ABL* в образцах РНК/мРНК, позволяющие определять экспрессию указанных генов в опухолевой ткани и циркулирующих опухолевых клетках, обладающие аналитической чувствительностью больше либо равно 5 копиям в пробе, аналитической специфичностью 100% [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 13, 14, 15, 19, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 38, 39, 43, 44, 45, 48, 49, 50].

2. Частота выделения ЦОК у пациентов, страдающих РМЖ I–IIIc (cT1–4N1–3bM0) стадий, составила 67,6%. ЦОК, выделенные из периферической крови данной категории пациентов, характеризуются выраженным разнообразием транскрипционного фенотипа. В 48,0% случаев ЦОК экспрессируют ген антиапоптотического протеина сурвивина *BIRC5*, в 62,7% случаев – ген рецептора эпидермального фактора роста *HER-2/neu*. В 73,9% случаев ЦОК экспрессируют по меньшей мере один из маркеров ЭМП, а 46,4% – маркер стволовой опухолевой клетки *ALDH1*. В 85,5% ЦОК определялась экспрессия как минимум одного гена лекарственной устойчивости семейства *ABC-транспортеров*.

Статистически значимо чаще на 60,0% гены ЭМП экспрессировались в ЦОК при сверхэкспрессирующем онкопротеин *HER-2/neu* раках – люминальном B *HER2+* и гиперэкспрессирующем *HER2* ($p=0,001$), а ЦОК, экспрессирующие ген стволовой опухолевой клетки *ALDH1*, идентифицировались только у пациентов с наличием метастазов в регионарные лимфатические узлы (N+) при IIb–IIIc стадиях опухолевого процесса ($p=0,001$).

Установлена сильная статистически значимая корреляция между экспрессией генов *AKT2* и *PI3K* ($r=0,782$; $p<0,01$). Обнаружена умеренная статистически значимая корреляция между уровнями нормализованной экспрессии генов *BIRC5* и *HER-2/neu* ($r=0,526$; $p<0,01$), а также между *HER-2/neu* и *PI3K* ($r=0,307$; $p<0,01$). Также установлена положительная слабая корреляция между экспрессией гена *BIRC5* и генами-маркерами ЭМП *TWIST* и генами *ABCB1* и *ABCC1*. Экспрессия гена *HER-2/neu* слабо коррелирует с экспрессией генов ЭМП и *ALDH1*. Слабая корреляционная связь выявлена между самими генами лекарственной устойчивости семейства *ABC-транспортеров*.

Несогласованность случаев по экспрессии гена *HER-2/neu* в ЦОК и онкопротеина *HER-2/neu*, определяемого ИГХ (FISH), составляла 36–67%. Потенциально химиорезистентными случаями с учетом транскрипционного

фенотипа ЦОК были приняты 68,1% случаев первичного РМЖ [1, 2, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 20, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 33, 35, 36, 40, 41, 42].

3. ЦОК, экспрессирующие гены *BIRC5* и *HER-2/neu*, в 70,9% обнаруживаются в периферической крови пациентов, страдающих РМЖ I–III стадий, до начала специального противоопухолевого лечения в группах низкого, промежуточного и высокого риска возврата болезни при всех молекулярно-генетических подтипах рака молочной железы. После оперативного вмешательства частота МОБ, подтверждаемая наличием ЦОК, экспрессирующих гены *BIRC5* и *HER-2/neu*, составляет 59,1%, причем после радикальной мастэктомии по Маддену частота сохранения ЦОК, экспрессирующих таргетные гены, статистически значимо ниже, чем после радикальной резекции молочной железы, и составляет 46,9% против 61,8% ($p=0,04$).

Статистически значимо чаще на 47,9% ($p=0,001$) ЦОК, экспрессирующие гены *BIRC5* и *HER-2/neu*, обнаруживались после радикальной операции в случае долькового строения инвазивной карциномы молочной железы, чем при неспецифицируемой карциноме [1, 2, 17, 20, 23, 36, 43].

4. У пациентов, страдающих РМЖ, получающих адъювантную терапию по схемам САФ (CEF), АС (EC), статистического изменения частоты определения ЦОК, экспрессирующих гены *BIRC5* и *HER-2/neu*, не установлено ($p>0,05$). Системная адъювантная терапия по схеме АС–Т приводит к статистически значимому снижению частоты определения ЦОК, экспрессирующих гены *BIRC5* и *HER-2/neu*, и позволяет снизить частоту МОБ с 68,0% до 16,0% ($p=0,006$). Таргетное использование моноклонального антитела трастузумаба помогает добиться эрадикации ЦОК у 15% пациентов и снизить частоту МОБ с 40% до 25%, однако показатели не являются статистически значимыми ($p>0,05$). Гормонотерапия тамоксифеном также не приводила к статистически значимому снижению частоты определения таргетных ЦОК ($p>0,05$). Послеоперационная лучевая терапия в плане комбинированного лечения при органосохраняющем лечении статистически значимо снижает частоту выявления ЦОК, экспрессирующих гены *BIRC5* и *HER-2/neu*, на 33,4% ($p=0,049$). Лучевая терапия как этап комплексного лечения при местно-распространенных формах РМЖ после адъювантной ПХТ не оказывает статистически значимого влияния на уменьшение частоты определения таргетных ЦОК и не позволяет осуществлять контроль над МОБ ($p>0,05$) [1, 2, 17, 18, 20, 23, 29, 37, 40, 44, 45].

У пациентов, страдающих РМЖ, получающих адъювантную терапию по схемам САФ (CEF), АС (EC), по мере проведения курсов в ЦОК отмечается статистически значимое увеличение уровня нормализованной экспрессии гена *BIRC5* с 0,316 до 4,537 ($p=0,01$) при схеме САФ (CEF) и с 0,456 до 1,444 ($p=0,05$) при схеме АС (EC). Статистического изменения уровня нормализованной экспрессии гена *HER-2/neu* не установлено. При проведении адъювантной терапии

по схеме АС–Т статистически значимого изменения как в сторону роста, так и в сторону снижения уровня нормализованной экспрессии генов *BIRC5* и *HER-2/neu* в ЦОК не установлено ($p=0,06$ и $p=0,08$ соответственно). По мере проведения таргетной терапии, включающей сочетание паклитаксела с трастузумабом, выявлено статистически значимое ($p=0,011$) увеличение уровня нормализованной экспрессии гена *HER-2/neu* в ЦОК по мере проведения курсов с 0,225 до 8,058. При лучевой терапии, а также гормонотерапии тамоксифеном статистически значимого изменения уровня нормализованной экспрессии генов *BIRC5* и *HER-2/neu* в ЦОК не установлено ($p>0,05$). Сохранение ЦОК, экспрессирующих гены *BIRC5* и *HER-2/neu*, а также динамическое увеличение уровня нормализованной экспрессии указанных генов на фоне проводимой адьювантной терапии дополнительно свидетельствуют о неэффективности проводимого лечения в отношении эрадикации ЦОК [1, 2, 17, 20, 21, 23, 29, 37, 40, 44, 45].

5. Неблагоприятные факторы риска развития прогрессирования и возврата болезни – стадия опухолевого процесса с поражением регионарных лимфатических узлов IIВ–IIIС (N+), которая увеличивает риск прогрессирования в 3,8 раза (95% ДИ: 1,59–9,34), Ki 67 >20%, увеличивающий риск в 2,7 раза (95% ДИ: 1,04–6,82), наличие ЦОК, экспрессирующих ген стволовой опухолевой клетки *ALDH1* до начала специального лечения, увеличивающее риск в 1,2 раза (95% ДИ: 1,07–7,73), и сохранение ЦОК (МОБ) после завершеного противоопухолевого лечения, что увеличивает риск рецидива болезни в 3,6 раза (95% ДИ: 1,32–9,99). У пациентов, страдающих РМЖ, имеющих все четыре неблагоприятных фактора, условная вероятность смерти в 44,3 выше, чем у пациентов, у которых эти факторы отсутствуют.

Скорректированная 5-летняя выживаемость статистически значимо была выше у пациентов с отсутствием ЦОК после завершения специального противоопухолевого лечения и составила 85,6 (95% ДИ: 77,0–94,2) по сравнению с пациентами с диагностированной МОБ после завершения специального противоопухолевого лечения, где данный показатель составил 71,1 (95% ДИ: 64,4–77,8) при p Log-Rank=0,00007.

Безрецидивная 5-летняя выживаемость статистически значимо была выше у пациентов с отсутствием ЦОК после завершения специального противоопухолевого лечения и составила 85,5 (95% ДИ: 79,8–91,2) по сравнению с пациентами с диагностированной МОБ после завершения специального противоопухолевого лечения, где данный показатель составил 66,1 (95% ДИ: 58,5–73,7) при p Log-Rank=0,00004 [1, 2, 17, 18, 20, 23, 29, 37, 40].

6. Применение метода контроля эффективности химиотерапии путем оценки нормализованной экспрессии генов *BIRC5* сурвивина и *HER-2/neu* рецептора эпидермального фактора роста в ЦОК, выделенных из периферической крови пациентов, страдающих РМЖ, позволило диагностировать неэффективность

проводимой адъювантной химиотерапии по схеме CAF (CEF) у 56,1%, по схеме AC (EC) у 52,5%, по схеме AC–T у 16%, по схеме T–Траст у 25% и при гормонотерапии у 44,1% пациентов [1, 2, 18, 23, 28, 37, 45, 46].

7. Применение метода лечения МОБ, основанного на своевременном переходе с неэффективной схемы адъювантной ПХТ на таксаны (при этом не следует дожидаться завершения всех запланированных курсов), а также дополнительная монокимиотерапия гемцитабином (при необходимости) у пациентов промежуточного и высокого риска возврата болезни позволяют добиться 100% эрадикации мРНК *BIRC5* и мРНК *HER-2/neu* положительных ЦОК в периферической крови, что дает возможность статистически значимо увеличить 5-летнюю скорректированную выживаемость на 11,6% ($p=0,036$) до $90,3\pm 3,8\%$, а безрецидивную выживаемость на 7,4% ($p=0,023$) до $88,0\pm 4,4\%$ с экономической эффективностью 11,82 [2, 17, 18, 23, 29, 37, 44, 45, 46, 47].

Рекомендации по практическому использованию результатов

При диагностировании и подтверждении у пациента РМЖ целесообразно исследовать периферическую кровь на наличие ЦОК, определив их транскрипционный фенотип, а именно экспрессию генов *HER-2/neu*, *BIRC5*, и при необходимости экспрессию генов семейства *ABC-транспортеров*, генов ЭМП, *ALDH1*. Наличие ЦОК, экспрессирующих таргетные гены, является неблагоприятным фактором с точки зрения прогрессирования заболевания. После хирургической операции исследуют периферическую кровь на ЦОК и при их наличии диагностируют МОБ. Дальнейшее лечение проводят с учетом оценки его эффективности по критерию наличия или отсутствия экспрессирующих таргетные гены ЦОК. После каждых двух курсов ПХТ осуществляют данную оценку и при наличии ЦОК производят смену терапии на другую линию, а именно на таксаны. После двух курсов таксанов проводят анализ периферической крови на ЦОК. При их наличии производят смену химиотерапии на гемцитабин и проводят 4 курса. При отсутствии ЦОК после двух курсов каждой из схем терапии она признается эффективной и продолжается лечение в прежнем режиме [44, 45].

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

Монографии

1. Шляхтунов, Е. А. Минимальная остаточная болезнь и рак молочной железы / Е. А. Шляхтунов. – Витебск : ВГМУ, 2018. – 243 с.
2. Шляхтунов, Е. А. Циркулирующие опухолевые клетки : характеристика, клиническое и прогностическое значение при раке молочной железы / Е. А. Шляхтунов. – Витебск : Чернин и Плешков, 2022. – 168 с.

Статьи

3. Shliakhtunou, E. A. Expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the tumor tissue of breast cancers / E. A. Shliakhtunou // Arch. Euromedica. – 2014. – Vol. 4, № 2. – P. 62–65.
4. Шляхтунов, Е. А. Молекулярно-генетическая диагностика некоторых злокачественных солидных опухолей / Е. А. Шляхтунов, В. М. Семенов // Новости хирургии. – 2014. – Т. 22, № 4. – С. 481–487.
5. Шляхтунов, Е. А. Молекулярно-генетическая диагностика минимальной остаточной болезни в онкогематологии / Е. А. Шляхтунов, В. М. Семенов // Вестн. ВГМУ. – 2014. – Т. 13, № 4. – С. 21–28.
6. Шляхтунов, Е. А. Минимальная остаточная болезнь при солидных опухолях – современное состояние проблемы / Е. А. Шляхтунов // Новости хирургии. – 2014. – Т. 22, № 6. – С. 735–742.
7. Шляхтунов, Е. А. Повышение диагностической надежности метода ПЦР-анализа биомаркеров рака молочной железы в режиме реального времени на основе использования эндогенного контроля полимеразной цепной реакции / Е. А. Шляхтунов, И. С. Веремей // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2016. – Т. 5, № 2. – С. 268–278.
8. Морфологические и физиологические особенности раковых клеток у млекопитающих (обзор литературы) / В. В. Побяржин, Е. С. Пашинская, В. М. Семенов, Т. И. Дмитраченко, Е. А. Шляхтунов // Вестн. ВГМУ. – 2016. – Т. 15, № 6. – С. 28–40.
9. Шляхтунов, Е. А. Прогностическая роль циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК), обнаруженных при помощи обратнo транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) при раке молочной железы: мета-анализ опубликованной литературы / Е. А. Шляхтунов, В. М. Семенов, А. В. Савченко // Онколог. журн. – 2017. – Т. 11, № 2. – С. 46–54.
10. Шляхтунов, Е. А. Поиск циркулирующих опухолевых клеток: итоги и перспективы / Е. А. Шляхтунов, В. М. Семенов, А. В. Савченко // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2017. – Т. 6, № 2. – С. 232–246.

11. Шляхтунов, Е. А. Экспрессия генетических маркеров эпителиально-мезенхимального перехода и маркера стволовой клетки в циркулирующих опухолевых клетках при первичном нематастатическом раке молочной железы / Е. А. Шляхтунов, И. С. Веремей // Евраз. онколог. журн. – 2017. – Т. 5, № 3. – С. 412–419.

12. Иммуногистохимические и молекулярно-генетические методы диагностики онкологических заболеваний (обзор литературы) / В. М. Семенов, Е. С. Пашинская, В. В. Побяржин, И. А. Субботина, Е. А. Шляхтунов, И. С. Веремей, С. В. Семенов // Вестн. ВГМУ. – 2017. – Т. 16, № 2. – С. 15–25.

13. Шляхтунов, Е. А. Экспрессия генов множественной лекарственной устойчивости ABC-транспортёров в циркулирующих опухолевых клетках при первичном нематастатическом раке молочной железы / Е. А. Шляхтунов, И. С. Веремей // Евраз. онколог. журн. – 2017. – Т. 5, № 4. – С. 505–512.

14. Генные механизмы возникновения раковых опухолей / В. М. Семенов, Е. С. Пашинская, В. В. Побяржин, И. А. Субботина, Е. А. Шляхтунов // Здоровоохранение. – 2017. – № 7. – С. 38–47.

15. Шляхтунов, Е. А. Сравнительная оценка современных технологий обогащения и изоляции циркулирующих опухолевых клеток при первичном нематастатическом раке молочной железы, их молекулярно-генетическая характеристика / Е. А. Шляхтунов, О. И. Овсяник // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2017. – Т. 6, № 4. – С. 507–519.

16. Шляхтунов, Е. А. Фенотипическая характеристика циркулирующих опухолевых клеток при первичном нематастатическом раке молочной железы / Е. А. Шляхтунов, И. С. Веремей, О. И. Овсяник // Онколог. журн. – 2017. – Т. 11, № 3. – С. 64–71.

17. Shliakhtunou, Ya. A. Clinical importance of expression of BIRC5 and HER-2/neu genes in circulating tumor cells as markers of minimum residual disease in surgical treatment of breast cancer / Ya. A. Shliakhtunou // Novosti Khirurgii. – 2018. – Vol. 26, № 4. – P. 457–464.

18. Шляхтунов, Е. А. Адьювантная цитостатическая терапия минимальной остаточной болезни при раке молочной железы / Е. А. Шляхтунов, В. М. Семенов // Вестн. ВГМУ. – 2018. – Т. 17, № 4. – С. 64–71.

19. Шляхтунов, Е. А. Экспрессия антиапоптотического протеина сурвивина и кодирующего его гена BIRC5 в первичной карциноме молочной железы как фактор прогноза заболевания / Е. А. Шляхтунов // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2018. – Т. 14, № 4. – С. 12–19.

20. Шляхтунов, Е. А. Экспрессии генов BIRC5 и HER-2/neu в циркулирующих опухолевых клетках при хирургическом лечении рака молочной железы / Е. А. Шляхтунов // Хирургическая практика. – 2018. – № 4. – С. 61–68.

21. Shliakhtunou, Ya. A. Expression of anti-apoptothic protein survivin and gene BIRC5 in primary breast carcinoma as a prognostic marker for progression of disease / Ya. A. Shliakhtunou // Онкология. – 2018. – Т. 20, № 4. – С. 255–259.

22. Шляхтунов, Е. А. Экспрессия антиапоптотического протеина сурвивина и его гена BIRC5 в первичной карциноме молочной железы / Е. А. Шляхтунов, В. А. Клопова // Архив патологии. – 2019. – Т. 81, № 2. – С. 18–23.

23. Shliakhtunou, Y. A. CTCs-oriented adjuvant personalized cytostatic therapy non-metastatic breast cancer patients: continuous non-randomized prospective study and prospective randomized controlled study / Y. A. Shliakhtunou // Breast Cancer Res. Treat. – 2021. – Vol. 186. – P. 439–451.

24. Shliakhtunou, Y. A. Transcription phenotype of circulating tumor cells in non-metastatic breast cancer: clinical and prognostic significance / Y. A. Shliakhtunou, V. M. Siamionau, V. V. Pobyarzhin // Int. J. of Health Sciences. – 2021. – Vol. 5, № 3. – P. 474–493.

Материалы конференций и тезисы докладов

25. Шляхтунов, Е. А. Экспрессия гена сурвивина (BIRC5) и ErbB-2 (HER-2/neu) в лимфоцитах при раке молочной железы / Е. А. Шляхтунов, В. М. Семенов, И. С. Веремей // Молекулярная онкология: итоги и перспективы : материалы конф., Москва, 16–17 дек. 2015 г. – [Опубл. в журн.] Успехи молекулярной онкологии. – 2015. – Т. 2, № 4. – С. 18.

26. Шляхтунов, Е. А. Экспрессия гена сурвивина (BIRC5) в первичной опухоли и циркулирующих опухолевых клетках при раке молочной железы / Е. А. Шляхтунов // Молекулярная онкология: итоги и перспективы : материалы конф., Москва, 16–17 дек. 2015 г. – [Опубл. в журн.] Успехи молекулярной онкологии. – 2015. – Т. 2, № 4. – С. 88.

27. Шляхтунов, Е. А. Экспрессия гена сурвивина (BIRC5) – маркер опухолевой прогрессии при раке молочной железы / Е. А. Шляхтунов, В. М. Семенов, И. С. Веремей // Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации : материалы 71-й науч. сессии сотрудников ун-та, Витебск, 25–26 янв. 2016 г. / под ред. А. Т. Щастного. – Витебск : ВГМУ, 2016. – С. 448.

28. Shlyakhtunou, Y. Surviving gene expression in the primary tumor and circulating tumor cells in breast cancer / Y. Shlyakhtunou // 10th European breast cancer conference, Amsterdam, The Netherlands, 9–11 march 2016. – [Publ.] Europ. J. of Cancer. – 2016. – Vol. 57, Suppl. 2. – S. 127.

29. Шляхтунов, Е. А. Анализ динамики экспрессии генов HER-2/neu и BIRC5 в ЦОК при РМЖ на фоне терапии трастузумабом / Е. А. Шляхтунов // Молекулярная онкология: итоги и перспективы : материалы II Всерос. конф.

по молекулярной онкологии, Москва, 6–8 дек. 2016 г. – [Опубл. в журн.] Успехи молекулярной онкологии. – 2016. – Т. 3, № 4. – С. 109.

30. Shlyakhtunou, Y. Tumor progression marker for breast cancer – surviving gene (BIRC5) / Y. Shlyakhtunou // 24th Birnnial Congress of the European Association for Cancer Research, Manchester, UK, 9–12 July 2016. – [Publ.] Europ. J. of Cancer. – 2016. – Vol. 61, Suppl. 1. – S. 104.

31. Shlyakhtunou, Y. Expression of survivin gene (BIRC5) and ErbB-2 (HER-2/neu) in lymphocytes in breast cancer / Y. Shlyakhtunou, V. Semenov // 24th Birnnial Congress of the European Association for Cancer Research, Manchester, UK, 9–12 July 2016. – [Publ.] Europ. J. of Cancer. – 2016. – Vol. 61, Suppl. 1. – S. 105.

32. Shlyakhtunou, Y. Survivin gene expression in the primary tumor and CTCs – a new biomarker of tumor progression of breast cancer / Y. Shlyakhtunou // ESMO Congress, Copenhagen, Denmark, 7–11 October 2016. – [Publ.] Ann. of Oncology. – 2016. – Vol. 27, Suppl. 6. – vi21.

33. Shlyakhtunou, Y. New biomarker of tumor progression of breast cancer – survivin gene expression in the primary tumor and circulating tumor cells / Y. Shlyakhtunou // ECCO 2017: European Cancer Congress, Amsterdam, The Netherlands, 27–30 January 2017. – [Publ.] Europ. J. of Cancer. – 2017. – Vol. 72, Suppl. 1. – S. 16.

34. Shlyakhtunou, Y. Expression of ErbB-2 (HER-2/neu) and surviving (BIRC5) gene in tumor infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer / Y. Shlyakhtunou // ECCO 2017: European Cancer Congress, Amsterdam, The Netherlands, 27–30 January 2017. – [Publ.] Europ. J. of Cancer. – 2017. – Vol. 72, Suppl. 1. – S. 16.

35. Shliakhtunou, Y. Gene expression BIRC5, Erb-b2/HER-2/neu, ESR1, PGR1, MMP11, MDR1, MRP1, MXR at the CTCs in the primary breast cancer / Y. Shliakhtunou // ESMO Congress, Madrid, Spain, 8–12 September 2017. – [Publ.] Ann. of Oncology. – 2017. – Vol. 28, № 5. – P. 39.

36. Шляхтунов, Е. А. Функциональная активность циркулирующих опухолевых клеток при первичном неметастатическом раке молочной железы / Е. А. Шляхтунов, В. М. Семенов // Достижения фундаментальной клинической медицины и фармации : материалы 72-й науч. сессии сотрудников ун-та, Витебск, 25–26 янв. 2017 г. / под ред. А. Т. Щастного. – Витебск : ВГМУ, 2017. – С. 73–74.

37. Шляхтунов, Е. А. Мониторинг полихимиотерапии рака молочной железы на основе оценки экспрессии гена BIRC5 в циркулирующих опухолевых клетках / Е. А. Шляхтунов, В. М. Семенов, Т. Е. Михайлова // Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации : материалы 73-й науч. сессии сотрудников ун-та, Витебск, 29–30 янв. 2018 г. : в 2 ч. Ч. 1 / под ред. А. Т. Щастного. – Витебск : ВГМУ, 2018. – С. 68–70.

38. Разработка тест-системы для суммарной оценки транскриптов сурвивина / В. М. Семенов, Е. А. Шляхтунов, В. В. Поляржин, И. А. Субботина,

Е. С. Пашинская, С. К. Егоров // Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации : материалы 73-й науч. сессии сотрудников ун-та, Витебск, 29–30 янв. 2018 г. : в 2 ч. Ч. 1 / под ред. А. Т. Щастного. – Витебск : ВГМУ, 2018. – С. 127–130.

39. Тест-система для количественного определения HER-2/neu транскриптов / В. М. Семенов, Е. А. Шляхтунов, В. В. Побяржин, И. А. Субботина, Е. С. Пашинская, С. К. Егоров, С. В. Семенов // Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации : материалы 73-й науч. сессии сотрудников ун-та, Витебск, 29–30 янв. 2018 г. : в 2 ч. Ч. 1 / под ред. А. Т. Щастного. – Витебск : ВГМУ, 2018. – С. 130–133.

40. Shlyakhtunou, Y. Gene expressin BIRC5, c-ERBB2/HER-2/neu, ESR1, PGR1, MMP11, MDR1, MRP1, MXR et the CTCsin the adjuvant treatment of primary non metastatic breast cancer / Y. Shlyakhtunou // 11th European breast cancer conference, Barselons, Spain, 21–23 march 2018. – [Publ.] Europ. J. of Cancer. – 2018. – Vol. 92, Suppl. 3. – S. 107.

41. Shlyakhtunou, Y. Phenotypic characteristic of circulating tumor cells in primary nonmetastatic breast cancer / Y. Shlyakhtunou // 11th European breast cancer conference, Barselons, Spain, 21–23 march 2018. – [Publ.] Europ. J. of Cancer. – 2018. – Vol. 92, Suppl. 3. – S. 147.

42. Shlyakhtunou, Y. Expression of the genes of multiple drug resistance ABC-transporters in circulating tumor cells in primary nonmetastatic breast cancer / Y. Shlyakhtunou // 11th European breast cancer conference, Barselons, Spain, 21–23 march 2018. – [Publ.] Europ. J. of Cancer. – 2018. – Vol. 92, Suppl. 3. – S. 147.

43. Shlyakhtunou, Y. Circulating tumor cells (CTCs) as a marker of the radicality of surgical treatment of breast cancer / Y. Shlyakhtunou // 7th International conference on general surgery and surgical research, Rome, Italy, 23–24 october 2019. – [Publ.] J. of Surg. and Clin. Pract. – 2019. – Vol. 3. – P. 29–30.

Инструкции по применению

44. Метод оценки эффективности химиотерапии путем определения экспрессии генов ERBB-2/HER-2/NEU и SURVIVIN (BIRC5) в ЦОК при злокачественных солидных новообразованиях : инструкция по применению № 007-0217 : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 14.04.2017 / УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» ; сост.: Е. А. Шляхтунов, В. М. Семенов, И. С. Веремей, В. В. Побяржин, И. А. Субботина. – Витебск, 2018. – 7 с.

45. Метод адьювантной цитостатической терапии минимальной остаточной болезни у пациентов, страдающих раком молочной железы : инструкция по применению № 045-0518 : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь

01.06.2018 / УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», УЗ «Витебский областной клинический онкологический диспансер» ; сост.: Е. А. Шляхтунов, В. М. Семенов, Т. Е. Михайлова. – Витебск, 2018. – 8 с.

Патенты на изобретения

46. Способ диагностики минимальной остаточной болезни при раке молочной железы : пат. ВУ 23161 / Е. А. Шляхтунов, В. М. Семенов, А. В. Томчина, О. И. Овсяник. – Оpubл. 30.10.2020.

47. Способ адьювантной цитостатической терапии минимальной остаточной болезни у пациентов, страдающих раком молочной железы : пат. ВУ 23261 / Е. А. Шляхтунов, В. М. Семенов, А. В. Томчина, Т. Е. Михайлова. – Оpubл. 30.12.2020.

Регистрационные удостоверения

48. Тест-система для определения HER2/NEU с-ДНК транскрипции методом real time PCR. Технические условия ТУ ВУ391360704.007–2016 ; разработчики: В. М. Семенов, И. С. Веремей, С. В. Семенов, Е. А. Шляхтунов, С. К. Егоров.

49. Тест-система для определения Survivin с-ДНК транскрипции методом real time PCR. Технические условия ТУ ВУ391360704.000–2016 ; разработчики: В. М. Семенов, И. С. Веремей, С. В. Семенов, Е. А. Шляхтунов, С. К. Егоров.

50. Тест-система для определения с-AVL с-ДНК транскрипции методом real time PCR. Технические условия ТУ ВУ391360704.013–2016 ; разработчики: В. М. Семенов, И. С. Веремей, Е. А. Шляхтунов, С. В. Семенов, С. К. Егоров.

РЭЗІЮМЭ

Шляхтуноў Яўген Аляксандравіч

МІНІМАЛЬНАЯ РЭШТКАВАЯ ХВАРОБА ПРЫ РАКУ МАЛОЧНАЙ ЗАЛОЗЫ – ДЫЯГНОСТЫКА І ЛЯЧЭННЕ

Ключавыя словы: рак малочнай залозы, цыркулюючыя пухлінавыя клеткі, экспрэсія генаў, ад’ювантная цытастатычная тэрапія.

Мэта даследавання: палепшыць вынікі тэрапіі пацыентаў, якія пакутуюць на рак малочнай залозы, шляхам распрацоўкі метадаў дыягностыкі і лячэння мінімальнай рэшткавай хваробы.

Матэрыялы і метады: дадзеныя пра 230 пацыентаў з I–III стадыямі рэзектабельнага раку малочнай залозы, якіх уключалі ў праспектыўнае безупыннае нерандамізіраванае і праспектыўнае кантраляванае даследаванне ў перыяд з 2015 па 2017 г., біялагічны матэрыял – перыферычная кроў, цыркулюючыя пухлінавыя клеткі, экспрэсія генаў.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: упершыню ўстаноўлена, што цыркулюючыя пухлінавыя клеткі вызначаюцца ў перыферычнай крыві пры рэзектабельным раку малочнай залозы да пачатку спецыяльнага проціпухліннага лячэння, захоўваюцца пасля хірургічнай аперацыі, у час правядзення ад’ювантнага лячэння, і з’яўляюцца незалежным фактарам рызыкі прагрэсавання. Цыркулюючыя пухлінавыя клеткі да пачатку спецыяльнага лячэння валодаюць значнай гетэрагеннасцю і розным транскрыпцыйным фенатыпам. Устаноўлена, што транскрыпцыйны фенатып цыркулюючых пухлінавых клетак перажывае змены ў ходзе праведзенай ад’ювантнай хіміятэрапіі, у тым ліку і таргетнай, у бок перавагі хіміярэзістэнтных клонаў. Адносна рызыка прагрэсавання раку малочнай залозы пры наяўнасці цыркулюючых пухлінавых клетак да пачатку спецыяльнага лячэння складае 14,713 (95% ДІ: 2,077–104,228), а пры іх захаванні пасля лячэння – 52,364 (95% ДІ: 7,360–372,552)). Новы метада ЦПК-арыентаванай ад’ювантнай цытастатычнай хіміятэрапіі дае магчымасць статыстычна значна павялічыць скарэктываваную 5-гадовую выжывальнасць на 11,6% ($p=0,036$) да $90,3\pm 3,8\%$, а безрэцыдыўную выжывальнасць на 7,4% ($p=0,023$) да $88,0\pm 4,4\%$ з эканамічнай эфектыўнасцю 11,82.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: матэрыялы дысертацыі выкарыстоўваюцца ў Віцебскім, Гомельскім анкалагічных дыспансерах, Гродзенскай абласной бальніцы, РНПЦ анкалогіі і медыцынскай радыялогіі імя М.М. Аляксандрава, уключаны ў лекцыйны курс вучэбнай праграмы кафедра анкалогіі ВДМУ і ГрДМУ.

Галіна прымянення: анкалогія, мамалогія, малекулярная генетыка.

РЕЗЮМЕ

Шляхтунов Евгений Александрович

МИНИМАЛЬНАЯ ОСТАТОЧНАЯ БОЛЕЗНЬ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ – ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ

Ключевые слова: рак молочной железы, циркулирующие опухолевые клетки, экспрессия генов, адьювантная цитостатическая терапия.

Цель исследования: улучшить результаты терапии пациентов, страдающих раком молочной железы, путем разработки методов диагностики и лечения минимальной остаточной болезни.

Материалы и методы: данные о 230 пациентах с I–III стадиями резектабельного рака молочной железы, включенных в проспективное сплошное нерандомизированное и проспективное контролируемое исследование в период с 2015 по 2017 г., биологический материал – периферическая кровь, циркулирующие опухолевые клетки, экспрессия генов.

Полученные результаты и их новизна: впервые установлено, что циркулирующие опухолевые клетки определяются в периферической крови при резектабельном раке молочной железы до начала специального противоопухолевого лечения, сохраняются после хирургической операции, во время проведения адьювантного лечения, и являются независимым фактором риска прогрессирования. Циркулирующие опухолевые клетки еще до начала специального лечения обладают значительной гетерогенностью и различным транскрипционным фенотипом. Установлено, что транскрипционный фенотип циркулирующих опухолевых клеток претерпевает изменения в ходе проводимой адьювантной терапии, в том числе и таргетной, в сторону преобладания химиорезистентных клонов. Относительный риск прогрессирования рака молочной железы при наличии циркулирующих опухолевых клеток до начала специального лечения составляет 14,713 (95% ДИ: 2,077–104,228), а при их сохранении после лечения – 52,364 (95% ДИ: 7,360–372,552)). Новый метод ЦОК-ориентированной адьювантной цитостатической химиотерапии дает возможность статистически значимо увеличить скорректированную 5-летнюю выживаемость на 11,6% ($p=0,036$) до $90,3\pm 3,8\%$, а безрецидивную выживаемость на 7,4% ($p=0,023$) до $88,0\pm 4,4\%$ с экономической эффективностью 11,82.

Рекомендации по использованию: материалы диссертационной работы используются в Витебском, Гомельском онкологических диспансерах, Гродненской областной больнице, РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, включены в лекционный курс учебной программы кафедр онкологии ВГМУ и ГрГМУ.

Область применения: онкология, маммология, молекулярная генетика.

SUMMARY

Shlyakhtunov Evgeny Alexandrovich

MINIMUM RESIDUAL DISEASE IN BREAST CANCER – DIAGNOSIS AND TREATMENT

Key words: breast cancer, circulating tumor cells, gene expression, adjuvant cytostatic therapy.

Objective of the study: was to improve the results of therapy for patients suffering from breast cancer by developing methods for diagnosis and treatment of minimal residual disease.

Materials and methods: data on 230 patients with I–III stages of resectable breast cancer included in a prospective continuous non-randomized and prospective controlled study during the period from 2015 to 2017, biological material – peripheral blood isolated from it circulating tumor cells, and gene expression.

The results achieved and their novelty: it was first established that circulating tumor cells are detected in peripheral blood in resectable breast cancer prior to the initiation of a specific antitumor treatment for all molecular-genetic subtypes of breast cancer that are preserved after surgery irrespective of its volume, and also during the adjuvant treatment, and are an independent risk factor for the progression of. Circulating tumor cells have significant heterogeneity and different transcription phenotype before the beginning of special treatment. It has been established that the transcriptional phenotype of circulating tumor cells undergoes changes during the course of adjuvant cytostatic chemotherapy, including targeting, towards the predominance of chemoresistant clones. The relative risk of progression of breast cancer in the presence of circulating tumor cells prior to treatment is 14.713 (95% CI: 2.077–104.228), and when they remain after treatment – 52.364 (95% CI: 7.360–372.552)).

The new method of CTC-oriented adjuvant cytostatic chemotherapy makes it possible to significantly increase the tumor-specific 5-years survival by 11.6% ($p=0.036$) to $90.3\pm 3.8\%$, and relapse-free survival by 7.4 ($p=0.023$) to $88.04\pm 4.4\%$ with cost-effectiveness of 11.82.

Recommendations for use: the materials of the dissertation work are used in the Vitebsk, Gomel Oncology Centers, Grodno Regional Hospital, and in N.N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus, are included in the lecture course of the curriculum of the Departments of Oncology of VSMU and GSMU.

Field of application: oncology, mammology, molecular genetics.