

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ТОМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи



Тараканова Валерия Олеговна

**РОЛЬ РЕГУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ ROR1 и VMI-1 В
ЭФФЕКТИВНОСТИ ГОРМОНОТЕРАПИИ ИНГИБИТОРАМИ
АРОМАТАЗЫ У БОЛЬНЫХ ЛЮМИНАЛЬНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ
ЖЕЛЕЗЫ**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

3.3.2. Патологическая анатомия

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук

Бабышкина Наталия Николаевна

доктор медицинских наук, профессор

Вторушин Сергей Владимирович

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1 Характеристика люминального рака молочной железы.....	16
1.2 Морфологические и иммуногистохимические особенности люминального рака молочной железы.....	18
1.3 Роль молекулярных механизмов активации рецепторов эстрогена при люминальном раке молочной железы.....	23
1.4 Механизмы приобретенной резистентности к проводимой гормонотерапии при люминальном раке молочной железы.....	30
1.5 Характеристика и роль белка ROR1 в развитии злокачественных новообразований.....	36
1.6 Характеристика и роль белка BMI-1 в развитии злокачественных новообразований.....	39
Закключение.....	42
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	45
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	56
3.1 Клинико-морфологическая характеристика пациенток и опухолей люминального HER2-негативного рака молочной железы.....	56
3.2 Экспрессия ROR1, BMI-1, Cyclin D1 и мутационный статус гена PIK3CA в сопоставлении с клинико-морфологическими характеристиками люминального HER2-негативного рака молочной железы.....	62
3.3 Экспрессия ROR1, BMI-1, Cyclin D1 и мутационный статус гена <i>PIK3CA</i> в зависимости от молекулярного подтипа люминального HER2-негативного рака молочной железы (люминальный А и люминальный В).....	75
3.4 Ассоциации экспрессии ROR1, BMI-1, Cyclin D1 и мутационного статуса гена <i>PIK3CA</i> в опухолевой ткани при люминальном HER2-негативном раке молочной железы.....	81

3.5 Ассоциация клинико-морфологических и молекулярных характеристик опухоли с развитием отдаленного гематогенного метастазирования при люминальном раке молочной железы	89
3.6 Анализ показателей выживаемости пациенток с люминальным HER2-негативным раком молочной железы с учетом молекулярных характеристик опухоли.....	94
3.7 Прогнозирование вероятности развития отдаленных метастазов у пациенток с люминальным HER2-негативным раком молочной железы....	100
ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ СОБСТВЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	109
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	129
ВЫВОДЫ	133
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	135
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	137
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	140

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность избранной темы

Рак молочной железы (РМЖ) остается ведущей онкологической патологией у женщин и одной из основных причин онкологической смертности во всем мире. В Российской Федерации РМЖ стабильно занимает первое место в структуре онкологической заболеваемости женского населения [1, 2].

Несмотря на внедрение программ ранней диагностики и совершенствование лечебных подходов, сохраняется высокая медико-социальная значимость заболевания и необходимость дальнейшего повышения эффективности лечения и прогностической стратификации пациенток.

Наиболее распространенным клинико-биологическим вариантом РМЖ является гормон-рецептор-положительный HER2-негативный подтип, для которого адъювантная эндокринотерапия является базовым компонентом комбинированного лечения. В постменопаузе ингибиторы ароматазы (анастрозол, летрозол, эксеместан) входят в число стандартов адъювантной терапии и рекомендованы ведущими международными экспертными сообществами [96, 111].

Вместе с тем, по данным крупных клинических исследований и метаанализов, у 15-20 % пациенток с ранним HR+/HER2– РМЖ развивается отдаленное прогрессирование заболевания даже на фоне адекватно проведенной гормонотерапии [96, 121].

Ограниченная прогностическая ценность стандартных клинико-морфологических факторов и базовых иммуногистохимических маркеров (ER, PR, Ki-67) обуславливает необходимость поиска дополнительных биологических показателей, отражающих молекулярную гетерогенность

опухоли и потенциальную резистентность к эндокринному воздействию [129].

Современные исследования указывают, что даже внутри люминального HER2-негативного подтипа существует выраженная вариабельность биологических свойств опухолей, определяющая различия клинического течения и исходов заболевания.

В последние годы возрастающее внимание уделяется регуляторным белкам, вовлеченным в сигнальные пути, связанные с пролиферацией, инвазивностью и устойчивостью опухолевых клеток. В этом контексте особый интерес представляет рецептор ROR1 (receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1), относящийся к онкофетальным молекулам. Показано, что экспрессия ROR1 ассоциируется с агрессивным фенотипом опухолевых клеток, активацией сигнальных каскадов выживания и снижением чувствительности к противоопухолевой терапии, что рассматривается как потенциальный механизм лекарственной резистентности [77, 133, 166].

Другим значимым регуляторным белком является BMI-1 – компонент Polycomb-репрессивного комплекса, участвующий в эпигенетическом контроле экспрессии генов, регуляции клеточного цикла и поддержании стволовоподобных свойств клеток. По данным экспериментальных и клинико-патологических исследований, повышенная экспрессия BMI-1 связана с усилением пролиферативной активности, инвазивного потенциала и неблагоприятным течением опухолевого процесса, а также с формированием фенотипа устойчивости к терапии [8, 154, 91].

Вместе с тем клиническая значимость BMI-1 при люминальном раке молочной железы и его роль в эффективности адъювантной гормонотерапии остаются недостаточно изученными.

Дополнительный уровень молекулярной гетерогенности HR+/HER2–РМЖ связан с мутациями гена *PIK3CA*, которые являются одними из наиболее частых генетических событий при данном подтипе опухоли. Современные исследования показывают, что мутации *PIK3CA* могут влиять

на активность PI3K/АКТ-сигнального пути, модифицировать биологическое поведение опухоли и ассоциироваться с особенностями ответа на эндокринную терапию и показателями безрецидивной выживаемости [40, 26, 147, 176].

Таким образом, при сохраняющейся высокой распространенности рака молочной железы в Российской Федерации и значительной доле пациенток, получающих адъювантную гормонотерапию ингибиторами ароматазы, поиск и клиничко-морфологическая валидация дополнительных молекулярных маркеров, включая ROR1 и BMI-1, в сочетании с анализом мутационного статуса *PIK3CA*, являются актуальной задачей современной онкопатологии и клинической онкологии.

Степень разработанности проблемы

Проблема биологической гетерогенности гормон-рецептор-положительного HER2-негативного рака молочной железы и факторов, влияющих на эффективность адъювантной гормонотерапии, активно изучается в течение последних десятилетий. Основное внимание уделено клиничко-морфологическим характеристикам опухоли, стандартным иммуногистохимическим маркерам (ER, PR, Ki-67), а также их прогностической и предиктивной значимости при выборе эндокринной терапии [129].

В клинических исследованиях доказано преимущество ингибиторов ароматазы перед тамоксифеном у больных люминальным раком молочной железы в постменопаузе, однако биологические факторы, определяющие вариабельность ответа на лечение, изучены недостаточно [95, 96, 121].

В последние годы активно изучаются молекулярные механизмы эндокринорезистентности. Показана связь экспрессии рецептора ROR1 с инвазивным потенциалом опухоли и снижением чувствительности к противоопухолевой терапии [77, 133, 166], однако большинство

исследований выполнено на экспериментальных моделях либо в смешанных клинических когортах.

Повышенная экспрессия белка BMI-1 ассоциирована с неблагоприятным течением опухолевого процесса при различных злокачественных новообразованиях, включая рак молочной железы [8, 91, 151], однако его клиническая значимость при люминальном HER2-негативном раке молочной железы остается недостаточно изученной.

Мутации гена *PIK3CA* относятся к наиболее частым молекулярным событиям при HR+/HER2- раке молочной железы и могут быть связаны с особенностями клинического течения и ответа на эндокринную терапию [40, 26, 147, 176]. Вместе с тем результаты исследований остаются неоднозначными.

Таким образом, несмотря на значительный объем накопленных данных, комплексная оценка эффективности адъювантной гормонотерапии ингибиторами ароматазы с учетом экспрессии ROR1 и BMI-1, а также мутационного статуса *PIK3CA*, остается недостаточно разработанной. В литературе отсутствуют комплексные клинико-морфологические исследования, выполненные в клинически однородных группах пациенток, что определяет научную нишу настоящего исследования.

Цель исследования

Оценить прогностическую значимость экспрессии регуляторных белков ROR1 и BMI-1, мутационного статуса гена *PIK3CA* и клинико-морфологических характеристик опухоли в отношении эффективности адъювантной гормонотерапии ингибиторами ароматазы у больных люминальным HER2-негативным раком молочной железы в постменопаузе.

Задачи исследования

1. Изучить уровень экспрессии регуляторных белков ROR1 и BMI-1 в ткани опухоли больных люминальным раком молочной железы в постменопаузе и проанализировать их связь с основными морфологическими характеристиками опухоли.
2. Оценить взаимосвязь экспрессии ROR1 и BMI-1 с параметрами регуляции клеточного цикла опухолевых клеток, включая экспрессию Cyclin D1.
3. Определить частоту соматических мутаций гена *PIK3CA* в ткани опухолей молочной железы и оценить их связь с клинико-морфологическими характеристиками опухоли и уровнем экспрессии ROR1 и BMI-1.
4. Проанализировать отдаленные результаты адъювантной гормонотерапии ингибиторами ароматазы у больных люминальным раком молочной железы в зависимости от уровня экспрессии ROR1, BMI-1 и мутационного статуса гена *PIK3CA*.
5. Оценить прогностическую значимость изучаемых молекулярных маркеров в отношении риска развития гематогенного метастазирования у больных люминальным раком молочной железы, получающих адъювантную гормонотерапию ингибиторами ароматазы.

Научная новизна

Впервые в клинически однородной когорте пациенток с первично-операбельным люминальным HER2-негативным раком молочной железы I-II стадий, получающих адъювантную гормонотерапию ингибиторами ароматазы, установлена прогностическая значимость экспрессии регуляторных белков ROR1 и BMI-1 в ткани первичной опухоли.

Впервые показано, что повышенная экспрессия ROR1 и, в наибольшей степени, BMI-1 ассоциирована с развитием отдаленного гематогенного метастазирования у пациенток данной клинической группы.

Впервые выявлена взаимосвязь экспрессии ROR1 и BMI-1 в ткани люминального HER2-негативного рака молочной железы и установлена их ассоциация с нарушением регуляции клеточного цикла опухолевых клеток, отраженным гиперэкспрессией Cyclin D1.

Установлено, что мутационный статус гена *PIK3CA* ассоциирован с ухудшением безметастатической выживаемости пациенток и не связан с уровнем экспрессии ROR1 и BMI-1, что свидетельствует о независимом характере указанных молекулярных факторов прогноза.

Впервые показана прогностическая значимость комплексной оценки молекулярных маркеров (ROR1, BMI-1 и мутационного статуса гена *PIK3CA*) для стратификации риска гематогенного метастазирования у больных люминальным HER2-негативным раком молочной железы, получающих адъювантную гормонотерапию ингибиторами ароматазы.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Полученные результаты углубляют современные представления о молекулярных факторах, ассоциированных со снижением эффективности адъювантной гормонотерапии ингибиторами ароматазы у больных люминальным HER2-негативным раком молочной железы, и уточняют прогностическую роль регуляторных белков ROR1 и BMI-1 в формировании неблагоприятного клинического течения заболевания.

Теоретическая значимость исследования заключается в уточнении роли ROR1 и BMI-1 в нарушении регуляции клеточного цикла опухолевых клеток при люминальном раке молочной железы, а также в обосновании независимого вклада молекулярных факторов, ассоциированных с

соматическими мутациями гена *PIK3CA*, в прогноз заболевания без прямой связи с экспрессией указанных регуляторных белков.

Практическая значимость работы состоит в возможности использования иммуногистохимической оценки экспрессии ROR1 и BMI-1, а также данных о мутационном статусе гена *PIK3CA* для дополнительной прогностической стратификации пациенток с люминальным HER2-негативным раком молочной железы, получающих адъювантную гормонотерапию ингибиторами ароматазы, и оптимизации тактики их динамического наблюдения.

Методология и методы исследования

Исследование выполнено в формате ретроспективного когортного анализа. В него включены пациентки с первично-операбельным люминальным HER2-негативным раком молочной железы I–II стадий, находящиеся в постменопаузе и получавшие адъювантную гормонотерапию ингибиторами ароматазы.

Материалом исследования служили операционные образцы опухолевой ткани молочной железы. Морфологическая оценка выполнялась с использованием стандартных гистологических методик. Иммуногистохимическое исследование применялось для количественной оценки экспрессии регуляторных белков ROR1, BMI-1 и Cyclin D1 с использованием валидированных антител и унифицированных протоколов окрашивания.

Молекулярно-генетическое исследование включало определение соматических мутаций гена *PIK3CA* в ткани опухоли методом полимеразной цепной реакции.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием методов описательной статистики. Для сравнения категориальных признаков применялся критерий χ^2 Пирсона. Для оценки факторов риска развития

гематогенного метастазирования использовался метод логистической регрессии. Анализ выживаемости выполнялся методом Каплана–Мейера с применением log-rank теста.

Положения, выносимые на защиту

1. Повышенная экспрессия регуляторных белков ROR1 и BMI-1 в ткани первичной опухоли ассоциирована с развитием гематогенного метастазирования и ухудшением безметастатической выживаемости у больных первично-операбельным люминальным HER2-негативным раком молочной железы I–II стадий, получающих адъювантную гормонотерапию ингибиторами ароматазы.
2. Экспрессия ROR1 и BMI-1 взаимосвязана и ассоциирована с гиперэкспрессией Cyclin D1, что свидетельствует о вовлеченности данных регуляторных белков в нарушение регуляции клеточного цикла опухолевых клеток при люминальном HER2-негативном раке молочной железы.
3. Комплексная оценка экспрессии ROR1, BMI-1 и мутационного статуса гена *PIK3CA* в ткани первичной опухоли позволяет осуществлять молекулярную стратификацию больных первично-операбельным люминальным HER2-негативным раком молочной железы I–II стадий при проведении адъювантной гормонотерапии ингибиторами ароматазы.

Степень достоверности результатов исследования

Достоверность результатов исследования обеспечена достаточным объемом клинического материала, включающего опухолевую ткань больных первично-операбельным люминальным HER2-негативным раком молочной железы I–II стадий.

В работе использован комплекс современных валидированных методов исследования, включающий морфологический, иммуногистохимический и молекулярно-генетический анализ. Применение стандартизированных протоколов, сертифицированного оборудования и количественной оценки исследуемых показателей обеспечило воспроизводимость результатов и минимизацию методических ошибок.

Статистическая обработка данных выполнена с использованием методов, адекватных поставленным задачам и характеру исследуемых признаков, что обеспечило корректность интерпретации результатов и обоснованность выводов.

Внутренняя согласованность исследования подтверждается воспроизводимостью выявленных взаимосвязей между клинико-морфологическими, иммуногистохимическими и молекулярно-генетическими характеристиками опухоли.

Апробация работы

Основные положения и результаты диссертационного исследования докладывались и обсуждались на юбилейной научно-практической конференции «Парадигмы лекарственной терапии у онкологических больных» (Обнинск, 2023); Первом молодежном международном онкологическом форуме «ГОНКа» (Санкт-Петербург, 2023); Всероссийской конференции с международным участием «Молодые лидеры в медицинской науке» (Томск, 2023); VII Международной морфологической научно-практической конкурс-конференции студентов и молодых ученых, посвященной 125-летию со дня рождения профессора В.М. Константинова (Новосибирск, 2022); VIII Международной морфологической научно-практической конкурс-конференции студентов и молодых ученых, посвященной 100-летию со дня рождения профессора Н.В. Донских

(Новосибирск, 2023); 37-м Европейском конгрессе патологов (Vienna, Austria, 2025).

Публикации по теме диссертации

По теме диссертационного исследования опубликовано 10 научных работ, включая 3 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Основные результаты исследования также представлены в материалах всероссийских и международных научно-практических конференций. По результатам работы зарегистрирована 1 база данных, отражающая клинико-патологические и молекулярные характеристики люминального рака молочной железы.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены в практическую деятельность отделения общей и молекулярной патологии и отделения общей онкологии НИИ онкологии Томского НИМЦ. Полученные данные используются при оценке прогностического значения экспрессии регуляторных белков ROR1 и BMI-1, а также мутационного статуса гена *PIK3CA* у больных люминальным HER2-негативным раком молочной железы, что способствует совершенствованию прогностической стратификации пациенток и выбору тактики их динамического наблюдения.

Соответствие диссертации паспортам научных специальностей

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия, направлению исследования п.2 «Исследования на молекулярном, клеточном и органном уровнях этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на современных достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии, биофизики и др.)», п.10 «Оценка эффективности противоопухолевого лечения на основе анализа отдалённых результатов» и паспорту научной специальности 3.3.2. Патологическая анатомия, направлению исследования п.2. «Научный анализ патологических процессов, лежащих в основе заболевания, прижизненная диагностика и прогнозная оценка болезней на основе исследований биопсийных материалов», п.3 «Исследование структурных, молекулярно-клеточных и молекулярно-генетических механизмов развития заболеваний в целом и отдельных их проявлений (симптомы, синдромы), создание основ персонализированной патогенетической терапии и профилактики».

Личный вклад автора

Автором определены цель и задачи исследования, разработан дизайн исследования и обоснованы основные методологические подходы к его выполнению. Проведены анализ и систематизация данных современной отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме. Автор участвовал в формировании исследуемой когорты пациенток, сборе и анализе клинико-морфологических данных, а также в оценке отдаленных результатов лечения. Иммуногистохимическое исследование экспрессии изучаемых регуляторных белков, а также анализ мутационного статуса гена *PIK3CA* проведены при непосредственном участии автора.

Статистическая обработка полученных данных, их интерпретация, формулирование выводов и практических рекомендаций выполнены автором лично. Автор принимал участие в подготовке научных публикаций по теме диссертационной работы и представлении результатов исследования на научных мероприятиях.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 164 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, главу «Материалы и методы исследования», главу «Результаты исследования», главу «Обсуждение собственных результатов исследования», заключение, выводы, практические рекомендации, список сокращений и условных обозначений, список литературы, а также список иллюстративного материала.

Список литературы содержит 184 источника, из которых 181 опубликован в зарубежных изданиях. Результаты, полученные в ходе исследования, представлены в 27 таблицах и 26 рисунках.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Характеристика люминального рака молочной железы

Неотъемлемой составляющей современной онкологии является изучение молекулярного профиля злокачественных новообразований различных локализаций и поиск факторов, позволяющих прогнозировать характер течения заболевания, риск развития отдаленного метастазирования, а также определять потенциальные мишени для таргетной терапии. Особое значение данные подходы приобрели в исследовании рака молочной железы (РМЖ), который характеризуется выраженной биологической и клинической гетерогенностью. Результаты многочисленных исследований, активно проводимых в течение последних десятилетий, существенно расширили представления о механизмах опухолевой трансформации, внутриопухолевой и межопухолевой гетерогенности первичных опухолей, а также о молекулярно-биологических предикторах эффективности системного лечения [6, 21, 48].

Ключевым этапом в развитии современных представлений о биологии РМЖ стало внедрение молекулярно-генетической классификации, предложенной С. М. Perou и соавторами, основанной на анализе транскриптомного профиля опухолевой ткани. Данная классификация позволила не только систематизировать опухоли молочной железы по молекулярным подтипам, но и продемонстрировать их принципиальные различия по прогнозу, чувствительности к системной терапии и клиническому течению заболевания [125]. В последующем эти концептуальные положения легли в основу клинико-биологического подхода к стратификации пациенток и персонализации лечебной тактики.

В клинической практике наибольшее распространение получила упрощенная суррогатная классификация, основанная на результатах иммуногистохимического исследования, в соответствии с которой выделяют

пять основных молекулярных подтипов РМЖ: люминальный А, люминальный В, HER2-позитивный, базальноподобный (трипл-негативный) и claudin-low. Каждый из указанных подтипов характеризуется специфическими клинико-морфологическими, молекулярно-биологическими и прогностическими особенностями, а также различной чувствительностью к эндокринной, химио- и таргетной терапии, что обуславливает необходимость индивидуализированного подхода к лечению [52, 128]. Опухоли, экспрессирующие рецепторы к половым гормонам, объединяются в люминальную группу [6].

Люминальные опухоли молочной железы являются наиболее распространенным вариантом РМЖ. По данным различных авторов, их частота варьирует от 60 до 75 %, достигая в отдельных клинических когортах до 80 % всех случаев заболевания [148]. Морфологически в подавляющем большинстве наблюдений данные опухоли представлены инвазивной карциномой неспецифического типа, тогда как инвазивный дольковый рак встречается существенно реже, однако также преимущественно относится к гормон-рецептор-позитивной группе.

Внутри люминального спектра РМЖ принято выделять три подгруппы: люминальный А, люминальный В/HER2-негативный и люминальный В/HER2-позитивный подтипы [52, 108, 173]. Такое подразделение отражает не только различия в пролиферативной активности и HER2-статусе опухоли, но и неоднородность клинического течения, риска рецидивирования и чувствительности к проводимой терапии.

Критериями отнесения опухоли к тому или иному люминальному подтипу являются уровень пролиферативной активности, оцениваемый по индексу Ki-67, а также статус экспрессии рецептора эпидермального фактора роста человека 2-го типа (HER2). Для люминального А подтипа характерно отсутствие HER2-экспрессии и низкий уровень пролиферативной активности ($Ki-67 \leq 20 \%$), что, как правило, ассоциируется с благоприятным прогнозом и высокой чувствительностью к эндокринной терапии. Люминальный

В/HER2-негативный подтип отличается более высоким уровнем пролиферации ($Ki-67 > 20 \%$) и менее благоприятным клиническим течением, тогда как люминальный В/HER2-позитивный вариант определяется наличием HER2-позитивности и характеризуется высокой биологической агрессивностью, при этом уровень Ki-67 не всегда имеет определяющее значение для его идентификации [27, 59].

Таким образом, люминальный рак молочной железы представляет собой гетерогенную группу опухолей, объединенных экспрессией гормональных рецепторов, но существенно различающихся по молекулярным характеристикам, клиническому поведению и прогнозу. Указанная гетерогенность обуславливает необходимость углубленного изучения дополнительных молекулярно-биологических факторов, ассоциированных с риском прогрессирования и метастазирования, что имеет принципиальное значение для оптимизации стратегии адъювантного и неoadъювантного лечения пациенток с люминальным HER2-негативным РМЖ.

1.2 Морфологические и иммуногистохимические особенности люминального рака молочной железы

Люминальный рак молочной железы характеризуется значительным морфологическим разнообразием, отражающим биологическую и молекулярную гетерогенность данной группы опухолей. Несмотря на объединяющий признак – экспрессию рецепторов эстрогена и/или прогестерона, люминальные карциномы демонстрируют широкий спектр гистологических вариантов, архитектурных паттернов роста и степеней злокачественности, что имеет принципиальное значение для морфологической диагностики, прогностической оценки и выбора оптимальной лечебной тактики [45]. Согласно рекомендациям 13-й Международной конференции по раку молочной железы в Санкт-Галлене

(2013 г.) и 5-му изданию Классификации опухолей молочной железы ВОЗ (2019 г.), люминальные опухоли классифицируются с использованием комплекса иммуногистохимических и гибридизационных методов (IHC/ISH), включающего оценку экспрессии рецепторов эстрогена (ER) и прогестерона (PR), статуса HER2 и уровня пролиферативной активности по индексу Ki-67. Все люминальные подтипы характеризуются ER-позитивностью, тогда как показатели PR, HER2 и Ki-67 используются для их дальнейшей дифференцировки и прогностической стратификации [35, 59, 172].

Инвазивная карцинома неспецифического типа

Инвазивная карцинома неспецифического типа является наиболее частым морфологическим вариантом люминального рака молочной железы и составляет морфологическую основу данной группы опухолей. При гормон-рецептор-положительном РМЖ до 96 % опухолей соответствуют именно этому гистологическому типу [120].

Опухоли характеризуются значительным морфологическим разнообразием и могут формировать тубулярные, трабекулярные или солидные структуры, с различной степенью выраженности десмопластической реакции стромы. Ядерный полиморфизм, митотическая активность и наличие некроза существенно варьируют между наблюдениями. Для клинико-биологической стратификации инвазивные карциномы неспецифического типа подразделяются на молекулярно-подобные подтипы на основании статуса ER, PR, HER2, уровня Ki-67 и степени злокачественности [57, 59, 139, 158, 165].

Положительная экспрессия ER выявляется в 61-80 % случаев, HER2 – приблизительно в 15 % наблюдений [140, 159]. Как правило, опухоли с высокой экспрессией ER и отрицательным HER2-статусом соответствуют степеням злокачественности G1-G2, однако в отдельных случаях могут относиться и к G3. Высокая степень злокачественности чаще ассоциируется с низким уровнем экспрессии ER либо ее отсутствием [149]. В рамках гормон-рецептор-положительного HER2-негативного РМЖ люминальный А подтип

чаще соответствует опухолям G1, тогда как опухоли G2 нередко соотносятся с люминальным В подтипом [101].

Инвазивный дольковый рак молочной железы составляет 5-15 % всех случаев РМЖ и был выделен в самостоятельную нозологическую форму еще в первой половине XX века [51]. Данный тип опухолей относится преимущественно к люминальному молекулярному подтипу и характеризуется специфическими морфологическими и иммуногистохимическими особенностями. Классический вариант инвазивной дольковой карциномы характеризуется отсутствием межклеточной адгезии, диффузным инфильтративным ростом в виде одиночных клеток или линейных рядов («индийские цепочки»), а также таргетоидным расположением опухолевых элементов. Клетки, как правило, небольшие или среднего размера, с округлыми ядрами, малозаметными ядрышками и умеренной цитоплазмой; опухоль обычно относится к промежуточной степени злокачественности [32, 103, 172].

Помимо классического варианта, описаны солидный, трабекулярный, альвеолярный, перстневидноклеточный, гистиоцитоподобный, апокриновый и плеоморфный варианты инвазивной дольковой карциномы [107, 146]. Ключевой иммуногистохимической особенностью долькового рака является утрата мембранной экспрессии Е-кадгерина, что морфологически проявляется характерным дискогезивным типом роста. До 100 % классических вариантов экспрессируют ER, PR – в 60-70 % наблюдений, тогда как HER2-позитивность выявляется редко [127].

По данным экспрессионного анализа, большинство инвазивных дольковых карцином относится к люминальному А подтипу, реже – к люминальному В. В плеоморфных и апокриновом вариантах возможно снижение экспрессии ER и появление HER2-позитивности, а гистиоцитоподобный вариант нередко характеризуется экспрессией андрогенового рецептора при отсутствии ER и PR [32, 98, 103, 131, 146, 170].

Тубулярный рак молочной железы является редким вариантом (около 2,2 %) и характеризуется формированием хорошо очерченных угловатых трубчатых структур, составляющих более 90 % опухолевого компонента. Опухоли относятся преимущественно к степени злокачественности G1, отличаются низкой митотической активностью и благоприятным прогнозом [9, 21, 132, 139]. Часто выявляется сочетание с дольковой неоплазией и столбчатыми изменениями эпителия («триада Розена»), что требует тщательного морфологического анализа материала [106]. Иммуногистохимически тубулярный рак характеризуется выраженной экспрессией ER, PR в 69-75 % случаев, отсутствием экспрессии HER2 и низким уровнем Ki-67 (<10 %) [9, 46].

Тубуло-дольковый рак сочетает морфологические признаки тубулярного и долькового роста, сохраняет мембранную экспрессию E-кадгерина и, несмотря на дискуссионный характер, в классификациях ВОЗ 4-го и 5-го изданий отнесен к группе инвазивных дольковых карцином [171, 172].

Инвазивная крибриформная карцинома является редкой формой люминального рака молочной железы (0,2-3,5 %) [13]. При преобладании типичного крибриформного паттерна (>90 %) прогноз заболевания благоприятный, тогда как при смешанных формах он сопоставим с инвазивной карциномой неспецифического типа. Опухоли, как правило, хорошо дифференцированы, ER- и PR-позитивны, HER2-негативны и характеризуются низким уровнем Ki-67 [36, 117, 93, 162, 181].

Инвазивная микропапиллярная карцинома характеризуется формированием плотных скоплений опухолевых клеток с реверсивной полярностью и высокой частотой лимфоваскулярной инвазии, что ассоциируется с менее благоприятным клиническим течением. Опухоли чаще экспрессируют ER и PR, статус HER2 варьирующ [58, 68, 155, 163, 172].

Отдельные инвазивные карциномы демонстрируют онкоцитарные черты, характеризующиеся зернистой эозинофильной цитоплазмой

вследствие увеличенного количества митохондрий [56]. Такие опухоли, как правило, имеют солидный характер роста и в большинстве случаев относятся к люминальному подтипу, демонстрируя положительную экспрессию ER до 78 % и PR – до 62,5 %. Положительный статус HER2 выявляется приблизительно в 25 % наблюдений. Клиническое течение и прогноз сопоставимы с инвазивной карциномой неспецифического типа [56, 130].

Гликогенобогатый светлоклеточный вариант представляет собой исключительно редкую форму, при которой опухолевые клетки содержат значительное количество внутриклеточного гликогена, придающего цитоплазме «светлый» вид. В части наблюдений такие опухоли относятся к люминальному подтипу, демонстрируя ER-позитивность в 35-62 % случаев при, как правило, отсутствии экспрессии PR [156, 172].

Сальноподобная дифференцировка является еще более редким вариантом инвазивного рака молочной железы. Опухолевые клетки экспрессируют адипофиллин и в ряде случаев сохраняют люминальный фенотип с ER- и PR-позитивностью и отрицательным HER2-статусом [73, 109, 153, 161].

Редкие нейроэндокринные опухоли молочной железы характеризуются солидным или трабекулярным ростом и экспрессией нейроэндокринных маркеров (синаптофизин и/или хромогранин А). Большинство опухолей относится к G1-G2 и сохраняет люминальный фенотип с ER- и PR-позитивностью и отрицательным HER2-статусом; высокозлокачественные варианты (G3) являются исключительно редкими [87, 136, 138, 172].

Таким образом, люминальный рак молочной железы характеризуется широким спектром морфологических форм и архитектурных вариантов роста, отражающих сложную биологическую неоднородность данной группы опухолей. Несмотря на общую гормон-рецептор-положительную природу, люминальные карциномы включают как наиболее распространенные варианты инвазивной карциномы неспецифического типа, так и специальные

гистологические формы, отличающиеся особенностями роста, степени злокачественности и иммуногистохимического профиля.

Морфологические характеристики люминальных опухолей тесно связаны с их молекулярными и клинико-биологическими параметрами, включая уровень пролиферативной активности, статус HER2 и степень дифференцировки, что определяет гетерогенность клинического течения и прогноза заболевания. В этой связи морфологическая оценка опухоли в сочетании с иммуногистохимическими критериями остается ключевым этапом стратификации пациенток и выбора оптимальной тактики системного лечения.

Выявление и корректная интерпретация морфологических особенностей люминального HER2-негативного рака молочной железы имеет принципиальное значение для уточнения биологического потенциала опухоли, прогнозирования риска прогрессирования и метастазирования, а также для дальнейшего поиска дополнительных прогностических и предиктивных маркеров, что и обуславливает актуальность настоящего исследования.

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

Люминальные опухоли молочной железы в целом характеризуются более благоприятным прогнозом по сравнению с другими молекулярными подтипами рака молочной железы [7]. Наиболее низкая частота прогрессирования и рецидивов отмечается при люминальном А подтипе. В данной группе пациентов адъювантное лечение, как правило, ограничивается гормонотерапией. Люминальный В/HER2-негативный подтип также отличается относительно благоприятным течением, однако в этих случаях значительно чаще возникает необходимость в комбинированном применении гормонотерапии и химиотерапии. При люминальном В/HER2-позитивном

варианте рака молочной железы используются различные комбинации гормонотерапии, химиотерапии и таргетной терапии [42], при поражении регионарных лимфатических узлов дополняется лучевым лечением [22].

По данным литературы, примерно у 80 % пациенток с раком молочной железы выявляется положительная экспрессия рецепторов эстрогена, тогда как экспрессия рецепторов прогестерона определяется в 55-65 % наблюдений [172]. Эстрогены относятся к группе стероидных гормонов и играют ключевую роль в регуляции процессов роста и дифференцировки тканей, включая ткань молочной железы. Основной биологически активной формой эстрогена является 17β -эстрадиол, который, взаимодействуя с рецепторами эстрогена (ER), регулирует развитие и функционирование репродуктивной системы, обмен костной ткани, а также оказывает влияние на сердечно-сосудистую и центральную нервную системы [29, 105]. Учитывая значимую роль эстрогенов в физиологии молочной железы, нарушения гормональной регуляции, изменение уровня эстрогенов и длительная гормональная заместительная терапия ассоциируются с повышенным риском развития карциномы молочной железы [30, 31, 74].

Биологические эффекты эстрогенов реализуются преимущественно через два внутриклеточных рецептора – $ER\alpha$ и $ER\beta$, кодируемые различными генами, локализованными на длинных плечах хромосом 6 (q24–27) и 14 (q21–22) соответственно. ДНК-связывающие домены этих рецепторов обладают высокой степенью гомологии (около 97 %), тогда как другие участки демонстрируют меньшую степень сходства. Несмотря на структурную схожесть и общие механизмы активации, $ER\alpha$ и $ER\beta$ выполняют частично различающиеся функции. Роль $ER\beta$ в нормальной ткани молочной железы остается недостаточно изученной, однако снижение его экспрессии при раке молочной железы ассоциировано с усилением пролиферативной активности опухолевых клеток [74].

Классический путь активации рецепторов эстрогена реализуется посредством связывания 17β -эстрадиола с внутриклеточными рецепторами,

что приводит к димеризации мономеров ER, их транслокации в ядро и взаимодействию с эстроген-реагирующими элементами ДНК (ERE). В комплексе с ядерными коактиваторами и корепрессорами рецепторы эстрогена инициируют транскрипцию генов-мишеней. Коактиваторы способны модулировать транскрипционную активность за счет ремоделирования хроматина и посттрансляционных модификаций, обеспечивая опосредованное взаимодействие ER с другими факторами транскрипции. Одной из ключевых прямых мишеней ER является циклин D1, активация которого запускает сигнальные пути CDK4 и CDK6, приводящие к фосфорилированию белка ретинобластомы и стимуляции клеточного цикла [65, 124].

Наряду с классическим существует неклассический путь активации рецепторов эстрогена, при котором активация ER осуществляется посредством перекрестных сигнальных каскадов, инициируемых ростовыми факторами. В этом случае задействуются рецепторы тирозинкиназ, включая HER2, EGFR, IGF1R, FGFR и другие, что приводит к активации протеинкиназных каскадов и стимуляции роста и пролиферации опухолевых клеток молочной железы [49, 72].

Для понимания механизмов активации рецепторов эстрогена принципиальное значение имеет их молекулярная структура. Рецепторы эстрогена состоят из шести субдоменов (A–F), которые формируют три функциональные области: N-концевой домен (NTD), ДНК-связывающий домен (DBD) и лиганд-связывающий домен (LBD) (рисунок 1).

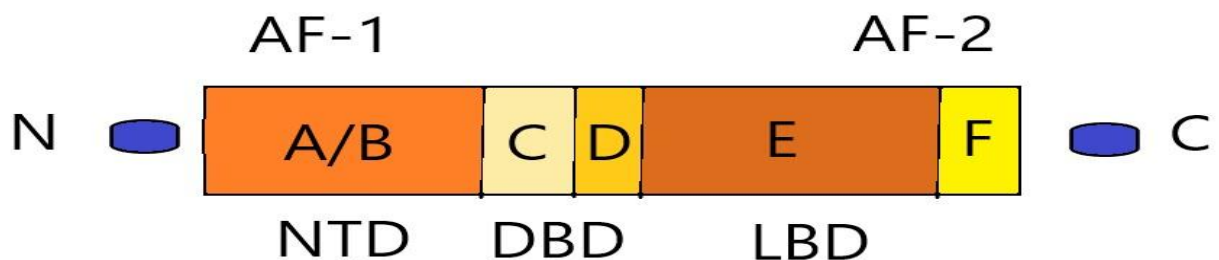


Рисунок 1 – Схема функционального строения доменов в структуре рецепторов эстрогена

Лиганд-связывающий домен представляет собой компактную глобулярную структуру, включающую 12 α -спиралей, формирующих активный центр взаимодействия с эстрогенами. Связывание лиганда индуцирует конформационные изменения 12-й спирали, функционирующей как активатор транскрипции AF-2, что обеспечивает взаимодействие рецептора с коактиваторами и регуляцию скорости транскрипции РНК [12, 20, 71]. F-домен, уникальный для рецепторов эстрогена, участвует во внутримолекулярных взаимодействиях и влияет на стабильность рецептора, а вариабельность его структуры может объяснять различия в чувствительности к гормонотерапии [104].

ДНК-связывающий домен рецепторов эстрогена содержит характерные структуры «цинковых пальцев», стабилизированные α -спиралями, и обеспечивает специфическое связывание с мотивами ERE (GGTCA_nnnTGACC) [18]. В этой области расположен проксимальный Р-бокс, определяющий селективность взаимодействия рецептора с ДНК [88]. N-концевой домен является наиболее вариабельной частью рецептора и содержит активатор транскрипции AF-1, обеспечивающий регуляцию транскрипции целевых генов независимо от присутствия лиганда [97].

Таким образом, рецепторы эстрогена способны активироваться как в лиганд-зависимом, так и в лиганд-независимом режиме (рисунок 2). В классическом варианте активации комплекс «эстрадиол–ER» транслируется в ядро и связывается с ERE, усиливая пролиферативную активность опухолевых клеток. Неклассический путь геномной активации реализуется посредством активации сигнальных каскадов PI3K/AKT/mTOR и воздействия ростовых факторов на рецепторы эстрогена, включая EGFR, HER2/neu и TGF- β [50, 81].

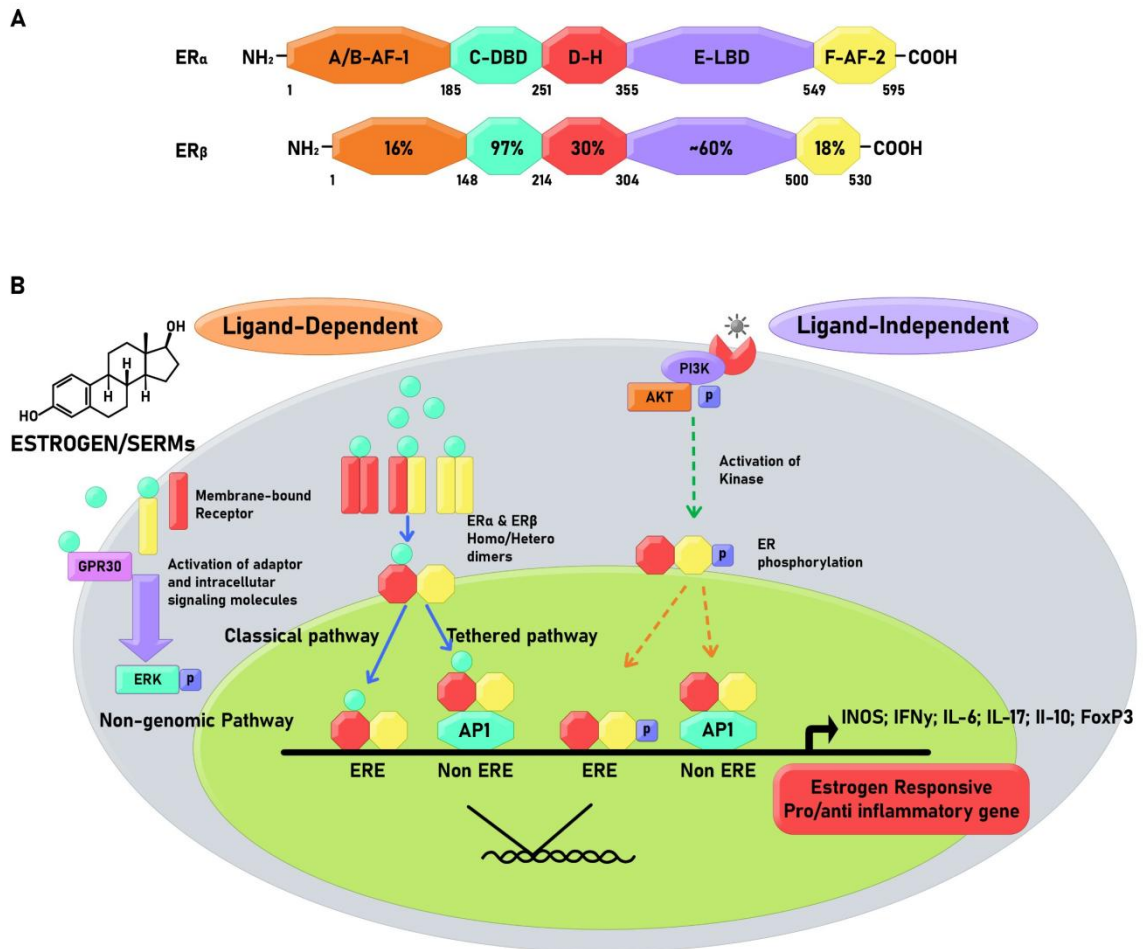


Рисунок 2 – Схема лиганд-зависимой и лиганд-независимой активации рецепторов эстрогенов

Активированные киназы, участвующие в передаче сигналов ростовых факторов, способны фосфорилировать рецепторы эстрогена и их транскрипционные корегуляторы, что приводит к активации экспрессии генов-мишеней независимо от уровня гормонов. После связывания с ДНК в ядре активируются транскрипционные коактиваторы, включая NCOA1, NCOA2 и NCOA3, а также корепрессоры NCOR1 и NCOR2, регулирующие экспрессию гормонозависимых генов. Важную роль в формировании транскрипционного ландшафта опухолевых клеток играют пионерные факторы транскрипции, такие как FOXA1 и GATA, обеспечивающие доступ ER к хроматину и координирующие экспрессию онкогенов при раке молочной железы и предстательной железы (рисунок 3). Нарушения в работе

данных регуляторных механизмов могут способствовать формированию резистентности к эндокринной терапии [50, 64, 144].

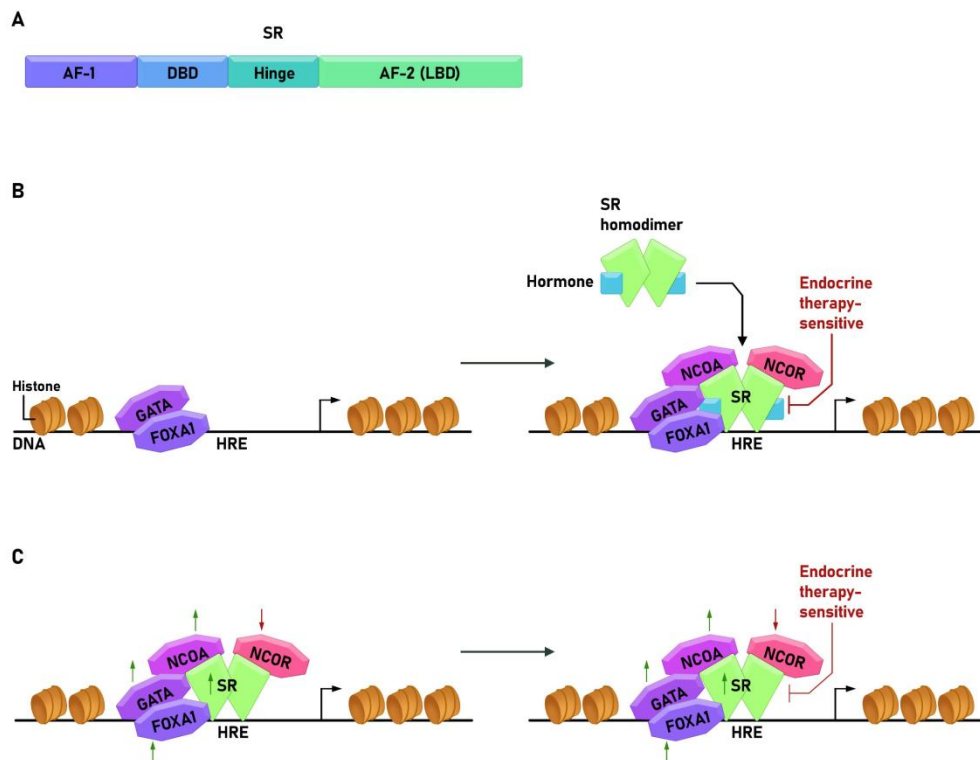


Рисунок 3 – Схема регуляции транскрипционной активности при развитии резистентности к эндокринной терапии РМЖ

По данным клинических исследований, примерно у трети пациенток, получающих антигормональную терапию, в течение 15 лет после постановки диагноза развиваются рецидивы заболевания. Одним из ключевых механизмов развития эндокринной резистентности считается утрата экспрессии $ER\alpha$ либо появление соматических мутаций в гене *ESR1*, кодирующем рецептор $ER\alpha$ [104, 123]. Результаты исследования SoFEA показали, что мутации *ESR1* ассоциированы с развитием первичной эндокринной резистентности у пациенток с метастатическим ER -положительным раком молочной железы [53].

Наиболее изученные мутации *ESR1*, включая Glu380, Y537S и D538G, локализуются в лиганд-связывающем домене рецептора и приводят к его

конститутивной активации, что способствует росту опухолевых клеток и снижению эффективности гормонотерапии. При этом данные мутации, как правило, не выявляются в первичных опухолях и характерны для метастатических форм заболевания [110, 114, 157].

Выбор тактики лечения при раке молочной железы определяется молекулярным подтипом опухоли. Использование молекулярно-генетических тестов, таких как PAM50, MammaPrint и Oncotype DX, позволяет стратифицировать пациенток по риску рецидива и прогнозировать эффективность системной терапии, что способствует реализации персонализированного подхода к лечению [15, 84].

Ингибиторы ароматазы являются ключевым компонентом терапии ER-положительного рака молочной железы у пациенток в постменопаузе. Ароматаза – фермент системы цитохрома P450 – обеспечивает конверсию андрогенов в эстрогены в периферических тканях, включая жировую ткань, печень, мышцы и опухолевую ткань молочной железы [76, 135]. У женщин в постменопаузе основной источник эстрогенов связан с внеяичниковым синтезом, что определяет высокую эффективность ингибиторов ароматазы в данной группе пациентов [14, 76, 182]. Применение ингибиторов ароматазы сопровождается снижением риска тромбоэмболических осложнений и рака эндометрия по сравнению с тамоксифеном, однако ассоциируется с повышенной частотой остеопороза, переломов костей и сердечно-сосудистых осложнений.

Монотерапия ингибиторами ароматазы рекомендована при люминальном А подтипе рака молочной железы, за исключением случаев поражения четырех и более регионарных лимфатических узлов. При люминальном В подтипе применение ингибиторов ароматазы в монорежиме возможно при небольших размерах первичной опухоли (T1a–b), отсутствии метастазов в регионарных лимфатических узлах (N0) либо при наличии противопоказаний к проведению химиотерапии (RUSSCO, 2024) [3].

Несмотря на значительный прогресс в персонализированном лечении, не все пациентки с люминальным раком молочной железы демонстрируют устойчивый ответ на гормонотерапию. В ряде случаев происходит гематогенное и лимфогенное распространение опухолевых клеток, что определяет неблагоприятный прогноз и необходимость дальнейшего изучения молекулярных механизмов гормонорезистентности.

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

В последние годы активно изучаются молекулярно-биологические характеристики опухолей молочной железы с целью углубленного понимания механизмов формирования устойчивости к проводимой системной терапии, включая гормонотерапию. Несмотря на высокую эффективность эндокринного лечения при люминальном раке молочной железы, значительная часть пациенток в процессе терапии или спустя определенный промежуток времени демонстрирует развитие лекарственной резистентности, что существенно ухудшает прогноз заболевания и определяет необходимость поиска новых прогностических маркеров и терапевтических мишеней [28].

Одним из ключевых факторов формирования гормонорезистентности является нарушение регуляции активности ароматазы – фермента, ответственного за конверсию андрогенов в эстрогены. В нормальных условиях в жировой ткани молочной железы экспрессия ароматазы остается низкой, при этом транскрипция гена осуществляется преимущественно с участием дистального промотора 1.4, тогда как проксимально расположенные промоторы 1.3 и II практически не вовлечены в данный процесс. Установлено, что злокачественные эпителиальные клетки молочной железы способны секретировать простагландин E_2 (PGE_2), который индуцирует переключение транскрипционной активности с промотора 1.4 на

промоторы 1.3/II, что приводит к резкому увеличению синтеза ароматазы и локальной гиперэстрогении в опухолевой ткани [141, 182]. В связи с этим перспективным направлением исследований является разработка селективных ингибиторов промоторной активности ароматазы как одного из потенциальных подходов к преодолению эндокринной резистентности.

Существенный вклад в формирование устойчивости к гормонотерапии вносят соматические мутации в ключевых генах, участвующих в регуляции клеточного цикла, апоптоза и гормональной сигнализации. Одним из наиболее изученных в этом контексте является ген *TP53*, дикий тип которого выполняет функцию опухолевого супрессора. Соматические мутации *TP53* значительно чаще выявляются при люминальном В подтипе рака молочной железы и ассоциируются с повышенной пролиферативной активностью опухоли, отражаемой высоким уровнем Ki-67. Наличие мутаций *TP53* коррелирует со сниженной чувствительностью к гормонотерапии, более агрессивным клиническим течением заболевания и неблагоприятным прогнозом [86, 123].

В противоположность этому, мутации гена *MAP3K1*, кодирующего протеинкиназу, являющуюся компонентом нескольких сигнальных каскадов, регулирующих воспалительные и иммунные процессы, преимущественно выявляются при люминальном А подтипе рака молочной железы. Наличие данных мутаций ассоциируется с низким уровнем пролиферативной активности, сохраненной гормональной чувствительностью и более благоприятным ответом на эндокринную терапию, что позволяет рассматривать *MAP3K1* как потенциальный молекулярный маркер благоприятного течения заболевания [148].

Важную роль в формировании гормонального фенотипа опухоли играют мутации транскрипционных факторов, прежде всего GATA3, являющегося ключевым регулятором дифференцировки люминального эпителия молочной железы. Экспериментальные исследования *in vitro* продемонстрировали, что GATA3 регулирует экспрессию набора генов,

вовлеченных в контроль процессов дифференцировки и пролиферации опухолевых клеток [44, 60]. Показано, что мутации *GATA3* коррелируют с более выраженным снижением уровня Ki-67 после терапии ингибиторами ароматазы, при отсутствии связи с исходным уровнем пролиферативной активности, что позволяет рассматривать данный фактор как маркер более благоприятного прогноза [60]. Кроме того, повышенная экспрессия *GATA3* преимущественно выявляется в ER-положительных опухолях низкой степени злокачественности и ассоциируется с лучшими клиническими исходами заболевания [52]. Особое значение также придается ДНК-связывающему белку *FOXA1*, экспрессия которого тесно коррелирует с наличием ER α , *GATA3* и PR, что указывает на его ключевую роль в реализации эстроген-зависимых сигнальных путей в опухолевых клетках [43].

В литературе широко представлены данные о роли соматических мутаций гена *ESR1*, кодирующего рецептор эстрогена α , в развитии резистентности к терапии тамоксифеном и ингибиторами ароматазы. Мутации *ESR1* преимущественно выявляются в метастатических очагах и крайне редко обнаруживаются в первичных опухолях, что указывает на их приобретенный характер. Наиболее часто описанные мутации локализуются в лиганд-связывающем домене рецептора и приводят к его конститутивной, лиганд-независимой активации. Функциональным следствием данных изменений является сохранение транскрипционной активности ER α в условиях подавления эстрогенового сигнала. Установлено, что наличие мутаций *ESR1* сопровождается гиперактивацией сигнального пути UPR (unfolded protein response), способствующего формированию эндокринорезистентного фенотипа опухоли. Вместе с тем показано, что часть пациенток с мутациями *ESR1* сохраняет чувствительность к терапии фулвестрантом или ингибиторами CDK4/6, однако преодоление устойчивых форм заболевания требует разработки более селективных деструкторов рецепторов эстрогена и новых таргетных подходов [53].

В последние годы активно изучается вклад иммунных механизмов в развитие эндокринной резистентности. В опухолевой ткани рака молочной железы нередко формируется хроническое воспаление, способствующее инвазии и метастазированию опухолевых клеток. В экспериментальных моделях показано, что $CD4^+$ Т-лимфоциты, продуцирующие IL-4, регулируют активность опухоль-ассоциированных макрофагов (TAMs), усиливая инвазивный потенциал опухоли и ее способность к метастатическому распространению. TAMs, в свою очередь, активируют EGFR-сигнальный путь, что ассоциируется с неблагоприятным прогнозом и сниженной эффективностью гормонотерапии [55]. Хроническое воспаление сопровождается повышением уровня простагландина E_2 , который способен индуцировать экспрессию FOXP3 в регуляторных Т-клетках (Treg), изменяя их фенотип и подавляя противоопухолевый иммунный ответ. Высокая плотность инфильтрации Treg-клетками в опухолевой ткани связана с более агрессивным течением заболевания и неэффективностью гормонального лечения; при этом применение гормонотерапии в неoadъювантном режиме сопровождается снижением уровня FOXP3 и уменьшением количества Treg-клеток в опухоли [55, 122].

Следует подчеркнуть, что ключевые элементы воспалительного ответа – простагландиновая сигнализация, активация врожденного иммунитета и сдвиг баланса в сторону иммунорегуляторных популяций – являются общими биологическими механизмами хронического воспаления вне зависимости от органа. Эти универсальные закономерности подробно рассмотрены в работах, посвященных иммунопатогенезу хронических воспалительных заболеваний, и могут служить концептуальной моделью для интерпретации воспалительного компонента опухолевого микроокружения [180].

Центральное место в молекулярных механизмах гормонорезистентности занимает сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR. Фосфатидилинозитол-3-киназа (PI3K), кодируемая геном *PIK3CA*,

регулирует процессы клеточной пролиферации, выживания и устойчивости к апоптозу. Активация данного сигнального каскада происходит под воздействием факторов роста и гормонов и является одним из ключевых механизмов опухолевой прогрессии [20, 23, 82, 126, 164, 165]. Соматические мутации гена *PIK3CA* выявляются до 40 % случаев первичного рака молочной железы и наиболее часто встречаются при люминальном HER2-негативном подтипе [134]. Наиболее клинически значимые мутации локализуются в экзонах 9 и 20 и приводят к конститутивной активации PI3K [102]. Диагностическое выявление данных мутаций имеет важное клиническое значение, поскольку позволяет идентифицировать пациенток, потенциально чувствительных к терапии ингибиторами PI3K, такими как алпелисиб, одобренный FDA и ЕМА для лечения HR-положительного, HER2-негативного рака молочной железы [11]. Вместе с тем результаты когортных исследований демонстрируют неоднозначное влияние мутаций *PIK3CA* на показатели безрецидивной и общей выживаемости, что подчеркивает ограниченную эффективность изолированного подавления эстроген-зависимой стимуляции опухолевого роста при наличии активации PI3K-каскада [134].

В настоящее время особое внимание уделяется изучению Wnt-сигнального пути, играющего ключевую роль в эмбриогенезе, клеточной дифференцировке и канцерогенезе. Активация неканонического пути Wnt/Ca²⁺ при взаимодействии белка Wnt5a с рецепторами ROR1/2, Frizzled и RYK приводит к активации G-белков, фосфолипазы C, увеличению внутриклеточной концентрации Ca²⁺ и активации кальцинейрина с последующей ядерной транслокацией NFAT, что способствует усилению клеточной подвижности и запуску эпителиально-мезенхимального перехода [97, 116, 167]. Wnt5a, связываясь с трансмембранной рецепторной протеинкиназой ROR1, индуцирует ее димеризацию и активацию сигнального пути PI3K/АКТ, что приводит к фосфорилированию

эпигенетического регулятора BMI-1 и ремоделированию хроматина (рисунок 4).



Рисунок 4 – Wnt-сигнальный путь. Механизм активации ROR1 и BMI-1

Данный каскад связывают с развитием генетической нестабильности опухолевых клеток и формированием лекарственной резистентности [116, 175].

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что приобретенная резистентность к гормонотерапии при люминальном раке молочной железы формируется в результате комплексного взаимодействия гормонозависимых, ростовых, иммунных и эпигенетических механизмов, приводящих к активации альтернативных сигнальных каскадов, обеспечивающих выживание и пластичность опухолевых клеток в условиях подавления эстрогенового сигнала. В этой связи особый интерес представляют онкофетальные рецепторные системы и эпигенетические регуляторы, способные интегрировать сигналы от факторов роста, элементов

опухолевого микроокружения и внутриклеточных протеинкиназных путей. Реэкспрессия рецепторной тирозинкиназоподобной протеинкиназы ROR1 и активация ассоциированного с ней эпигенетического регулятора BMI-1 рассматриваются как потенциальные ключевые звенья, обеспечивающие поддержание опухолевой стволовости, эпителиально-мезенхимального перехода и лекарственной резистентности. Это определяет целесообразность детального рассмотрения биологической роли ROR1 и BMI-1 в развитии и прогрессии люминального рака молочной железы, что и послужило предметом последующих разделов настоящей работы.

1.5 Характеристика и роль белка ROR1 в развитии злокачественных новообразований

Рецептор тирозинкиназоподобный сиротский рецептор 1 (Receptor Tyrosine Kinase–Like Orphan Receptor 1, ROR1) относится к семейству рецепторных тирозинкиназ и кодируется одноименным геном *ROR1*. Высокая экспрессия данного белка характерна для эмбриональных тканей, где он участвует в процессах морфогенеза и органогенеза, тогда как в большинстве зрелых тканей взрослого организма его экспрессия минимальна или полностью отсутствует [19, 80]. В физиологических условиях экспрессия ROR1 может выявляться в отдельных тканях, включая паращитовидные железы, островки поджелудочной железы, эпителий пищевода, желудка и двенадцатиперстной кишки [13].

Реэкспрессия ROR1 в зрелых тканях ассоциирована с развитием злокачественных новообразований различной локализации. Наиболее подробно данный маркер изучен при хроническом лимфолейкозе, где его высокая экспрессия коррелирует со снижением общей выживаемости и неблагоприятным прогнозом заболевания [61, 143]. Помимо гематологических неоплазий, повышенный уровень экспрессии ROR1

выявляется при ряде солидных опухолей, включая рак легкого, яичников и молочной железы [143].

При раке яичников опухолевые клетки с высокой экспрессией ROR1 демонстрируют молекулярные и фенотипические признаки опухолевых стволовых клеток, что проявляется повышенной экспрессией маркеров CD133, CD44 и ALDH1. Такие опухоли характеризуются большей склонностью к раннему метастазированию и ассоциируются с неблагоприятным прогнозом и снижением продолжительности жизни пациентов [61].

В контексте рака молочной железы установлено, что высокая экспрессия ROR1 коррелирует с более поздними стадиями заболевания, агрессивным клиническим течением, повышенной частотой рецидивов и сниженной общей выживаемостью [70, 171]. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что ROR1 способствует пролиферации опухолевых клеток, их устойчивости к апоптозу, а также активации эпителиально-мезенхимального перехода, что, в свою очередь, повышает инвазивный и метастатический потенциал опухоли [89].

Одним из ключевых регуляторов экспрессии ROR1 является семейство транскрипционных факторов Twist. Twist1 и Twist2 играют важную роль в эмбриональном развитии и органогенезе, а также вовлечены в процессы опухолевой прогрессии. Twist1 участвует в ангиогенезе, инвазии, метастазировании и формировании химиорезистентности, а также способствует приобретению опухолевыми клетками свойств стволовости. Биологическая роль Twist2 при опухолевом росте остается менее изученной и дискуссионной [184].

По данным исследования Сао J. и соавт., транскрипционный фактор Twist1 способен напрямую активировать транскрипцию гена *ROR1*, иницируя сигнальные каскады, приводящие к эпителиально-мезенхимальному переходу, повышению инвазивности и метастатическому распространению опухолевых клеток [24]. Эти данные подчеркивают

ключевую роль оси Twist–ROR1 в прогрессии злокачественных новообразований.

Механизмы, посредством которых ROR1 реализует свои эффекты, включают фосфорилирование кортактина – белка, участвующего в ремоделировании актинового цитоскелета. Кортактин (EMS1, CTTN) широко экспрессируется в опухолевых клетках различных злокачественных новообразований и играет существенную роль в процессах клеточной миграции. Фосфорилирование кортактина тирозиновыми остатками приводит к упорядоченной полимеризации актиновых филаментов и активации механизмов клеточной подвижности, необходимых для инвазии и метастазирования [66, 69].

Отдельные исследования указывают на взаимосвязь активации ROR1 с сигнальными путями факторов роста. Так, на моделях базальноподобного рака молочной железы показано, что активация ROR1 сопряжена с активацией FGFR-сигналинга, что ассоциируется с более агрессивным течением заболевания и неблагоприятным прогнозом [119].

В экспериментальных исследованиях с использованием моделей ксенотрансплантатов рака молочной железы у мышей было показано, что после проведения химиотерапии паклитакселом в резидуальных опухолевых клетках сохраняется высокий уровень экспрессии ROR1. Назначение в качестве последующей линии терапии моноклонального антитела против ROR1 – цирмтузумаба – приводило к замедлению процессов метастазирования. При этом наибольшая эффективность лечения наблюдалась в группе, получавшей комбинированную терапию паклитакселом и цирмтузумабом, по сравнению с монотерапией паклитакселом [179].

Дополнительно было установлено, что высокая экспрессия ROR1 ассоциирована с активацией Hippo-сигнального пути, в частности с повышенной активностью транскрипционных коактиваторов YAP/TAZ, а также с усилением экспрессии белка BMI-1 [79]. Блокирование ROR1

цирмтузумабом ингибировало Wnt5a-опосредованную активацию оси Hippo-YAP/TAZ и снижало активность BMI-1, что сопровождалось уменьшением признаков опухолевой стволовости и более благоприятным прогнозом [179].

Одним из механизмов повышения химиорезистентности опухолевых клеток при высокой экспрессии ROR1 является активация трансмембранных транспортеров семейства ABC. Через активацию каскада MAPK/ERK ROR1 повышает экспрессию ABCB1 (Р-гликопротеина), который осуществляет активный вывод химиотерапевтических препаратов из клетки. ABC-транспортеры представляют собой интегральные мембранные белки, состоящие из трансмембранных и нуклеотид-связывающих доменов, и реализуют транспорт субстратов за счет гидролиза АТФ [54]. Ингибирование ROR1 ассоциируется с усилением ДНК-повреждающего эффекта антрациклинов и препаратов платины, что подтверждает его роль в формировании лекарственной устойчивости [54].

Активация ROR1 под действием лиганда Wnt5a сопровождается димеризацией рецептора и привлечением адапторных белков, инициирующих сигнальный каскад PI3K/AKT. Данный путь играет центральную роль в регуляции выживания, пролиферации и метаболической активности опухолевых клеток и является одним из ключевых механизмов прогрессии люминального HER2-негативного рака молочной железы [20, 37].

1.6 Характеристика и роль белка BMI-1 в развитии злокачественных новообразований

Белок BMI-1 (B-cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1) относится к семейству Polycomb-группы и является одним из ключевых эпигенетических регуляторов транскрипции. BMI-1 функционирует в составе поликомб-репрессивного комплекса 1 (PRC1), образуя гетеродимер с Ring1B/Rnf2, который обладает E3-убиквитинлигазной активностью и катализирует моноубиквитинирование

лизина 119 гистона H2A (H2A-K119ub) [62]. Данная эпигенетическая модификация приводит к репрессии транскрипции генов, участвующих в контроле клеточного цикла, дифференцировке, апоптозе и репарации ДНК [9].

В физиологических условиях BMI-1 играет важную роль в поддержании способности к самообновлению и дифференцировке нормальных стволовых клеток, включая гемопоэтические и нейрональные популяции. Вместе с тем, при злокачественной трансформации данный белок приобретает онкогенные свойства, способствуя поддержанию опухолевых стволовых клеток и прогрессии опухолевого процесса [62].

Повышенная экспрессия BMI-1 выявляется при злокачественных новообразованиях различных локализаций, включая рак предстательной железы, легких, поджелудочной железы, яичников, гематологические неоплазии и рак молочной железы. Экспрессия BMI-1 ассоциирована с приобретением опухолевыми клетками свойств стволовости, усилением эпителиально-мезенхимального перехода, повышенной инвазивностью и формированием лекарственной устойчивости [62].

Экспериментальные исследования на моделях рака молочной железы продемонстрировали, что нокдаун *BMI-1* приводит к утрате способности опухолевых стволовых клеток инициировать туморогенез, тогда как восстановление экспрессии данного белка сопровождается возобновлением опухолевого роста. Фосфорилирование белков PolysomB-группы, включая BMI-1, способствует ремоделированию хроматина и ассоциируется с более агрессивным клиническим течением заболевания, а также развитием устойчивости к лучевой и лекарственной терапии [79,151].

Фармакологическое ингибирование BMI-1 также рассматривается как перспективный терапевтический подход. В экспериментальных моделях показано, что ингибитор РТС-209 снижает уровень экспрессии BMI-1 в опухолевых клетках колоректального рака, опухолей билиарного тракта и лейкозов, что сопровождается снижением пролиферативной активности и

улучшением прогностических показателей [18, 39]. Инактивация BMI-1, как правило, приводит к блокированию фаз G1 и S клеточного цикла и индукции апоптоза опухолевых клеток [142].

Перспективным направлением является комбинирование эпигенетических модификаторов с таргетными препаратами, направленными на ключевые сигнальные каскады опухолевого роста [34], поскольку эпигенетическая перестройка может менять транскрипционный ответ и снижать вероятность формирования устойчивых клонов. Подобная концепция показала эффективность в ряде экспериментальных опухолевых моделей при сочетании ингибиторов HDAC с блокаторами MAPK-каскада [47].

Особый интерес представляет роль BMI-1 при различных молекулярных подтипах рака молочной железы. Ряд исследований указывает на то, что повышенная экспрессия BMI-1 чаще выявляется при люминальном подтипе РМЖ и ассоциируется с благоприятными клинико-патологическими характеристиками, включая низкую степень злокачественности, низкий митотический индекс и отсутствие экспрессии HER2 [8]. Эти данные подчеркивают контекст-зависимую роль BMI-1 в опухолевом процессе.

Исследование Jin-yan Liu и соавт. продемонстрировало, что биологические эффекты активации BMI-1 различаются в зависимости от молекулярного подтипа рака молочной железы. В клеточных линиях люминального A подтипа BMI-1 способствует пролиферации опухолевых клеток за счет ингибирования транскрипции гена *CDKN2D*, кодирующего ингибитор циклин-зависимых киназ p19^{INK4d}. Данный белок относится к семейству INK4 (CDKN2A–D), представители которого специфически ингибируют активность комплексов циклин D–CDK4/6 и играют ключевую роль в контроле перехода клетки из фазы G1 в фазу S клеточного цикла [41,91].

Гены семейства INK4 функционируют как опухолевые супрессоры и обеспечивают связь между онкогенезом и утратой негативного контроля

клеточной пролиферации. Нарушение регуляции *CDKN2D* было описано при ряде злокачественных заболеваний, включая острый промиелоцитарный лейкоз, где химерный ген *PML/RARα* подавляет его экспрессию, способствуя нарушению дифференцировки и неконтролируемому росту клеток [83, 169, 178].

В клетках тройного негативного рака молочной железы BMI-1, напротив, ингибирует транскрипцию гена *BRCA1*, что также способствует усилению пролиферативной активности и геномной нестабильности опухолевых клеток [41]. Таким образом, BMI-1 реализует свои онкогенные эффекты через различные молекулярные мишени в зависимости от биологического контекста опухоли.

Дополнительные исследования показали, что экспрессия BMI-1 значительно повышена в ткани рака молочной железы по сравнению с нормальной тканью как на уровне мРНК, так и на белковом уровне. Иммунофлуоресцентный анализ выявил высокие уровни экспрессии BMI-1 как при люминальном А, так и при тройном негативном подтипе РМЖ, что подтверждает его универсальную роль в опухолевом росте [63, 137]. Функциональные эксперименты *in vitro* и *in vivo* продемонстрировали, что снижение экспрессии BMI-1 приводит к подавлению роста и миграции опухолевых клеток, что позволяет рассматривать данный белок как онкоген при раке молочной железы [91, 154].

Заключение

Таким образом, проведенный анализ отечественных и зарубежных источников литературы свидетельствует о том, что люминальный рак молочной железы представляет собой клинико-биологически неоднородную группу злокачественных новообразований, внутри которой вариабельность морфологических характеристик, молекулярных профилей и чувствительности к системной терапии обусловлена многоуровневым взаимодействием гормональных, ростовых, иммунных и эпигенетических регуляторных механизмов. Центральное место в патогенезе люминальных

опухолей занимает сигнальная ось рецепторов эстрогена, активность которой реализуется как посредством классических лиганд-зависимых путей транскрипционной регуляции, так и через альтернативные механизмы активации, опосредованные рецепторами факторов роста и внутриклеточными протеинкиназными каскадами.

Развитие приобретенной резистентности к гормонотерапии является результатом кумулятивного действия ряда молекулярных нарушений, включающих соматические мутации гена *ESR1*, активацию сигнального пути PI3K/AKT/mTOR, дисрегуляцию процессов апоптоза и клеточного цикла, а также ремоделирование опухолевого микроокружения с формированием иммунодепрессивного фенотипа. Существенную роль в прогрессии люминального рака молочной железы играют механизмы клеточной пластичности, реализуемые через эпителиально-мезенхимальный переход, что способствует приобретению опухолевыми клетками инвазивных свойств, формированию метастатического потенциала и устойчивости к проводимому лечению.

В этом контексте особое внимание привлекают онкофетальные сигнальные пути, в частности ось Wnt5a–ROR1, обеспечивающая интеграцию сигналов от факторов роста, элементов цитоскелета и эпигенетических регуляторов. Резэкспрессия ROR1 в опухолевых клетках ассоциируется с поддержанием фенотипа опухолевых стволовых клеток, активацией программ выживания и усилением лекарственной резистентности, что определяет его значимость в биологии люминального рака молочной железы. Эпигенетический регулятор BMI-1, функционирующий в составе поликомб-репрессивных комплексов, выступает ключевым медиатором транскрипционной репрессии генов, контролирующей дифференцировку и клеточный цикл, и в зависимости от молекулярного подтипа опухоли может оказывать как проонкогенное, так и контекст-зависимое модулирующее влияние на опухолевый рост.

Совокупность представленных данных подчеркивает, что взаимодействие сигнальных и эпигенетических механизмов, реализуемое через оси ROR1–PI3K/AKT–BMI-1, формирует молекулярную основу прогрессии и терапевтической резистентности люминального рака молочной железы. Это обосновывает необходимость комплексного изучения экспрессии и функциональной роли ROR1 и BMI-1 в опухолевой ткани с учетом клинико-морфологических и молекулярных характеристик новообразований, а также определяет научную и практическую значимость настоящего диссертационного исследования, направленного на поиск новых прогностических маркеров и потенциальных терапевтических мишеней.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн исследования и характеристика когорты

Настоящее исследование выполнено в формате ретроспективного когортного анализа и направлено на изучение клинико-морфологических и молекулярно-биологических характеристик люминального HER2-негативного рака молочной железы, ассоциированных с риском отдаленного метастатического прогрессирования на фоне адъювантной гормонотерапии ингибиторами ароматазы.

В исследование включены 80 пациенток с первично-операбельным раком молочной железы, проходивших обследование и лечение в НИИ онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» в период с 2017 по 2020 годы. Средний возраст пациенток составил $62,1 \pm 8,1$ года. Все больные находились в постменопаузе, что обеспечивало относительное единообразие гормонального фона и позволяло минимизировать влияние эндокринных факторов, связанных с сохраненной функцией яичников, на течение заболевания и эффективность терапии.

Клиническое стадирование опухолевого процесса на момент установления диагноза проводили в соответствии с классификацией TNM (8-е издание); во всех случаях стадия соответствовала T1–2N0–1M0. Таким образом, в исследование были включены пациентки с первично-операбельными формами рака молочной железы, что обеспечивало однородность когорты по исходной распространенности опухолевого процесса и позволяло корректно анализировать влияние морфологических и молекулярных характеристик опухоли на дальнейшее течение заболевания.

Критериями включения являлись: наличие инвазивного рака молочной железы люминального HER2-негативного молекулярного подтипа, подтвержденного морфологически и иммуногистохимически; постменопаузальный статус; выполнение хирургического этапа лечения в

радикальном объеме; проведение адъювантной гормонотерапии ингибиторами ароматазы.

Критериями исключения являлись: проведение неoadъювантной системной терапии (включая химиотерапию и гормонотерапию), проведение адъювантной химиотерапии, а также наличие первично-множественных злокачественных новообразований. Исключение указанных категорий пациенток было обусловлено необходимостью минимизировать влияние предшествующего системного лечения и сопутствующих онкологических заболеваний на морфологические, иммуногистохимические и молекулярные характеристики опухолевой ткани, а также на оценку клинических исходов. Дизайн исследования представлен на рисунке 5.



Рисунок 5 – Дизайн исследования

Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ (протокол № 13 от 21.12.2020) и выполнено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации. Использование архивного операционного материала и данных медицинской документации осуществлялось с соблюдением требований конфиденциальности и действующих этических норм.

Клиническое и инструментальное обследование

Обследование пациенток проводили по стандартному диагностическому алгоритму, принятому для выявления и стадирования рака молочной железы, в соответствии с действующими клиническими рекомендациями. Диагностический процесс включал морфологическое подтверждение злокачественного характера опухоли, оценку локальной и регионарной распространенности заболевания, а также исключение отдаленного метастатического поражения, что являлось принципиально важным для корректного стадирования и выбора тактики лечения.

На этапе первичного обращения всем пациенткам выполняли сбор анамнеза и физикальное обследование. В ходе клинического осмотра оценивали состояние молочных желез с определением локализации опухолевого узла, его размеров, консистенции и подвижности, а также состояние кожи и сосково-ареолярного комплекса. Инструментальная диагностика первичной опухоли включала маммографию и/или ультразвуковое исследование молочных желез и регионарных лимфатических узлов. Ультразвуковое исследование применяли для уточнения размеров опухоли, ее эхоструктуры и характера роста, а также для оценки состояния регионарных лимфатических узлов и выявления подозрительных изменений, требующих морфологической верификации

Стадирование и подтверждение статуса M0

Стадирование опухолевого процесса осуществляли в соответствии с клиническими рекомендациями по раку молочной железы. Для подтверждения отсутствия отдаленных метастазов (статус M0) применяли

комплекс лучевых методов исследования. В стандартный объем обследования входила компьютерная томография органов грудной клетки и брюшной полости. Для выявления возможного метастатического поражения костной системы по показаниям выполняли сцинтиграфию костей скелета.

Морфологическая верификация и определение молекулярного подтипа

Морфологическая верификация диагноза осуществлялась на основании исследования биопсийного материала. Дополнительно проводилось иммуногистохимическое исследование, необходимое для определения молекулярного подтипа опухоли и включения пациенток в исследование.

Иммуногистохимическое определение молекулярного подтипа выполняли в соответствии с действующими клиническими рекомендациями. Люминальный подтип рака молочной железы подтверждали при наличии экспрессии рецепторов эстрогенов (ER) и/или прогестерона (PR) не менее чем в 1 % опухолевых клеток. HER2-негативный статус устанавливали при отсутствии гиперэкспрессии или амплификации данного онкогена. Уровень пролиферативной активности оценивали по экспрессии маркера Ki-67.

Разграничение люминального А и люминального В HER2-негативного молекулярных подтипов осуществляли с учетом уровня пролиферативной активности опухолевых клеток. К люминальному А подтипу относили опухоли с низким уровнем пролиферативной активности ($Ki-67 < 20 \%$), тогда как люминальный В HER2-негативный подтип диагностировали при повышенном уровне экспрессии Ki-67 ($\geq 20 \%$) при сохраненной экспрессии рецепторов эстрогенов и/или прогестерона и отсутствии гиперэкспрессии или амплификации HER2.

Лечение пациенток

Лечение пациенток проводилось в соответствии с действующими клиническими рекомендациями по раку молочной железы и носило комплексный характер, включая хирургический этап и адъювантную терапию. Тактика лечения определялась на основании клинико-

инструментальных данных, морфологических характеристик опухоли и результатов стадирования опухолевого процесса.

Во всех случаях пациенткам выполнялось оперативное лечение, направленное на радикальное удаление первичного опухолевого очага. В зависимости от клинической ситуации и индивидуальных особенностей заболевания хирургическое вмешательство осуществлялось в объеме мастэктомии либо органосохраняющей операции – секторальной резекции молочной железы. Выбор объема хирургического вмешательства определялся размерами и локализацией опухоли, соотношением размеров опухолевого узла и объема молочной железы, наличием или отсутствием мультифокального роста, а также возможностью достижения радикальности вмешательства с формированием отрицательных краев резекции. Во всех случаях целью хирургического этапа лечения являлось полное удаление опухолевой ткани с соблюдением принципов онкологической радикальности. Хирургический этап лечения включал стадирующие вмешательства на регионарных лимфатических узлах. В зависимости от клинической картины и результатов предоперационного обследования выполняли биопсию сторожевого лимфатического узла и/или аксиллярную лимфодиссекцию. Выбор объема лимфохирургического вмешательства определялся клинической ситуацией, предполагаемой распространенностью опухолевого процесса и необходимостью уточнения регионарного статуса.

Все удаленные лимфатические узлы подвергались обязательному морфологическому исследованию с целью выявления метастатического поражения и уточнения стадии заболевания. Полученные данные использовались как для окончательного стадирования опухолевого процесса, так и для последующего анализа клинико-морфологических характеристик исследуемой когорты.

Адъювантная терапия

После завершения хирургического этапа лечения всем пациенткам проводилась лучевая терапия в адъювантном режиме в соответствии с

принятыми клиническими стандартами и рекомендациями. Лучевая терапия рассматривалась как обязательный компонент комплексного лечения, направленный на снижение риска локорегионарного рецидива заболевания. Кроме того, всем пациенткам была назначена адъювантная гормонотерапия ингибиторами ароматазы. Выбор данного класса препаратов был обусловлен постменопаузальным статусом больных и люминальным характером опухолей. Продолжительность гормонотерапии составляла 5 лет, что соответствовало действующим клиническим рекомендациям и позволяло обеспечить сопоставимость терапевтических воздействий в исследуемой группе пациенток.

Морфологическое исследование операционного материала

Материалом морфологического исследования служили образцы ткани первичной опухоли молочной железы и регионарных лимфатических узлов, полученные в ходе хирургического лечения. Все препараты исследовались в отделении общей и молекулярной патологии НИИ онкологии Томского НИМЦ по стандартным патоморфологическим протоколам.

Фиксацию операционного материала осуществляли в 10 % нейтральном формалине в стандартном режиме. После завершения фиксации материал подвергали стандартной гистологической проводке с последующей заливкой в парафин. Из парафиновых блоков изготавливали серийные гистологические срезы толщиной 3-4 мкм. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике.

Микроскопическое исследование проводили с использованием светового микроскопа Nikon ECLIPSE Ci. В ткани первичной опухоли определяли гистологический тип новообразования в соответствии с классификацией опухолей молочной железы Всемирной организации здравоохранения (5-е издание, 2019). Степень гистологической злокачественности опухоли оценивали по системе Nottingham с учетом трех параметров: степени тубулярной дифференцировки, выраженности ядерного полиморфизма и митотической активности. По сумме баллов опухоли

классифицировали на G1, G2 или G3. Все удаленные регионарные лимфатические узлы подвергались последовательному морфологическому исследованию. В каждом лимфатическом узле оценивали наличие или отсутствие метастатического поражения, а также характер метастазов (микрометастазы или макрометастазы при их наличии). При отсутствии метастазов фиксировали реактивные изменения лимфоидной ткани.

Полученные данные использовались для окончательного стадирования опухолевого процесса и анализа клинико-морфологических параметров исследуемой когорты.

Иммуногистохимическое исследование

Иммуногистохимическое исследование выполняли на парафиновых срезах ткани первичной опухоли молочной железы. Окрашивание проводили на автоматическом иммуногистостейнере Bond-MAX (Leica Biosystems) с использованием стандартной системы детекции и протоколов, рекомендованных производителем оборудования. Во всех случаях применяли иммуногистохимические антитела к следующим белкам: ROR1 (ROR1 antibody, polyclonal, рабочее разведение 1:100, ThermoFisher Scientific), BMI-1 (BMI-1 antibody, polyclonal, рабочее разведение 1:100, ThermoFisher Scientific) и Cyclin D1 (Cyclin D1 antibody, monoclonal, рабочее разведение 1:100, Abcam). Подбор антител и рабочих разведений осуществлялся с учетом данных литературы и рекомендаций производителей. Иммуногистохимическую реакцию оценивали в ткани первичной опухоли молочной железы. При интерпретации результатов экспрессии маркеров ROR1 и BMI-1 учитывали исключительно тип иммунного окрашивания опухолевых клеток (ядерный или цитоплазматический) что соответствовало биологическим особенностям исследуемых белков и целям настоящего исследования. Степень экспрессии ROR1 и BMI-1 определяли по доле опухолевых клеток с позитивным окрашиванием. В зависимости от процента позитивных клеток экспрессию классифицировали как слабую (1-25 %), умеренную (25-50 %) или высокую

(более 50 % опухолевых клеток). Такой полуколичественный подход позволял унифицировать оценку иммуногистохимических реакций и обеспечить сопоставимость результатов между наблюдениями. Экспрессию Cyclin D1 оценивали по наличию ядерного иммунного окрашивания в опухолевых клетках. Гиперэкспрессию Cyclin D1 регистрировали при выявлении позитивного ядерного окрашивания более чем в 25 % опухолевых клеток, что соответствовало принятым в литературе критериям и использовалось для дальнейшего анализа.

Молекулярно-генетическое исследование

Молекулярно-генетическое исследование выполняли с целью определения мутационного статуса гена *PIK3CA* в ткани первичной опухоли молочной железы. Анализ проводили на образцах опухолевой ткани, фиксированных в формалине и залитых в парафин (FFPE), полученных в ходе хирургического лечения. Для молекулярного анализа отбирали блоки с наибольшей долей опухолевой ткани. В каждом случае предварительно оценивали гистологические препараты, окрашенные гематоксилином и эозином, с целью подтверждения репрезентативности материала и достаточного содержания опухолевых клеток. При необходимости выполняли макродиссекцию опухолевой ткани для обогащения образца опухолевыми клетками. Молекулярно-генетическое исследование проводили исключительно на ткани первичной опухоли. Выделение ДНК из FFPE-образцов осуществляли с использованием набора cobas® DNA Sample Preparation Kit в соответствии с инструкцией производителя. Качество и пригодность выделенной ДНК для последующего анализа оценивали в рамках стандартных процедур внутреннего контроля, предусмотренных методикой.

Определение мутационного статуса гена *PIK3CA* выполняли с применением набора cobas® *PIK3CA* Mutation Test, основанного на методе полимеразной цепной реакции в реальном времени. Данный тест предназначен для качественного выявления и идентификации 17 клинически

значимых мутаций в экзонах 2 (R88Q), 5 (N345K), 8 (C420R), 10 (E542K, E545A, E545D, E545G, E545K, Q546E, Q546K, Q546L и Q546R) и 21 (H1047L, H1047R, H1047Y, G1049R и M1043L) гена *PIK3CA*, кодирующего каталитическую субъединицу α фосфатидилинозитол-3-киназы. Амплификацию и анализ результатов осуществляли с использованием платформы cobas® 4800.

Результаты молекулярно-генетического исследования интерпретировали в соответствии с критериями, установленными производителем тест-системы. Полученные данные использовали для последующего сопоставления мутационного статуса гена *PIK3CA* с клинико-морфологическими характеристиками опухолей, показателями иммуногистохимической экспрессии исследуемых маркеров, а также с клиническими исходами заболевания.

Оценка клинических исходов

Оценку клинических исходов проводили на основании анализа медицинской документации пациенток исследуемой когорты. Динамическое наблюдение осуществлялось в течение 5 лет с момента выполнения хирургического этапа лечения. В процессе наблюдения фиксировали данные клинических осмотров, результаты инструментальных методов обследования и сведения о развитии опухолевого прогрессирования. В качестве клинического исхода в настоящем исследовании рассматривали развитие отдаленного гематогенного метастатического поражения. Под прогрессированием заболевания понимали выявление метастазов во внутренние органы или костную систему, подтвержденных данными лучевых методов исследования. Для верификации отдаленных метастазов использовали компьютерную томографию и сцинтиграфию костей скелета в соответствии с клинической практикой. Локорегионарные рецидивы заболевания в анализ клинических исходов и выживаемости не включались. Безметастатическую выживаемость определяли как интервал времени от даты хирургического лечения до момента выявления первых признаков

отдаленного метастатического прогрессирования либо до окончания периода наблюдения у пациенток без признаков прогрессирования. Такой подход позволял сосредоточить анализ на факторах, ассоциированных именно с развитием системного метастатического процесса, что соответствовало целям настоящего исследования.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с использованием программных пакетов Statistica 10.0 и GraphPad Prism 10. Характер распределения количественных переменных оценивали с применением критерия Колмогорова–Смирнова. В связи с отсутствием нормального распределения большинства показателей для анализа использовали непараметрические методы статистики.

Количественные данные представляли в виде медианы (Me) и межквартильного размаха (Q1-Q3), категориальные переменные – в виде абсолютных и относительных частот.

Для сравнения количественных показателей между двумя независимыми группами применяли U-критерий Манна – Уитни, при сравнении более чем двух групп – критерий Краскела – Уоллиса. Сравнение категориальных признаков выполняли с использованием χ^2 -критерия Пирсона.

Анализ безметастатической выживаемости (metastasis-free survival, MFS) выполняли методом Каплана–Майера. В качестве события учитывали развитие отдаленного гематогенного метастатического прогрессирования. Сравнение кривых выживаемости между группами проводили с применением лог-рангового теста.

Для оценки прогностической значимости отдельных клинико-морфологических, иммуногистохимических и молекулярно-генетических показателей выполняли ROC-анализ с построением ROC-кривых и расчетом площади под кривой (AUC). Оптимальные пороговые значения определяли с использованием индекса Юдена.

Для выявления факторов, ассоциированных с риском развития отдаленного метастатического прогрессирования, применяли бинарную логистическую регрессию. В модель включали клинико-морфологические, иммуногистохимические и молекулярно-генетические параметры, продемонстрировавшие статистически значимую связь с развитием прогрессирования на этапе однофакторного анализа. Результаты представляли в виде отношений шансов (OR) с указанием 95 % доверительных интервалов.

Во всех случаях уровень статистической значимости принимали равным $p < 0,05$.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Клинико-морфологическая характеристика пациенток и опухолей

В исследуемой когорте пациенток с люминальным HER2-негативным раком молочной железы ($n = 80$) в течение пятилетнего периода наблюдения прогрессирование заболевания в виде развития отдаленных гематогенных метастазов было зарегистрировано у 14 пациенток (17,5 %), которые составили группу с прогрессированием заболевания. У остальных 66 пациенток (82,5 %) признаков отдаленного метастатического прогрессирования в течение всего периода наблюдения выявлено не было.

Сравнительный анализ клинико-морфологических параметров первичной опухоли между группами с наличием и отсутствием прогрессирования представлен в таблице 1. В целом сформированные группы были сопоставимы по ряду ключевых клинических характеристик, что позволяло рассматривать выявленные различия как отражение биологических особенностей опухолевого процесса, а не исходной распространенности заболевания.

Распределение пациенток по стадии заболевания (TNM, 8-е издание) не выявило статистически значимых различий между группами. В обеих группах преобладали опухоли I и IIA стадии. В группе с прогрессированием заболевания I стадия была диагностирована у 50,0 % пациенток, IIA – у 36,0 %, IIB – у 14,0 %. В группе без прогрессирования соответствующие показатели составили 49,0 %, 39,0 % и 12,0 % соответственно ($p = 0,96$).

Отсутствие различий по стадии подчеркивает, что развитие отдаленного метастатического процесса в данной когорте не было напрямую связано с исходной клинической распространенностью опухоли.

Таблица 1 – Клинико-морфологические параметры пациенток с раком молочной железы в зависимости от наличия или отсутствия прогрессирования заболевания

Параметр, абс. (%)		Наличие признаков прогрессирования заболевания	Отсутствие признаков прогрессирования заболевания	p
Стадия	I	7/14 (50,0)	32/66 (49,0)	0,96
	IIA	5/14 (36,0)	26/66 (39,0)	
	IIB	2/14 (14,0)	8/66 (12,0)	
Гистологический тип	IDP	2/14 (14,0)	6/66 (9,0)	0,56
	ИКНТ	12/14 (86)	60/66 (91)	
Степень злокачественности	I	6/14 (43,0)	42/66 (64,0)	0,05
	II	7/14 (50,0)	24/66 (36,0)	
	III	1/14 (7,0)	0/66 (0,0)	
Молекулярный подтип	Люм.А	7/14 (50,0)	59/66 (89,0)	0,0004
	Люм.В	7/14 (50,0)	7/66 (11,0)	
Примечание: ИДР – инвазивная дольковая карцинома; ИКНТ – инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа; ЛюмА – люминальный А молекулярный подтип; ЛюмВ – люминальный В HER2-негативный молекулярный подтип.				

В исследуемой когорте наряду с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа выявлялись случаи инвазивной дольковой карциномы. Опухоли данного гистологического варианта характеризовались типичным дискогезивным ростом опухолевых клеток с формированием линейных рядов и мишеневидных (таргетоидных) структур вокруг протоков молочной железы, что соответствовало классическому подтипу инвазивной дольковой карциномы (рисунок 6). В отдельных наблюдениях регистрировался плеоморфный вариант инвазивной дольковой карциномы, отличавшийся более выраженным ядерным полиморфизмом и клеточной атипией (рисунок 7).

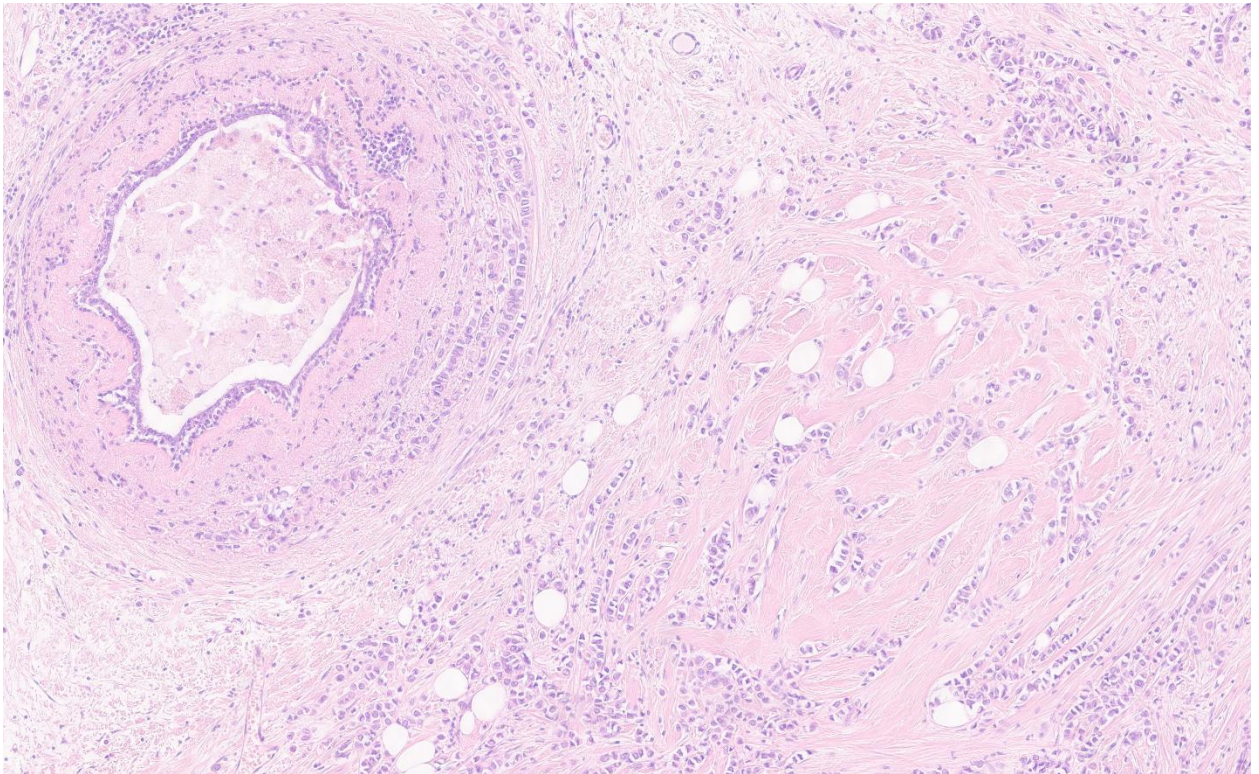


Рисунок 6 – Инвазивная дольковая карцинома молочной железы, классический вариант. Дискогезивный рост опухолевых клеток с формированием мишеневидных (таргетоидных) структур вокруг протока молочной железы. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 40$

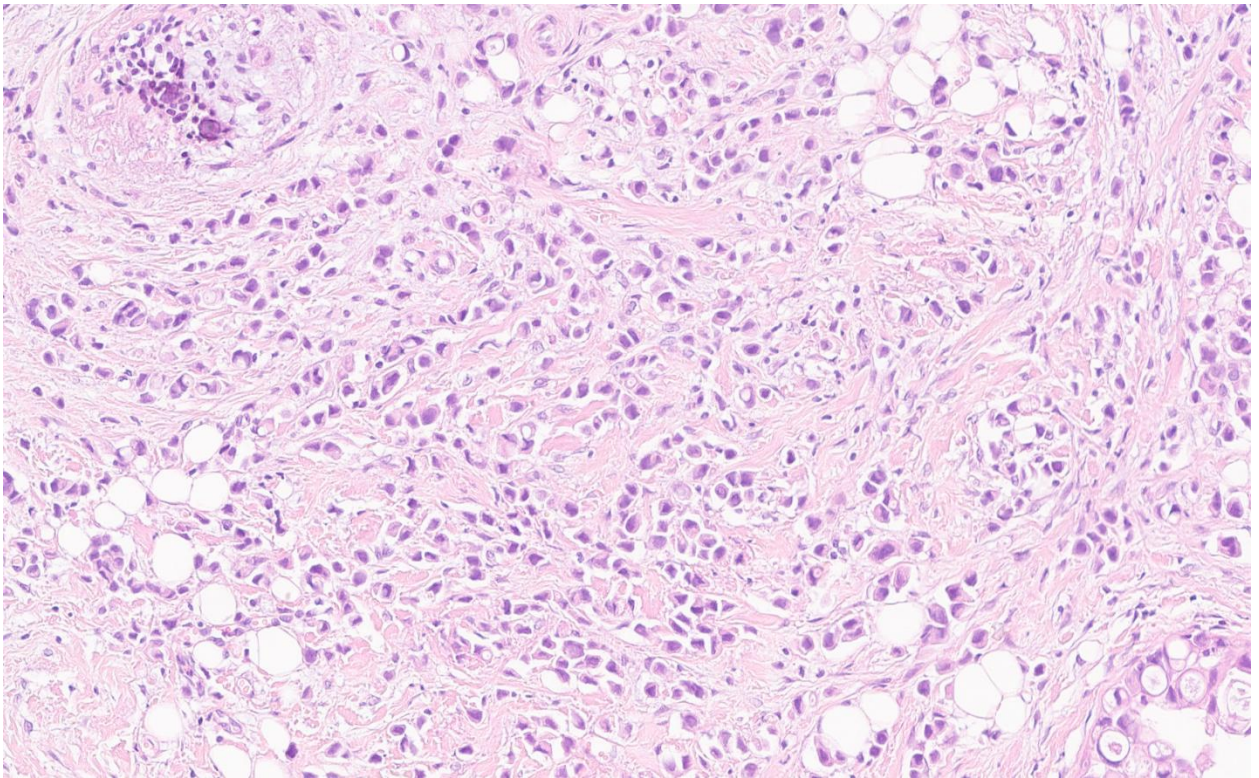


Рисунок 7 – Инвазивная дольковая карцинома молочной железы, плеоморфный вариант. Опухоль представлена дискогезивными клетками с выраженным ядерным полиморфизмом и увеличенными гиперхромными ядрами. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$

Анализ гистологического типа опухоли показал преобладание инвазивной карциномы неспецифического типа рака молочной железы в обеих группах. В группе с прогрессированием ИКНТ выявлен у 86,0 % пациенток, инвазивный дольковый рак – у 14,0 %; в группе без прогрессирования – у 91,0 % и 9,0 % соответственно.

Статистически значимых различий по гистологическому типу опухоли выявлено не было ($p = 0,56$), что указывает на ограниченную прогностическую значимость данного параметра в рамках люминального HER2-негативного подтипа.

В то же время при анализе степени гистологической злокачественности опухоли были выявлены различия, достигшие порогового уровня статистической значимости ($p = 0,05$). В группе с прогрессированием

заболевания чаще регистрировались опухоли II–III степени злокачественности. Так, опухоли G1 выявлены у 43,0 % пациенток, G2 – у 50,0 %, G3 – у 7,0 %. В группе без прогрессирования преобладали опухоли низкой степени злокачественности: G1 – 64,0 %, G2 – 36,0 %, опухоли G3 отсутствовали. Морфологические особенности инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа представлены на рисунке 8.

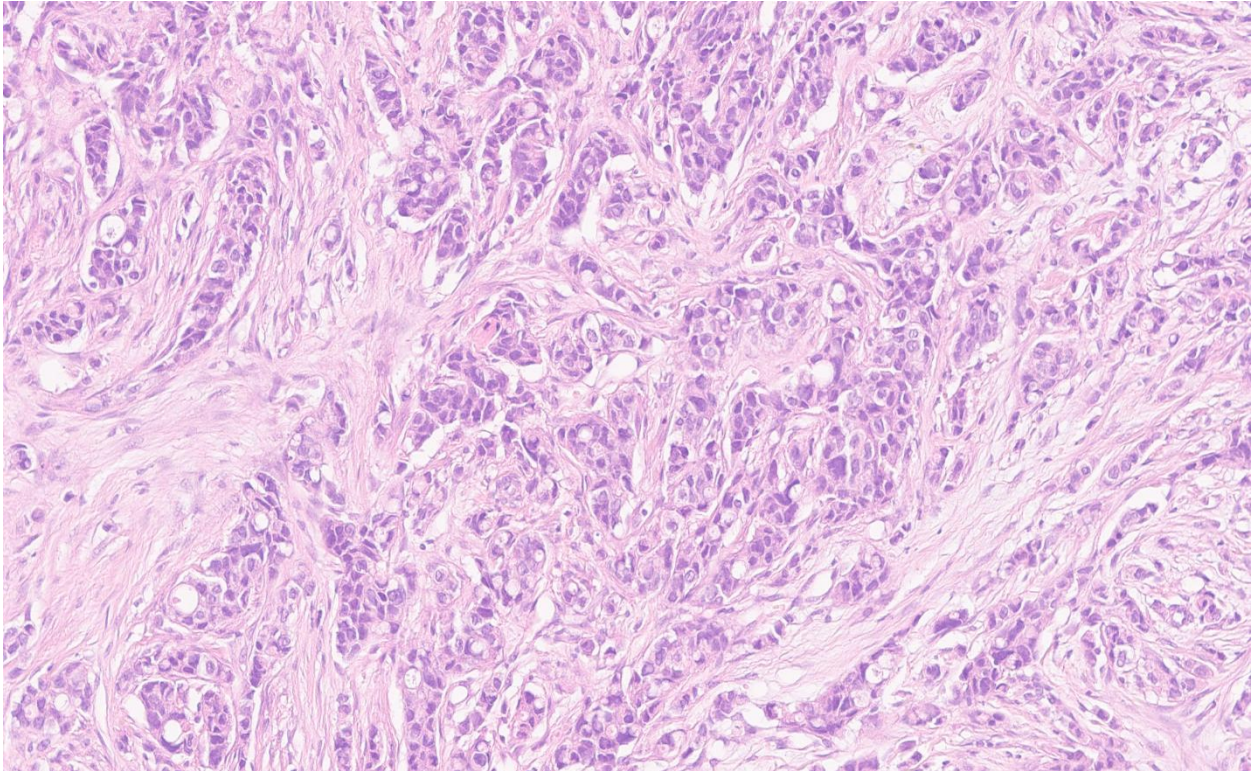


Рисунок 8 – Инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа, солидно-трабекулярный тип роста, степень злокачественности G2.

Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$

Эти данные свидетельствуют о том, что более высокая степень морфологической анаплазии опухоли ассоциирована с повышенным риском последующего системного прогрессирования даже при гормонозависимом варианте рака молочной железы.

Наиболее выраженные различия между группами были выявлены при анализе молекулярного подтипа опухоли. В группе с прогрессированием

заболевания доля люминального В HER2-негативного подтипа составила 50,0 %, тогда как в группе без прогрессирования данный подтип выявлялся лишь у 11,0 % пациенток. Напротив, люминальный А подтип значительно чаще встречался в группе без признаков прогрессирования (89,0 % против 50,0 % в группе с прогрессированием). Различия по данному параметру носили выраженный статистически значимый характер ($p = 0,0004$).

С учетом того, что ключевым отличительным признаком люминального В HER2-негативного подтипа является повышенная пролиферативная активность опухолевых клеток, дополнительное значение приобрела оценка экспрессии Ki-67. Опухоли, ассоциированные с последующим развитием отдаленных метастазов, характеризовались более высоким уровнем пролиферативной активности, что наглядно отражает биологическую гетерогенность люминального рака молочной железы.

Таким образом, проведенный анализ показал, что развитие отдаленного метастатического прогрессирования в исследуемой когорте пациенток не было связано с исходной стадией заболевания или гистологическим типом опухоли, но ассоциировалось с признаками повышенной биологической агрессивности, включая более высокую степень гистологической злокачественности и принадлежность опухоли к люминальному В HER2-негативному молекулярному подтипу с повышенной пролиферативной активностью. Полученные данные обосновывают целесообразность дальнейшего анализа иммуногистохимических и молекулярных маркеров, потенциально вовлеченных в формирование резистентности к гормонотерапии и развитие системного прогрессирования заболевания.

3.2 Анализ экспрессии ROR1, BMI-1, Cyclin D1 и мутационного статуса гена *PIK3CA* в сопоставлении с клинико-морфологическими характеристиками люминального рака молочной железы

На следующем этапе исследования была проведена детальная оценка взаимосвязи экспрессии молекулярных маркеров ROR1, BMI-1, Cyclin D1, а также мутационного статуса гена *PIK3CA* с основными клинико-морфологическими характеристиками опухолевого процесса у пациенток с люминальным HER2-негативным раком молочной железы. Анализ охватывал параметры, традиционно используемые для клинической стратификации больных, включая стадию заболевания, степень гистологической злокачественности, гистологический подтип опухоли и наличие метастатического поражения регионарных лимфатических узлов.

При иммуногистохимическом исследовании экспрессия ROR1 была выявлена у 46 из 80 пациенток (57,5 %), тогда как отсутствие экспрессии данного маркера зарегистрировано у 34 пациенток (42,5 %). Примеры выраженной мембранно-цитоплазматической экспрессии ROR1 и отрицательного иммуногистохимического окрашивания в опухолевых клетках инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа представлены на рисунках 9 и 10 соответственно.

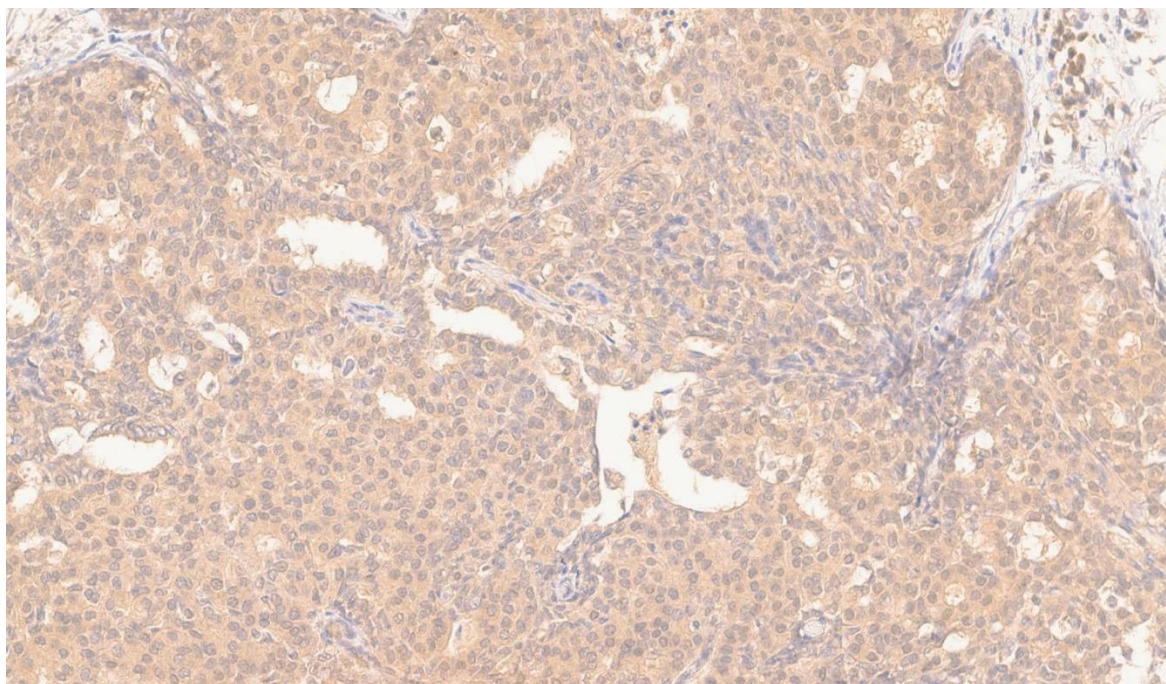


Рисунок 9 – Иммуногистохимическая экспрессия ROR1 в ткани инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа. Выраженная мембранно-цитоплазматическая экспрессия ROR1 в опухолевых клетках.

Увеличение $\times 200$

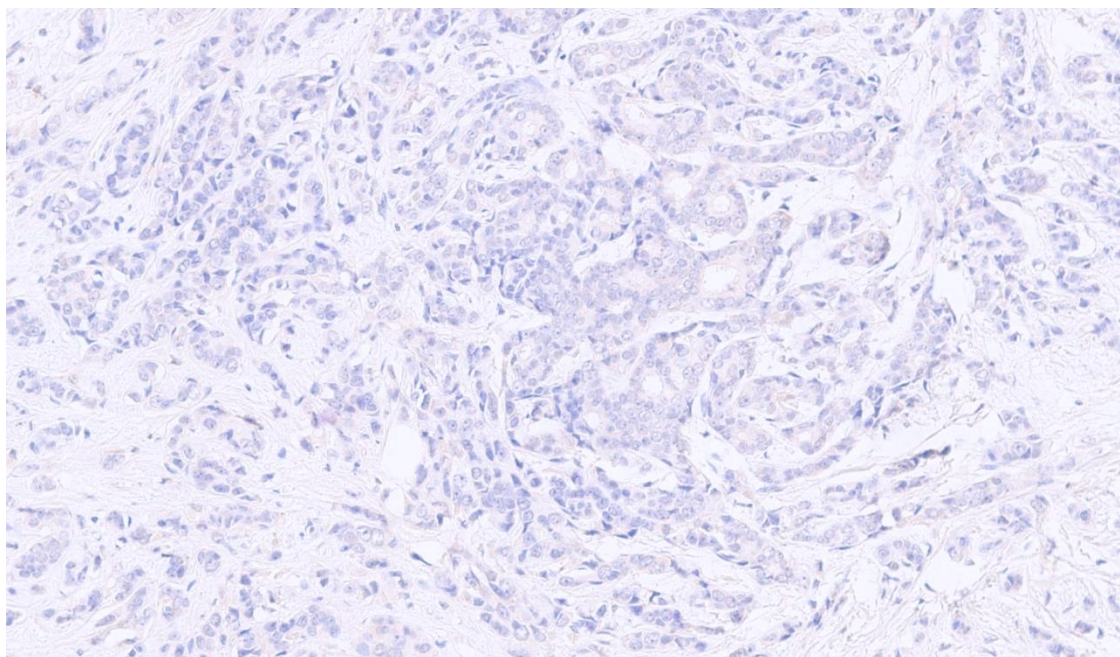


Рисунок 10 – Инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа с отсутствием иммуногистохимической экспрессии ROR1 в опухолевых клетках. Увеличение $\times 200$

Экспрессия VIM-1 выявлялась у 66 из 80 пациенток (82,5 %) и носила преимущественно ядерный характер (рисунок 11). Гиперэкспрессия Cyclin D1 была зарегистрирована у 30 из 80 пациенток (37,5 %).

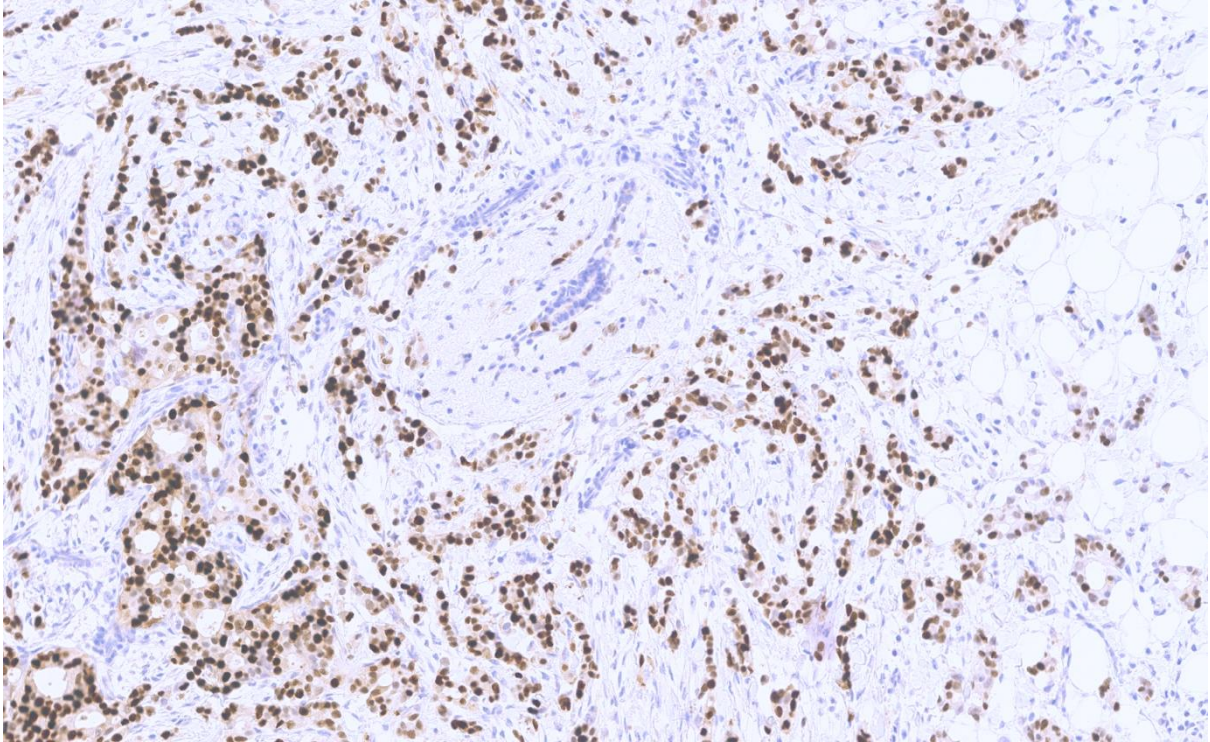


Рисунок 11 – Иммуногистохимическая экспрессия VIM-1 в ткани инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа. Выраженная ядерная экспрессия VIM-1 в опухолевых клетках при отсутствии окрашивания в неизмененном эпителии протоков молочной железы (центральная часть изображения). Увеличение $\times 100$

В исследуемой когорте пациенток с люминальным HER2-негативным раком молочной железы мутации гена *PIK3CA* были выявлены у 24 из 80 пациенток, что составило 30,0 %. Наличие мутаций *PIK3CA* регистрировалось как в группе с прогрессированием заболевания, так и в группе без признаков отдаленного метастатического прогрессирования.

В дополнение к бинарной оценке мутационного статуса гена *PIK3CA* был проанализирован спектр выявленных мутационных вариантов.

Установлено, что в исследуемой когорте преобладали hotspot-мутации E545X и H1047X, локализованные в экзонах 10 и 21 соответственно; реже выявлялись варианты N345K и Q546X, единично – мутация E542K (рисунок 12). Полученные данные отражают доминирование типичных активирующих изменений *PIK3CA*, характерных для люминального рака молочной железы, и служат основой для последующей интерпретации роли PI3K/АКТ-сигнального пути в регуляции экспрессии исследуемых молекулярных маркеров.

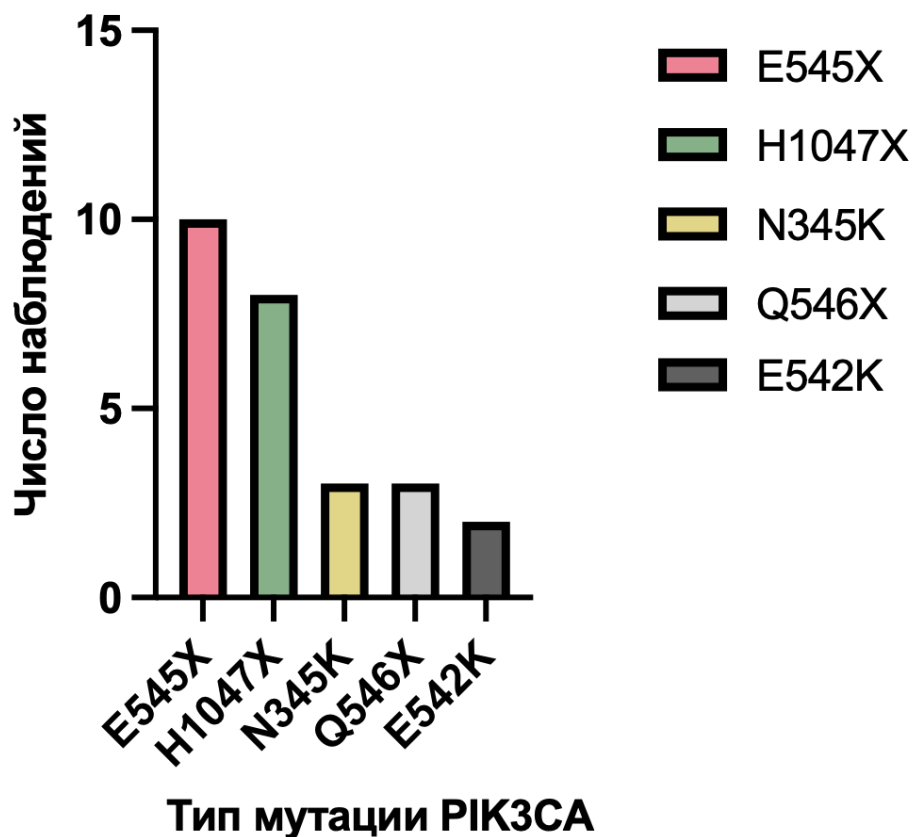


Рисунок 12 – Спектр выявленных hotspot-мутаций гена *PIK3CA* в исследуемой когорте пациенток с люминальным HER2-негативным раком молочной железы

Метастатическое поражение регионарных лимфатических узлов является одним из ключевых факторов прогноза при раке молочной железы и отражает ранние этапы системного распространения опухоли. В этой связи

особый интерес представляла оценка связи изучаемых молекулярных маркеров с N-статусом.

Как показал проведенный анализ, экспрессия ROR1, BMI-1 и гиперэкспрессия Cyclin D1 не была статистически значимо ассоциирована с наличием метастазов в регионарных лимфатических узлах (таблица 2).

Таблица 2 – Распределение пациенток с люминальным раком молочной железы в зависимости от экспрессии ROR1, BMI-1 и гиперэкспрессии Cyclin D1 и наличия метастатического поражения регионарных лимфатических узлов

Параметр		Наличие метастатического поражения регионарных лимфоузлов абс. (%)	
		Нет n = 65	Есть n = 15
Экспрессия ROR1	Нет	30 (46 %)	4 (27 %)
	Есть	35 (54 %)	11 (73 %)
$\chi^2 = 1,89; p = 0,16$			
Экспрессия BMI-1	Нет	10 (15 %)	4 (27 %)
	Есть	55 (85 %)	11 (73 %)
$\chi^2 = 1,07; p = 0,29$			
Гиперэкспрессия Cyclin D1	Нет	40 (62 %)	10 (67 %)
	Есть	25 (38 %)	5 (33 %)
$\chi^2 = 0,14; p = 0,71$			

Аналогичным образом, мутации гена *PIK3CA* выявлялись с сопоставимой частотой у пациенток с поражением и без поражения лимфатических узлов (таблица 3). Отсутствие достоверных ассоциаций указывает на то, что исследуемые молекулярные маркеры не отражают склонность опухоли к регионарному метастазированию и, вероятно, не вовлечены в механизмы лимфогенной диссеминации.

Таблица 3 – Распределение пациенток с люминальным раком молочной железы в зависимости от наличия мутации гена *PIK3CA* и наличия метастазов в регионарных лимфоузлах

Мутация гена <i>PIK3CA</i>	Наличие метастатического поражения регионарных лимфоузлов абс. (%)	
	Нет n = 65	Есть n = 15
Нет мутации	45 (69 %)	11 (73 %)
Есть мутация	20 (31 %)	4 (27 %)
$\chi^2 = 0,09; p = 0,75$		

Анализ распределения экспрессии ROR1, BMI-1 и Cyclin D1 в зависимости от стадии опухолевого процесса также не выявил статистически значимых различий (таблица 4). Частота гиперэкспрессии указанных маркеров оставалась сопоставимой при I, IIa и IIb стадиях заболевания.

Таблица 4 – Распределение пациенток с люминальным раком молочной железы в зависимости от стадии заболевания и экспрессии BMI-1, ROR1 и гиперэкспрессии Cyclin D1 в первичной опухоли

Параметр		Стадия опухолевого процесса абс. (%)		
		Стадия I n = 39	Стадия IIa n = 31	Стадия IIb n = 10
Экспрессия BMI-1	Нет	7 (18 %)	5 (16 %)	2 (20 %)
	Есть	32 (82 %)	26 (84 %)	8 (80 %)
$\chi^2 = 0,08; p = 0,95$				
Экспрессия ROR1	Нет	18 (46 %)	14 (45 %)	2 (20 %)
	Есть	21 (54 %)	17 (55 %)	8 (80 %)
$\chi^2 = 2,37; p = 0,30$				
Гиперэкспрессия Cyclin D1	Нет	23 (59 %)	20 (65 %)	7 (70 %)
	Есть	16 (41 %)	11 (35 %)	3 (30 %)
$\chi^2 = 0,50; p = 0,78$				

Аналогичная картина была получена при оценке мутационного статуса гена *PIK3CA*, частота мутаций которого не зависела от стадии опухолевого процесса (таблица 5).

Таблица 5 – Распределение пациенток с люминальным раком молочной железы в зависимости от наличия мутации гена *PIK3CA* и стадии опухолевого процесса

Мутация гена <i>PIK3CA</i>	Стадия опухолевого процесса абс. (%)		
	Стадия I n = 39	Стадия IIa n = 31	Стадия IIb n = 10
Нет мутации	27 (69 %)	22 (71 %)	7 (70 %)
Есть мутация	12 (31 %)	9 (29 %)	3 (30 %)
	$\chi^2 = 0,02; p = 0,98$		

Данные результаты свидетельствуют о том, что изучаемые молекулярные маркеры не являются отражением клинической распространенности опухоли на момент диагностики и не могут рассматриваться как суррогатные показатели стадии заболевания.

Степень гистологической злокачественности традиционно рассматривается как морфологический индикатор биологической агрессивности опухоли. Однако в настоящем исследовании экспрессия ROR1, BMI-1 и Cyclin D1 не демонстрировала статистически значимой зависимости от степени злокачественности опухоли (таблица 6). Экспрессия BMI-1 выявлялась с высокой частотой во всех градациях злокачественности, тогда как экспрессия ROR1 и Cyclin D1 распределялась относительно равномерно между опухолями различной степени анаплазии.

Таблица 6 – Распределение пациенток с люминальным раком молочной железы в зависимости от степени злокачественности опухоли экспрессии BMI-1, ROR1 и гиперэкспрессии Cyclin D1

Параметр		Степень злокачественности опухоли абс. (%)		
		Grade 1 n = 48	Grade 2 n = 31	Grade 3 n = 1
Экспрессия BMI-1	Нет	9 (19 %)	5 (16 %)	0 (0 %)
	Есть	39 (81 %)	26 (84 %)	1 (100 %)
$\chi^2 = 0,95; p = 0,62$				
Экспрессия ROR1	Нет	23 (48 %)	10 (32 %)	1 (100 %)
	Есть	25 (52 %)	21 (68 %)	0 (0 %)
$\chi^2 = 3,26; p = 0,2$				
Гиперэкспрессия Cyclin D1	Нет	31 (65 %)	18 (58 %)	1 (100 %)
	Есть	17 (35 %)	13 (42 %)	0 (0 %)
$\chi^2 = 0,97; p = 0,62$				

Наличие мутации гена *PIK3CA* также не было ассоциировано со степенью гистологической злокачественности опухоли (таблица 7). Несмотря на ограниченное число опухолей G3 в исследуемой когорте, полученные данные не указывают на прямую связь мутационного статуса *PIK3CA* с морфологическими признаками опухолевой агрессии.

Таблица 7 – Распределение пациенток с люминальным раком молочной железы в зависимости от наличия мутации гена *PIK3CA* и степени злокачественности опухоли

Мутация гена <i>PIK3CA</i>	Степень злокачественности опухоли абс. (%)		
	1 n = 48	2 n = 31	3 n = 1
Нет мутации	34 (71 %)	22 (71 %)	0 (0 %)
Есть мутация	14 (29 %)	9 (29 %)	1 (100 %)
	$\chi^2 = 2,36; p = 0,30$		

При анализе экспрессии молекулярных маркеров и мутационного статуса гена *PIK3CA* в зависимости от гистологического подтипа опухоли также не выявлено статистически значимых различий. Это свидетельствует о том, что изучаемые молекулярные маркеры не являются специфичными для конкретного гистологического варианта люминального рака молочной железы. Так, как показано в таблице 8, частота мутаций гена *PIK3CA* не различалась между инфильтрирующим протоковым и инфильтрирующим дольковым раком ($\chi^2 = 1,69$; $p = 0,19$), что указывает на отсутствие связи мутационного статуса данного гена с гистологическим вариантом люминального рака молочной железы.

Таблица 8 – Распределение пациенток с люминальным раком молочной железы в зависимости от наличия мутации гена *PIK3CA* и гистологического подтипа опухоли

Мутация гена <i>PIK3CA</i>	Гистологический подтип опухоли абс. (%)	
	ИКНТ n = 72	ИДР n = 8
Нет мутации	52 (72 %)	4 (50 %)
Есть мутация	20 (28 %)	4 (50 %)
	$\chi^2 = 1,69$; p = 0,19	
Примечания: 1 ИКНТ – инвазивная карцинома неспецифического типа; 2 ИДР – инвазивный дольковый рак.		

Аналогичным образом, при оценке экспрессии ВМІ-1 (таблица 9) достоверных различий между основными гистологическими подтипами опухоли также выявлено не было ($\chi^2 = 0,15$; $p = 0,69$). Частота экспрессии ВМІ-1 оставалась сопоставимой как при ИКНТ, так и при инвазивном дольковом раке.

Таблица 9 – Распределение больных с люминальным раком молочной железы в зависимости от гиперэкспрессии ВМІ-1 и гистологического подтипа опухоли

Экспрессия ВМІ-1	Гистологический подтип опухоли абс. (%)	
	ИКНТ n = 72	ИДР n = 8
Нет экспрессии	13 (18 %)	1 (13 %)
Есть экспрессия	59 (82 %)	7 (87 %)
	$\chi^2 = 0,15; p = 0,69$	
Примечания:		
1 ИКНТ – инвазивная карцинома неспецифического типа;		
2 ИДР – инвазивный дольковый рак.		

При анализе экспрессии ROR1 в зависимости от гистологического подтипа опухоли (таблица 10) также не отмечено статистически значимых различий ($\chi^2 = 1,11; p = 0,29$), несмотря на тенденцию к более высокой частоте экспрессии данного маркера при инфильтрирующем дольковом раке.

Таблица 10 – Распределение пациенток с люминальным раком молочной железы в зависимости от экспрессии ROR1 и гистологического подтипа опухоли

Экспрессия ROR1	Гистологический подтип опухоли абс. (%)	
	ИКНТ n = 72	ИДР n = 8
Нет экспрессии	32 (44 %)	2 (25 %)
Есть экспрессия	40 (56 %)	6 (75 %)
	$\chi^2 = 1,11; p = 0,29$	
Примечания:		
1 ИКНТ – инвазивная карцинома неспецифического типа;		
2 ИДР – инвазивный дольковый рак.		

При иммуногистохимическом исследовании экспрессия Cyclin D1 выявлялась в ядрах опухолевых клеток люминального HER2-негативного рака молочной железы и характеризовалась различной степенью выраженности в зависимости от гистологического варианта опухоли. В инвазивной карциноме молочной железы неспецифического типа отмечалась выраженная ядерная гиперэкспрессия Cyclin D1 (рисунок 13), тогда как в инвазивной дольковой карциноме экспрессия Cyclin D1 часто носила диффузный характер умеренной интенсивности (рисунок 14).

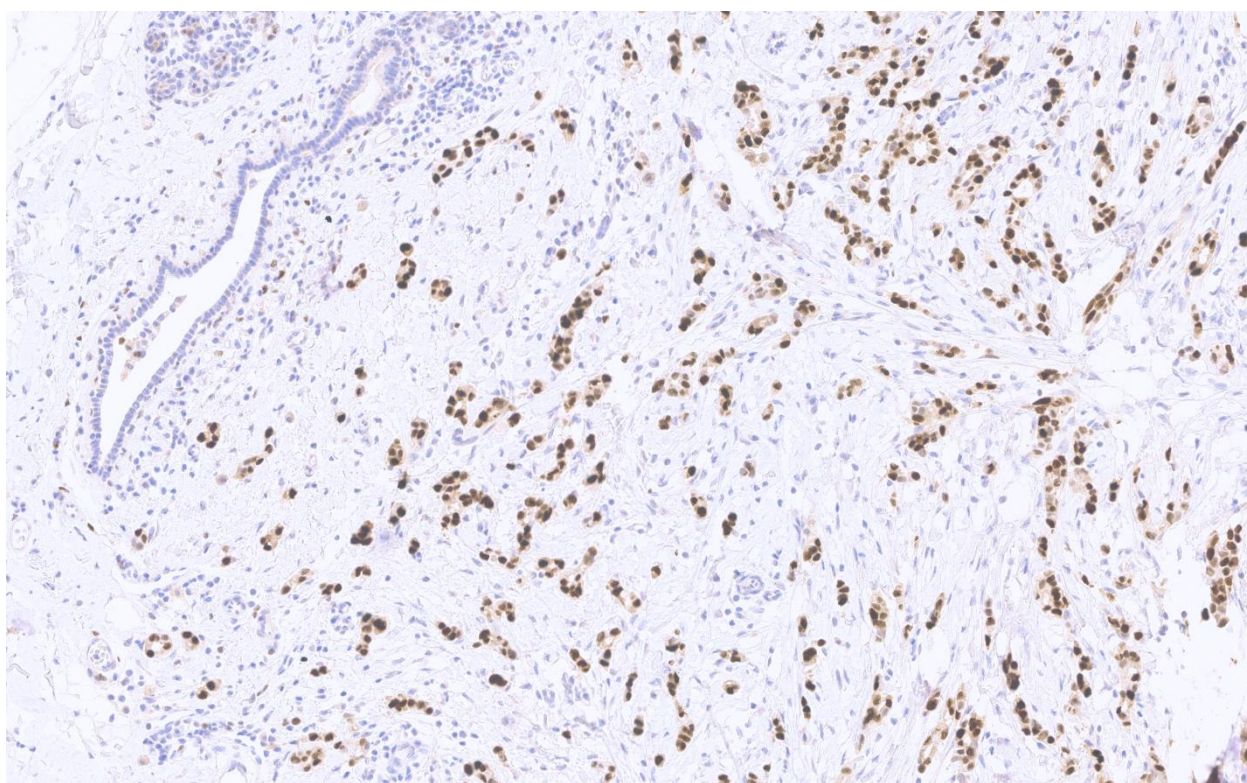


Рисунок 13 – Иммуногистохимическая экспрессия Cyclin D1 в ткани инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа.

Выраженная ядерная гиперэкспрессия Cyclin D1 в опухолевых клетках. Отсутствие ядерного окрашивания в нормальном эпителии протока (левая часть снимка сверху). Увеличение $\times 100$

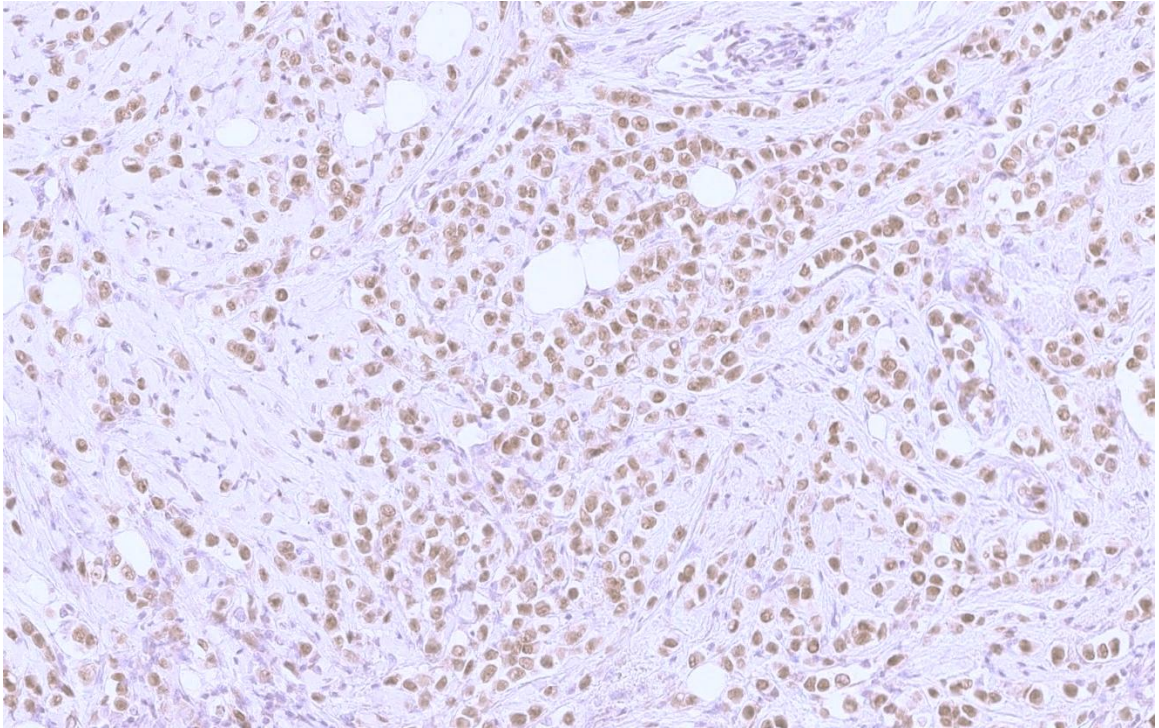


Рисунок 14 – Иммуногистохимическая экспрессия Cyclin D1 в ткани инвазивной дольковой карциномы молочной железы. Диффузная ядерная экспрессия Cyclin D1 умеренной интенсивности в опухолевых клетках.

Увеличение $\times 200$

Оценка гиперэкспрессии Cyclin D1 в зависимости от гистологического подтипа опухоли (таблица 11) также не выявила достоверных различий между группами ($\chi^2 = 2,37$; $p = 0,12$), что свидетельствует об отсутствии специфической ассоциации пролиферативной активности с гистологическим вариантом люминального рака молочной железы.

Таблица 11 – Распределение пациенток с люминальным раком молочной железы в зависимости от гиперэкспрессии Cyclin D1 и гистологического подтипа опухоли

Гиперэкспрессия Cyclin D1	Гистологический подтип опухоли абс. (%)	
	ИКНТ n = 72	ИДР n = 8
Нет гиперэкспрессии	47 (65 %)	3 (38 %)

Гиперэкспрессия Cyclin D1	Гистологический подтип опухоли абс. (%)	
	ИКНТ n = 72	ИДР n = 8
Есть гиперэкспрессия	25 (35 %)	5 (62 %)
	$\chi^2 = 2,37; p = 0,12$	
Примечания:		
1 ИКНТ – инвазивная карцинома неспецифического типа;		
2 ИДР – инвазивный дольковый рак.		

Таким образом, проведенный анализ показал, что экспрессия молекулярных маркеров ROR1, BMI-1 и Cyclin D1, а также мутационный статус гена *PIK3CA* не демонстрируют статистически значимой связи с основными клинико-морфологическими характеристиками люминального HER2-негативного рака молочной железы, отражающими анатомическую распространенность и морфологическую структуру опухоли. В частности, изучаемые молекулярные параметры не были ассоциированы со стадией заболевания, статусом регионарных лимфатических узлов, степенью гистологической злокачественности и гистологическим подтипом опухоли.

В рамках настоящего исследования мутационный статус гена *PIK3CA* оценивался в бинарном формате (наличие или отсутствие мутации), при этом дополнительный анализ спектра выявленных мутационных вариантов показал преобладание типичных активирующих hotspot-мутаций, локализованных в экзонах 10 и 21. Полученные данные дополняют молекулярную характеристику исследуемой когорты и отражают особенности генетического профиля люминального рака молочной железы.

Отсутствие ассоциаций между экспрессией ROR1, BMI-1 и Cyclin D1, а также мутационным статусом *PIK3CA* и клинико-морфологическими параметрами опухоли свидетельствует о том, что данные молекулярные характеристики не являются отражением клинической распространенности опухолевого процесса на момент диагностики и не могут рассматриваться

как суррогатные показатели стадии или морфологической агрессивности новообразования.

Совокупность полученных результатов позволяет рассматривать экспрессию ROR1, BMI-1 и Cyclin D1, а также мутационный статус гена *PIK3CA* как характеристики, отражающие молекулярные и регуляторные особенности опухолевых клеток, не находящие прямого отражения в традиционных клинико-морфологических критериях. Это создает логическую и методологическую основу для последующего анализа их взаимосвязей между собой, а также для оценки их роли в формировании биологического фенотипа опухоли и клинических исходов заболевания, что будет рассмотрено в следующих разделах работы.

3.3 Экспрессия ROR1, BMI-1, Cyclin D1 и мутационный статус гена *PIK3CA* в зависимости от молекулярного подтипа люминального HER2-негативного рака молочной железы (люминальный А и люминальный В)

На следующем этапе исследования была проведена оценка взаимосвязи экспрессии молекулярных маркеров ROR1, BMI-1, Cyclin D1, а также мутационного статуса гена *PIK3CA* с молекулярным подтипом опухоли у пациенток с люминальным HER2-негативным раком молочной железы. Анализ выполняли с учетом деления опухолей на люминальный А и люминальный В HER2-негативный подтипы, которое отражает биологическую гетерогенность гормонозависимого рака молочной железы и имеет принципиальное значение для прогноза и выбора терапии.

Наиболее выраженные различия между молекулярными подтипами были выявлены при анализе экспрессии ROR1. В группе пациенток с люминальным В HER2-негативным подтипом опухоли гиперэкспрессия ROR1 выявлялась во всех случаях, тогда как при люминальном А подтипе данный маркер экспрессировался значительно реже. Выявленные различия

носили выраженный статистически значимый характер, что указывает на тесную связь экспрессии ROR1 с более агрессивным люминальным В подтипом (таблица 12).

Таблица 12 – Распределение больных люминальным раком молочной железы в зависимости экспрессии ROR1и молекулярного подтипа опухоли

Экспрессия ROR1	Молекулярный подтип опухоли абс. (%)	
	Люминальный А n= 66	Люминальный В Her2- n = 14
Нет экспрессии	34 (52 %)	0 (0 %)
Есть экспрессия	32 (48 %)	14 (100 %)
	$\chi^2 = 12,54$; $p = 0,0004$	

Полученные данные позволяют рассматривать ROR1 как маркер, ассоциированный с биологическими особенностями люминального В HER2-негативного рака молочной железы, включая повышенную пролиферативную активность и потенциальную склонность к формированию эндокринорезистентного фенотипа.

Анализ экспрессии BMI-1 в зависимости от молекулярного подтипа показал тенденцию к более частой экспрессии данного маркера при люминальном В HER2-негативном раке молочной железы по сравнению с люминальным А подтипом. Несмотря на то, что в рамках однофакторного анализа выявленные различия не достигали строгого уровня статистической значимости, наблюдаемая направленность изменений указывает на потенциальную связь экспрессии BMI-1 с более агрессивным биологическим вариантом люминального рака молочной железы (таблица 13).

Таблица 13 – Распределение пациенток с люминальным раком молочной железы в зависимости от гиперэкспрессии BMI-1 и молекулярного подтипа опухоли

Экспрессия BMI-1	Молекулярный подтип опухоли абс. (%)	
	Люминальный А n = 66	Люминальный В Her2- n = 14
Нет	14 (21 %)	0 (0 %)
Есть	52 (79 %)	14 (100 %)
	$\chi^2 = 3,56; p = 0,057$	

Учитывая известную роль BMI-1 в поддержании стволовых свойств опухолевых клеток, регуляции хроматинового ремоделирования и устойчивости к терапии, полученные результаты представляют интерес в контексте формирования резистентности к гормонотерапии при люминальном В подтипе.

При анализе количественных уровней экспрессии молекулярных маркеров в зависимости от молекулярного подтипа опухоли выявлены статистически значимые различия между люминальным А и люминальным В HER2-негативным раком молочной железы.

Опухоли люминального В HER2-негативного подтипа характеризовались более высокими значениями экспрессии ROR1 по сравнению с люминальным А подтипом (рисунок 15А). Медиана экспрессии ROR1 составила 25,0 % (Q1-Q3: 16,25-38,25) в группе люминального В и 5,0 % (Q1-Q3: 0,0-12,0) в группе люминального А; различия были статистически значимыми (критерий Манна –Уитни, $U = 130,5; p < 0,0001$).

Аналогичная закономерность выявлена при анализе экспрессии BMI-1. В опухолях люминального В HER2-негативного подтипа медиана экспрессии BMI-1 составила 68,5 % (Q1-Q3: 26,25-89,5), тогда как в группе люминального А – 13,5% (Q1-Q3: 2,0-20,75) (рисунок 15В). Различия между подтипами также носили статистически значимый характер ($U = 140,0; p < 0,0001$).

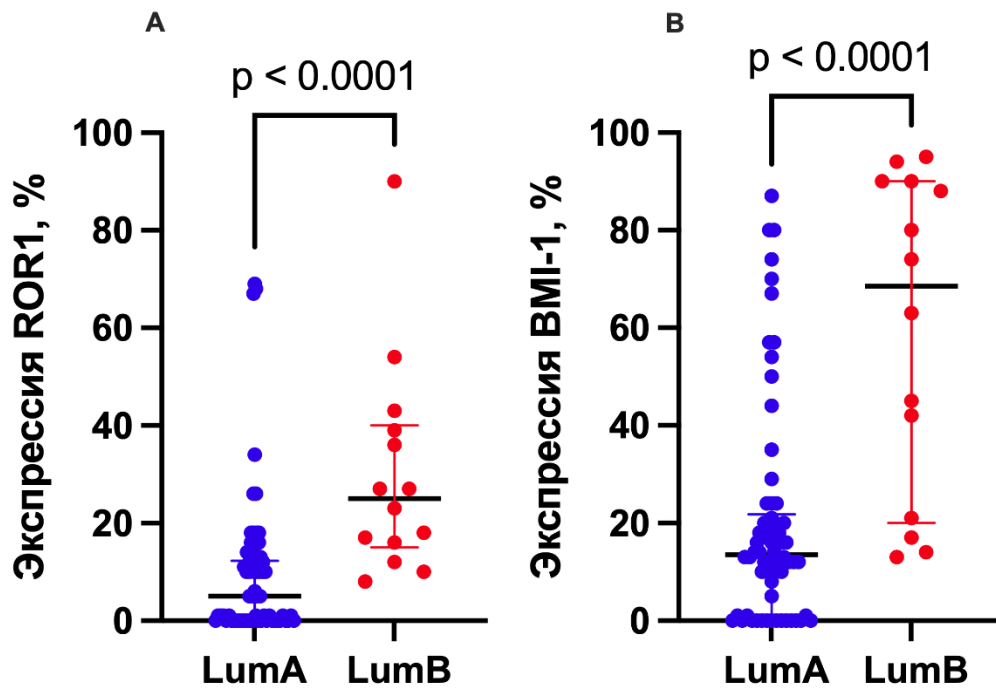


Рисунок 15 – Распределение экспрессии ROR1 (A) и BMI-1 (B) в опухолях люминального А и люминального В HER2-негативного подтипов рака молочной железы. Каждая точка соответствует индивидуальному наблюдению; горизонтальные линии отражают медиану и межквартильный размах (Q1-Q3). Различия между группами оценивали с использованием критерия Манна–Уитни

Полученные данные свидетельствуют о более выраженной активации сигнальных и эпигенетических регуляторных механизмов, ассоциированных с экспрессией ROR1 и BMI-1, в опухолях люминального В HER2-негативного подтипа, что отражает их более агрессивный биологический фенотип по сравнению с люминальным А раком молочной железы.

При анализе экспрессии Cyclin D1 были выявлены статистически значимые различия между люминальным А и люминальным В HER2-негативным подтипами. Гиперэкспрессия Cyclin D1 значительно чаще выявлялась в опухолях люминального В подтипа (таблица 14), что согласуется с более высоким уровнем пролиферативной активности, характерным для данного варианта рака молочной железы.

Таблица 14 – Распределение пациенток с люминальным раком молочной железы в зависимости от гиперэкспрессии Cyclin D1 и молекулярного подтипа опухоли

Гиперэкспрессия Cyclin D1	Молекулярный подтип опухоли абс. (%)	
	Люминальный А n = 66	Люминальный В Her2- n = 14
Нет гиперэкспрессии	46 (70 %)	4 (29 %)
Есть гиперэкспрессия	20 (30 %)	10 (71 %)
	$\chi^2 = 8,33; p = 0,0038$	

Связь гиперэкспрессии Cyclin D1 с люминальным В подтипом подчеркивает роль нарушений регуляции клеточного цикла в формировании биологической агрессивности опухолей данной группы и подтверждает значимость данного маркера в контексте молекулярной стратификации люминального рака молочной железы.

Анализ мутационного статуса гена *PIK3CA* в зависимости от молекулярного подтипа не выявил статистически значимых различий между люминальным А и люминальным В HER2-негативными вариантами опухоли. Частота мутаций *PIK3CA* была сопоставимой в обеих группах (таблица 15), что указывает на отсутствие прямой связи данного генетического события с молекулярной стратификацией люминального рака молочной железы по критерию пролиферативной активности.

Таблица 15 – Распределение пациенток с люминальным раком молочной железы в зависимости от наличия мутации гена *PIK3CA* и молекулярного подтипа опухоли

Мутация гена <i>PIK3CA</i>	Молекулярный подтип опухоли абс. (%)	
	Люминальный А n = 66	Люминальный В Her2- n = 14
Нет мутации	49 (74 %)	7 (50 %)
Есть мутация	17 (26 %)	7 (50 %)
	$\chi^2 = 3,23; p = 0,07$	

В то же время полученные данные свидетельствуют о том, что биологическая значимость мутации гена *PIK3CA*, вероятно, реализуется не на уровне формирования молекулярного подтипа, а через взаимодействие с другими внутриклеточными сигнальными путями и регуляторами клеточного цикла, что будет рассмотрено в последующих разделах исследования.

Таким образом, проведенный анализ показал, что экспрессия ROR1 и Cyclin D1 тесно связана с люминальным В HER2-негативным молекулярным подтипом рака молочной железы, характеризующимся более высокой биологической агрессивностью и пролиферативной активностью. Экспрессия BMI-1 демонстрировала тенденцию к увеличению при люминальном В подтипе, тогда как мутационный статус гена *PIK3CA* не зависел от молекулярного подтипа опухоли.

Совокупность полученных данных подчеркивает, что молекулярная гетерогенность люминального рака молочной железы определяется не только классическими параметрами гормонального статуса и пролиферативной активности, но и особенностями экспрессии сигнальных и эпигенетических регуляторов, таких как ROR1, BMI-1 и Cyclin D1. Это обосновывает необходимость дальнейшего анализа их взаимосвязей между собой и с клиническими исходами заболевания, что будет рассмотрено в следующих разделах работы.

3.4 Ассоциации экспрессии ROR1, BMI-1, Cyclin D1 и мутационного статуса гена *PIK3CA* в опухолевой ткани при люминальном HER2-негативном раке молочной железы

На данном этапе исследования был выполнен анализ взаимосвязей между экспрессией молекулярных маркеров ROR1, BMI-1 и Cyclin D1, а также мутационным статусом гена *PIK3CA* с целью выявления кооперативных молекулярных механизмов, определяющих биологические особенности люминального рака молочной железы.

В первую очередь нами была проанализирована взаимосвязь экспрессии ROR1 и Cyclin D1. Как показано в таблице 16, в опухолях с наличием экспрессии ROR1 гиперэкспрессия Cyclin D1 выявлялась достоверно чаще по сравнению с ROR1-негативными опухолями ($\chi^2 = 13,1$; $p = 0,0003$). При этом доля случаев с гиперэкспрессией Cyclin D1 в группе ROR1-позитивных опухолей более чем в три раза превышала аналогичный показатель в группе без экспрессии ROR1, что указывает на тесную функциональную сопряженность данных маркеров.

Таблица 16 – Взаимосвязь экспрессии ROR1 и гиперэкспрессии Cyclin D1 при люминальном раке молочной железы

Гиперэкспрессия циклина D1	Экспрессия ROR1 абс. (%)	
	Нет n = 34	Есть n = 46
Нет гиперэкспрессии	29 (85 %)	21 (46 %)
Есть гиперэкспрессия	5 (15 %)	25 (54 %)
	$\chi^2 = 13,1$; $p = 0,0003$	

Для уточнения характера выявленной ассоциации был проведен анализ распределения экспрессии Cyclin D1 в зависимости от уровней экспрессии

ROR1. Согласно данным таблицы 17, по мере увеличения уровня экспрессии ROR1 наблюдалось достоверное возрастание доли опухолей с гиперэкспрессией Cyclin D1 ($\chi^2 = 17,7$; $p = 0,0001$).

Выявленная ассоциация между уровнями экспрессии ROR1 и гиперэкспрессией Cyclin D1 свидетельствует о возможной роли ROR1 в регуляции пролиферативной активности опухолевых клеток.

Таблица 17 – Распределение гиперэкспрессии Cyclin D1 в зависимости от уровня экспрессии ROR1 при люминальном раке молочной железы

Гиперэкспрессия Cyclin D1	Уровни экспрессии ROR1 абс. (%)		
	До 25 % n = 68	25-50 % n = 8	Более 50 % n = 4
Нет гиперэкспрессии	49 (72 %)	1 (13 %)	0 (0 %)
Есть гиперэкспрессия	19 (28 %)	7 (87 %)	4 (100 %)
	$\chi^2 = 17,85$; $p = 0,0001$		

Полученные данные позволяют предположить, что активация ROR1 может быть вовлечена в стимуляцию пролиферативных процессов в опухолевых клетках, опосредованных, по крайней мере, частично, через усиление экспрессии Cyclin D1 – ключевого регулятора перехода клеточного цикла из фазы G1 в S.

Анализ проведенной нами взаимосвязи экспрессии ROR1 и BMI-1 также выявил статистически значимую ассоциацию. Позитивная экспрессия BMI-1 достоверно чаще выявлялась в опухолях с экспрессией ROR1 (таблица 18), что указывает на возможное сопряжение активации ROR1-сигнального пути с эпигенетическими механизмами регуляции опухолевого роста.

Таблица 18 – Взаимосвязь экспрессии ROR1 и экспрессии BMI-1 при люминальном раке молочной железы

Экспрессия BMI-1	Экспрессия ROR1 абс. (%)	
	Нет n = 34	Есть n = 46
Нет	10 (29 %)	4 (9 %)
Есть	24 (71 %)	42 (91 %)
	$\chi^2 = 5,81; p = 0,02$	

В то же время при анализе уровней экспрессии BMI-1 в зависимости от степени экспрессии ROR1 (таблица 19) статистически значимых различий выявлено не было ($\chi^2 = 2,0; p = 0,37$). Отсутствие зависимости позволяет предположить, что взаимодействие ROR1 и BMI-1 реализуется преимущественно на уровне наличия или отсутствия экспрессии BMI-1, без четкой градации ее интенсивности.

Таблица 19 – Распределение экспрессии BMI-1 в зависимости от уровня экспрессии ROR1 при люминальном раке молочной железы

Экспрессия BMI-1	Уровни экспрессии ROR1 абс. (%)		
	До 25 % n = 68	25-50 % n = 8	Более 50 % n = 4
Нет	13 (19 %)	0 (0 %)	1 (25 %)
Есть	55 (81 %)	8 (100 %)	3 (75 %)
	$\chi^2 = 1,98; p = 0,37$		

Учитывая роль BMI-1 как компонента комплекса Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1), участвующего в поддержании стволовых свойств опухолевых клеток, репрессии генов-супрессоров опухолевого роста и формировании лекарственной устойчивости, выявленная взаимосвязь между ROR1 и BMI-1 представляет собой важный биологический результат,

свидетельствующий о вовлечении ROR1-зависимых сигнальных каскадов в поддержание агрессивного опухолевого фенотипа.

Дополнительный анализ выявил статистически значимую ассоциацию между уровнями экспрессии BMI-1 и Cyclin D1. Гиперэкспрессия Cyclin D1 чаще регистрировалась в опухолях с повышенной экспрессией BMI-1 (таблица 20), что указывает на потенциальную координацию эпигенетических механизмов регуляции и контроля клеточного цикла.

Таблица 20 – Распределение пациенток с люминальным раком молочной железы в зависимости от гиперэкспрессии Cyclin D1 и уровней экспрессии BMI-1 в первичной опухоли

Гиперэкспрессия Cyclin D1	Уровни экспрессии BMI-1 абс. (%)		
	До 25 % n = 57	25-50 % n = 6	Более 50 % n = 17
Нет гиперэкспрессии	39 (68 %)	5 (83 %)	6 (35 %)
Есть гиперэкспрессия	18 (32 %)	1 (17 %)	11 (65 %)
	$\chi^2 = 7,33$; p = 0,02		

Данная взаимосвязь подтверждает концепцию о том, что BMI-1 может способствовать усилению пролиферативной активности опухолевых клеток не только за счет подавления дифференцировки и апоптоза, но и посредством опосредованного влияния на регуляторы клеточного цикла, включая Cyclin D1.

Особое внимание было уделено анализу взаимосвязи мутационного статуса гена *PIK3CA* с экспрессией Cyclin D1. Как показано в таблице 21, гиперэкспрессия Cyclin D1 достоверно чаще выявлялась в опухолях с наличием мутации *PIK3CA* по сравнению с опухолями с диким типом

данного гена ($\chi^2 = 9,14$; $p = 0,002$). Данный факт свидетельствует о функциональной связи между активацией PI3K/АКТ-сигнального пути и усилением пролиферативной активности опухолевых клеток, реализуемой, в том числе, через регуляцию экспрессии Cyclin D1.

Таблица 21 – Распределение пациенток с люминальным раком молочной железы в зависимости от мутационного статуса гена *PIK3CA* и гиперэкспрессии Cyclin D1

Мутация гена <i>PIK3CA</i>	Гиперэкспрессия Cyclin D1 в опухоли абс. (%)	
	Нет n = 50	Есть n = 30
Нет мутации	41 (82 %)	15 (50 %)
Есть мутация	9 (18 %)	15 (50 %)
	$\chi^2 = 9,14$; $p = 0,002$	

При анализе уровней экспрессии Cyclin D1 в зависимости от мутационного статуса гена *PIK3CA* выявлены статистически значимые различия между сравниваемыми группами. В опухолях с мутацией *PIK3CA* медиана экспрессии Cyclin D1 составила 27,5 % (Q1-Q3: 9,0-40,0), что было достоверно выше по сравнению с опухолями с диким типом гена, где данный показатель составил 13,0 % (Q1-Q3: 6,0-28,0) (рисунок 16). Различия носили статистически значимый характер (критерий Манна–Уитни, $U = 473,5$; $p = 0,0365$).

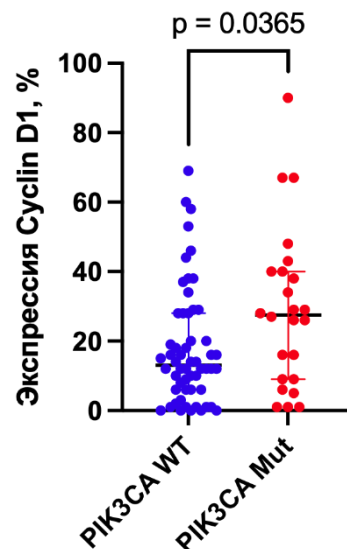


Рисунок 16 – Экспрессия Cyclin D1 в опухолях люминального HER2-негативного рака молочной железы в зависимости от мутационного статуса гена *PIK3CA* Примечание. *PIK3CA*WT – опухоли с диким типом гена *PIK3CA*; *PIK3CA*Mut – опухоли с наличием мутации гена *PIK3CA*

С учетом известной роли PI3K/АКТ-сигнального каскада в стимуляции клеточной пролиферации и выживании опухолевых клеток, выявленная ассоциация с Cyclin D1 подтверждает биологическую обоснованность данного взаимодействия и подчеркивает значение мутаций гена *PIK3CA* в формировании пролиферативного потенциала люминального рака молочной железы.

В целях уточнения характера выявленных взаимосвязей был дополнительно проведен анализ ассоциаций мутационного статуса гена *PIK3CA* с экспрессией ROR1 и BMI-1, включая бинарную оценку наличия экспрессии и анализ уровней экспрессии данных маркеров. В то же время прямой статистически значимой взаимосвязи между мутационным статусом гена *PIK3CA* и экспрессией ROR1 (таблицы 22-23) или BMI-1 выявлено не было (таблицы 24-25). Данный факт свидетельствует о том, что активация ROR1/BMI-1-ассоциированных механизмов и PI3K-зависимых сигнальных путей может происходить параллельно или на различных уровнях регуляции

опухолевой биологии, с последующей конвергенцией на уровне регуляции клеточного цикла и пролиферации.

Таблица 22 – Распределение пациенток с люминальным раком молочной железы в зависимости от мутационного статуса гена *PIK3CA* и экспрессии ROR1

Мутация гена <i>PIK3CA</i>	Экспрессия ROR1 абс. (%)	
	Нет n = 34	Есть n = 46
Нет мутации	25 (74 %)	31 (67 %)
Есть мутация	9 (26 %)	15 (33 %)
	$\chi^2 = 0,35; p = 0,55$	

При анализе количественных уровней экспрессии ROR1 в зависимости от мутационного статуса гена *PIK3CA* статистически значимых различий выявлено не было. Медиана экспрессии ROR1 составила 10,0 % (Q1-Q3: 0,0-16,0) в опухолях с диким типом гена *PIK3CA* и 10,0 % (Q1-Q3: 1,0-26,25) в опухолях с мутацией *PIK3CA* (критерий Манна–Уитни, $U = 609,0; p = 0,51$).

Таблица 23 – Распределение пациенток с люминальным раком молочной железы в зависимости от мутационного статуса гена *PIK3CA* и уровней экспрессии ROR

Мутация гена <i>PIK3CA</i>	Уровни экспрессии ROR1 абс. (%)		
	До 25 % n = 68	25-50 % n = 8	Более 50 % n = 4
Нет мутации	50 (74 %)	3 (38 %)	3 (75 %)
Есть мутация	18 (26 %)	5 (62 %)	1 (25 %)
	$\chi^2 = 4,47; p = 0,10$		

Таблица 24 – Распределение пациенток с люминальным раком молочной железы в зависимости от мутационного статуса гена *PIK3CA* и наличия экспрессии BMI-1

Мутация гена <i>PIK3CA</i>	Наличие экспрессии BMI-1 абс. (%)	
	Нет n = 14	Есть n = 66
Нет мутации	9 (64 %)	47 (71 %)
Есть мутация	5 (36 %)	19 (29 %)
	$\chi^2 = 0,26$; p = 0,60	

Таблица 25 – Распределение пациенток с люминальным раком молочной железы в зависимости от мутационного статуса гена *PIK3CA* и уровня экспрессии BMI-1

Мутация гена <i>PIK3CA</i>	Уровень экспрессии BMI-1 абс. (%)		
	До 25 % n = 57	25-50 % n = 6	Более 50 % n = 17
Нет мутации	41 (72 %)	6 (100 %)	9 (53 %)
Есть мутация	16 (28 %)	0 (0 %)	8 (47 %)
	$\chi^2 = 5,02$; p = 0,08		

Аналогично, при сравнении уровня экспрессии BMI-1 между группами с наличием и отсутствием мутации *PIK3CA* статистически значимых различий также не выявлено. Медиана экспрессии BMI-1 составила 16,0% (Q1-Q3: 9,5-30,5) при диком типе гена и 15,5 % (Q1-Q3: 10,75-65,75) при наличии мутации *PIK3CA* (U = 608,5; p = 0,51).

Таким образом, результаты настоящего раздела свидетельствуют о наличии сложной и многоуровневой сети взаимосвязей между экспрессией ROR1, BMI-1 и Cyclin D1, а также мутационным статусом гена *PIK3CA* при люминальном раке молочной железы. Полученные данные позволяют

предположить существование потенциальной функциональной оси ROR1 → BMI-1 → Cyclin D1, отражающей координацию сигнальных и эпигенетических механизмов, вовлеченных в регуляцию пролиферативной активности опухолевых клеток.

Наряду с этим выявленная независимая ассоциация мутационного статуса гена *PIK3CA* с гиперэкспрессией Cyclin D1 подтверждает участие PI3K/AKT-сигнального пути в контроле клеточного цикла и формировании пролиферативного фенотипа опухоли. Отсутствие прямых статистически значимых взаимосвязей между мутациями *PIK3CA* и экспрессией ROR1 и BMI-1 указывает на параллельную активацию данных молекулярных каскадов с возможной конвергенцией их эффектов на уровне регуляции клеточного цикла.

Выявленные взаимосвязи имеют принципиальное значение для понимания молекулярных механизмов биологической агрессивности люминального рака молочной железы и формируют теоретическую основу для последующего анализа прогностической значимости изучаемых маркеров, их связи с клиническими исходами заболевания и роли в развитии лекарственной резистентности, что будет подробно рассмотрено в следующих разделах настоящей работы.

3.5 Ассоциация клинико-морфологических и молекулярных характеристик опухоли с развитием отдаленного гематогенного метастазирования при люминальном раке молочной железы

На следующем этапе исследования была проведена оценка взаимосвязи клинико-морфологических и молекулярных параметров опухолевого процесса с развитием отдаленного гематогенного метастазирования, подтвержденного инструментальными методами диагностики в период динамического наблюдения.

В исследуемой когорте развитие гематогенных метастазов было зарегистрировано у 14 из 80 пациенток (17,5 %), тогда как у 66 пациенток (82,5 %) признаки отдаленного метастазирования в течение пятилетнего периода наблюдения отсутствовали.

Анализ традиционных клинико-морфологических параметров показал, что такие показатели, как клиническая стадия заболевания, размер первичной опухоли (Т-категория), статус регионарных лимфатических узлов (N-категория), а также гистологический подтип опухоли (инфильтрирующий протоковый и инфильтрирующий дольковый рак), не имели статистически значимой ассоциации с развитием гематогенного метастазирования ($p > 0,05$).

При анализе степени гистологической злокачественности была выявлена тенденция к более частому развитию метастазов у пациенток с опухолями более высокой степени злокачественности, однако с учетом малочисленного представительства опухолей G3 данный результат следует интерпретировать с осторожностью.

В отличие от большинства клинико-морфологических характеристик, молекулярный подтип опухоли продемонстрировал статистически значимую связь с развитием гематогенного метастазирования. В группе пациенток без признаков отдаленного метастазирования преобладал люминальный А подтип (89,4 %), тогда как в группе с зарегистрированным гематогенным метастазированием доля люминального В HER2-негативного варианта увеличивалась до 50,0 % ($p = 0,002$). Полученные данные подтверждают более агрессивный биологический потенциал люминального В HER2-негативного рака молочной железы и его склонность к развитию гематогенных метастазов даже при первично-операбельных стадиях заболевания, что наглядно отражено в распределении молекулярных подтипов опухоли в зависимости от наличия метастазирования (рисунок 17).

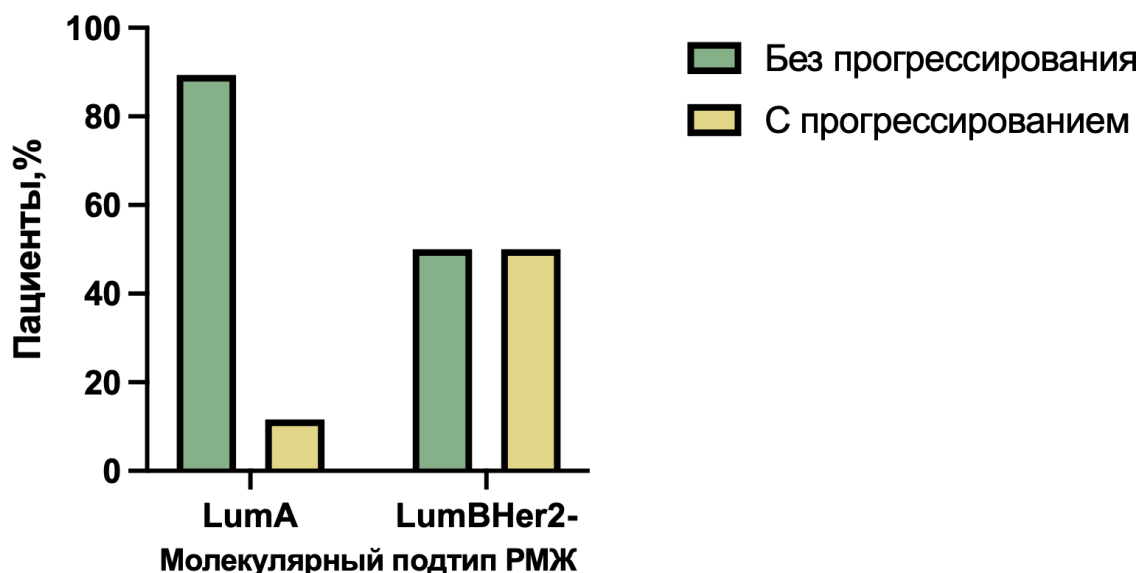


Рисунок 17 – Распределение молекулярных подтипов опухоли (люминальный А и люминальный В HER2-негативный) в зависимости от наличия прогрессирования заболевания

При анализе количественных уровней экспрессии молекулярных маркеров выявлены достоверные различия между пациентками с наличием и отсутствием прогрессирования заболевания (таблица 26).

Таблица 26 – Количественные уровни экспрессии молекулярных маркеров в зависимости от прогрессирования заболевания

Показатель	Без прогрессии (n = 66) Me (Q1–Q3)	Прогрессия (n = 14) Me (Q1–Q3)	U	p
ROR1, %	5,5 (0,0-13,75)	17,0 (10,25-27,0)	268,5	0,0122
BMI-1, %	13,5 (2,0-20,75)	72,0 (53,25-85,25)	133,5	<0,0001
Cyclin D1, %	15,5 (6,0-29,0)	17,5 (12,0-39,5)	394,0	0,392
Ki-67, %	14,0 (10,0-18,0)	19,0 (15,5-23,25)	242,5	0,005

Опухоли, ассоциированные с развитием отдаленного гематогенного метастазирования, характеризовались статистически значимо более высокими уровнями экспрессии ROR1 и BMI-1, а также повышенной пролиферативной активностью, отраженной увеличением индекса Ki-67. Наиболее выраженные различия были выявлены для маркера BMI-1, что указывает на его потенциальную роль в формировании агрессивного биологического фенотипа опухоли.

В то же время статистически значимых различий в уровнях экспрессии Cyclin D1 между группами с наличием и отсутствием метастазов выявлено не было ($p = 0,392$), что свидетельствует о более сложном, опосредованном характере его участия в механизмах опухолевой прогрессии.

Наглядное сравнение распределения уровней экспрессии BMI-1 и ROR1 в зависимости от наличия отдаленного гематогенного метастазирования представлено на рисунке 18, где отчетливо визуализируется смещение значений в сторону более высоких показателей у пациенток с зарегистрированными гематогенными метастазами.

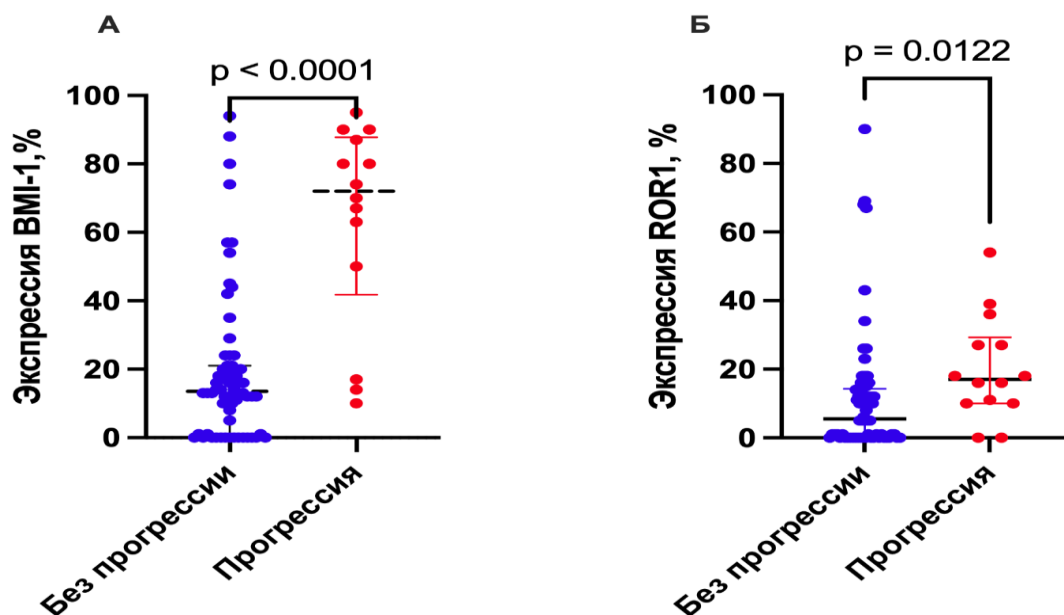


Рисунок 18 – Распределение уровней экспрессии молекулярных маркеров в первичной опухоли у пациенток с люминальным раком молочной железы в зависимости от наличия прогрессирования заболевания: А – BMI-1, Б – ROR1

Примечание - Точки соответствуют индивидуальным значениям экспрессии; горизонтальные линии отражают медиану, вертикальные – межквартильный размах (Q1-Q3). Статистическая значимость различий оценивалась с использованием U-критерия Манна–Уитни.

Анализ мутационного статуса гена *PIK3CA* не выявил статистически значимой ассоциации с развитием отдаленного гематогенного метастазирования ($p > 0,05$), что указывает на отсутствие прямой связи данного молекулярного события с риском развития отдаленных метастазов в исследуемой когорте. Вероятно, вклад сигнального пути PI3K/AKT в формирование агрессивного фенотипа реализуется опосредованно – через downstream-регуляторы клеточного цикла и пролиферации.

Таким образом, результаты настоящего раздела демонстрируют, что развитие отдаленного гематогенного метастазирования при люминальном раке молочной железы в большей степени определяется молекулярно-биологическими особенностями опухоли, нежели традиционными клинико-морфологическими характеристиками. К числу наиболее значимых факторов, ассоциированных с развитием отдаленных метастазов, относятся люминальный В HER2-негативный молекулярный подтип, а также повышенные уровни экспрессии ROR1 и BMI-1 и увеличение пролиферативной активности опухолевых клеток.

Выявленные закономерности подчеркивают потенциальную роль сигнально-эпигенетической оси ROR1–BMI-1 в формировании агрессивного биологического фенотипа люминального рака молочной железы и создают теоретическую основу для последующего анализа прогностической значимости данных маркеров и их вклада в развитие лекарственной резистентности.

3.6 Анализ показателей безметастатической выживаемости пациентов с люминальным HER2-негативным раком молочной железы с учетом молекулярных характеристик опухоли

В целях оценки прогностической значимости исследуемых молекулярных маркеров проведен анализ показателей выживаемости пациентов с люминальным HER2-негативным раком молочной железы. В анализ были включены данные об общей выживаемости и безметастатической выживаемости, а также информация о развитии прогрессирования заболевания в период наблюдения. В качестве потенциальных прогностических факторов рассматривались уровни экспрессии ROR1, BMI-1 и Cyclin D1, а также мутационный статус гена *PIK3CA*.

Для оценки выживаемости использовали метод Каплана–Мейера. Сравнение кривых выживаемости между группами проводили с применением лог-рангового критерия. В случаях анализа влияния мутационного статуса *PIK3CA* дополнительно использовали регрессионный анализ Кокса. Во всех анализах статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Анализ безметастатической выживаемости продемонстрировал статистически значимые различия между сравниваемыми группами пациентов (log-rank test, $p = 0,00083$). На кривых Каплана–Мейера отмечалась отчетливая дивергенция выживаемости, что указывает на выраженную гетерогенность клинического течения люминального HER2-негативного рака молочной железы в исследуемой когорте. Полученные данные подтверждают целесообразность поиска молекулярных факторов, ассоциированных с неблагоприятным прогнозом, и служат обоснованием для последующего стратификационного анализа (рисунок 19).

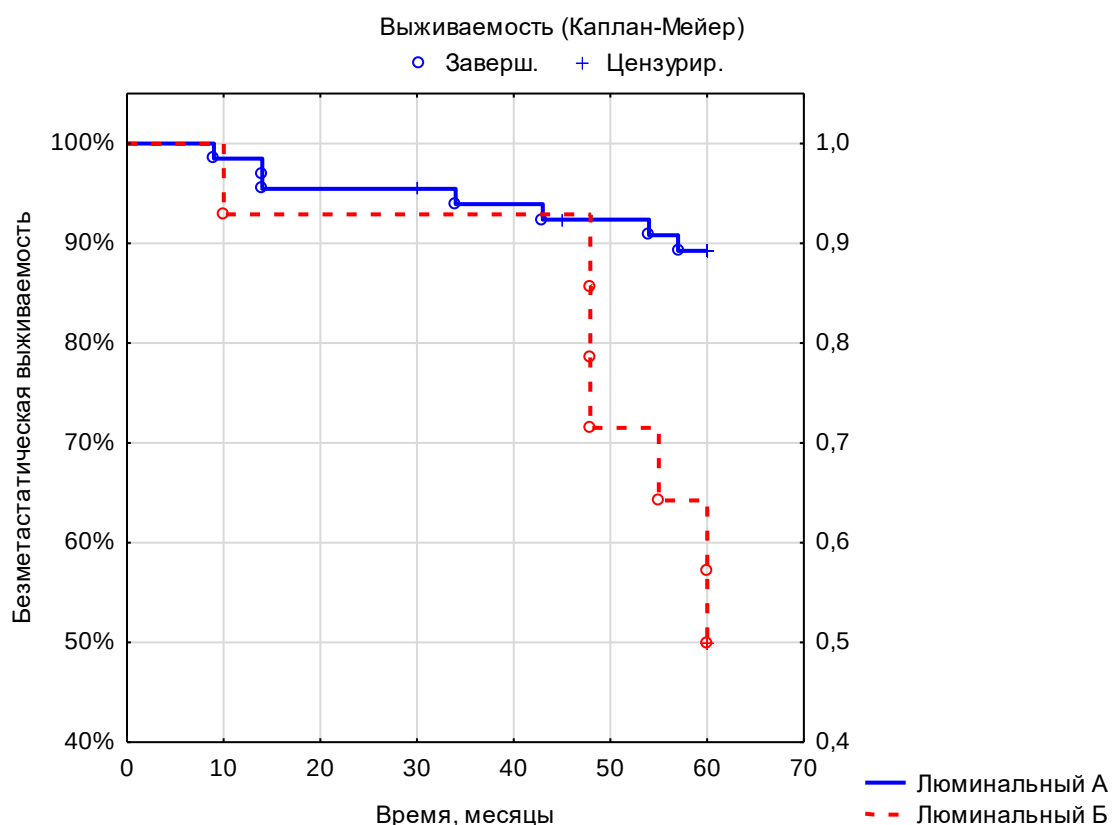


Рисунок 19 – Кривые Каплана–Мейера безметастатической выживаемости пациентов с люминальным HER2-негативным раком молочной железы

При анализе безметастатической выживаемости в зависимости от уровня экспрессии Cyclin D1 статистически значимых различий между сравниваемыми группами выявлено не было (log-rank test, $p = 0,653$). Кривые Каплана–Мейера имели сходный характер и не демонстрировали устойчивого расхождения на протяжении всего периода наблюдения. Таким образом, в рамках настоящего исследования экспрессия Cyclin D1 не показала самостоятельной прогностической значимости в отношении риска прогрессирования заболевания у пациентов с люминальным HER2-негативным раком молочной железы (рисунок 20).

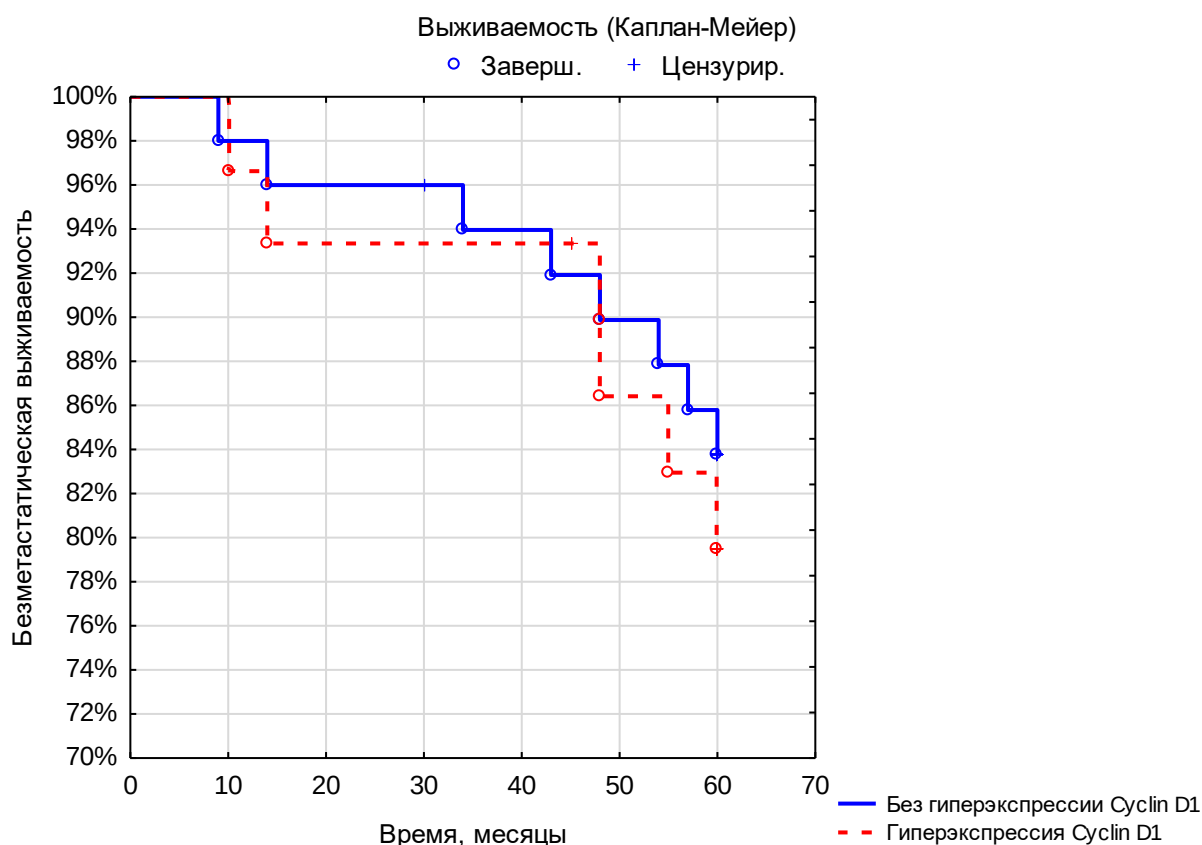


Рисунок 20 – Безметастатическая выживаемость пациентов с люминальным HER2-негативным раком молочной железы в зависимости от уровня экспрессии Cyclin D1

Стратификация пациентов по уровню экспрессии ROR1 выявила статистически значимые различия показателей выживаемости ($\chi^2 = 7,26$; $p = 0,026$). У пациентов с повышенной экспрессией ROR1 отмечалось более раннее развитие прогрессирования заболевания и менее благоприятное течение по сравнению с пациентами с низким уровнем экспрессии данного маркера. Кривые Каплана–Мейера характеризовались отчетливым расхождением, сохранявшимся на протяжении всего периода наблюдения, что указывает на потенциальную прогностическую значимость ROR1 в контексте люминального HER2-негативного рака молочной железы (рисунок 21).

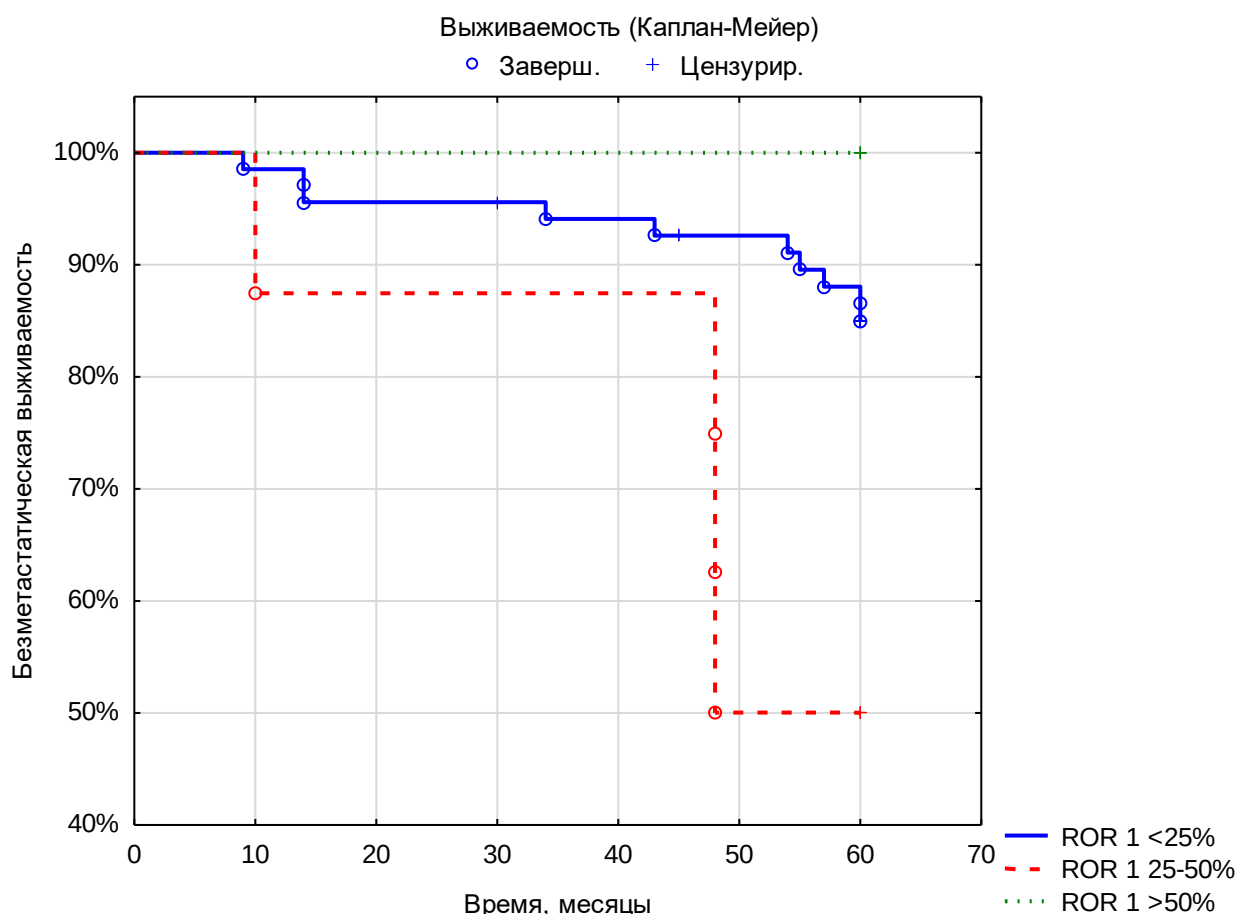


Рисунок 21 – Безметастатическая выживаемость пациентов с люминальным HER2-негативным раком молочной железы в зависимости от уровня экспрессии ROR1

Наиболее выраженные различия показателей выживаемости были выявлены при анализе экспрессии BMI-1. По данным лог-рангового критерия различия между группами носили высокодостоверный характер ($\chi^2 = 24,89$; $p < 0,0001$). Повышенный уровень экспрессии BMI-1 ассоциировался с существенным увеличением риска прогрессирования заболевания и более неблагоприятным клиническим течением. Кривые Каплана–Мейера демонстрировали раннее и устойчивое расхождение, что позволяет рассматривать BMI-1 как один из наиболее значимых молекулярных факторов, ассоциированных с прогнозом в исследуемой когорте пациентов (рисунок 22).

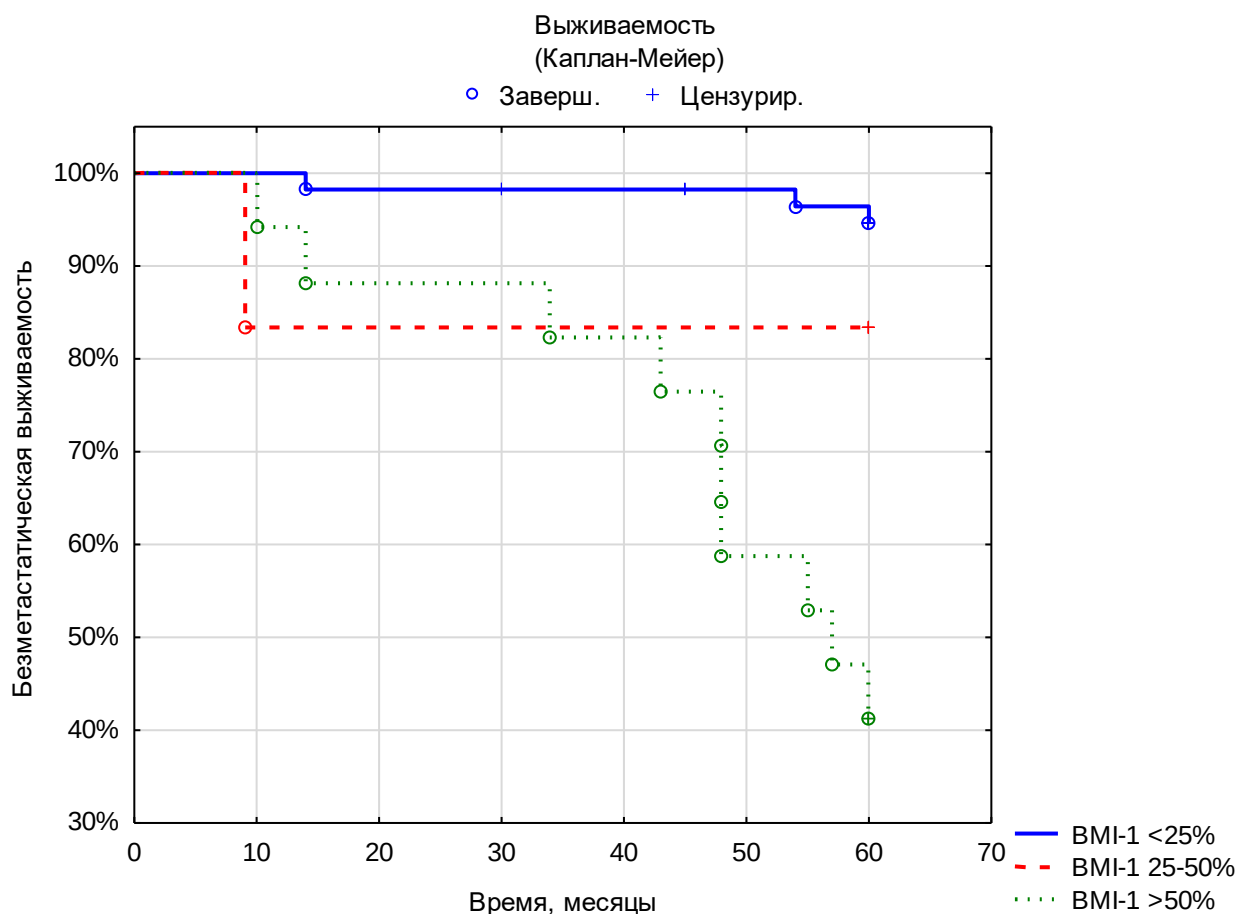


Рисунок 22 – Безметастатическая выживаемость пациентов с люминальным HER2-негативным раком молочной железы в зависимости от уровня экспрессии BMI-1

Анализ безметастатической выживаемости с учетом мутационного статуса гена *PIK3CA* выявил статистически значимую ассоциацию между наличием мутации и риском прогрессирования заболевания ($p = 0,036$ по данным регрессионного анализа Кокса). Пациенты с опухолями, несущими мутацию *PIK3CA*, характеризовались менее благоприятными показателями выживаемости по сравнению с пациентами с диким типом гена. Полученные данные свидетельствуют о вовлеченности PI3K/АКТ-сигнального пути в формирование неблагоприятного клинического течения люминального HER2-негативного рака молочной железы (рисунок 23).

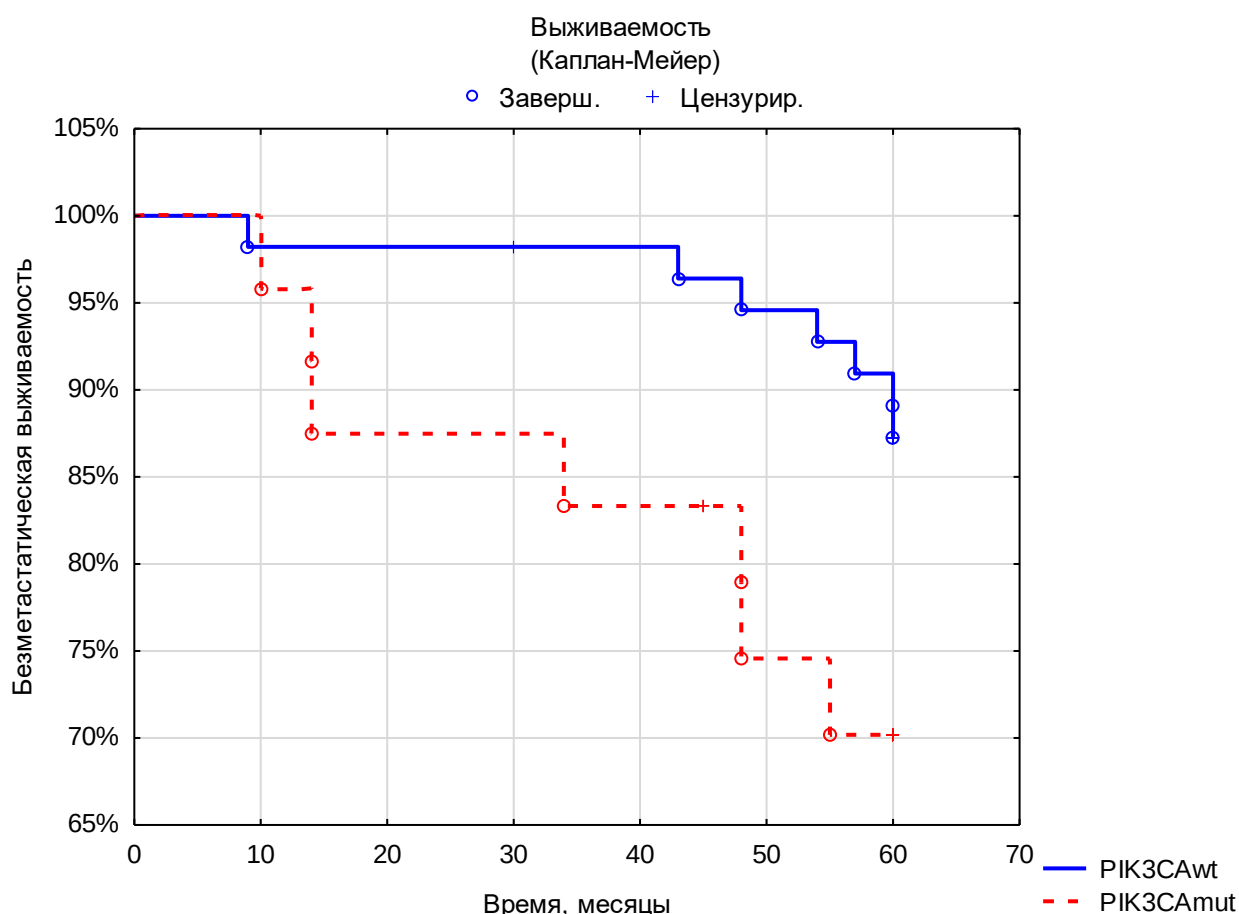


Рисунок 23 – Безметастатическая выживаемость пациентов с люминальным HER2-негативным раком молочной железы в зависимости от мутационного статуса гена *PIK3CA*. Анализ выполнен с использованием регрессионной модели Кокса ($p = 0,036$)

Примечание - *PIK3CAwt* – опухоли с диким типом гена *PIK3CA*; *PIK3CAmut* – опухоли с наличием мутации гена *PIK3C*.

Таким образом, анализ показателей выживаемости показал, что молекулярные характеристики опухоли играют существенную роль в формировании клинического течения люминального HER2-негативного рака молочной железы. В рамках настоящего исследования экспрессия Cyclin D1 не продемонстрировала прогностической значимости, тогда как повышенная экспрессия ROR1 и, особенно, BMI-1 была ассоциирована с повышенным риском прогрессирования заболевания. Кроме того, мутационный статус гена

PIK3CA также продемонстрировал связь с показателями безметастатической выживаемости.

Совокупность полученных результатов подчеркивает прогностический потенциал отдельных молекулярных маркеров и обосновывает целесообразность их дальнейшего изучения для стратификации пациентов и оптимизации тактики ведения люминального HER2-негативного рака молочной железы.

3.7 Прогнозирование вероятности развития отдаленных метастазов у пациенток с люминальным раком молочной железы

Проблема отдаленного метастазирования остается одной из ключевых в современной онкологии, поскольку именно развитие гематогенных метастазов в большинстве случаев определяет неблагоприятный прогноз и летальный исход заболевания. Несмотря на относительно более благоприятное клиническое течение люминального рака молочной железы по сравнению с другими молекулярными подтипами, данная группа опухолей характеризуется выраженной биологической гетерогенностью и сохраняет риск позднего прогрессирования даже при первично-операбельных стадиях заболевания и проведении стандартной адъювантной гормонотерапии. В связи с этим разработка прогностических моделей, позволяющих количественно оценивать индивидуальный риск развития отдаленных метастазов, является актуальной задачей клинической онкологии и патологической анатомии.

Существующие подходы к прогнозированию прогрессирования люминального рака молочной железы преимущественно основаны на клинико-морфологических характеристиках опухоли и молекулярном подтипе. Однако их прогностическая ценность остается ограниченной, что обусловлено сложной молекулярно-биологической организацией опухолевого процесса и значительной внутриподтипной гетерогенностью.

Это определяет необходимость разработки компактных и интерпретируемых моделей, основанных на интеграции клинических и молекулярных параметров, отражающих ключевые механизмы опухолевой прогрессии.

В рамках настоящего исследования с использованием метода бинарной логистической регрессии была предпринята попытка построения прогностической модели, направленной на оценку вероятности развития отдаленных метастазов у пациенток с люминальным раком молочной железы.

Одним из принципиальных этапов логистического регрессионного анализа является корректный отбор независимых переменных, определяющий устойчивость и прогностическую значимость модели. В связи с этим в работе был использован комбинированный поэтапный подход.

На первом этапе проводился однофакторный анализ, направленный на выявление ассоциаций отдельных клинико-морфологических и молекулярных параметров с развитием отдаленных метастазов. Для количественных переменных применялся непараметрический U-критерий Манна–Уитни, для категориальных – χ^2 -критерий Пирсона. В качестве потенциальных предикторов рассматривались молекулярный подтип опухоли (люминальный А и люминальный В HER2-негативный), уровни экспрессии BMI-1, ROR1, Cyclin D1, индекс пролиферативной активности Ki-67, а также мутационный статус гена *PIK3CA*.

По результатам однофакторного анализа статистически значимую ассоциацию с развитием отдаленных метастазов продемонстрировали молекулярный подтип опухоли и уровень экспрессии BMI-1 ($p < 0,05$). Экспрессия Cyclin D1 и мутационный статус гена *PIK3CA* статистически значимой связи с прогрессированием заболевания не показали и были исключены из дальнейшего анализа.

На втором этапе проводилась оценка взаимосвязей между потенциальными предикторами с целью исключения мультиколлинеарности. С учетом ограниченного числа событий прогрессирования и с целью

минимизации риска переобучения была сформирована компактная модель с минимальным числом клинически и биологически обоснованных предикторов.

В логистическую регрессионную модель были включены следующие независимые предикторы: уровень экспрессии BMI-1 (количественный показатель, %) и молекулярный подтип опухоли (люминальный А / люминальный В HER2-негативный).

В результате бинарного логистического регрессионного анализа была получена статистически значимая прогностическая модель, позволяющая оценивать вероятность развития отдаленных метастазов у пациенток с люминальным раком молочной железы.

Расчет вероятности гематогенного метастазирования выполнялся по следующей формуле:

$$P = \frac{1}{1 + e^{-z}}$$

$$z = -3,5796 + 0,0475 \times X_1 + 0,7005 \times X_2,$$

Где P – вероятность развития отдаленных метастазов;

X_1 – процент экспрессии BMI-1 в опухоли (%);

X_2 – Молекулярный подтип РМЖ, 1 – для люминального В HER2-негативного подтипа и 0 – для люминального А подтипа.

Анализ отношения шансов показал, что увеличение уровня экспрессии BMI-1 на 1 % ассоциировано с достоверным возрастанием риска развития отдаленных метастазов (AOR = 1,05; 95 % ДИ 1,02-1,08; $p < 0,001$). Для молекулярного подтипа люминальный В HER2-негативный по сравнению с люминальным А отмечалась тенденция к увеличению риска прогрессирования (AOR = 2,02), однако данный фактор не достиг уровня статистической значимости в многофакторной модели (95 % ДИ 0,37-10,90; $p = 0,416$).

Результаты однофакторного и многофакторного логистического регрессионного анализа представлены в таблице 27.

Таблица 27 – Результаты однофакторного и многофакторного логистического регрессионного анализа факторов риска развития отдаленных метастазов у пациенток с люминальным раком молочной железы

Предиктор	COR	95 % ДИ	p	AOR	95 % ДИ	p
BMI-1, % (на увеличение на 1%)	1,07	1,03-1,11	<0,001*	1,05	1,02-1,08	<0,001*
Люминальный B HER2– vs люминальный A	3,85	1,12-13,3	0,032*	2,02	0,37-10,90	0,416
Примечания: 1 COR – отношение шансов, полученное при однофакторном логистическом регрессионном анализе; 2 AOR – отношение шансов, полученное при многофакторном логистическом регрессионном анализе; 3 95 % ДИ – 95 % доверительный интервал; 4 *– статистически значимые различия при $p < 0,05$.						

Для наглядной оценки вклада независимых предикторов в риск развития отдаленных метастазов был построен forest plot, отражающий значения отношения шансов и соответствующие 95 % доверительные интервалы по данным многофакторного логистического регрессионного анализа (рисунок 24).

Forest plot продемонстрировал, что уровень экспрессии BMI-1 является устойчивым независимым количественным предиктором развития отдаленных метастазов. Для молекулярного подтипа люминальный B HER2-негативный характерен широкий доверительный интервал, что, вероятно, связано с ограниченным числом наблюдений и событий прогрессирования в исследуемой выборке.

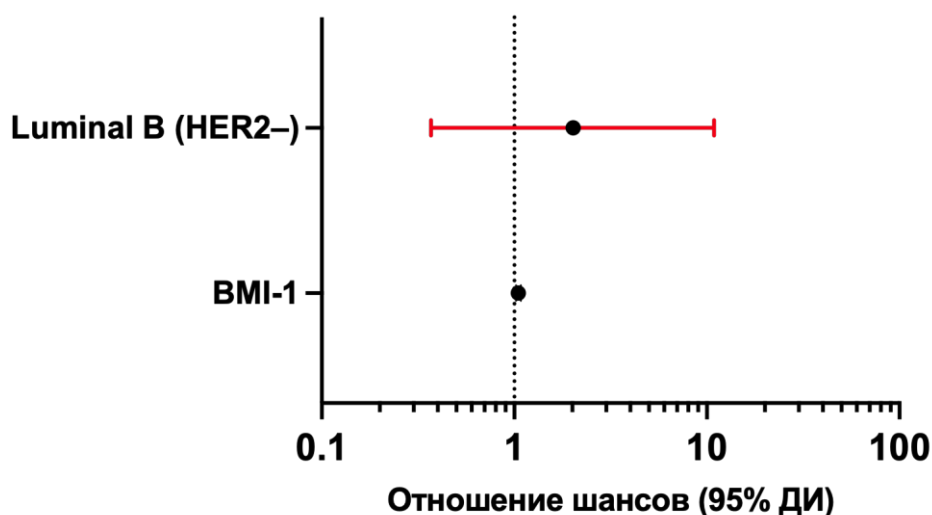


Рисунок 24 – Оценка отношения шансов (OR) с 95 % доверительным интервалом для независимых предикторов развития отдаленных метастазов у пациенток с люминальным раком молочной железы по данным многофакторного логистического регрессионного анализа

Полученная регрессионная модель оказалась статистически значимой ($p < 0,0001$). Оценка отношения шансов показала, что увеличение уровня экспрессии BMI-1 ассоциировано с достоверным возрастанием риска развития отдаленных метастазов, тогда как принадлежность опухоли к люминальному В HER2-негативному подтипу ассоциировалась с тенденцией к увеличению риска, однако не достигала статистической значимости в многофакторной модели.

Для оценки дискриминирующей способности, разработанной логистической регрессионной модели, был проведен ROC-анализ, основанный на индивидуальных значениях предсказанной вероятности развития гематогенных метастазов. Площадь под ROC-кривой составила $AUC = 0,869$ (рисунок 25), что свидетельствует о высокой способности модели различать пациенток с высоким и низким риском прогрессирования. 95 % доверительный интервал AUC составил 0,752-0,985, статистическая значимость модели подтверждена значением $p < 0,0001$.

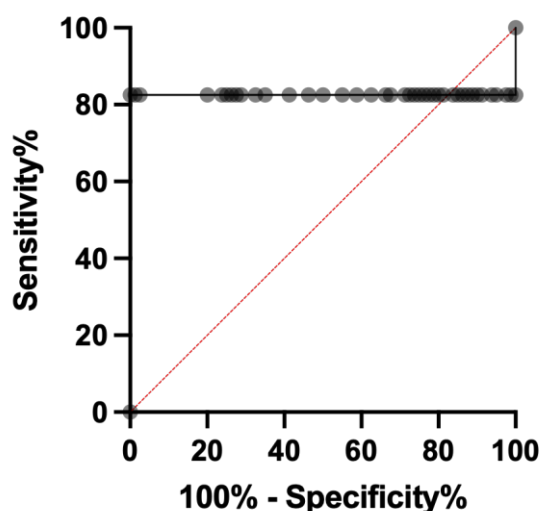


Рисунок 25 – ROC-кривая многофакторной логистической регрессионной модели прогнозирования гематогенного метастазирования

Оптимальное пороговое значение логистической функции, определенное с использованием индекса Юдена, составило $P = 0,112$. При данном cut-off чувствительность модели достигала 85,7 %, а специфичность – 81,8 %, что указывает на благоприятное соотношение диагностической чувствительности и специфичности.

В качестве иллюстрации практического применения разработанной логистической регрессионной модели и демонстрации возможностей индивидуального прогнозирования риска развития отдаленных метастазов у пациенток с люминальным раком молочной железы ниже приведены два клинических примера с различным характером течения заболевания. Представленные наблюдения отражают сопоставление рассчитанной по модели предсказанной вероятности прогрессирования с фактическими клиническими исходами в ходе динамического наблюдения.

Клинический пример 1

Пациентка, 52 года. Диагноз: инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа, G2. Молекулярный подтип опухоли – люминальный А. Клиническая стадия заболевания на момент первичного обращения –

pT2N0M0, стадия IIА. Уровень экспрессии ВМІ-1 в опухолевой ткани составил 8 %.

Пациентке было выполнено радикальное хирургическое лечение с последующим назначением адъювантной гормонотерапии ингибиторами ароматазы. Период динамического наблюдения составил 62 месяца. В течение всего периода наблюдения признаков локального рецидива и отдаленного метастазирования выявлено не было.

Расчет вероятности прогрессирования по разработанной логистической модели: $X_1 = 8$; $X_2 = 0$

$$z = -3,5796 + (0,0475 \times 8) + (0,7005 \times 0) = -3,1996$$

$$P = 1 / (1 + e^{(3,1996)}) = 0,039$$

Таким образом, предсказанная вероятность развития отдаленных метастазов составила около 3,9 %, что соответствует низкому риску прогрессирования и полностью согласуется с благоприятным клиническим течением заболевания.

Клинический пример 2

Пациентка, 47 лет. Диагноз: инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа, G2. Молекулярный подтип опухоли – люминальный В HER2-негативный. Клиническая стадия заболевания на момент первичного обращения – pT2N0M0, стадия IIА. Уровень экспрессии ВМІ-1 в опухолевой ткани составил 32 %. Пациентке выполнено хирургическое лечение с последующим назначением адъювантной гормонотерапии ингибиторами ароматазы. Адъювантная химиотерапия не проводилась.

Расчет вероятности прогрессирования по разработанной логистической модели: $X_1 = 32$; $X_2 = 1$

$$z = -3,5796 + (0,0475 \times 32) + (0,7005 \times 1) = -1,3591$$

$$P = 1 / (1 + e^{(1,3591)}) = 0,204.$$

Предсказанная вероятность развития отдаленных метастазов составила около 20,4 %, что превышает оптимальное пороговое значение модели ($P = 0,112$) и соответствует высокому риску прогрессирования. Период

наблюдения составил 28 месяцев. Через 22 месяца от начала гормонотерапии у пациентки были выявлены отдаленные метастазы в печени, подтвержденные данными компьютерной томографии (рисунок 26).

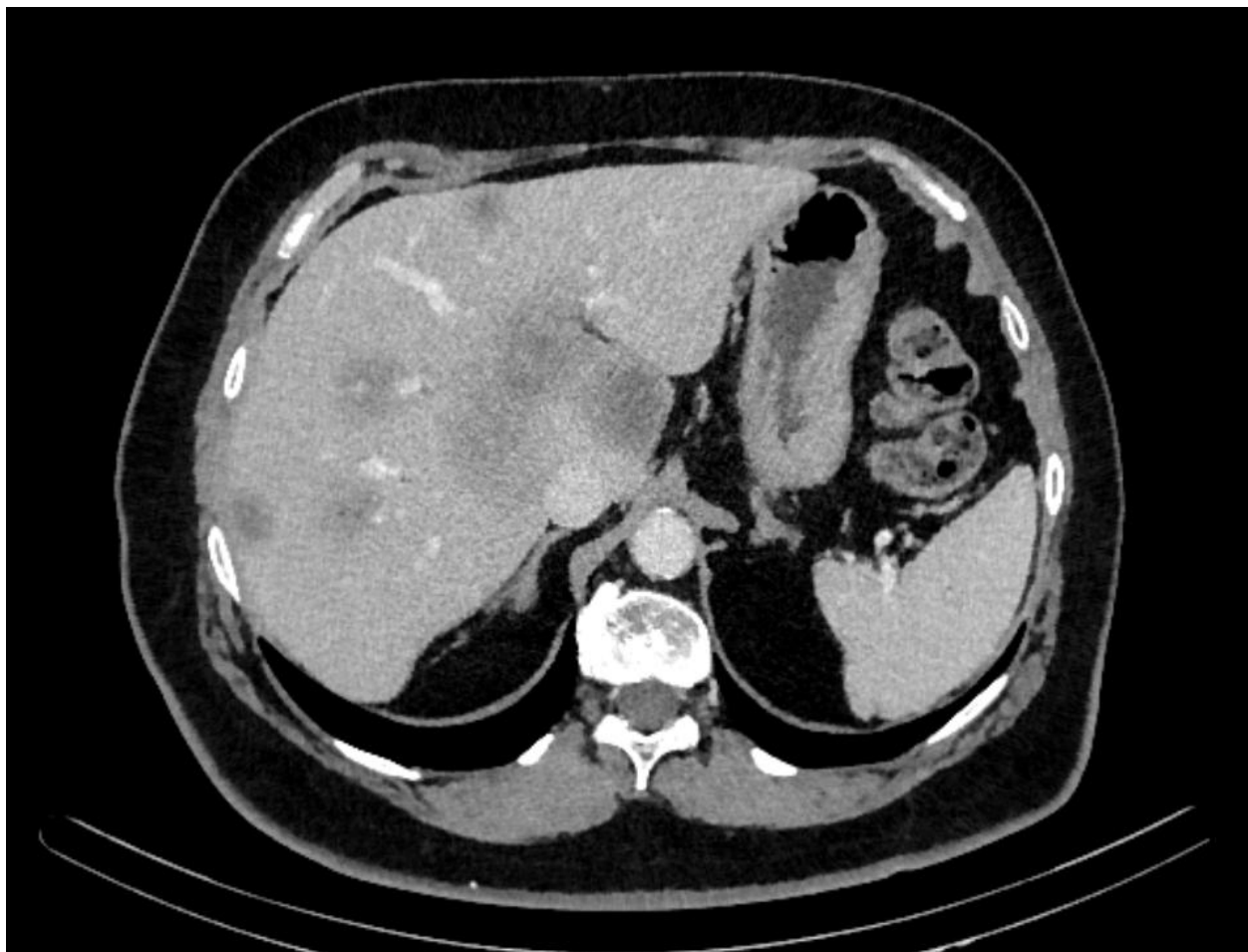


Рисунок 26 – Компьютерная томография органов брюшной полости

Печень с неоднородной структурой за счет множественного метастатического поражения обеих долей. В правой доле печени определяется крупный сливной метастатический очаг с вовлечением сегментов S8, S7, S4 и S5, размерами до $92 \times 72 \times 81$ мм, с признаками инвазии собирательных печеночных вен и нижней полой вены.

Таким образом, результаты логистического регрессионного анализа свидетельствуют о том, что риск развития отдаленных метастазов у пациенток с люминальным раком молочной железы в большей степени определяется молекулярно-биологическими характеристиками опухоли, чем

традиционными клинико-морфологическими параметрами. Наиболее значимым независимым предиктором прогрессирования оказался высокий уровень экспрессии BMI-1, тогда как принадлежность опухоли к люминальному В HER2-негативному подтипу ассоциировалась с тенденцией к увеличению риска.

Полученные данные подтверждают ключевую роль эпигенетических механизмов и регуляторов клеточного цикла в формировании агрессивного биологического фенотипа люминального рака молочной железы и создают теоретическую основу для дальнейшего анализа прогностической значимости оси ROR1–BMI-1, а также для разработки персонализированных стратегий стратификации риска и оптимизации адъювантной терапии.

ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ СОБСТВЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты нашего исследования наглядно демонстрируют выраженную молекулярно-биологическую гетерогенность гормон-рецептор-положительного HER2-негативного рака молочной железы, которая обуславливает различия в клиническом течении заболевания. В наблюдаемой когорте пациенток с люминальным HER2-негативным РМЖ в течение 5-летнего периода отдаленные метастатические прогрессирования развились у 17,5 % больных, несмотря на проведение стандартной адъювантной эндокринотерапии ингибиторами ароматазы. Данный показатель соответствует данным крупных клинических исследований, согласно которым около 15-20 % женщин с ранним HR+/HER2 – раком молочной железы переносят отдаленные рецидивы уже в первые годы после завершения эндокринной терапии [118].

Таким образом, даже относительно благоприятный люминальный подтип несет риск прогрессирования, подтверждая необходимость более тонкой стратификации риска помимо базовых клинико-морфологических критериев.

Интересно, что такие традиционные прогностические факторы, как размер опухоли, степень поражения лимфоузлов и стадия по TNM, в нашей однородной по подтипу группе не показали достоверной связи с развитием метастазов ($p > 0,05$). Это созвучно с литературными сведениями о том, что при гормон-чувствительном раке молочной железы начальные анатомические показатели не всегда отражают вероятность позднего прогрессирования. Известно, что даже у пациенток с опухолью T1N0 после 5 лет эндокринотерапии кумулятивный 20-летний риск отдаленного рецидива может достигать ~10 %, а при более неблагоприятных факторах (большой размер, положительные узлы, высокая степень злокачественности) – до 30-40 % [118].

В нашем исследовании отсутствие значимых различий по стадийным характеристикам между группами с прогрессированием и без него подчеркивает ограниченную прогностическую ценность одних лишь клинико-морфологических критериев при люминальном РМЖ. Данный вывод согласуется с позицией современных онкологов о необходимости поиска новых молекулярных маркеров, которые отражают биологические особенности опухоли и позволяют прогнозировать течение заболевания сверх стандартных факторов [25].

Люминальный А против люминального В: значение молекулярного подтипа. Одним из наиболее существенных результатов нашей работы стало подтверждение высокого прогностического значения молекулярной стратификации внутри люминального HER2-негативного подтипа. Мы показали, что неблагоприятное течение ассоциировано преимущественно с люминальным В вариантом опухоли: в группе пациенток с прогрессированием доля люминального В HER2-негативного рака достигала 50 %, тогда как без прогрессирования – лишь около 11 % ($p < 0,01$). Эти данные находятся в полном соответствии с современными литературными сведениями. Известно, что люминальный В подтип характеризуется более высокой пролиферативной активностью и худшим прогнозом по сравнению с люминальным А [85]. В данном крупном анализе, например, было показано, что у больных с люминальным В опухолями риск отдаленного метастазирования ~1,4 раза выше, чем при люминальном А (HR ~1,44; $p = 0,03$). Кроме того, длительная эндокринная терапия более эффективна для пациенток с люминальным А раком, тогда как для люминального В ее продление не дает существенного снижения частоты рецидивов [85].

Эти факты отражают наличие относительной эндокринорезистентности у биологически более агрессивного люминального В подтипа. Наши результаты подтвердили, что принадлежность опухоли к люминальному В HER2-негативному подтипу сама по себе связана с повышенным риском раннего прогрессирования заболевания. Такое наблюдение согласуется с

биологическими характеристиками люминального В рака – для него типичны более высокий индекс пролиферации (Ki-67), более частое отсутствие экспрессии рецепторов прогестерона, а также нередко более высокая степень злокачественности по сравнению с люминальным А. Все это обуславливает большую склонность люминального В к метастатическому распространению и снижает чувствительность к одной лишь гормонотерапии.

Полученные нами данные согласуются с этим: даже при сопоставимых исходных стадиях заболевания люминальный В подтип демонстрировал худшие отдаленные результаты лечения. Следовательно, молекулярная классификация на люминальный А и В отражает прямое клиническое значение для прогноза. В практическом плане это указывает на необходимость более интенсивного наблюдения и, возможно, дополнительных адъювантных воздействий (например, химиотерапии, целевой терапии) для больных с люминальным В РМЖ, несмотря на небольшие размеры опухоли или отсутствие поражения узлов.

Важнейшей проблемой современной клинической онкологии является феномен первичной и вторичной гормонорезистентности при HR+ раке молочной железы [28, 100, 147, 157]. Наше исследование подтверждает, что около одной шестой пациенток с люминальным РМЖ испытывают системный рецидив даже при проведении адъювантной эндокринотерапии. Возникновение метастазов свидетельствует о том, что у части опухолей изначально присутствуют или со временем развиваются механизмы, позволяющие обходить блокаду гормональных путей.

В наших наблюдениях традиционные иммуногистохимические маркеры (ER, PR, уровень Ki-67) и морфологические показатели не дали полного объяснения выявленной вариабельности исходов. Поэтому особый интерес представляет анализ экспрессии регуляторных белков и онкогенных мутаций, способных влиять на чувствительность клеток к эндокринной терапии.

Литературные данные указывают, что наиболее существенные механизмы эндокринной резистентности связаны с активацией обходных пролиферативно-сигнальных путей и поддержанием клонов опухолевых клеток с признаками стволовости [100, 115].

В этом контексте нами были изучены белки ROR1 и BMI-1 как потенциальные маркеры агрессивного, терапевтически устойчивого фенотипа опухоли, а также мутации гена *PIK3CA* как одного из частых драйверов сигнального пути PI3K/АКТ. Результаты нашего исследования показали, что повышенная экспрессия ROR1 и BMI-1, а также наличие мутации *PIK3CA*, ассоциируются с неблагоприятным течением заболевания. Обсудим каждую из этих молекулярных характеристик с позиций современной онкобиологии.

ROR1 как маркер агрессивного фенотипа и прогрессирования. Мы впервые охарактеризовали экспрессию рецептора ROR1 при люминальном HER2-негативном РМЖ в клиническом материале и выяснили ее связь с особенностями течения болезни. Полученные данные однозначно свидетельствуют о неблагоприятной роли ROR1 в прогрессии опухоли. Во-первых, экспрессия ROR1 оказалась существенно чаще выявлена при более агрессивном молекулярном подтипе – люминальном В. В нашей выборке все опухоли люминального В подтипа экспрессировали ROR1, тогда как при люминальном А экспрессия отмечалась менее чем в половине случаев (48 %, $p < 0,001$). Этот факт согласуется с представлением, что ROR1 ассоциирован с высокопролиферативным и менее дифференцированным состоянием клеток, характерным для люминального В рака. Во-вторых, уровень экспрессии ROR1 коррелировал с риском метастатического прогрессирования: у пациенток, у которых развились отдаленные метастазы, медиана экспрессии ROR1 в опухоли была ~17 %, тогда как при благоприятном течении – лишь ~5 % ($p = 0,012$). Более того, повышенная экспрессия ROR1 статистически значимо ассоциировалась с сокращением безметастатической выживаемости: по нашим данным, пациенты с ROR1-

позитивными опухолями прогрессировали раньше и чаще, чем пациенты с низкой экспрессией этого маркера ($\log\text{-rank } p = 0,026$). Эти результаты согласуются с опубликованными наблюдениями: в исследовании Cui B (2014) было показано, что высокие уровни ROR1 в опухолях груди ассоциируются с «подписью» эпителио-мезенхимального перехода (EMT) и более высокой частотой метастазов и рецидивов по сравнению с ROR1-негативными опухолями [38].

Таким образом, наши данные подтверждают, что ROR1 является молекулярным маркером агрессивного биологического поведения опухоли. С биологической точки зрения, ROR1 представляет собой онкофетальный рецептор тирозинкиназного типа, который обычно экспрессируется в эмбриональных тканях и практически отсутствует в нормальных дифференцированных тканях человека после рождения. Его повторная активация в раковых клетках связана с запуском нетипичных сигнальных каскадов выживания и миграции. В частности, показано, что ROR1 способен связываться с лигандами Wnt5a, активируя не Canonical Wnt-пути, а также усиливать сигнализацию через PI3K/AKT и другие пролонгирующие выживание механизмы [16]. Экспериментальное подавление экспрессии ROR1 в клеточных линиях агрессивного РМЖ приводило к снижению способности к миграции и инвазии, восстановлению эпителиального фенотипа и уменьшению метастазирования *in vivo* [38].

Более того, ROR1, как показали исследования, может способствовать сохранению популяции стволовых опухолевых клеток, которые устойчивы к химио- и гормонотерапии [75, 145]. Эти данные позволяют объяснить, почему в нашем исследовании экспрессия ROR1 была тесно связана именно с теми опухолями, которые впоследствии продемонстрировали гормонорезистентное прогрессирование. Вероятно, ROR1-экспрессирующие клетки обладают повышенной способностью к выживанию при эндокринной блокаде, отчасти за счет активации альтернативных путей роста (PI3K/AKT, MAPK и др.) и поддержания EMT/стволового фенотипа.

Примечательно также, что экспрессия ROR1 в нашей выборке сопряжена с другими нарушениями, характерными для агрессивного течения. В частности, нами выявлена достоверная связь между экспрессией ROR1 и гиперэкспрессией Cyclin D1: в ROR1-позитивных опухолях циклин D1 гиперэкспрессировался в три раза чаще, чем в ROR1-негативных (54 % vs 15 %, $p < 0,001$). Это указывает на то, что ROR1-зависимые сигнальные пути могут приводить к усилению драйверов клеточного цикла и пролиферации, таких как циклин D1. Помимо этого, отмечена тенденция к более частой ко-экспрессии ROR1 и BMI-1 (см. ниже), что может отражать участие ROR1 в формировании субпопуляции опухолевых клеток с признаками стволовости. Все вышеперечисленные факты позволяют концептуально представить ROR1 как ключевой элемент сигнальной сети, который при активации запускает каскады, усиливающие выживаемость, безграничную пролиферацию и инвазивность клеток, тем самым способствуя развитию метастатического процесса и устойчивости к терапии. С практической точки зрения, ROR1 интересен и как потенциальная терапевтическая мишень. Уже ведутся попытки его фармакологической блокады: разработаны моноклональные антитела (например, цирмтузумаб), конъюгаты антител с токсинами и даже CAR-T-клетки против ROR1 [16, 183].

Доклинические испытания показали, что подавление ROR1 способно тормозить рост и метастазирование опухолей молочной железы [38]. В будущем у пациенток с ROR1-позитивным люминальным раком высок риск рецидива, поэтому добавление анти-ROR1 терапии к стандартной гормонотерапии могло бы стать одним из путей преодоления эндокринорезистентности. Конечно, данная концепция требует клинических исследований, однако наши результаты создают веские предпосылки для такой стратегии.

BMI-1: регулятор стволовых свойств и прогрессии опухоли. Другим ключевым молекулярным маркером, изученным в работе, является белок BMI-1. Это компонент Polycomb-репрессивного комплекса 1 (PRC1),

участвующий в эпигенетическом подавлении транскрипции ряда генов-супрессоров опухолей, включая регуляторы клеточного цикла и дифференцировки. BMI-1 играет важную роль в поддержании возобновляемости популяции стволовых и прогениторных клеток, а также в ингибировании апоптоза. В норме он необходим для самообновления стволовых клеток крови, нейронов и др., но в опухолях часто переэкспрессирован, что придает клеткам «стволовую» агрессивность. [17, 92].

Результаты нашего исследования свидетельствуют о значимости BMI-1 как фактора, ассоциированного с неблагоприятным прогнозом при люминальном РМЖ. Прежде всего, мы обнаружили, что гиперэкспрессия BMI-1 (определяемая как высокий процент позитивных опухолевых клеток) гораздо чаще встречается у пациенток люминального В подтипа по сравнению с люминальным А. В нашей серии 100 % опухолей люминального В имели повышенную экспрессию BMI-1, тогда как при люминальном А – около 79 % (различия на грани статистической значимости, $p \approx 0,057$). Кроме того, количественный уровень BMI-1 в клетках люминального В был значительно выше: медиана ~68,5 % против 13,5 % при люминальном А ($p < 0,0001$). Эти данные указывают на связь BMI-1 с более агрессивным биологическим профилем опухоли, что подтверждается и другими работами. Так, повышенная экспрессия BMI-1 ранее отмечалась при быстрорастущих, низкодифференцированных карциномах молочной железы и ассоциировалась с высокой митотической активностью и инвазией [90, 92]. Наши результаты согласуются с этим: люминальный В подтип, характеризующийся усиленной пролиферацией, имеет и существенно более высокий уровень BMI-1.

Важнейшим выводом настоящей работы стало обнаружение сильной прогностической значимости экспрессии BMI-1. Среди всех изученных молекулярных параметров именно BMI-1 продемонстрировал наибольшую ассоциацию с риском развития метастазов. В группе пациенток с прогрессированием медиана экспрессии BMI-1 составила 72 % клеток, тогда

как без прогрессирования – лишь 13,5 % ($p < 0,0001$). Различия были значимыми: практически каждая опухоль, давшая метастазы, имела выраженную экспрессию BMI-1. Соответственно, по данным анализа выживаемости, высокая экспрессия BMI-1 сопровождалась резким снижением безметастатической выживаемости ($\log\text{-rank } \chi^2 = 24,89$; $p < 0,0001$). Пациентки с BMI-1-позитивными опухолями прогрессировали значительно чаще и быстрее, кривые безметастатической выживаемости расходились очень рано после начала наблюдения. Это позволяет рассматривать BMI-1 как один из наиболее сильных молекулярных прогностических факторов при люминальном HER2-негативном РМЖ в нашей когорте.

Наши данные поддерживаются результатами отдельных экспериментальных исследований. Показано, что сверхэкспрессия BMI1 способна придавать клеткам РМЖ устойчивость к гормональной терапии. В частности, Ojo et al. (2018) продемонстрировали, что повышенная экспрессия BMI1 в ER+-клетках (линия MCF7) делает их резистентными к тамоксифену, тогда как нокдаун гена BMI1 восстанавливает чувствительность. Более того, в тамоксифен-резистентных производных клетках исходно наблюдалось повышение уровня BMI1, и его подавление снижало лекарственную устойчивость. В опытах *in vivo* на модели ксенотрансплантатов опухолей MCF7 было показано: тамоксифен тормозил рост обычных опухолей, но ускорял рост тех, где искусственно сверхэкспрессировали BMI1 [115]. Эти результаты убедительно подтверждают, что BMI-1 прямо участвует в механизмах эндокринной резистентности. Вероятное объяснение заключается в том, что BMI-1, подавляя ряд генов-супрессоров (например, ингибиторы циклинов, проапоптотические факторы), позволяет части клеток пережить гормональную блокаду и продолжить цикл деления. Кроме того, BMI-1 поддерживает фенотип опухолевых стволовых клеток, которые характеризуются повышенной устойчивостью к любым видам терапии и

способностью к длительной репопуляции опухоли после первоначального регресса.

Таким образом, высокая экспрессия BMI-1 может означать, что в опухоли присутствует значительная субпопуляция таких «клеток-предшественников», что и приводит со временем к рецидиву заболевания.

В исследовании выявлена тесная положительная взаимосвязь между экспрессией BMI-1 и ROR1. Мы выявили, что опухоли, экспрессирующие ROR1, почти всегда имеют и высокую экспрессию BMI-1 (тенденция, $p = 0,06$), причем анализ количественных данных подтвердил сопряженность этих показателей. Этот факт позволяет выдвинуть гипотезу о существовании функциональной «оси» ROR1–BMI1. Можно предположить, что активация ROR1-сигналинга (например, через Wnt5a или подобные лиганды) приводит к эпигенетическим изменениям и перепрограммированию клеток, усилению экспрессии BMI-1. В результате клетки приобретают одновременно признаки EMT/инвазивности (за счет ROR1) и стволовости/терапевтической устойчивости (за счет BMI-1). Совокупно это ведет к формированию особо агрессивного клона, способного к метастазированию и переживанию эндокринотерапии. Такая модель согласуется с нашими клиническими наблюдениями: самыми неблагоприятными по исходу оказались опухоли, где одновременно присутствовали высокие уровни и ROR1, и BMI-1.

В литературе имеются косвенные подтверждения этой концепции. Отмечено, что BMI-1 может опосредованно усиливать пролиферацию путем взаимодействия с компонентами клеточного цикла: в экспериментах показано, что сверхэкспрессия BMI1 ведет к повышению уровней циклина D1 и активации CDK4/6 комплекса [150].

В нашем исследовании ROR1-позитивные опухоли отличались одновременно и более высокой экспрессией Cyclin D1, и повышенным BMI-1, то есть все три компонента (ROR1, BMI-1, циклин D1) были вовлечены. Это позволяет предположить существование единого онкогенного процесса, включающего активацию сигнальных каскадов (ROR1), эпигенетическую

перестройку и поддержание стволовости (BMI-1) и ускорение клеточного цикла (Cyclin D1).

С практических позиций, выявленная прогностическая значимость BMI-1 чрезвычайно важна. В многофакторном логистическом регрессионном анализе только уровень экспрессии BMI-1 остался независимым предиктором развития метастазов: при увеличении BMI-1 на каждые 1 % шансы прогрессирования возрастали на ~5 % (OR = 1,05; $p < 0,001$). Ни молекулярный подтип, ни другие маркеры не имели сопоставимой значимости в итоговой модели. Это означает, что количественное определение BMI-1 в первичной опухоли может служить надежным критерием для оценки прогноза у пациенток люминальным РМЖ. Больные с опухолями, гиперэкспрессирующими BMI-1, относятся к группе высокого риска раннего метастатического прогрессирования, и им могли бы быть показаны более агрессивные схемы адъювантной терапии (например, добавление химиотерапии, продленная эндокринотерапия, включение таргетных агентов – ингибиторов CDK4/6, PI3K и т.д.). Кроме того, BMI-1 сам по себе рассматривается как потенциальная мишень терапии: ведутся поиски ингибиторов BMI-1, хотя пока они находятся на доклиническом этапе [4]. Перспективным направлением может стать комбинация анти-ROR1 и анти-BMI1 подходов с целью одновременного подавления сигнальных и эпигенетических механизмов резистентности. Таким образом, наши результаты по BMI-1 имеют как непосредственное прогностическое, так и концептуальное значение, раскрывая новые стороны патогенеза прогрессирования люминального рака.

Гиперэкспрессия Cyclin D1 и дисрегуляция клеточного цикла. Циклин D1 (продукт гена *CCND1*) – давно известный фактор, участвующий в патогенезе гормонзависимого рака молочной железы. Он является ключевым регулятором прохождения клеткой точки рестрикции G1/S: образуя комплексы с киназами CDK4/6, циклин D1 фосфорилирует белок Rb и тем самым запускает транскрипцию генов, необходимых для синтеза ДНК [113].

Экспрессия циклина D1 тесно контролируется эстрогеновыми сигналами – рецептор эстрогена напрямую стимулирует транскрипцию *CCND1*. Соответственно, в большинстве ER-положительных опухолей молочной железы циклин D1 повышен; по данным литературы, иммуногистохимически он определяется примерно у 50-70 % таких случаев [5, 99].

В нашем исследовании гиперэкспрессию Cyclin D1 (наличие >25 % сильно окрашенных ядер) мы наблюдали у 30% опухолей люминального А подтипа и у 71 % опухолей люминального В. Таким образом, как и ожидалось, люминальный В подтип характеризуется значительно более частым повышением Cyclin D1 ($p = 0,0038$), что сочетается с его высокой пролиферативной активностью. Этот вывод соответствует установленным фактам: усиление экспрессии циклина D1 – одна из молекулярных черт, отличающих люминальный В от люминального А, наряду с Ki-67 и пониженной экспрессией PR. Известно также, что ген *CCND1* амплифицирован примерно в 15-20 % случаев ER+ рака, чаще встречаясь при опухолях с высокой степенью злокачественности [5]. В нашей работе специфический анализ амплификации не проводился, но обнаруженная гиперэкспрессия может отражать как транскрипционную активацию, так и геномные усиления *CCND1*.

Однако наиболее примечательным является то, что вопреки разнице между подтипами, сам по себе уровень экспрессии Cyclin D1 не показал связи с прогнозом. Мы не выявили статистически значимого различия ни в частоте прогрессирования, ни в показателях безрецидивной выживаемости между группами опухолей с низкой и высокой экспрессией циклина D1 (log-rank $p = 0,65$). В многофакторном анализе экспрессия Cyclin D1 также не внесла существенного вклада в модель прогнозирования метастазов (исключена из модели ввиду отсутствия значимого эффекта). Этот результат на первый взгляд противоречит интуиции, ведь циклин D1 – промотор пролиферации, а высокая пролиферация обычно связана с худшим прогнозом. Тем не менее, подобное отсутствие самостоятельной

прогностической роли Cyclin D1 подтверждается и литературными данными. Ряд исследований указывает, что избыточная экспрессия циклина D1 в ER-позитивных опухолях может иметь двойное значение. С одной стороны, она коррелирует с высокой скоростью деления и более высокой смертностью от рака Ahlin et al., 2017 показали 3-кратное повышение риска смерти у больных с высоким уровнем Cyclin D1 в ER+ опухолях [5]. С другой стороны, циклин D1 ассоциирован с присутствием функционального ER α (поскольку является его мишенью), а высокая экспрессия ER и PgR зачастую характеризует более дифференцированные, гормон-чувствительные опухоли, которые лучше отвечают на терапию. Действительно, в некоторых работах парадоксально отмечалась несколько лучшая общая выживаемость у пациенток с гиперэкспрессией Cyclin D1, получавших тамоксифен, по сравнению с негативными по Cyclin D1 опухолями [152]. Предполагается, что циклин D1 может играть роль предиктора ответа на эндокринотерапию: при его высоком уровне клетки больше зависят от оси CDK4/6 для роста, и потому особенно чувствительны к ингибированию эстрогенового сигнала либо к добавлению ингибиторов CDK4/6. В нашем исследовании все пациентки получали гормонотерапию, что могло нивелировать потенциальный отрицательный эффект гиперэкспрессии циклина D1 на прогноз. Даже в условиях эффективного подавления эстроген-зависимой пролиферации антиэстрогенной терапией, такие факторы, как повышенная экспрессия cyclin D1, продолжают оказывать стимулирующее влияние на рост опухоли. При этом антиэстрогенная терапия не устраняет опухоль полностью, а лишь создает селективное давление, в результате которого выживают клоны опухолевых клеток, использующие альтернативные механизмы роста и выживания, включая активацию сигнальных путей ROR1, поддержание стволовоподобных свойств через BMI-1 и PI3K-зависимые каскады.

Кроме того, важно отметить, что показатель Ki-67 оказался более точным маркером пролиферативного потенциала и прогноза, чем экспрессия циклина D1. В нашей когорте средний Ki-67 был значимо выше в опухолях,

давших метастазы (19 % vs 14 %, $p = 0,005$), и увеличение Ki-67 ассоциировалось с сокращением безметастатической выживаемости ($\chi^2 = 7,82$; $p = 0,005$). Таким образом, Ki-67, по сути, отразил суммарный эффект всех пролиферативных драйверов (включая Cyclin D1), тогда как изолированно по циклину D1 предсказать исход не удалось.

Похожее отмечено и в литературе: стандартной практикой прогнозирования для люминальных опухолей является учет индекса Ki-67, тогда как уровень циклина D1 рутинно не используется из-за противоречивости данных [35, 59]. Тем не менее, циклин D1 остается важным молекулярным звеном, участие которого в гормонорезистентности не до конца ясно. Показано, что сверхэкспрессия *CCND1* способна снижать эффект антиэстрогенов: в клетках с мутантной конститутивно активной формой циклина D1 (Cyclin D1b) наблюдается резистентность к тамоксифену [41, 67, 99]. Клинические данные разнятся, но можно предположить, что у небольшого поднабора больных с очень высокой экспрессией Cyclin D1 эндокринотерапия менее эффективна. В настоящее время в клинической практике проблему гиперактивации оси циклин D1-CDK4/6 решают с помощью таргетных ингибиторов CDK4/6 (пальбоциклиб, рибоциклиб и др.), которые в сочетании с гормонотерапией существенно улучшают результаты лечения метастатического HR+ РМЖ [3, 25, 111]. Наши данные косвенно подтверждают рациональность такого подхода для подтипов с высокой пролиферацией: хотя сам циклин D1 не был прогностически значим, люминальный В подтип с высоким Ki-67 (в котором и встречается чаще гиперэкспрессия Cyclin D1) имел хуже исходы и, вероятно, выиграл бы от усиления терапии (например, добавления ингибитора CDK4/6 в адъюванте).

Подводя итог по Cyclin D1: наше исследование показывает, что нарушение регуляции клеточного цикла через гиперэкспрессию данного циклина характерно для агрессивного люминального рака и связано с высокой пролиферацией опухоли. Однако само по себе это нарушение не является достаточным условием для метастатического прогрессирования –

необходимы сопутствующие изменения, такие как активация сигнальных путей (ROR1/PI3K) и отключение контрольных механизмов (через BMI-1 и др.). Поэтому циклин D1 можно рассматривать скорее как маркер интенсивности роста, который должен оцениваться в контексте других факторов. Его значимость ярко проявляется при совместной оценке с Ki-67: как показывают недавние работы, комбинация количественной оценки Ki-67 и Cyclin D1 дает более точный прогноз, чем любой из них по отдельности [67]. В будущем такая интегральная характеристика пролиферативного статуса может найти применение для уточнения прогноза у пациенток с люминальным РМЖ.

Мутации PIK3CA: влияние на сигнальные пути и выживаемость. Ген *PIK3CA*, кодирующий каталитическую субъединицу p110 α класса I PI3-киназы, является одним из самых часто мутированных генов при раке молочной железы. Частота его соматических мутаций особенно высока в люминальных подтипах – по различным данным, от 30 % до 45 % HR+/HER2– опухолей содержат мутацию *PIK3CA*. Наиболее распространены «горячие» мутации в экзонах 10 и 21 (E545K, H1047R и др.), приводящие к конститутивной активации PI3K/AKT/mTOR сигнального каскада. Активация этого пути стимулирует клеточную пролиферацию, подавляет апоптоз и может способствовать гормональной независимости клеток, поскольку ряд эффекторов PI3K взаимодействуют с рецепторными путями ER α .

В нашей работе мы провели анализ статуса *PIK3CA* и его значимости для клинических исходов. Полученные результаты несколько сложны для интерпретации,. С одной стороны, наличие мутации *PIK3CA* не коррелировало ни с одним из традиционных клинико-морфологических параметров и молекулярным подтипом опухоли. Частота мутаций *PIK3CA* оказалась сопоставимой в группах люминального А и люминального В ($\approx 26\%$ и 50% соответственно, $p = 0,07$). Также не было выявлено достоверных различий в доле мутаций между опухолями пациенток с

прогрессированием и без прогрессирования (хотя мутированный *PIK3CA* несколько чаще встречался при прогрессировании – 50 % vs 26 %, но $p > 0,05$).

Это согласуется с рядом публикаций, где показано, что мутации *PIK3CA* ассоциируются скорее с определенными молекулярными особенностями (например, с выраженной гормональной зависимостью, наличием PgR, низким Ki-67), но не обязательно с более высокой агрессивностью на момент диагностики [33].

Некоторые исследования указывали на парадоксально более благоприятное клиническое течение раннего рака молочной железы при наличии мутаций *PIK3CA*. В ряде мета-анализов и крупных когортных исследований было показано, что опухоли с мутантным *PIK3CA* характеризуются более длительной безметастатической выживаемостью по сравнению с опухолями дикого типа, особенно в контексте первично операбельного заболевания [78, 177]. Подобные наблюдения объясняются тем, что мутации *PIK3CA* значительно чаще выявляются в гормон-рецептор-положительных, преимущественно люминальных А опухолях, которые в целом обладают более низкой пролиферативной активностью и благоприятным биологическим поведением [94]. В связи с этим в неселективных когортах пациенток наличие мутаций *PIK3CA* может ассоциироваться с лучшим прогнозом, отражая не прямой протективный эффект мутации, а принадлежность опухоли к менее агрессивному молекулярному подтипу. Наши данные частично отражают это: *PIK3CA* действительно чаще был мутирован при фенотипе, характерном для люминального А подтипа (выраженная гормональная чувствительность, отсутствие очевидной корреляции с высокой пролиферацией или ROR1/BMI-1 статусом). С другой стороны, при более длительном наблюдении проявился отрицательный эффект *PIK3CA*-мутации на риск позднего прогрессирования. В анализе безметастатической выживаемости с учетом времени мы обнаружили, что наличие *PIK3CA*-мутации ассоциировано со статистически

значимым повышением вероятности рецидива ($p = 0,036$ в модели Кокса). Кривые безметастатической выживаемости разделялись: пациентки с мутантным *PIK3CA* прогрессировали чаще, чем носительницы дикого типа. Этот результат созвучен с клиническими данными, полученными в эру таргетной терапии. Так, в исследовании SOLAR-1 было показано, что у пациенток с метастатическим HR+/HER2– раком молочной железы наличие мутации *PIK3CA* ассоциируется с неблагоприятным прогнозом при стандартной эндокринной терапии без ингибирования PI3K-сигнального пути, тогда как добавление селективного ингибитора PI3Kα (алпелисиба) приводит к значимому улучшению показателей выживаемости без прогрессирования [10].

Вероятно, *PIK3CA*-мутация сама по себе не ускоряет рост опухоли в ранние сроки (поэтому не влияет на исходы в первые 3-5 лет), однако способствует появлению клеточных клонов, обходящих эстрогеновую зависимость, что приводит к рецидивам на более поздних стадиях наблюдения.

Активация PI3K/AKT-сигналинга может индуцировать фосфорилирование и активацию ключевых регуляторов клеточного цикла (например, cyclin D1 / CDK4/6), обеспечивая пролиферацию независимо от ERα-опосредованной трансдукции сигнала. Параллельно PI3K/AKT способствует понижению экспрессии ERα и смещению баланса в сторону ростовых путей (growth factor-driven signalling), что приводит к снижению чувствительности опухолевых клеток к эндокринной терапии (ингибиторам ароматазы, тамоксифену) через механизмы кросс-толка между путями [168].

Наши результаты указывают, что значение *PIK3CA*-мутации для прогноза носит сложный, контекст-зависимый характер. Если оценивать традиционные параметры или краткосрочный прогноз, *PIK3CA* не выглядит грозным фактором (он не ассоциируется с высокой степенью злокачественности, напротив, часто встречается при сильной ER/PgR-экспрессии). Однако при долгосрочном наблюдении мутированный *PIK3CA*

проявляет свою биологическую значимость через развитие эндокринной резистентности и метастазов. Весьма показательно, что в разработанной нами модели прогноза (логистическая регрессия) *PIK3CA* не вошел в финальную модель наряду с *ВМІ-1*, но при добавлении его как ковариаты в регрессионный анализ выживаемости он внес вклад. Практическим следствием этих данных может служить то, что пациентки с мутацией *PIK3CA* могут нуждаться в более интенсивной или продленной эндокринотерапии, а возможно – в раннем подключении таргетных препаратов. В настоящее время уже одобрена терапия ингибитором *PI3K-α* алпелисибом в сочетании с гормонотерапией у больных метастатическим РМЖ с мутацией *PIK3CA*. В адьювантном режиме такие исследования пока продолжаются. Наши данные предполагают, что данная мутация могла бы быть учтена при стратификации риска: ее присутствие сигнализирует о латентной опасности позднего рецидива, даже если поначалу опухоль хорошо ответила на лечение.

Обращает на себя внимание, что мутация *PIK3CA* у нас не продемонстрировала связи с люминальным В подтипом (где преобладали *ROR1* и высокий *Ki-67*). Это согласуется с тем, что активация *PI3K* пути – механизм эндокринной резистентности, характерный и для части люминальных А опухолей. Иначе говоря, даже опухоль фенотипически люминальная А (с низким *Ki-67*) но с мутантным *PIK3CA* может дать метастазы спустя несколько лет гормонотерапии. Такие случаи тяжело предсказать по одним только иммуногистохимическим маркерам, поэтому включение *PIK3CA*-статуса в панель прогностических показателей выглядит оправданным. Конечно, необходимы дальнейшие исследования на большем материале, чтобы точнее количественно оценить влияние конкретных мутаций *PIK3CA* на выживаемость. Тем не менее, уже сейчас наши результаты вписываются в общую картину: молекулярные нарушения сигнальных путей (*PI3K/AKT*) вносят свой вклад в формирование агрессивного фенотипа люминального рака наряду с нарушениями

экспрессии регуляторных белков (ROR1, BMI-1, циклины). Комплексная оценка всех этих факторов способна значительно улучшить прогнозирование.

Взаимосвязь молекулярных нарушений и концептуальная модель прогрессии. Проанализировав по отдельности ключевые молекулярные показатели (ROR1, BMI-1, Cyclin D1, PIK3CA), важно обсудить их совокупное значение и взаимодействие в контексте прогрессирования люминального РМЖ. Наше исследование предоставляет основания для концепции, согласно которой отдаленное метастатическое прогрессирование у гормон-положительного рака молочной железы обусловлено не случайным набором независимых факторов, а кооперативным действием связанных между собой молекулярных нарушений. Можно выделить два главных взаимодополняющих «маршрута», ведущих к развитию агрессивного фенотипа: (1) сигнально-пролиферативный путь, ассоциированный с ROR1, PI3K/AKT активацией и гиперэкспрессией циклинов, и (2) эпигенетический путь, связанный с BMI-1 и фенотипом опухолевых стволовых клеток.

В наших данных первым «маршрутом» характеризовались преимущественно люминальный В опухоли: для них типична гиперактивность пролиферативных стимулов (высокий Ki-67, частая гиперэкспрессия циклина D1) и нередко активация PI3K/AKT. Второй «маршрут» был представлен повышением BMI-1, что встречалось как при люминальном В, так и в отдельных люминальных А случаях, и указывало на присутствие устойчивого клеточного субклона. На пересечении этих маршрутов находился ROR1 – как показано, он одновременно ассоциирован и с повышенной пролиферацией (через косвенное усиление циклина D1), и с повышением стволовых свойств (через корреляцию с BMI-1 и индукцию EMT). Таким образом, ROR1 можно рассматривать как «инициатор» комплекса изменений, который запускает оба процесса: и активирует пути роста (в обход зависимости от гормонов), и способствует генетической

пластичности/устойчивости клеток. Добавление мутации *PIK3CA* усугубляет эту картину, дополняя ROR1-индуцированные сигналы конститутивной активностью внутриклеточного каскада, тем самым еще больше уменьшая зависимость опухоли от гормональной регуляции.

На основе этих наблюдений мы предлагаем следующую гипотетическую модель прогрессии люминального HER2-негативного рака молочной железы. В подгруппе опухолей, изначально относимых к люминальному В (ER+, HER2–, высокий Ki-67), уже на раннем этапе присутствуют нарушения, ускоряющие рост (например, сверхэкспрессия циклина D1) и признаки активации эмбриональных путей (экспрессия ROR1). Эти опухоли более склонны к метастазированию, что подтверждается нашим и чужими клиническими данными [85].

Стандартная эндокринотерапия замедляет их рост, но не устраняет популяцию клеток с альтернативными путями выживания (ROR1+, BMI-1+ клоны). В течение некоторого времени эти клетки, хотя и составляют меньшинство, способны пережить гормональную блокаду, используя, к примеру, ROR1→PI3K/AKT→Cyclin D1 сигналинг для продолжения цикла деления и BMI-1–опосредованную защиту от апоптоза. Постепенно (через 2-3 года) они дают начало рецидиву – клинически проявляющемуся метастазированию, часто уже нечувствительному к эндокринной терапии.

В подгруппе опухолей люминального А (ER+, HER2–, низкий Ki-67) начально пролиферация умеренно подавлена, и риск раннего рецидива невелик. Однако если в такой опухоли присутствует *PIK3CA*-мутация или возникает экспрессия ROR1/BMI-1 из-за внутриопухолевой эволюции, то со временем (5-10 лет) может появиться субклон, не зависящий от эстрогенового сигнала. Такие опухоли известны тем, что способны давать поздние метастазы спустя многие годы после лечения, причем часто метастазы уже гормонорезистентны. Наши данные о связи мутации *PIK3CA* с более низкой безметастатической выживаемостью и о ключевой роли BMI-1 в прогрессии подтверждают этот сценарий: даже «благополучные»

люминальные опухоли могут не быть излеченными полностью, если в них остается резервуар устойчивых клеток.

Таким образом, объединяя результаты, можно сказать, что прогрессирование люминального HER2-негативного РМЖ определяется молекулярными характеристиками опухоли в большей степени, чем классическими клиническими факторами. Нами показано, что присутствие люминального В подтипа, экспрессия ROR1 и высокий уровень BMI-1 – взаимосвязанные показатели, образующие своеобразный «портрет» опухоли высокого риска. Добавление к этому портрету признаков высокой пролиферации (Ki-67) и *PIK3CA*-мутации еще более утяжеляет прогноз. Данные факторы не существуют изолированно, а формируют единую сеть взаимодействующих изменений, ведущих к формированию эндокринорезистентного фенотипа опухоли. Условно ее можно назвать «ROR1–BMI1-позитивный люминальный рак», который характеризуется: агрессивным клиническим течением, устойчивостью к гормонотерапии, склонностью к ранним метастазам. Признание существования такого фенотипа имеет важное значение для онкопатологии и клиники, так как открывает возможности для его ранней идентификации и адресного лечения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного исследования и последующего обсуждения полученные результаты были сопоставлены с современными представлениями в онкологии, молекулярной биологии и патоморфологии рака молочной железы. Комплексный анализ клинико-морфологических и молекулярных характеристик люминального HER2-негативного рака молочной железы позволил сформулировать ряд концептуальных выводов, уточняющих механизмы опухолевой гетерогенности и прогрессирования заболевания.

Установлено, что молекулярный подтип оказывает существенное влияние на клиническое течение люминального HER2-негативного рака молочной железы. Люминальный В подтип характеризуется достоверно более высоким метастатическим потенциалом по сравнению с люминальным А даже при сходных исходных стадиях опухолевого процесса. Это подтверждает прогностическую значимость стратификации люминальных опухолей с учетом пролиферативной активности и указывает на ограниченность использования только клинико-морфологических критериев для оценки риска прогрессирования заболевания.

Показано, что экспрессия онкофетального рецептора ROR1 ассоциирована с формированием агрессивного фенотипа опухоли и признаками эндокринорезистентности. ROR1-положительные опухоли характеризуются повышенной пролиферативной активностью, наличием черт эпителиально-мезенхимального перехода и более высокой частотой развития отдаленных метастазов. Впервые на клиническом материале люминального HER2-негативного рака молочной железы продемонстрирована прогностическая значимость ROR1, высокая экспрессия которого связана с достоверным ухудшением безметастатической выживаемости пациенток.

Установлено, что повышение экспрессии BMI-1 является одним из ключевых молекулярных предикторов метастатического прогрессирования. Уровень BMI-1 в опухолевой ткани напрямую коррелирует с риском развития отдаленных метастазов и выступает независимым количественным фактором риска. Полученные данные согласуются с биологической ролью BMI-1 как регулятора стволовых свойств опухолевых клеток и их лекарственной устойчивости, что позволяет рассматривать данный маркер в качестве перспективного инструмента прогностической стратификации пациенток с люминальным раком молочной железы.

Показано, что гиперэкспрессия циклина D1 чаще выявляется в опухолях люминального В подтипа и отражает повышенную пролиферативную активность, однако сама по себе не определяет неблагоприятный прогноз. Прогностическое значение циклина D1 реализуется во взаимодействии с другими молекулярными и сигнальными факторами, включая Ki-67, ROR1 и BMI-1, что подчеркивает многофакторный характер формирования метастатического потенциала при раке молочной железы.

Выявлено, что мутации гена *PIK3CA* не оказывают существенного влияния на исходные клиничко-морфологические характеристики опухоли, однако ассоциированы с повышенным риском позднего рецидива заболевания. Вероятно, данный эффект реализуется через активацию PI3K/АКТ-сигнального каскада, обеспечивающего выживание опухолевых клеток в условиях подавления эстроген-рецепторного сигнального пути. Полученные результаты подтверждают целесообразность применения ингибиторов PI3K у пациенток с мутированным *PIK3CA* в рамках персонализированного терапевтического подхода.

Обобщая представленные данные, можно заключить, что прогрессирование люминального HER2-негативного рака молочной железы является следствием совокупности молекулярных нарушений, формирующих эндокринорезистентный опухолевый клон. Наиболее значимыми маркерами

данного клона являются высокая экспрессия ROR1 и BMI-1, определяющие агрессивное биологическое поведение опухоли при сохраненном люминальном иммунофенотипе.

Практическая значимость полученных результатов заключается в возможности разработки прогностических панелей, включающих оценку экспрессии ROR1, BMI-1, статуса *PIK3CA* наряду с Ki-67 и молекулярным субтипированием опухоли. В рамках настоящего исследования предпринята попытка интеграции подобных параметров: построенная прогностическая модель на основе экспрессии BMI-1 и молекулярного подтипа продемонстрировала высокий уровень дискриминации ($AUC = 0,87$), что подтверждает информативность молекулярных маркеров для оценки риска прогрессирования заболевания.

Перспективы дальнейших исследований по теме работы включают несколько направлений. Во-первых, представляется целесообразным расширение выборки и проведение проспективных исследований, направленных на независимую валидацию прогностической значимости ROR1 и BMI-1 при люминальном раке молочной железы. Особый интерес представляет изучение данных маркеров в контексте длительной (до 10 лет) эндокринотерапии с целью оценки возможности снижения риска позднего рецидива у пациенток группы высокого риска при продлении лечения.

Во-вторых, востребованы функциональные исследования на моделях *in vitro* и *in vivo*, направленные на расшифровку молекулярных механизмов взаимодействия ROR1 и BMI-1, включая участие ключевых сигнальных каскадов, регулирующих опухолевую прогрессию и клеточную устойчивость. В частности, представляет интерес установление того, приводит ли активация ROR1 к повышению экспрессии BMI-1 и через какие сигнальные посредники реализуется данный эффект. Перспективным также является изучение влияния подавления BMI-1 на чувствительность ROR1-позитивных опухолевых клеток к гормональной терапии.

В-третьих, обоснованным представляется проведение клинических исследований с применением таргетных препаратов, включая ингибиторы PI3K, CDK4/6 и препараты, направленные на ROR1, в когорте пациенток с опухолями, характеризующимися высокой экспрессией ROR1 и BMI-1, с целью оценки возможности улучшения показателей безметастатической выживаемости.

Наконец, с точки зрения фундаментальной онкологии представляет интерес дальнейшее изучение взаимосвязи исследованных молекулярных маркеров с иммунологическими характеристиками опухоли, включая особенности микроокружения и степень инфильтрации лимфоцитами [112]. Имеются данные о том, что высокая экспрессия BMI-1 может сопровождаться формированием иммуносупрессивного опухолевого микроокружения, что делает актуальным анализ влияния данных факторов на клиническое течение заболевания и потенциальный ответ на противоопухолевую терапию, включая современные иммуноонкологические подходы [174].

В целом выполненная работа расширяет существующие представления о биологических основах гетерогенности люминального HER2-негативного рака молочной железы и подчеркивает значение комплексной молекулярной оценки опухоли для прогнозирования клинического течения заболевания и выбора персонализированных терапевтических стратегий, направленных на предотвращение метастатического прогрессирования.

ВЫВОДЫ

1. В исследуемой когорте больных первично-операбельным люминальным HER2-негативным раком молочной железы I-II стадий, получавших адъювантную гормонотерапию ингибиторами ароматазы, развитие отдаленного гематогенного метастазирования не связано с клинической стадией заболевания ($p = 0,96$), статусом регионарных лимфатических узлов ($p > 0,05$) и гистологическим типом опухоли ($\chi^2 = 0,34$; $p = 0,56$).
2. Уровни экспрессии регуляторного белка ROR1 в первичной опухоли выше у пациенток с развитием отдаленного гематогенного метастазирования на фоне гормонотерапии ингибиторами ароматазы по сравнению с пациентками без признаков метастатического прогрессирования (Me 17,0% против 5,5 %; $U = 268,5$; $p = 0,0122$).
3. У пациенток с первично-операбельным люминальным HER2-негативным раком молочной железы I-II стадий, получавших адъювантную гормонотерапию ингибиторами ароматазы, развитие отдаленного гематогенного метастазирования сопровождается существенно более высокими уровнями экспрессии регуляторного белка BMI-1 в первичной опухоли по сравнению с пациентками без признаков метастатического прогрессирования (Me 72,0 % против 13,5 %; $U = 133,5$; $p < 0,0001$).
4. Совместная экспрессия ROR1 и BMI-1 чаще выявляется в опухолях с неблагоприятным клиническим течением; экспрессия BMI-1 чаще определяется в ROR1-позитивных опухолях по сравнению с ROR1-негативными ($\chi^2 = 5,81$; $p = 0,02$).
5. Повышенная экспрессия ROR1 и BMI-1 в опухолевой ткани ассоциирована с гиперэкспрессией Cyclin D1 (ROR1: $\chi^2 = 13,1$; $p = 0,0003$; BMI-1: $\chi^2 = 7,33$; $p = 0,02$), что указывает на связь экспрессии

данных регуляторных белков с нарушением регуляции клеточного цикла опухолевых клеток.

6. Повышенная экспрессия ROR1 и, в наибольшей степени, BMI-1 ассоциирована с ухудшением показателей безметастатической выживаемости у больных люминальным HER2-негативным раком молочной железы, получавших гормонотерапию ингибиторами ароматазы (ROR1: $\chi^2 = 7,26$; $p = 0,026$; BMI-1: $\chi^2 = 24,89$; $p < 0,0001$). Наличие мутации гена *PIK3CA* также ассоциировано с ухудшением безметастатической выживаемости ($p = 0,036$) и не связано с уровнями экспрессии ROR1 и BMI-1 ($p > 0,05$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При патоморфологическом исследовании операционного материала у пациенток с первично-операбельным люминальным HER2-негативным раком молочной железы I-II стадий, получающих адъювантную гормонотерапию ингибиторами ароматазы, рекомендуется включать в патоморфологическое заключение информацию об уровне экспрессии регуляторного белка BMI-1 (в процентах положительных опухолевых клеток), а также указывать молекулярный подтип опухоли (люминальный А или люминальный В HER2-негативный) для расчета индивидуального риска развития гематогенного метастазирования.
2. Расчет вероятности развития гематогенных метастазов у пациенток с люминальным раком молочной железы рекомендуется проводить по следующей формуле логистической регрессии:

$$P = \frac{1}{1 + e^{-z}}$$

$$z = -3,5796 + 0,0475 \times X_1 + 0,7005 \times X_2,$$

где:

- P – вероятность развития отдаленных метастазов;
- X_1 – уровень экспрессии BMI-1 в опухоли (%);
- X_2 – молекулярный подтип рака молочной железы (0 – люминальный А; 1 – люминальный В HER2-негативный).

Прогноз считается неблагоприятным при значении $P \geq 0,112$, что соответствует оптимальной пороговой точке (cut-off).

Пациентки с люминальным HER2-негативным раком молочной железы, у которых по результатам расчета по приведенной логистической модели определяется высокая вероятность развития гематогенных метастазов ($P \geq 0,112$), могут быть отнесены к группе повышенного риска неблагоприятного течения заболевания и требуют более тщательного

динамического наблюдения в процессе адъювантной гормонотерапии ингибиторами ароматазы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ИГХ – иммуногистохимическое исследование

ИДР – инвазивный дольковый рак

ИКНТ – инвазивная карцинома неспецифического типа

ЛУ – лимфатические узлы

РМЖ – рак молочной железы

ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

ABC ATP-binding cassette transporters – АТФ-связывающие кассетные транспортеры

AF activation function – функция активации транскрипции

AKT protein kinase B – протеинкиназа B

ALDH1 aldehyde dehydrogenase 1 – альдегиддегидрогеназа 1

AR androgen receptor – андрогеновый рецептор

AUC area under the curve – площадь под кривой

BMI-1 B-cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1 – эпигенетический регулятор BMI-1

BRCA1 breast cancer susceptibility gene 1 – ген предрасположенности к раку молочной железы 1

CDK cyclin-dependent kinase – циклин-зависимая киназа

EGFR epidermal growth factor receptor – рецептор эпидермального фактора роста

EMT epithelial–mesenchymal transition – эпителиально-мезенхимальный переход

ER estrogen receptor – рецептор эстрогена

ERE estrogen response element – эстроген-реагирующий элемент ДНК

ER α estrogen receptor alpha – рецептор эстрогена альфа

ER β estrogen receptor beta – рецептор эстрогена бета

ESR1 estrogen receptor 1 – ген рецептора эстрогена 1

FGFR fibroblast growth factor receptor – рецептор фактора роста фибробластов

FOXA1 forkhead box A1 – транскрипционный фактор FOXA1

GATA3 GATA binding protein 3 – транскрипционный фактор GATA3

HER2 human epidermal growth factor receptor 2 – рецептор эпидермального фактора роста человека 2-го типа

HDAC histone deacetylase – гистондеацетилаза

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

INK4 inhibitor of CDK4 – ингибитор циклин-зависимой киназы 4

Ki-67 Ki-67 antigen – маркер пролиферативной активности

LBD ligand-binding domain – лиганд-связывающий домен

MAPK mitogen-activated protein kinase – митоген-активируемая протеинкиназа

MFS metastasis-free survival – безметастатическая выживаемость

mTOR mammalian target of rapamycin – мишень рапамицина млекопитающих

NFAT nuclear factor of activated T-cells – ядерный фактор активированных Т-клеток

NCOA nuclear receptor coactivator – коактиватор ядерных рецепторов

NCOR nuclear receptor corepressor – корепрессор ядерных рецепторов

NTD N-terminal domain – N-концевой домен

OS overall survival – общая выживаемость

PAM50 prediction analysis of microarray 50 – молекулярный классификатор PAM50

PI3K phosphoinositide 3-kinase – фосфатидилинозитол-3-киназа

PIK3CA phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha – ген каталитической субъединицы PI3K

PR progesterone receptor – рецептор прогестерона

PRC1 polycomb repressive complex 1 – поликомб-репрессивный комплекс 1

ROC receiver operating characteristic – рабочая характеристика приемника

ROR1 receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 – рецептор тирозинкиназоподобный орфанный рецептор 1

RS recurrence-free survival – выживаемость без рецидива

TAM tumor-associated macrophages – опухоль-ассоциированные макрофаги

TGF- β transforming growth factor beta – трансформирующий фактор роста бета

UPR unfolded protein response – ответ на неправильно свернутые белки

YAP yes-associated protein – ассоциированный с Yes белок

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каприн А. Д., Старинский В. В., Шахзадова А. О. Злокачественные новообразования в России в 2023 году (заболеваемость и смертность). – М. : МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2024. – 250 с.
2. Состояние онкологической помощи населению России в 2023 году / под ред. А. Д. Каприна. – М. : ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2024. – 312 с.
3. Практические рекомендации по лечению рака молочной железы / С. А. Тюляндин, Е. В. Артамонова, А. Н. Жигулев [и др.] // Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO. – 2024. – Т. 14, № 3S2. – С. 32–81. – DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.2-01.
4. Polycomb protein BMI-1 as a potential therapeutic target in mucinous ovarian cancer / S. Abobaker, H. Kulbe, E. T. Taube [et al.] // Anticancer Research. – 2022. – Vol. 42, № 4. – P. 1739–1747. – DOI: 10.21873/anticancer.15650.
5. High expression of cyclin D1 is associated with high proliferation rate and increased risk of mortality in women with ER-positive but not in ER-negative breast cancers / C. Ahlin, C. Lundgren, E. Embretsén-Varro [et al.] // Breast Cancer Research and Treatment. – 2017. – Vol. 164, № 3. – P. 667–678. – DOI: 10.1007/s10549-017-4294-5.
6. Prognostic value of proliferation assay in the luminal, HER2-positive, and triple-negative biologic classes of breast cancer / M. A. Aleskandarany, A. R. Green, A. A. Benhasouna [et al.] // Breast Cancer Research. – 2012. – Vol. 14, № 1. – Art. R3. – DOI: 10.1186/bcr3084.
7. Oestrogen-regulated protein SLC39A6: a biomarker of good prognosis in luminal breast cancer / M. Althobiti, K. A. El-Sharawy, C. Joseph [et al.] // Breast Cancer Research and Treatment. – 2021. – Vol. 189, № 3. – P. 621–630. – DOI: 10.1007/s10549-021-06336-y.

8. The prognostic significance of BMI1 expression in invasive breast cancer is dependent on its molecular subtypes / M. Althobiti, A. A. Muftah, M. A. Aleskandarany [et al.] // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2020. – Vol. 182, № 3. – P. 581–589. – DOI: 10.1007/s10549-020-05719-x.
9. Reappraisal of immunohistochemical profiling of special histological types of breast carcinomas: a study of 121 cases of eight different subtypes / C. A. Alvarenga, P. I. Paravidino, M. Alvarenga [et al.] // *Journal of Clinical Pathology*. – 2012. – Vol. 65, № 12. – P. 1066–1071. – DOI: 10.1136/jclinpath-2012-200885.
10. Alpelisib for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive advanced breast cancer / F. André, E. Ciruelos, G. Rubovszky [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2019. – Vol. 380, № 20. – P. 1929–1940. – DOI: 10.1056/NEJMoa1813904.
11. Alpelisib plus fulvestrant for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer: final overall survival results from SOLAR-1 / F. André, E. M. Ciruelos, D. Juric [et al.] // *Annals of Oncology*. – 2021. – Vol. 32. – P. 208–217. – DOI: 10.1016/j.annonc.2020.11.011.
12. The F domain of estrogen receptor α is involved in species-specific, tamoxifen-mediated transactivation / Y. Arao, K. S. Korach // *Journal of Biological Chemistry*. – 2018. – Vol. 293, № 22. – P. 8495–8507. – DOI: 10.1074/jbc.RA117.001212.
13. Analysis of ROR1 protein expression in human cancer and normal tissues / A. Balakrishnan, T. Goodpaster, J. Randolph-Habecker [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2017. – Vol. 23, № 12. – P. 3061–3071. – DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2083.
14. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomized trial / M. Baum, A. U. Budzar, J.

- Cuzick [et al.] // The Lancet. – 2002. – Vol. 359, № 9324. – P. 2131–2139. – DOI: 10.1016/S0140-6736(02)09088-8.
15. Molecular subtyping predicts pathologic tumor response in early-stage breast cancer treated with neoadjuvant docetaxel plus capecitabine with or without trastuzumab / S. Bayraktar, M. Royce, L. Stork-Sloots [et al.] // Medical Oncology. – 2014. – Vol. 31, № 10. – Art. 163. – DOI: 10.1007/s12032-014-0163-9.
 16. Development of human recombinant antibodies against ROR1 tumor antigen / P. Bemani, S. Moazen, E. Nadimi, F. Nejatollahi // Reports of Biochemistry and Molecular Biology. – 2022. – Vol. 11, № 2. – P. 282–288. – DOI: 10.52547/rbmb.11.2.282.
 17. Bmi-1: At the crossroads of physiological and pathological biology / R. Bhattacharya, S. B. Mustafi, M. Street, A. Dey, S. K. Dwivedi // Genes & Diseases. – 2015. – Vol. 2, № 3. – P. 225–239. – DOI: 10.1016/j.gendis.2015.04.001.
 18. Targeting of BMI-1 with PTC-209 shows potent anti-myeloma activity and impairs the tumour microenvironment / A. Bolonsky, K. Schlangen, W. Schreiner [et al.] // Journal of Hematology & Oncology. – 2016. – Vol. 9. – Art. 17. – DOI: 10.1186/s13045-016-0243-4.
 19. ROR1, an embryonic protein with an emerging role in cancer biology / N. Borchering, D. Kusner, G. H. Liu, W. Zhang // Protein & Cell. – 2014. – Vol. 5, № 7. – P. 496–502. – DOI: 10.1007/s13238-014-0059-7.
 20. PI3K inhibition results in enhanced estrogen receptor function and dependence in hormone receptor-positive breast cancer / A. Bosch, Z. Li, A. Bergamaschi [et al.] // Science Translational Medicine. – 2015. – Vol. 7, № 283. – P. 283ra51. – DOI: 10.1126/scitranslmed.aaa4442.
 21. The “Rosen triad”: tubular carcinoma, lobular carcinoma in situ, and columnar cell lesions / S. M. Brandt, G. Q. Young, S. A. Hoda // Advances in Anatomic Pathology. – 2008. – Vol. 15, № 3. – P. 140–146. – DOI: 10.1097/PAP.0b013e31816ff313.

22. Adjuvant radiotherapy of regional lymph nodes in breast cancer: a meta-analysis of randomized trials / W. Budach, K. Kammers, E. Boelke, C. Matuschek // *Radiation Oncology*. – 2013. – Vol. 8. – Art. 267. – DOI: 10.1186/1748-717X-8-267.
23. The phosphoinositide 3-kinase pathway / L. C. Cantley // *Science*. – 2002. – Vol. 296, № 5573. – P. 1655–1657. – DOI: 10.1126/science.296.5573.1655.
24. Twist promotes tumor metastasis in basal-like breast cancer by transcriptionally upregulating ROR1 / J. Cao, X. Wang, T. Dai [et al.] // *Theranostics*. – 2018. – Vol. 8, № 10. – P. 2739–2751. – DOI: 10.7150/thno.21477.
25. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up / F. Cardoso, S. Kyriakides, S. Ohno [et al.] // *Annals of Oncology*. – 2019. – Vol. 30, № 8. – P. 1194–1220. – DOI: 10.1093/annonc/mdz173.
26. PIK3CA mutations and disease-free survival in HR+/HER2– early breast cancer / D. Čerina Pavlinović, J. Šušnjar, L. Kirigin [et al.] // *Journal of Oncology*. – 2024. – Vol. 2024. – Art. 5648845. – DOI: 10.1155/2024/5648845.
27. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer / M. C. U. Cheang, S. K. Chia, D. Voduc [et al.] // *Journal of the National Cancer Institute*. – 2009. – Vol. 101, №10. – P. 736–750. – DOI: 10.1093/jnci/djp082.
28. An “omics” approach to determine the mechanisms of acquired aromatase inhibitor resistance / S. Chen // *OMICS*. – 2011. – Vol. 15, № 6. – P. 347–352. – DOI: 10.1089/omi.2010.0097.
29. Exogenous and endogenous hormones and breast cancer / W. Y. Chen // *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2008. – Vol. 22, № 4. – P. 573–585. – DOI: 10.1016/j.beem.2008.08.001.

30. Menopausal hormone therapy and cancer: changing clinical observations of target site specificity / R. T. Chlebowski, G. L. Anderson // *Steroids*. – 2014. – Vol. 90. – P. 53–59. – DOI: 10.1016/j.steroids.2014.06.001.
31. Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in postmenopausal women / R. T. Chlebowski, G. L. Anderson, M. Gass [et al.] // *JAMA*. – 2010. – Vol. 304, № 15. – P. 1684–1692. – DOI: 10.1001/jama.2010.1500.
32. Lobular breast cancer: clinical, molecular and morphological characteristics / M. Christgen, D. Steinemann, E. Kühnle [et al.] // *Pathology Research and Practice*. – 2016. – Vol. 212, № 7. – P. 583–597. – DOI: 10.1016/j.prp.2016.05.002.
33. Clinicopathological and prognostic analysis of PIK3CA-mutated invasive breast cancer in Chinese women / J. Chu, L. Huang, Y. Wang, M. Qian // *Clinics (São Paulo)*. – 2025. – Vol. 80. – Art. 100702. – DOI: 10.1016/j.clinsp.2025.100702.
34. Use of epigenetic modulators as a powerful adjuvant for breast cancer therapies / A. Claude-Taupin, M. Boyer-Guittaut, R. Delage-Mourroux, E. Hervouet // *Methods in Molecular Biology*. – 2015. – Vol. 1238. – P. 487–509. – DOI: 10.1007/978-1-4939-1804-1_25.
35. Coates, A. S. Evolution of the St. Gallen consensus process for the optimal treatment of women with breast cancer / A. S. Coates // *The Breast*. – 2015. – Vol. 24, Suppl. 1. – P. S1. – DOI: 10.1016/S0960-9776(15)70003-2.
36. Invasive cribriform carcinoma of the breast: a report of nine cases and a review of the literature / Y. Cong, G. Qiao, H. Zou [et al.] // *Oncology Letters*. – 2015. – Vol. 9, № 4. – P. 1753–1758. – DOI: 10.3892/ol.2015.2972.
37. High-level ROR1 associates with accelerated disease progression in chronic lymphocytic leukemia / B. Cui, E. M. Ghia, L. Chen [et al.] // *Blood*. – 2016. – Vol. 128, № 25. – P. 2931–2940. – DOI: 10.1182/blood-2016-04-712562.

- 38.Targeting ROR1 inhibits epithelial-mesenchymal transition and metastasis / B. Cui, S. Zhang, L. Chen [et al.] // Cancer Research. – 2013. – Vol. 73, № 12. – P. 3649–3660. – DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3832.
- 39.Acute myeloid leukemia stem cell markers in prognosis and targeted therapy: potential impact of BMI-1, TIM-3 and CLL-1 / N. H. Darwish, T. Sudha, K. Godugu [et al.] // Oncotarget. – 2016. – Vol. 7. – P. 57811–57820. – DOI: 10.18632/oncotarget.11063.
- 40.PIK3CA mutations and clinical outcomes in hormone receptor-positive breast cancer / M. V. Dieci, V. Guarneri, P. Conte // Cancer Treatment Reviews. – 2025. – Vol. 120. – Art. 102601. – DOI: 10.1016/j.ctrv.2025.102601.
- 41.Drexler, H. G. Review of alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor INK4 family genes p15, p16, p18 and p19 in human leukemia-lymphoma cells / H. G. Drexler // Leukemia. – 1998. – Vol. 12, № 6. – P. 845–859.
- 42.Clinical Aspects of Estrogen and Progesterone Receptors and ERBB2 Testing / S. Ebru, E. Sari, S. Yalcin // Breast Disease. – Cham : Springer International Publishing, 2016. – P. 161–185. – DOI: 10.1007/978-3-319-22843-3_9.
- 43.Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition / M. J. Ellis, L. Ding, D. Shen [et al.] // Nature. – 2012. – Vol. 486, № 7403. – P. 353–360. – DOI: 10.1038/nature11143.
- 44.Mutant GATA3 actively promotes the growth of normal and malignant mammary cells / N. Emmanuel, K. A. Lofgren, E. A. Peterson [et al.] // Anticancer Research. – 2018. – Vol. 38, № 8. – P. 4435–4441. – DOI: 10.21873/anticancer.12745.
- 45.Histology of luminal breast cancer / R. Erber, A. Hartmann // Breast Care (Basel). – 2020. – Vol. 15, № 4. – P. 327–336. – DOI: 10.1159/000509025.
- 46.The ductal phenotypic expression of the E-cadherin/catenin complex in tubulolobular carcinoma of the breast / N. N. Esposito, M. Chivukula, D. J.

- Dabbs // *Modern Pathology*. – 2007. – Vol. 20, № 1. – P. 130–138. – DOI: 10.1038/modpathol.3800721.
47. HDAC inhibition enhances the in vivo efficacy of MEK inhibitor therapy in uveal melanoma / F. Faião-Flores, M. F. Emmons, M. A. Durante [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2019. – Vol. 25, № 18. – P. 5686–5701. – DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-3382.
48. Estrogen receptor, progesterone receptor, human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), and epidermal growth factor receptor expression and benefit from lapatinib in a randomized trial of paclitaxel with lapatinib or placebo as first-line treatment in HER2-negative or unknown metastatic breast cancer / R. S. Finn, M. F. Press, J. Dering [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2009. – Vol. 27, № 24. – P. 3908–3915. – DOI: 10.1200/JCO.2008.18.1925.
49. Quantitative ER and PgR assessment as predictors of benefit from lapatinib in postmenopausal women with hormone receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer / R. S. Finn, M. F. Press, J. Dering [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2014. – Vol. 20, № 3. – P. 736–743. – DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1260.
50. AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor / J. Font de Mora, M. Brown // *Molecular and Cellular Biology*. – 2000. – Vol. 20, № 14. – P. 5041–5047. – DOI: 10.1128/MCB.20.14.5041-5047.2000.
51. Lobular carcinoma in situ: a rare form of mammary cancer / F. W. Foote, F. W. Stewart // *American Journal of Pathology*. – 1941. – Vol. 17, № 4. – P. 491–496.
52. Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer / S. M. Fragomeni, A. Sciallis, J. S. Jeruss // *Surgical Oncology Clinics of North America*. – 2019. – Vol. 27, № 1. – P. 95–120. – DOI: 10.1016/j.soc.2017.08.005.

53. Plasma ESR1 mutations and the treatment of estrogen receptor-positive advanced breast cancer / C. Fribbens, B. O’Leary, L. Kilburn [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2016. – Vol. 34, № 25. – P. 2961–2968. – DOI: 10.1200/JCO.2016.67.3061.
54. ROR1 regulates chemoresistance in breast cancer via modulation of drug efflux pump ABCB1 / N. Fultang, A. Illendula, J. Lin [et al.] // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10. – Art. 1821. – DOI: 10.1038/s41598-020-58864-0.
55. Immunomodulation of FOXP3+ regulatory T cells by the aromatase inhibitor letrozole in breast cancer patients / D. Generali, G. Bates, A. Berruti [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2009. – Vol. 15, № 3. – P. 1046–1051. – DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1507.
56. Genomic profiling of mitochondrion-rich breast carcinoma: chromosomal changes may be relevant for mitochondria accumulation and tumour biology / F. C. Geyer, D. de Biase, M. B. Lambros [et al.] // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2012. – Vol. 132, № 1. – P. 15–28. – DOI: 10.1007/s10549-011-1504-4.
57. St. Gallen/Vienna 2017: a brief summary of the consensus discussion about escalation and de-escalation of primary breast cancer treatment / M. Gnant, N. Harbeck, C. Thomssen // *Breast Care (Basel)*. – 2017. – Vol. 12, № 2. – P. 102–107. – DOI: 10.1159/000475698.
58. Invasive micropapillary carcinoma of the breast: a clinicopathologic study of 103 cases of an unusual and highly aggressive variant of breast carcinoma / H. Gokce, M. G. Durak, M. M. Akin [et al.] // *Breast Journal*. – 2013. – Vol. 19, № 4. – P. 374–381. – DOI: 10.1111/tbj.12128.
59. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013 / A. Goldhirsch, E. P. Winer, A. S. Coates [et al.] // *Annals of Oncology*. – 2013. – Vol. 24, № 9. – P. 2206–2223. – DOI: 10.1093/annonc/mdt303.

60. GATA-3 expression in male and female breast cancers: comparison of clinicopathologic parameters and prognostic relevance / R. S. Gonzalez, J. Wang, T. Kraus [et al.] // *Human Pathology*. – 2013. – Vol. 44, № 6. – P. 1065–1070. – DOI: 10.1016/j.humpath.2012.09.010.
61. Commonly occurring cell subsets in high-grade serous ovarian tumors identified by single-cell mass cytometry / V. D. Gonzalez, N. Samusik, T. J. Chen [et al.] // *Cell Reports*. – 2018. – Vol. 22, № 7. – P. 1875–1888. – DOI: 10.1016/j.celrep.2018.01.053.
62. BMI1 regulates PRC1 architecture and activity through homo- and hetero-oligomerization / F. Gray, H. J. Cho, S. Shukla [et al.] // *Nature Communications*. – 2016. – Vol. 7. – Art. 13343. – DOI: 10.1038/ncomms13343.
63. Bmi-1 promotes invasion and metastasis, and its elevated expression is correlated with an advanced stage of breast cancer / B. H. Guo, Y. Feng, R. Zhang [et al.] // *Molecular Cancer*. – 2011. – Vol. 10. – Art. 10. – DOI: 10.1186/1476-4598-10-10.
64. GATA3 frameshift mutation promotes tumor growth in human luminal breast cancer cells and induces transcriptional changes seen in primary GATA3 mutant breast cancers / J. P. Gustin, J. Miller, M. Farag [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, № 61. – P. 103415–103427. – DOI: 10.18632/oncotarget.21910.
65. Targeting CDK4/6 in patients with cancer / E. Hamilton, J. R. Infante // *Cancer Treatment Reviews*. – 2016. – Vol. 45. – P. 129–138. – DOI: 10.1016/j.ctrv.2016.03.002.
66. Src tyrosyl phosphorylates cortactin in response to prolactin / A. Hammer, S. Laghate, M. Diakonova // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2015. – Vol. 463. – P. 644–649. – DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.05.116.

67. Combined use of cyclin D1 and Ki-67 for prognosis of luminal-like breast cancer patients / J. Hao, W. Zhang, Y. Lyu [et al.] // *Frontiers in Oncology*. – 2021. – Vol. 11. – Art. 737794. – DOI: 10.3389/fonc.2021.737794.
68. Invasive micropapillary carcinoma of the breast had no difference in prognosis compared with invasive ductal carcinoma: a propensity-matched analysis / S. Hao, Y. Y. Zhao, J. J. Peng [et al.] // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9, № 1. – Art. 286. – DOI: 10.1038/s41598-018-36362-8.
69. Impact of cortactin in cancer progression on Wnt5a/ROR1 signaling pathway / K. Hasan, T. J. Kipps // *Oncotarget*. – 2023. – Vol. 14. – P. 207–209. – DOI: 10.18632/oncotarget.28386.
70. Wnt5a induces ROR1 to recruit cortactin to promote breast-cancer migration and metastasis / K. Hasan, G. F. Widhopf 2nd, S. Zhang [et al.] // *NPJ Breast Cancer*. – 2019. – Vol. 5. – Art. 35. – DOI: 10.1038/s41523-019-0131-9.
71. Structural basis for nuclear hormone receptor DNA binding / C. Helsen, S. Kerkhofs, L. Clinckemalie // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2012. – Vol. 348, № 2. – P. 411–417. – DOI: 10.1016/j.mce.2011.07.025.
72. Structural dynamics, intrinsic disorder, and allostery in nuclear receptors as transcription factors / V. J. Hilser, E. B. Thompson // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – Vol. 286, № 46. – P. 39675–39682. – DOI: 10.1074/jbc.R111.278929.
73. Sebaceous carcinoma of the breast: case report and review of the literature / M. Hisaoka, Y. Takamatsu, Y. Hirano [et al.] // *Virchows Archiv*. – 2006. – Vol. 449, № – P. 484–488. – DOI: 10.1007/s00428-006-0264-8.
74. Differential expression of estrogen receptor α , β 1, and β 2 in lobular and ductal breast cancer / B. Huang, Y. Omoto, H. Iwase [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2014. – Vol. 111, № 5. – P. 1933–1938. – DOI: 10.1073/pnas.1323719111.
75. Long noncoding RNA DLEU2 and ROR1 pathway induces epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells in breast cancer / S. S. Islam,

- T. Al-Tweigeri, L. Al-Harbi [et al.] // Cell Death Discovery. – 2024. – Vol. 10. – Art. 61. – DOI: 10.1038/s41420-024-01829-3.
76. Endocrine function of the postmenopausal ovary: concentration of androgens and estrogens in ovarian and peripheral vein blood / H. L. Judd, G. E. Judd, W. E. Lucas, S. S. Yen // Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 1974. – Vol. 39, № 6. – P. 1020–1024. – DOI: 10.1210/jcem-39-6-1020.
77. The role of receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 (ROR1) in cancer progression and therapeutic resistance / M. S. Jung, R. Gupta, Y. Li // Cancers. – 2025. – Vol. 17, № 4. – Art. 612. – DOI: 10.3390/cancers17040612.
78. PIK3CA mutation associates with improved outcome in breast cancer / K. Kalinsky, L. M. Jacks, A. Heguy [et al.] // Clinical Cancer Research. – 2009. – Vol. 15, № 16. – P. 5049–5059. – DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0632.
79. Molecular mechanisms associated with ROR1-mediated drug resistance: crosstalk with Hippo-YAP/TAZ and BMI-1 pathways / H. Karvonen, H. Barker, L. Kaleva [et al.] // Cells. – 2019. – Vol. 8, № 8. – Art. 812. – DOI: 10.3390/cells8080812.
80. Crosstalk between ROR1 and BCR pathways defines novel treatment strategies in mantle cell lymphoma / H. Karvonen, D. Chiron, W. Niininen [et al.] // Blood Advances. – 2017. – Vol. 1, № 24. – P. 2257–2268. – DOI: 10.1182/bloodadvances.2017010215.
81. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase / S. Kato, H. Endoh, Y. Masuhiro [et al.] // Science. – 1995. – Vol. 270, № 5241. – P. 1491–1494. – DOI: 10.1126/science.270.5241.1491.
82. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer / R. Katso, K. Okkenhaug, K.

- Ahmadi [et al.] // Annual Review of Cell and Developmental Biology. – 2001. – Vol. 17. – P. 615–675. – DOI: 10.1146/annurev.cellbio.17.1.615.
83. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging / W. Y. Kim, N. E. Sharpless // Cell. – 2006. – Vol. 127, No. 2. – P. 265–275. – DOI: 10.1016/j.cell.2006.10.003.
84. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours / D. C. Koboldt, R. Fulton, M. McLellan [et al.] // Nature. – 2012. – Vol. 490. – P. 61–70. – DOI: 10.1038/nature11412.
85. The prognostic and predictive value of the luminal-like subtype in hormone receptor-positive breast cancer: an analysis of the DATA trial / S. W. M. Lammers, S. M. E. Geurts, K. E. P. E. Hermans [et al.] // ESMO Open. – 2025. – Vol. 10, № 2. – Art. 104154. – DOI: 10.1016/j.esmoop.2025.104154.
86. Revealing clonality and subclonality of driver genes for clinical survival benefits in breast cancer / Y. Lan, E. Zhao, S. Luo [et al.] // Breast Cancer Research and Treatment. – 2019. – Vol. 175, № 1. – P. 91–104. – DOI: 10.1007/s10549-019-05153-8.
87. Comprehensive clinical and molecular analyses of neuroendocrine carcinomas of the breast / M. Lavigne, E. Menet, J. C. Tille [et al.] // Modern Pathology. – 2018. – Vol. 31, № 1. – P. 68–82. – DOI: 10.1038/modpathol.2017.107.
88. Differential regulation of native estrogen receptor-regulatory elements by estradiol, tamoxifen, and raloxifene / N. Levy, D. Tatomer, C. B. Herber [et al.] // Molecular Endocrinology. – 2008. – Vol. 22, № 2. – P. 287–303. – DOI: 10.1210/me.2007-0340.
89. A ROR1–HER3–lncRNA signalling axis modulates the Hippo–YAP pathway to regulate bone metastasis / C. Li, S. Wang, Z. Xing [et al.] // Nature Cell Biology. – 2017. – Vol. 19. – P. 106–119. – DOI: 10.1038/ncb3464.

90. Bmi-1 induces radioresistance in MCF-7 mammary carcinoma cells / Z. G. Liu, L. Liu, L. H. Xu [et al.] // *Oncology Reports*. – 2012. – Vol. 27, № 4. – P. 1116–1122. – DOI: 10.3892/or.2011.1615.
91. BMI-1 promotes breast cancer proliferation and metastasis through different mechanisms in different subtypes / J. Y. Liu, Y. N. Jiang, H. Huang [et al.] // *Cancer Science*. – 2023. – Vol. 114, № 2. – P. 449–462. – DOI: 10.1111/cas.15623.
92. Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells / S. Liu, G. Dontu, I. D. Mantle [et al.] // *Cancer Research*. – 2006. – Vol. 66, № 12. – P. 6063–6071. – DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0054.
93. Clinicopathological characteristics and survival outcomes of invasive cribriform carcinoma of breast: a SEER population-based study / X. Y. Liu, Y. Z. Jiang, Y. R. Liu [et al.] // *Medicine (Baltimore)*. – 2015. – Vol. 94, № 31. – Art. e1309. – DOI: 10.1097/MD.0000000000001309.
94. PIK3CA mutations define favorable prognostic biomarkers in operable breast cancer: a systematic review and meta-analysis / Y. R. Liu, Y. Z. Jiang, W. J. Zuo [et al.] // *OncoTargets and Therapy*. – 2014. – Vol. 7. – P. 543–552. – DOI: 10.2147/OTT.S60115.
95. Extended adjuvant endocrine therapy in early breast cancer: current evidence and future perspectives / S. Lobo-Martins, F. Cardoso, M. Lambertini // *ESMO Open*. – 2025. – Vol. 10, № 1. – Art. 101004. – DOI: 10.1016/j.esmoop.2024.101004.
96. Breast cancer. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines / S. Loibl, P. Poortmans, M. Morrow, C. Denkert, G. Curigliano // *Annals of Oncology*. – 2024. – Vol. 35, Suppl. 3. – P. iii1–iii24. – DOI: 10.1016/j.annonc.2023.11.002.
97. Rapid signaling responses in Sertoli cell membranes induced by follicle stimulating hormone and testosterone: calcium inflow and electrophysiological changes / E. S. Loss, A. P. Jacobus, G. F. Wassermann

- // Life Sciences. – 2011. – Vol. 89, № 15–16. – P. 577–583. – DOI: 10.1016/j.lfs.2011.05.017.
98. Uncommon breast tumors in perspective: incidence, treatment and survival in the Netherlands / M. W. Louwman, M. Vriezen, M. W. van Beek [et al.] // International Journal of Cancer. – 2007. – Vol. 121, № 1. – P. 127–135. – DOI: 10.1002/ijc.22625.
99. Effects of cyclin D1 gene amplification and protein expression on time to recurrence in postmenopausal breast cancer patients treated with anastrozole or tamoxifen: a TransATAC study / K. Lundgren, M. Brown, S. Pineda [et al.] // Breast Cancer Research. – 2012. – Vol. 14, № 2. – Art. R57. – DOI: 10.1186/bcr3161.
100. Mechanisms of aromatase inhibitor resistance / C. X. Ma, T. Reinert, I. Chmielewska, M. J. Ellis // Nature Reviews Cancer. – 2015. – Vol. 15, № 5. – P. 261–275. – DOI: 10.1038/nrc3920.
101. Makki, J. Diversity of breast carcinoma: histological subtypes and clinical relevance / J. Makki // Clinical Medicine Insights: Pathology. – 2015. – Vol. 8. – P. 23–31. – DOI: 10.4137/CPath.S31563.
102. Frequency and spectrum of PIK3CA somatic mutations in breast cancer / O. Martínez-Sáez, N. Chic, T. Pascual [et al.] // Breast Cancer Research. – 2020. – Vol. 22. – Art. 45. – DOI: 10.1186/s13058-020-01284-9.
103. Invasive lobular carcinoma of the breast: morphology, biomarkers and “omics” / A. E. McCart Reed, J. R. Kutasovic, S. R. Lakhani, P. T. Simpson // Breast Cancer Research. – 2015. – Vol. 17, № 1. – Art. 12. – DOI: 10.1186/s13058-015-0519-x.
104. Different regions in activation function-1 of the human estrogen receptor required for antiestrogen- and estradiol-dependent transcription activation / E. M. McInerney, B. S. Katzenellenbogen // Journal of Biological Chemistry. – 1996. – Vol. 271, № 39. – P. 24172–24178. – DOI: 10.1074/jbc.271.39.24172.

105. Vascular actions of estrogens: functional implications / V. M. Miller, S. P. Duckles // *Pharmacological Reviews*. – 2008. – Vol. 60, № 2. – P. 210–241. – DOI: 10.1124/pr.107.08002.
106. Tubular carcinoma of the breast: clinicopathologic features and survival outcome compared with ductal carcinoma in situ / Y. Min, S. Y. Bae, H. C. Lee [et al.] // *Journal of Breast Cancer*. – 2013. – Vol. 16, № 4. – P. 404–409. – DOI: 10.4048/jbc.2013.16.4.404.
107. Pleomorphic lobular carcinoma: a distinctive clinical and molecular breast cancer type / L. Monhollen, C. Morrison, F. O. Ademuyiwa [et al.] // *Histopathology*. – 2012. – Vol. 61, № 3. – P. 365–377. – DOI: 10.1111/j.1365-2559.2012.04230.x.
108. Immunohistochemically defined subtypes and outcome in occult breast carcinoma with axillary presentation / E. Montagna, V. Bagnardi, N. Rotmensz [et al.] // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2011. – Vol. 129, № 3. – P. 867–875. – DOI: 10.1007/s10549-011-1697-6.
109. Sebaceous carcinoma of the breast / A. Murakami, K. Kawachi, T. Sasaki [et al.] // *Pathology International*. – 2009. – Vol. 59, № 3. – P. 188–192. – DOI: 10.1111/j.1440-1827.2009.02349.x.
110. The prevalence of estrogen receptor-1 mutation in advanced breast cancer: the estrogen receptor one study (EROS1) / O. Najim, M. Huizing, K. Papadimitriou [et al.] // *Cancer Treatment and Research Communications*. – 2019. – Vol. 19. – Art. 100123. – DOI: 10.1016/j.ctarc.2019.100123.
111. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Breast Cancer. Version 4.2025. – Fort Washington, PA : National Comprehensive Cancer Network, 2025. – URL: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast.pdf (дата обращения: 23.07.2026).
112. Pan-cancer analysis of polycomb repressive complex 1 (PRC1) in relation to prognosis and immunotherapy response / B. Ning, Q. Meng, B.

- Jia // Central European Journal of Immunology. – 2025. – Vol. 50, № 2. – P. 149–167. – DOI: 10.5114/ceji.2025.151960.
113. Treating cancer with selective CDK4/6 inhibitors / B. O’Leary, R. S. Finn, N. C. Turner // Nature Reviews Clinical Oncology. – 2016. – Vol. 13, № 7. – P. 417–430. – DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.26.
 114. The search for ESR1 mutations in breast cancer / S. Oesterreich, N. E. Davidson // Nature Genetics. – 2013. – Vol. 45, № 12. – P. 1415–1416. – DOI: 10.1038/ng.2831.
 115. Polycomb complex protein BMI1 confers resistance to tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer / D. Ojo, X. Lin, Y. Wu [et al.] // Cancer Letters. – 2018. – Vol. 426. – P. 4–13. – DOI: 10.1016/j.canlet.2018.03.048.
 116. CaSR stimulates secretion of Wnt5a from colonic myofibroblasts to stimulate CDX2 and sucrase-isomaltase using Ror2 on intestinal epithelia / I. I. Pacheco, R. J. Macleod // American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology. – 2008. – Vol. 295, № 4. – P. G748–G759. – DOI: 10.1152/ajpgi.00560.2007.
 117. Invasive cribriform carcinoma of the breast / D. L. Page, J. M. Dixon, T. J. Anderson [et al.] // Histopathology. – 1983. – Vol. 7, № 4. – P. 525–536. – DOI: 10.1111/j.1365-2559.1983.tb02265.x.
 118. 20-Year Risks of Breast-Cancer Recurrence after Stopping Endocrine Therapy at 5 Years / H. Pan, R. Gray, J. Braybrooke [et al.] // New England Journal of Medicine. – 2017. – Vol. 377, № 19. – P. 1836–1846. – DOI: 10.1056/NEJMoa1701830.
 119. ROR1 potentiates FGFR signaling in basal-like breast cancer / G. Pandey, N. Borchering, R. Kolb [et al.] // Cancers (Basel). – 2019. – Vol. 11, №5. – Art. 718. – DOI: 10.3390/cancers11050718.
 120. Prevalence of molecular subtypes of breast cancer: a single institutional experience of 2062 patients / P. Pandit, R. Patil, V. Palwe [et

- al.] // European Journal of Breast Health. – 2019. – Vol. 16, № 1. – P. 39–43. – DOI: 10.5152/ejbh.2019.4997.
121. Adjuvant endocrine treatment strategies for estrogen receptor-positive early breast cancer / A. Papakonstantinou, K. Tryfonidis, D. Zardavas, M. Piccart // EClinicalMedicine. – 2025. – Vol. 63. – Art. 102186. – DOI: 10.1016/j.eclinm.2025.102186.
 122. Luminal breast cancer: risk of recurrence and tumor-associated immune suppression / B. Pellegrino, Z. Hlavata, C. Migali [et al.] // Molecular Diagnosis & Therapy. – 2021. – Vol. 25, № 4. – P. 409–424. – DOI: 10.1007/s40291-021-00525-7.
 123. The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refine their genomic and transcriptomic landscapes / B. Pereira, S. F. Chin, O. M. Rueda [et al.] // Nature Communications. – 2016. – Vol. 7. – Art. 11479. – DOI: 10.1038/ncomms11479.
 124. CDK4/6 inhibition in breast cancer: current practice and future directions / S. Pernas, S. M. Tolaney, E. P. Winer, S. Goel // Therapeutic Advances in Medical Oncology. – 2018. – Vol. 10. – Art. 1758835918786451. – DOI: 10.1177/1758835918786451.
 125. Molecular portraits of human breast tumours / C. M. Perou, T. Sørli, M. B. Eisen [et al.] // Nature. – 2000. – Vol. 406. – P. 747–752. – DOI: 10.1038/35021093.
 126. PIK3CA (phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide) / J. Phillips, E. Domingo // Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. – 2019. – URL: <https://atlasgeneticsoncology.org/gene/41770/PIK3CA>(дата обращения: 23.07.2026).
 127. C-erbB-2 oncogene protein in in situ and invasive lobular breast neoplasia / P. L. Porter, R. Garcia, R. Moe, D. J. Corwin, A. M. Gown // Cancer. – 1991. – Vol. 68, № 2. – P. 331–334. – DOI: 10.1002/1097-0142(19910715)68:2<331::AID-CNCR2820680221>3.0.CO;2-X.

128. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer / A. Prat, J. S. Parker, O. Karginova [et al.] // *Breast Cancer Research*. – 2010. – Vol. 12. – Art. R68. – DOI: 10.1186/bcr2635.
129. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer / A. Prat, C. M. Perou // *Molecular Oncology*. – 2024. – Vol. 18, № 5. – P. 1026–1045. – DOI: 10.1002/1878-0261.13456.
130. Oncocytic carcinoma of the breast: frequency, morphology and follow-up / M. Ragazzi, D. de Biase, C. M. Betts [et al.] // *Human Pathology*. – 2011. – Vol. 42, № 2. – P. 166–175. – DOI: 10.1016/j.humpath.2010.07.014.
131. Invasive lobular carcinoma of the breast: response to hormonal therapy and outcomes / E. A. Rakha, M. E. El-Sayed, D. G. Powe [et al.] // *European Journal of Cancer*. – 2008. – Vol. 44, № 1. – P. 73–83. – DOI: 10.1016/j.ejca.2007.10.009.
132. Tubular carcinoma of the breast: further evidence to support its excellent prognosis / E. A. Rakha, A. H. Lee, A. J. Evans [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2010. – Vol. 28, № 1. – P. 99–104. – DOI: 10.1200/JCO.2009.23.5051.
133. ROR1-mediated signaling pathways in breast cancer cells / V. L. Reed, E. W. Thompson, B. G. Hollier // *Biomolecules*. – 2025. – Vol. 15, № 5. – Art. 734. – DOI: 10.3390/biom15050734.
134. PIK3CA-mutations in breast cancer / K. Reinhardt, K. Stückerath, C. Hartung [et al.] // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2022. – Vol. 196, № 3. – P. 483–493. – DOI: 10.1007/s10549-022-06637-w.
135. Hormonal regulation of estradiol biosynthesis, aromatase activity, and aromatase mRNA in rat ovarian follicles and corpora lutea / J. S. Richards, G. J. Hickey, S. Chen [et al.] // *Steroids*. – 1987. – Vol. 50, № 4–6. – P. 393–409. – DOI: 10.1016/0039-128X(87)90027-4.
136. Neuroendocrine differentiation in breast cancer: established facts and unresolved problems / L. Righi, A. Sapino, C. Marchiò, M. Papotti, G.

- Bussolati // *Seminars in Diagnostic Pathology*. – 2010. – Vol. 27, № 1. – P. 69–76. – DOI: 10.1053/j.semdp.2009.12.003.
137. Expression of BMI-1 and Mel-18 in breast tissue – a diagnostic marker in patients with breast cancer / M. L. Riis, T. Lüders, A. J. Nesbakken [et al.] // *BMC Cancer*. – 2010. – Vol. 10. – Art. 686. – DOI: 10.1186/1471-2407-10-686.
 138. A common classification framework for neuroendocrine neoplasms: an International Agency for Research on Cancer (IARC) and World Health Organization (WHO) expert consensus proposal / G. Rindi, D. S. Klimstra, B. Abedi-Ardekani [et al.] // *Modern Pathology*. – 2018. – Vol. 31, № 12. – P. 1770–1786. – DOI: 10.1038/s41379-018-0110-y.
 139. Rosai and Ackerman's *Surgical Pathology* / J. Rosai. – 10th ed. – Philadelphia : Elsevier, 2011.
 140. Rosen's *Breast Pathology* / P. P. Rosen (ed.). – 4th ed. – Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2014. – P. 413–452.
 141. Differential oestrogen receptor binding is associated with clinical outcome in breast cancer / C. S. Ross-Innes, R. Stark, A. E. Teschendorff [et al.] // *Nature*. – 2012. – Vol. 481, № 7381. – P. 389–393. – DOI: 10.1038/nature10730.
 142. BMI1: a biomarker of hematologic malignancies / A. A. Sahasrabudhe // *Biomarkers in Cancer*. – 2016. – Vol. 8. – P. 65–75.
 143. Prognostic value of lymphocyte-activation gene 3 (LAG3) in cancer: a meta-analysis / R. R. Saleh, P. Peinado, J. Fuentes-Antrás [et al.] // *Frontiers in Oncology*. – 2019. – Vol. 9. – Art. 1040. – DOI: 10.3389/fonc.2019.01040.
 144. Preclinical modeling of combined phosphatidylinositol-3-kinase inhibition with endocrine therapy for estrogen receptor-positive breast cancer / C. G. Sanchez, C. X. Ma, R. J. Crowder [et al.] // *Breast Cancer Research*. – 2011. – Vol. 13, № 2. – Art. R13. – DOI: 10.1186/bcr2833.

145. Immune-induced epithelial-to-mesenchymal transition in vivo generates breast cancer stem cells / M. Santisteban, J. M. Reiman, M. K. Asiedu [et al.] // *Cancer Research*. – 2009. – Vol. 69, № 7. – P. 2887–2895. – DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3343.
146. Infiltrating lobular carcinoma of the breast: clinicopathologic analysis of 975 cases with reference to data on conservative therapy and metastatic patterns / X. Sastre-Garau, M. Jouve, B. Asselain [et al.] // *Cancer*. – 1996. – Vol. 77, № 1. – P. 113–120. – DOI: 10.1002/(SICI)1097-0142(19960101)77:1<113::AID-CNCR19>3.0.CO;2-8.
147. PIK3CA mutations and endocrine resistance in hormone receptor-positive breast cancer / C. Schagerholm, B. Nordenskjöld, O. Stål // *Scientific Reports*. – 2024. – Vol. 14. – Art. 62664. – DOI: 10.1038/s41598-024-62664-1.
148. Various types and management of breast cancer: an overview / G. N. Sharma, R. Dave, J. Sanadya [et al.] // *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*. – 2010. – Vol. 1, № 2. – P. 109–126.
149. Molecular subtype profiling of invasive breast cancers weakly positive for estrogen receptor / B. S. Sheffield, Z. Kos, K. Asleh-Aburaya [et al.] // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2016. – Vol. 155, № 3. – P. 483–490. – DOI: 10.1007/s10549-016-3689-z.
150. Role of BMI1, a stem cell factor, in cancer recurrence and chemoresistance: preclinical and clinical evidences / H. R. Siddique, M. Saleem // *Stem Cells*. – 2012. – Vol. 30, № 3. – P. 372–378. – DOI: 10.1002/stem.1035.
151. Downregulation of Bmi1 in breast cancer stem cells suppresses tumor growth and proliferation / M. Srinivasan, D. J. Bharali, T. Sudha [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8. – P. 38731–38742. – DOI: 10.18632/oncotarget.16317.
152. Cyclin D1 overexpression is a negative predictive factor for tamoxifen response in postmenopausal breast cancer patients / M. Stendahl, A.

- Kronblad, L. Rydén [et al.] // *British Journal of Cancer*. – 2004. – Vol. 90, № 10. – P. 1942–1948. – DOI: 10.1038/sj.bjc.6601831.
153. Sebaceous carcinoma of the breast: report of four cases and review of the literature / M. Švajdler, P. Baník, K. Poliaková [et al.] // *Polish Journal of Pathology*. – 2015. – Vol. 66, № 2. – P. 142–148. – DOI: 10.5114/pjp.2015.53010.
 154. BMI-1 in breast cancer: biological role and clinical implications / A. Szustka, A. Krześlak // *Cellular Physiology and Biochemistry*. – 2024. – Vol. 58, № 5. – P. 584–596. – DOI: 10.33594/000000733.
 155. Clinicopathologic study of invasive micropapillary carcinoma of the breast / S. L. Tang, J. Q. Yang, Z. G. Du [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, № 26. – P. 42455–42465. – DOI: 10.18632/oncotarget.16405.
 156. Tumors of the Mammary Gland / F. A. Tavassoli, V. Eusebi. – Washington, DC : American Registry of Pathology, 2009. – (AFIP Atlas of Tumor Pathology. Series 4. Fascicle 10).
 157. ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer / W. Toy, Y. Shen, H. Won [et al.] // *Nature Genetics*. – 2013. – Vol. 45. – P. 1439–1445. – DOI: 10.1038/ng.2822.
 158. Initial treatment of patients with primary breast cancer: evidence, controversies, consensus: spectrum of opinion of German specialists at the 15th International St. Gallen Breast Cancer Conference (Vienna 2017) / M. Untch, J. Huober, C. Jackisch [et al.] // *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*. – 2017. – Vol. 77, № 6. – P. 633–644. – DOI: 10.1055/s-0043-111601.
 159. Encyclopedia of Pathology. Breast Pathology / A. Sapino, J. Kulka (eds.) ; J. H. van Krieken (ed.-in-chief). – Cham : Springer, 2020. – P. 151.
 160. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling / B. Vanhaesebroeck, J. Guillermet-Guibert, M. Graupera, B. Bilanges // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2010. – Vol. 11. – P. 329–341. – DOI: 10.1038/nrm2882.

161. Sebaceous carcinoma of the breast / Z. Varga, S. A. Kolb, R. Flury, R. Burkhard, R. Caduff // *Pathology International*. – 2000. – Vol. 50, № 1. – P. 63–66. – DOI: 10.1046/j.1440-1827.2000.01003.x.
162. Infiltrating cribriform carcinoma of the breast: a distinctive clinicopathologic entity / J. G. Venable, A. M. Schwartz, S. G. Silverberg // *Human Pathology*. – 1990. – Vol. 21, № 3. – P. 333–338. – DOI: 10.1016/0046-8177(90)90235-W.
163. The clinical relevance of micropapillary carcinoma of the breast: a case-control study / A. Vingiani, P. Maisonneuve, P. Dell’Orto [et al.] // *Histopathology*. – 2013. – Vol. 63, № 2. – P. 217–224. – DOI: 10.1111/his.12147.
164. The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer / I. Vivanco, C. L. Sawyers // *Nature Reviews Cancer*. – 2002. – Vol. 2. – P. 489–501. – DOI: 10.1038/nrc839.
165. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes / G. von Minckwitz, M. Untch, J.-U. Blohmer [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2012. – Vol. 30, № 15. – P. 1796–1804. – DOI: 10.1200/JCO.2011.38.8595.
166. Targeting ROR1 in breast cancer: biological rationale and therapeutic potential / F. Wang, X. Liu, Y. Zhang [et al.] // *Breast Cancer Research*. – 2025. – Vol. 27. – Art. 45. – DOI: 10.1186/s13058-025-02005-w.
167. Oxidative stress activates the TRPM2-Ca²⁺-CaMKII-ROS signaling loop to induce cell death in cancer cells / Q. Wang, L. Huang, J. Yue // *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research*. – 2017. – Vol. 1864, № 6. – P. 957–967. – DOI: 10.1016/j.bbamcr.2016.12.014.
168. Impact of PIK3CA mutations on the clinical benefits of CDK4/6 inhibitors in HR+/HER2– advanced breast cancer: an updated pairwise and network meta-analysis / S. F. Wang, C. Y. Chou, Y. W. Chao [et al.]

- // Journal of Cancer. – 2025. – Vol. 16, № 10. – P. 3065–3079. – DOI: 10.7150/jca.111362.
169. Transcriptional repression of CDKN2D by PML/RAR α contributes to the altered proliferation and differentiation block of acute promyelocytic leukemia cells / Y. Wang, W. Jin, X. Jia [et al.] // Cell Death & Disease. – 2014. – Vol. 5. – Art. e1431. – DOI: 10.1038/cddis.2014.398.
 170. The molecular underpinning of lobular histological growth pattern: a genome-wide transcriptomic analysis of invasive lobular carcinomas and grade- and molecular subtype-matched invasive ductal carcinomas of no special type / B. Weigelt, F. C. Geyer, R. Natrajan [et al.] // Journal of Pathology. – 2010. – Vol. 220, № 1. – P. 45–57. – DOI: 10.1002/path.2629.
 171. Tubulolobular carcinoma of the breast: an analysis of 27 cases of a tumor with a hybrid morphology and immunoprofile / D. T. Wheeler, L. H. Tai, G. L. Bratthauer [et al.] // American Journal of Surgical Pathology. – 2004. – Vol. 28, № 12. – P. 1587–1593. – DOI: 10.1097/00000478-200412000-00006.
 172. Breast Tumours / WHO Classification of Tumours Editorial Board. – Lyon : International Agency for Research on Cancer, 2019. – (WHO Classification of Tumours Series ; 5th ed. ; Vol. 2. – P. 96.
 173. Negative progesterone receptor status is an adverse prognostic factor for luminal B breast cancer / F. Wu, W. Huang, K. Chen [et al.] // International Journal of Clinical and Experimental Pathology. – 2017. – Vol. 10, № 2. – P. 901–911.
 174. Integrated immune-related gene signature predicts clinical outcome for patients with luminal B breast cancer / Z. Xie, D. Cai, R. Ye [et al.] // Gland Surgery. – 2024. – Vol. 13, № 12. – P. 2253–2263. – DOI: 10.21037/gs-24-377.
 175. Targeting PI3K/AKT/mTOR-mediated autophagy for tumor therapy / Z. Xu, X. Han, D. Ou [et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology.

- 2020. – Vol. 104, № 2. – P. 575–587. – DOI: 10.1007/s00253-019-10257-8.
176. Clinical impact of PIK3CA mutations in early hormone receptor-positive breast cancer / M. Yan, L. Zhang, Y. Chen [et al.] // *Frontiers in Oncology*. – 2025. – Vol. 15. – Art. 11869396. – DOI: 10.3389/fonc.2025.11869396.
 177. PIK3CA mutations in breast cancer: reconciling findings from preclinical and clinical data / D. Zardavas, W. A. Phillips, S. Loi // *Breast Cancer Research*. – 2014. – Vol. 16, № 1. – Art. 201. – DOI: 10.1186/bcr3605.
 178. LINC01012 upregulation promotes cervical cancer proliferation and migration via downregulation of CDKN2D / K. Zhang, X. Ni, X. Ma [et al.] // *Oncology Letters*. – 2023. – Vol. 25, № 3. – Art. 124. – DOI: 10.3892/ol.2023.13710.
 179. Inhibition of chemotherapy resistant breast cancer stem cells by a ROR1 specific antibody / S. Zhang, H. Zhang, E. M. Ghia [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2019. – Vol. 116, № 4. – P. 1370–1377. – DOI: 10.1073/pnas.1816262116.
 180. Cellular and molecular immunopathogenesis of ulcerative colitis / S. Zhang, X. Zhao, D. Zhang // *Cellular & Molecular Immunology*. – 2014. – Vol. 11, № 3. – P. 314–321. – DOI: 10.1038/cmi.2014.18.
 181. Invasive cribriform carcinoma in a Chinese population: comparison with low-grade invasive ductal carcinoma-not otherwise specified / W. Zhang, T. Zhang, Z. Lin [et al.] // *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. – 2013. – Vol. 6, № 3. – P. 445–457.
 182. Aromatase expression and regulation in breast and endometrial cancer / H. Zhao, L. Zhou, A. J. Shangguan, S. E. Bulun // *Journal of Molecular Endocrinology*. – 2016. – Vol. 57, № 1. – P. R19–R33. – DOI: 10.1530/JME-15-0310.

183. Tyrosine kinase ROR1 as a target for anti-cancer therapies / Y. Zhao, D. Zhang, Y. Guo [et al.] // *Frontiers in Oncology*. – 2021. – Vol. 11. – Art. 680834. – DOI: 10.3389/fonc.2021.680834.
184. The role of TWIST1 in epithelial–mesenchymal transition and cancers / Q. Q. Zhu, C. Ma, Q. Wang [et al.] // *Tumour Biology*. – 2016. – Vol. 37, № 1. – P. 185–197. – DOI: 10.1007/s13277-015-4450-7.