

**Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования Первый Московский государственный медицинский
университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения
Российской Федерации (Сеченовский Университет)**

На правах рукописи

ПОНОМАРЕВ ВАЛЕРИЙ ЕВГЕНЬЕВИЧ

**ЗНАЧЕНИЕ ПОРАЖЕНИЯ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ И НАЛИЧИЯ
ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК
ПРИ ПЕРВИЧНО-ОПЕРАБЕЛЬНОМ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

14.01.12 – Онкология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук

Поликарпова Светлана Борисовна

кандидат медицинских наук

Вишневская Яна Владимировна

МОСКВА – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1 Эпидемиология РМЖ.....	11
1.2 Особенности лимфогенного метастазирования.....	12
1.3 Основные прогностические и предиктивные факторы при РМЖ и их связь с метастатическим поражением регионарных лимфатических узлов.....	13
1.4 Размер опухоли.....	21
1.5 Лимфоваскулярная инвазия.....	22
1.6 Гистологический тип и степень злокачественности опухоли.....	22
1.7 Рецепторный статус.....	24
1.8 Оценка экспрессии HER2.....	24
1.9 Индекс пролиферации.....	25
1.10 Молекулярно-биологические подтипы.....	26
1.11 Диссеминированные и циркулирующих опухолевых клетки как факторы прогноза.....	27
1.12 Определение микрометастазов в костном мозге.....	27
1.13 Диссеминированные и циркулирующие опухолевые клетки.....	30
1.14 Определение ЦОК при РМЖ.....	30
1.15 Определение ЦОК при ранних стадиях РМЖ.....	34
1.16 ЦОК у больных с метастатической формой РМЖ.....	36
1.17 ЦОК и молекулярно-биологические подтипы.....	37
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	40
2.1 Дизайн исследования.....	40
2.2 Техника выполнения гистологического исследования.....	41
2.3 Клиническая характеристика больных первично-операбельным РМЖ.....	41
2.4 Морфологическая характеристика опухолей больных первично-операбельным РМЖ.....	45
2.5 Методика определения ЦОК в периферической крови.....	51
2.6 Методы статистической обработки.....	54

ГЛАВА III. НЕПОСРЕДСТВЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БОЛЬНЫХ ПЕРВИЧНО-ОПЕРАБЕЛЬНЫМ РМЖ С МЕТАСТАТИЧЕСКИМ ПОРАЖЕНИЕМ АКСИЛЛЯРНЫХ ЛУ	55
3.1 Клиническая оценка больных первично-операбельным РМЖ с метастатическим поражением аксиллярных ЛУ	55
3.2 Морфологическая оценка операционного материала больных первично-операбельным РМЖ с метастатическим поражением аксиллярных ЛУ	57
ГЛАВА IV. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ С ЦОК	69
4.1 Клиническая оценка больных I-III стадий РМЖ с ЦОК	69
4.2 Морфологическая характеристика операционного материала больных I-III стадий РМЖ с ЦОК	71
4.3 Сравнительный анализ клинико-морфологических характеристик больных с I-III стадий РМЖ с ЦОК	74
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	81
ВЫВОДЫ	87
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	89
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	90
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	91

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Рак молочной железы (РМЖ) занимает 1-е место в структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями у женщин в России. Из 335 275 новых случаев, выявляемых ежегодно, на его долю приходится 21,1%. [5].

Эффективность методов диагностики и лечения непосредственно влияет на прогноз заболевания. Особенно важным критерием, определяющим течение заболевания и его прогноз, является точное стадирование опухолевого процесса, причем как первичного опухолевого очага, так и зон регионарного метастазирования при первично-операбельных формах РМЖ.

Первично-операбельный РМЖ в зависимости от стадии заболевания по системе TNM включает в себя I- II B стадии (T1 или T2, N0 или N1) при отсутствии отдаленных метастазов (M0). Распределение пациентов таким образом позволяет на дооперационном периоде спланировать объем хирургического и комплексного лечения с учетом современных подходов к проблеме РМЖ, однако оно основано лишь на клинико-патологической классификации без учета внутреннего деления РМЖ на подтипы и подгруппы. За рубежом существует аналогичное первично-операбельному раку молочной железы понятие «ранний рак молочной железы», основанное не только на классификации TNM, но и на результатах иммуногистохимического исследования и других современных лабораторных методах исследования. Такой подход позволяет более дифференцировано подходить к выбору хирургических техник и делает прогноз лечения более предсказуемым [1].

Процесс метастазирования при РМЖ и ряде других новообразований рассматривается как последовательный процесс распространения заболевания через опухолевую прогрессию с образованием отсевов в других органах и тканях, посредством лимфатической и кровеносной систем. Лимфогенное метастазирование является одним из неблагоприятных факторов прогноза [2].

Для РМЖ этот сложный процесс часто происходит упорядоченным образом, начиная с сигнального лимфатического узла (сентинального) в качестве

возможного шлюза. Однако опухолевые клетки могут распространяться в другие лимфатические коллекторы, минуя сторожевой лимфоузел [3].

До сих пор остается невыясненной роль микрометастазов РМЖ в регионарных лимфатических узлах. Это вызвано рядом объективных причин: во-первых, определение микрометастазов не является рутинной практикой в работе врача патологоанатома, и требует использования дополнительных методов детекции; во-вторых, по данным литературы нет единого мнения о влиянии микрометастазов в лимфатических узлах на прогноз и сроки выживаемости пациентов; в-третьих, нет систематизированных обзоров литературы по данной теме, которые включали в себя большое число пациентов.

Все это говорит о том, что данная научная тема является недостаточно изученной, а значение микрометастазов и изолированных опухолевых клеток (ИОК) в лимфатических узлах (ЛУ) представляется неопределенным.

Цель исследования

Повышение точности риск-стратификации больных первично-операбельным РМЖ на основании морфологических особенностей поражения регионарных лимфатических узлов и наличия циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови.

Задачи исследования

1. Провести сравнительную оценку клинических и морфологических особенностей метастатического поражения регионарных ЛУ при первично-операбельных формах РМЖ.
2. Установить морфологические особенности субклинических метастазов (микрометастазов и изолированных опухолевых клеток) в регионарных ЛУ.
3. Оценить общую и безрецидивную выживаемость больных первично-операбельным РМЖ в зависимости от характера поражения регионарных ЛУ.
4. Изучить частоту выявления ЦОК при первично-операбельном РМЖ с различным статусом регионарных ЛУ.

5. Оценить общую и безрецидивную выживаемость больных первично-операбельным РМЖ в зависимости от количества ЦОК в периферической крови.

Научная новизна

Впервые в России определена клиническая роль субклинических метастазов (микрометастазов и изолированных опухолевых клеток) в аксиллярных ЛУ у больных первично-операбельным РМЖ.

Представлены данные по сопоставлению метастатического поражения аксиллярных ЛУ больных первично-операбельным РМЖ с морфологической характеристикой опухоли и особенностью клинического течения.

Проведено сопоставление частоты выявления ЦОК в периферической крови у больных с первично-операбельными и местно-распространенными формами РМЖ, а также сопоставление с морфологической характеристикой опухоли и особенностью клинического течения.

Теоретическая и практическая значимость

На основании полученных результатов исследования расширены представления о влиянии субклинических метастазов в регионарных лимфатических узлах при РМЖ. Определение дополнительных факторов прогноза (ЦОК) с уже известными прогностическими факторами, влияющими на метастатическое поражение аксиллярных лимфоузлов у больных первично-операбельным РМЖ дает возможность лучшего понимания закономерностей процессов метастазирования и позволяет улучшить непосредственные результаты лечения больных.

Методы и методология исследования

В основу работы положено ретроспективное исследование клинкоморфологических характеристик 541 больной первично-операбельным РМЖ (T0-2 – N0-1 – M0), находившихся на обследовании и лечении в ФГБУ «НМИЦ онкологии им Н.Н. Блохина» Минздрава России с 2007 по 2012 гг.

Дизайн исследования включал в себя разделение всех больных на 2 группы в зависимости от поражения аксиллярных ЛУ.

В 1 группу вошли больные, у которых при гистологическом исследовании не было выявлено никаких изменений в регионарных ЛУ (pN0). Во 2 группу включены больные, у которых были выявлены макро- и микрометастазы, а также ИОК, обнаруженные при дополнительном ИГХ исследовании (pN1; pN1mi; pN0 (i+)).

С помощью ИГХ метода дополнительно проведены исследования парафиновых срезов регионарных ЛУ у 100 больных первично-операбельным РМЖ с отрицательным статусом ЛУ для выявления субклинических метастазов (микрометастазов и ИОК). Для выявления субклинических метастазов с помощью ИГХ метода дополнительно проведены исследования срезов всех удаленных регионарных ЛУ у 100 больных первично-операбельным РМЖ с отрицательным статусом ЛУ. Для ИГХ исследования с парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 4-5 микрон, которые помещали на стеклах, обработанных поли-L-лизином. Затем материал обрабатывался по общепринятой стандартной методике с использованием полимерных систем детекции и применением антител фирмы CellMarque (Sigma-Aldrich, США): PanCK, CK18, ER, PR, HER2, Ki67.

Микрометастазы и изолированные опухолевые клетки в ЛУ выявлялись с помощью окраски кератинами (PanCK, CK18). Оценка суррогатного молекулярного подтипа проводилась по результатам ИГХ исследования с ER, PR, HER2, Ki67 в соответствии с версией, представленной на международной конференции в St. Gallen в 2013 году.

Применение жидкостной биопсии, как неинвазивного метода, позволяет использовать значения ЦОК и сравнивать их с основными клинико-морфологическими характеристиками больных злокачественными новообразованиями.

В основу проспективной части исследования положена оценка наличия ЦОК и их взаимосвязь с клинико-морфологическими характеристиками у 47 больных I-III стадий РМЖ, находившихся на обследовании и лечении в ФГБУ «НМИЦ онкологии им Н.Н. Блохина» Минздрава России с 2015 по 2018 гг. ЦОК определялись у больных до начала лечения.

Анализ ЦОК проводился в 7,5 мл периферической крови, из которой опухолевые клетки выделяются на растворе Фикола (плотность 1,077 г/см³, ООО НПП «ПанЭко»). Выделенные клетки центрифугируются в 10 мл фосфатно-солевого буфера (рН 7,2-7,6, «ЭкоСервис»). К осадку добавляется 100 мкл блокирующего раствора и инкубируется 30 мин при температуре +2 С. Далее клетки центрифугируются в 5 мл фосфатно-солевого буфера. К осадку добавляются моноклональные антитела к пан-лейкоцитарному антигену CD45 и молекуле эпителиальной адгезии EpCam (CD326) фирмы Becton Dickinson (США) и инкубируются 20 мин при температуре +2 С. Далее клетки центрифугируются в 5 мл фосфатно-солевого буфера. К осадку добавляется 500 мкл пермеабилзирующего раствора (BD FACS Permeabilizing Solution 2, Becton Dickinson, США) и инкубируется 10 минут при комнатной температуре. Далее клетки центрифугируются в 5 мл фосфатно-солевого буфера. К осадку добавляются моноклональные антитела к цитокератинам (KL1 или Cam5.2) фирмы Becton Dickinson (США) и инкубируются 20 мин при температуре +2 С. Далее клетки центрифугируются в 5 мл фосфатно-солевого буфера. К осадку добавляется 1 мл фосфатно-солевого буфера для счета на проточном цитометре (FACS Canto 2, Becton Dickinson (США) или Attune, ThermoFisher Scientific, США).

Статистическая обработка данных, полученных в исследовании, производилась с помощью программ: Excel (Microsoft, США) и SAS (версия 11.0, SAS, США). Дескриптивные статистики приведены как частоты для качественных признаков и как среднее и ошибка среднего для количественных. Для сравнения частот изученных признаков использовался критерий хи-квадрат; для малых выборок – точный критерий Фишера. Кривые выживаемости анализировались методом Каплана-Мейера, их сравнение производилось методом log-rank. При проверке нулевых гипотез критическое значение уровня статистической значимости принималось равным 0,05.

Положения, выносимые на защиту

1. У больных с метастатическим поражением аксиллярных ЛУ к неблагоприятным клиническим факторам прогноза относятся: возраст менее 55 лет, длительность менопаузы менее 5 лет ($p < 0,05$). Морфологические факторы неблагоприятного прогноза - размер опухоли ≥ 2 см, ИР НСТ, мультицентрическая форма роста, высокая степень злокачественности, очаговая степень выраженности ИОЛ, наличие ЛВИ и фокусов рака *in situ* в окружающей ткани ($p < 0,05$).

2. Факторами, достоверно увеличивающими риск метастатического поражения аксиллярных ЛУ у больных первично-операбельным РМЖ являются: размер опухоли ≥ 2 см, мультицентрическая форма роста опухоли, инвазия опухолевых клеток в лимфатические сосуды ($p < 0,05$).

3. Субклинические метастазы (микрометастазы и изолированные опухолевые клетки) не являются независимыми прогностическими факторами и не оказывают влияния на показатели ОВ и БРВ ($p > 0,05$).

4. При первично-операбельном РМЖ поражение микро- и макрометастазами 1-2 лимфатических аксиллярных ЛУ не ухудшает как показатели 3,5 и 10-летней ОВ больных: 96,6% и 98,9%; 92,5 и 97,9%; 85,6% и 91,9% ($p > 0,05$), так и 3, 5 и 10-летней БРВ: 83,4% и 95,2%; 77,6% и 91,3%; 60,3% и 69,3% ($p > 0,05$) по сравнению с группой пациентов с отрицательным статусом ЛУ, соответственно.

5. Единственным независимым прогностическим фактором, влияющим на БРВ больных, является прорастание капсулы ЛУ. Показатели 10-летней БРВ больных без прорастания капсулы и при его наличии составили 94,1% и 75,8% соответственно ($p < 0,05$).

6. Частота выявления ЦОК у больных первично-операбельным РМЖ составляет 88,5%. В группе больных с отрицательным статусом аксиллярных ЛУ циркулирующие опухолевые клетки определялись в 90,9% случаев, что свидетельствует о возможном первично-диссеминированном процессе. Данный фактор достоверно не влияет на показатель БРВ ($p > 0,05$).

7. У больных с люминальным В HER2-негативным подтипом РМЖ достоверно чаще (53,2%, $p=0,05$) определялись ЦОК по сравнению с другими подтипами, что позволяет использовать метод выявления ЦОК, как дополнительный критерий риск-стратификации больных РМЖ.

Степень достоверности и апробация результатов

Диссертация апробирована и рекомендована к защите 29 августа 2019 года на совместной научной конференции с участием кафедры онкологии Института клинической медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), отделения лаборатории иммунологии гемопоза, отделения хирургического №2 (диагностики опухолей), отделения хирургического №5 (опухолей молочных желез), отделения патологической анатомии отдела морфологической и молекулярно-генетической диагностики опухолей НИИ клинической онкологии имени академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Результаты диссертационной работы были представлены в рамках XVIth International Conference Hematopoiesis Immunology в г. Тбилиси. (5-7 июня 2019 г.). Доклад на тему “Circulating tumor cells in patients with stage II–III breast cancer” занял второе место в конкурсе молодых ученых.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Эпидемиология РМЖ

Во всем мире, особенно в развитых странах, РМЖ является серьезной проблемой здравоохранения. Из 10 миллионов новых случаев злокачественных новообразований на долю РМЖ приходится 10-12% [4]. РМЖ занимает 1-е место в структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями у женщин в России. Из 335 275 новых случаев, выявляемых ежегодно в Российской Федерации, на его долю приходится 21,1% [5].

В целом, прогноз рака молочной железы относительно благоприятен. Наилучший показатель 5-летней выживаемости отмечен в США (84%), Австралии (73%), Японии (74%). Показатель выживаемости в Европе составляет 63-67%. В целом же в мире 5-летняя выживаемость равна 50-60 % [6-10].

Динамика повозрастных показателей заболеваемости РМЖ женщин в России свидетельствует о том, что наибольший прирост заболеваемости пришелся на возрастную группу 65–79 лет (60–80%), наименьший – на возрастную группу 45–54 года [11].

Удельный вес впервые выявленных больных с I–II стадией в России составляет 63 %, с III стадией – 26,1 %, с IV стадией – 10,0 % [12].

Этиология и обоснованное объяснение патогенеза большинства случаев РМЖ остаются неясными, отсутствуют эффективные пути первичной профилактики, поэтому рост заболеваемости находится вне реального контроля. В то же время исследования последних лет позволили значительно продвинуться в понимании эпидемиологии и канцерогенеза опухоли.

Таким образом, основным реальным путем успешного излечения и снижения смертности от РМЖ в настоящее время является улучшение ранней диагностики. Профилактические мероприятия, в настоящее время, не являются универсальными, однако, их применение позволяет снизить риск возникновения РМЖ и, непосредственно, уровень смертности [13].

1.2 Особенности лимфогенного метастазирования

Процесс метастазирования является основной причиной смертности у пациентов с установленным диагнозом РМЖ и других солидных опухолей [14]. Первичными участками метастазирования, как правило, являются регионарные лимфоколлекторы [15]. Сопоставляя клинические и экспериментальные данные по данному вопросу, можно предположить, что миграция опухолевых клеток в лимфатические узлы в значительной степени осуществляется благодаря лимфангиогенезу, который представляет собой процесс формирования новых лимфатических сосудов из уже существующих сосудов [16,17], или из эндотелиальных лимфогенных клеток-предшественников [18]. Этот процесс характерен для эмбрионального периода и раннего постнатального периода развития. Во взрослом организме лимфангиогенез характерен при воспалении, регенерации тканей и заживлении ран. Основным белком, регулирующий лимфангиогенез является рецептор VEGFR3 (сосудистый фактор роста эндотелия сосудов) [12] и рецептор тирозинкиназы, экспрессируемый преимущественно на лимфатических эндотелиальных клетках [19]. Активация VEGFR-3 пути происходит путем связывания с VEGF-C или сходным белком, VEGF-D [20-22]. Эти лимфогенные факторы обычно экспрессируются в опухолях с инфильтративным компонентом и в стромальных клетках, тем самым, создавая благоприятную среду для формирования новых лимфатических сосудов [23]. Многочисленные исследования показали, что уровень плотности внутриопухолевых и перитуморальных лимфатических сосудов ассоциируется как с частой метастазирования, так и с уменьшением ОБ [24,25]. Более низкая экспрессия VEGFR-3 коррелирует с меньшим количеством пораженных лимфатических узлов и увеличением уровня ОБ. Агенты, которые нейтрализуют VEGF-C и VEGF-D или блокируют передачу сигналов VEGFR-3, подавляют развитие новых лимфатических сосудов, лимфатической гиперплазии и метастазирования опухолей в экспериментальных моделях рака [26].

В работе Ran et al. [19] была показана преимущественная роль инвазии клеток РМЖ в лимфатические сосуды. Это стало возможно благодаря

применению специфических лимфатических ИГХ маркеров, таких как LYVE-1, Prox и podoplanin. Лимфатическая сосудистая инвазия коррелирует с поражением сигнальных и подмышечных лимфоузлов, а также с исходом заболевания [27-28].

В исследовании Schorppmann et al. [29] было показано, что перитуморальная лимфатическая инвазия в значительной степени связана с метастазированием в лимфатические узлы, определяемая в три раза чаще у пациентов с положительным статусом pN, чем в группе с pN0 (65% против 23%).

Таким образом, большинство исследований доказывает ведущую роль лимфогенного метастазирования над гематогенным. Несмотря на это, лимфоваскулярная инвазия, как и инвазия в кровеносные сосуды, являются неблагоприятными прогностическими факторами, влияющими на ОВ. Основной причиной смерти у пациентов РМЖ являются не метастазы в ЛУ как таковые, а отдаленные метастазы, влияющие на основные функции органов (костный мозг, легкие, головной мозг), обеспечивающих регуляцию всего организма.

1.3 Основные прогностические и предиктивные факторы при РМЖ и их связь с метастатическим поражением регионарных лимфатических узлов

Прогностическим фактором является любой фактор, который можно оценить во время постановки диагноза и который связан с клиническим исходом в отсутствие системной адъювантной терапии. Напротив, предиктивным фактором является фактор, связанный с реакцией или отсутствием реакции на конкретную терапию [30]. В целом, прогностические и предиктивные факторы используются для прогнозирования естественного течения заболевания и его реакции на конкретную терапию соответственно. При РМЖ некоторые факторы являются исключительно прогностическими или предиктивными, тогда как другие имеют как прогностическое, так и предиктивное значение (таблица 1) [30]. Использование этих факторов основано на рекомендациях междисциплинарных групп консенсуса Национальных институтов здравоохранения, Колледжа американских патологов (CAP) и Американского общества клинической онкологии (ASCO) [31-32]. Эти прогностические и предиктивные факторы включают состояние ЛУ, размер опухоли, лимфоваскулярную инвазию (ЛВИ),

гистологический тип и степень дифференцировки опухоли, рецепторный статус и наличие амплификации гена *HER2* (Таблица 1).

Таблица 1 – Прогностические и предиктивные факторы при РМЖ

	Прогностические факторы	Предиктивные факторы
Статус лимфатических узлов	+++	
Размер опухоли	+++	
ЛВИ	++	
Степень дифференцировки опухоли	++	++
Гистологический тип	+	+
Стероидные рецепторы	+	+++
Экспрессия Her2	+	+++

У пациентов с I и II клиническими стадиями РМЖ состояние ЛУ является одним из наиболее важных прогностических факторов выживания, независимо от размера опухоли, гистологической степени и других клинко-патологических параметров [33-34]. Гистологическое исследование ЛУ является наиболее точным методом оценки распространения заболевания. Следовательно, все ЛУ должны быть тщательно исследованы при гистологическом анализе на предмет метастатического поражения. Метастатически пораженные ЛУ могут быть отобраны репрезентативными срезами, но узлы, которые кажутся отрицательными при рутинном исследовании, должны быть приготовлены срезами толщиной 2–3 мм и подвергнуты гистологической оценке в полном объеме [35-37]. Для оптимизации точности прогностической информации, следует провести оценку как минимум десяти ЛУ на основании их полного исследования [38, 39]. ЛУ могут подвергаться исследованию в нативном или фиксированном состоянии. В большинстве учреждений используется стандартная

гистологическая обработка исследуемого материала с изготовлением препаратов, окрашенных гематоксилин-эозином (Г-Э). Некоторые исследователи выступают за более подробное исследование ЛУ с ИГХ оценкой и с использованием эпителиальных маркеров для выявления микрометастазов [35, 40].

До недавнего времени обязательное выполнение полной лимфодиссекции входило в стандартную практику хирургов-онкологов. При этом наличие пораженных ЛУ наблюдалось у 30% пациентов [40]. Однако диссекция подмышечных ЛУ связана с увеличением койко-дня, а также с ухудшением качества жизни, что проявляется в снижении подвижности плеча, сенсорных нарушениях и лимфедеме. Альтернативой подмышечной лимфодиссекции явилась биопсия сторожевого лимфатического узла (СЛУ), которая впервые была выполнена в 1993 г. Этот метод определял распространение опухолевых клеток в региональные узлы. СЛУ является первым узлом, получающим лимфодренаж из опухоли, который может содержать метастатические клетки [40]. Пациенты с положительным СЛУ подвергаются полной лимфодиссекции, в то время как пациентам без поражения СЛУ выполнение лимфодиссекции не требовалось. В целом, СЛУ является положительным у 20–35% пациентов с ранней стадией РМЖ. Метастазирование в ЛУ можно классифицировать как макрометастазы (≥ 2 мм), микрометастазы (< 2 мм) или как изолированные опухолевые клетки, идентифицированные с помощью иммуноокрашивания с использованием маркеров эпителиальных клеток (Рисунок 1).

Идентификация опухолевых клеток на основе цитокератина (СК) улучшает стадирование, которые могут быть не обнаружены с помощью обычной окраски Г-Э при световой микроскопии [41].

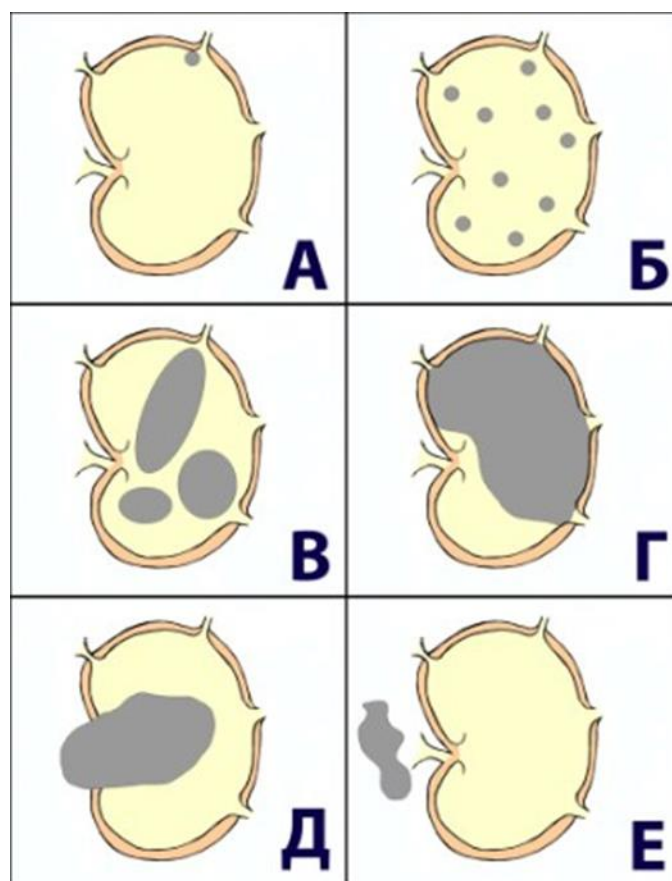


Рисунок 1 – Варианты расположения метастазов в лимфатических узлах. а – одиночный микрометастаз; б – множественные микрометастазы; в – макрометастазы; г – одиночный макрометастаз со значительным замещением ткани лимфатического узла; д – экстракапсулярная инвазия; е – метастаз в клетчатке без сохранения предсуществующей ткани лимфатического узла

Биопсия СЛУ была принята в качестве стандартного подхода для оценки регионарных ЛУ и считается стандартом медицинской помощи женщинам с клинически негативными лимфатическими узлами и с опухолями T1 или T2 [39, 42-46]. В 2010 г. ASCO, Международная экспертная консенсусная группа по первичной терапии раннего РМЖ и другие национальные и международные организации одобрили этот подход [47]. Другим очень важным аспектом процедуры биопсии СЛУ является то, что она верифицирует лимфатический узел или узлы, наиболее вероятные для локализации метастатического рака. Эта процедура значительно сократила количество узлов, отправляемых для гистопатологической оценки, что позволило более детально оценить

патологическое состояние меньшего числа ЛУ, которые подвергаются наибольшему риску возникновения метастатической болезни. Достижения в области молекулярных технологий также облегчили анализ статуса региональных ЛУ [48-50].

На первый взгляд, подобный алгоритм удобен и прост в клинической практике, однако самым спорным аргументом и объектом многих клинических испытаний в последние годы является наличие микрометастазов в СЛУ.

Современное отношение к определению статуса ЛУ нашло отражение в классификации РМЖ по системе TNM (Таблица 2).

Таблица 2 – Критерий pN в классификации РМЖ по системе TNM (8 издание, 2017 г.)

pN0 (i+)	Изолированные опухолевые клетки (одиночные клетки или опухолевые депозиты). Не более чем 0,2 мм и не более чем 200 клеток.
pN0 (mol+)	Наличие молекулярных маркеров опухоли, определяемых ПЦР. Отсутствие ИОК. NCCN Guidelines v.4.2018 Breast Cancer
pN1mi	Метастаз более чем 0,2 мм и/или более чем 200 клеток, но не более чем 2,0 мм.
pN1a	Макрометастазы в 1-3 лимфатических узлах, как минимум 1 метастаз больше, чем 2,0 мм.
pN2a	Метастазы в 4-9 лимфатических узлах, как минимум 1 метастаз больше, чем 2,0 мм.
pN3a	Метастазы в 10 и более подмышечных лимфатических узлах, как минимум 1 метастаз больше, чем 2,0 мм.

При исследовании непораженных ЛУ при окраске ИГХ-методом, метастатическая карцинома была выявлена в 12–29% случаев. В 2000 году колледж американских патологоанатомов (CAP) сделал консенсусное заявление, в

котором рекомендовал окрашивание одного среза Г-Э, из каждого блока ЛУ, без обязательного использования ИГХ. Это заявление было основано на исследовании John Wayne Cancer Center, где не было обнаружено различий в пятилетней БРВ больных, у которых СЛУ не были поражены, при окраске Г-Э и ИГХ-методом, и в группе, где в СЛУ не было достоверных признаков поражения при окраске Г-Э, но имелись положительные признаки при ИГХ- исследовании [51]. Среди пациентов, которым выполнялась подмышечная лимфодиссекция (ПЛД) при пораженных СЛУ, при плановом гистологическом исследовании в регионарной клетчатке в 48,3% случаев был обнаружен хотя бы 1 макрометастаз. Ретроспективно в подмышечной клетчатке в 9–15% случаев найдены ИОК, а в 15–35% случаев — микрометастазы. ПЛД выполнялась только при стадии pN1mi или при наличии макрометастазов, но не для pN0 (i +) [52].

В 2005 году были опубликованы рекомендации Американского общества клинической онкологии (ASCO) по выполнению биопсии СЛУ при первично-операбельных формах РМЖ. Рекомендации были основаны на обзоре литературы одного проспективного рандомизированного контролируемого исследования, 4 метаанализов, 69 опубликованных одноцентровых и многоцентровых испытаний. Только биопсия СЛУ без радикальной ПЛД считается стандартом лечения у пациентов с непораженным СЛУ. Выполнение ПЛД является стандартным лечением тех пациентов, у которых были выявлены макро- и микрометастазы в СЛУ для опухолей T1 и T2. Биопсия СЛУ не рекомендуется при всех формах РМЖ стадии T3 и T4 [53].

По данным SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results) микрометастазы представляют собой важный прогностический фактор. В данном анализе (n=209720) с 1992 по 2003 год, уровень 10-летней выживаемости среди пациентов с pN1, pN1mi и pN0 (i +) составил 73, 77 и 78%, соответственно. Также отмечалось увеличение доли РМЖ с pN1mi с 2,3% до 7% [54].

В исследовании MIRROR (Micrometastases and Isolated Tumor Cells, Relevant and Robust Or Rubbish, de Boer et al., 2009) участвовали три когорты с медианой наблюдения 5,1 года: 865 пациентов с пораженными регионарными

лимфатическими узлами, которые не получали адъювантной ХТ, 865 пациенток с ИОК или микрометастазами в ЛУ, не получавшие адъювантной ХТ и 994 пациентов либо с ИОК, либо с микрометастазами в ЛУ, которые получали адъювантную ХТ. Авторы показали, что при ИОК или микрометастазах в регионарные ЛУ, БРВ была ниже у пациенток, не получавших адъювантную ХТ, в отличие от группы с включением адъювантного лечения [55].

Особый интерес представляют три проспективных рандомизированных исследования, посвященных значению биопсии СЛУ: исследование Национального Хирургического Проекта по изучению онкологических заболеваний молочных желез и кишечника (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project) (NSABP) 32, исследование Американской коллегии онкологических хирургов (ACOSOG) Z0011 и IBCSG 23 -01 Международной исследовательской группы по изучению РМЖ.

По данным рандомизированного исследования 3 фазы NSABP B-32 (n=5611) все пациенты были разделены на 2 группы. В группе 1 выполнялась биопсия СЛУ с последующей ПЛД, а в группе 2 ПЛД выполнялась лишь в том случае, когда СЛУ оказывался пораженным. Длительность наблюдения составила 95,6 месяца, а конечной точкой являлась ОВ. Авторы не обнаружили различий в ОВ и БРВ между двумя группами.

В исследовании NSABP B-32 также рассматривалось клиническое значение «оккультных метастазов»: сравнивая группы pN0, pN0 (i+) и pN1mi, где также не было достоверной разницы в ОВ этих групп в течение 5-летнего периода наблюдения. Авторы пришли к выводу, что дополнительная оценка, включая применение ИГХ метода и многоуровневое исследование СЛУ, не обязательна, поскольку клиническая значимость полученных результатов не имела значения [56-57].

В 2011 году были представлены результаты рандомизированного исследования ACOSOG Z0011 (n=813), в котором предполагалось доказать, что выполнение ПЛД не является обязательным для больных РМЖ с T1 и T2, при поражении одного или двух СЛУ. Все пациенты в этом исследовании получали

адьювантную ЛТ. Группы были рандомизированы следующим образом: 388 больных с ПЛД и 425 пациентов без ПЛД. Критика исследования ACOSOG Z0011 заключалась в том, что выбор случая был предвзятым по отношению к женщинам пожилого возраста, преимущественно с положительными опухолями по рецепторному статусу (ER) (молодые женщины с отрицательными ER-опухолями были не полностью представлены), короткое время наблюдения (6,3 года).

Многоцентровое рандомизированное исследование 3 фазы IBCSG 23-01 включало пациентов с размером опухолевого узла менее или равным 5 см, разделение на pN0 (i+) и pN1mi без экстракапсулярной инвазии СЛУ при световой микроскопии (n=464), у которых была выполнена ПЛД, и группы без ПЛД (n=467) со средней медианой наблюдения 5 лет. Результат был аналогичен исследованию ACOSOG Z0011. ПЛД не является обязательной, поскольку не оказывает неблагоприятного воздействия на ОВ [58]. Кроме того, Европейская организация по исследованию и лечению рака (EORTC) также подтвердила выводы ACOSOG Z0011 о том, что нет никаких различий между ПЛД и ЛТ регионарных зон у пациентов с положительным СЛУ при использовании в дальнейшем ХТ или ГТ [59].

В другом рандомизированном многоцентровом исследовании POSNOC рассматривается применение только адьювантной терапии в сравнении ПЛД/ЛТ. Таким образом, выполнение ПЛД не обеспечивает преимущества в ОВ и БРВ при пораженном СЛУ (pN0 (i+) и pN1mi). Даже макрометастазы в одном или двух СЛУ в исследовании ACOSOG Z0011 не влияли на ОВ. Существуют убедительные доказательства того, что биопсия СЛУ сама по себе может быть стандартной практикой, демонстрирующей ее эффективность, точность и эквивалентный результат выживания больных по сравнению с выполнением ПЛД и биопсией СЛУ только при раке молочной железы T1-T2 [60].

На сегодняшний день понимание клинической и прогностической значимости микрометастазов и ИОК остается ограниченным [61-64].

1.4 Размер опухоли

Размер опухоли является важным прогностическим фактором, связанным с БВ и ОВ больных РМЖ [65-66]. Риск рецидива заболевания увеличивается пропорционально увеличению размера опухоли. Гистологическая оценка размера опухоли является более важной и значимой, чем клиническая оценка. Размер опухоли - это размер только компонента инвазивной карциномы.

Считается, что риск развития метастазов монотонно возрастает с увеличением размера опухоли, в связи с большой опухолевой массой, которая прямо ассоциирована с ростом риска метастазирования [67].

На сегодняшний день в большинстве исследований [68-69] сообщается о корреляции между размером первичной опухоли и вероятностью метастазирования как в ЛУ, так и в другие органы. Опухоли ранжируют по размеру следующим образом: опухоли размером менее 1,0 см. и более 5,0 см. Опухоли от 1,0 до 5,0 см. занимают промежуточное положение, так как по данным исследований [68] нет четкой корреляции между частотой метастазирования и данным диапазоном размеров, в отличие от опухолей менее 1,0 см. или более 5,0 см. Появляется все больше фактов, свидетельствующих о том, что риск метастазирования в значительной степени определяется внутренней биологией РМЖ, а не временем постановки диагноза в рамках клинического окна и размером опухолевого узла [69-72].

В исследовании Orang et al. [73] изучена взаимосвязь между размером опухоли и вовлечением подмышечных ЛУ у пациентов с инвазивным РМЖ для отбора кандидатов к выполнению радикальной ПЛД. Авторы установили, что 84,3% пациентов с размером опухолевого узла ≥ 2 см имели метастазы в регионарные ЛУ, поэтому наилучшим лечением для этой группы было выполнение радикальной ПЛД. Для пациентов с размером опухолевого узла ≤ 2 см решение о выполнении радикальной ПЛД остается открытым.

1.5 Лимфоваскулярная инвазия

Наличие опухолевых эмболов в лимфоваскулярных пространствах взаимосвязано с размером опухоли и состоянием ЛУ и является независимым прогностическим фактором ОВ и БРВ. Для практических целей инвазии лимфатических и кровеносных сосудов рассматриваются вместе, потому что их разделение не имеет прогностического значения. Значительные различия в частоте встречаемости ЛВИ (20–55%), скорее всего, связаны с выбором критериев, использованных для ее идентификации [74-75].

ИГХ-исследование с использованием эндотелиальных маркеров может нести дополнительную информацию о ЛВИ, но в рутинной практике нет целесообразности в этом исследовании, а сами результаты следует интерпретировать с осторожностью [76].

В исследовании Shen et al. [77] было установлено, что наличие ЛВИ является предиктором метастатического поражения регионарных ЛУ. Однако данный морфологический критерий до сих пор не включен в международную систему стадирования TNM. ЛВИ является доступным морфологическим маркером, который определяется с помощью окрашивания Г-Э, поэтому ее необходимо указывать в заключительном диагнозе для дополнительного клинического типирования РМЖ. Кроме того, терапия, направленная на подавление механизма ангио- и лимфангиогенеза может стать новой терапевтической мишенью для РМЖ.

1.6 Гистологический тип и степень злокачественности опухоли

Инвазивные карциномы молочной железы классифицируются на основании их морфологических особенностей: строения и характера роста (гистологического типа), а также степени злокачественности. Гистологический тип и степень злокачественности являются прогностическими факторами, коррелирующими с молекулярно-биологическими особенностями опухоли [78]. Выявление специальных гистологических типов позволяет дополнительно уточнить прогноз клинического исхода. CAP (ассоциация американских патологоанатомов)

рекомендует использовать систему классификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), которая выделяет 20 различных гистологических типов. В большинстве случаев РМЖ не имеет специфических гистологических особенностей и классифицируется как инвазивная протоковая карцинома неспецифического типа [78]. Некоторые гистологические типы имеют различное клиническое поведение и связаны с особенно благоприятным прогнозом. Тубулярный, крибриформный, муцинозный и аденокистозный рак имеют хороший прогноз [79-82]. Строгие диагностические критерии должны использоваться для обеспечения точности диагностики и, следовательно, прогнозирования результата.

Другие гистологические виды РМЖ имеют неблагоприятный прогноз. К ним относятся метапластический рак и инвазивный микропапиллярный рак [83-89]. Однако существуют гистологические типы, которые не имеют прогностического значения, но связаны с определенной молекулярно-биологической характеристикой и специфическим клиническим поведением. Например, ИДР, который чаще бывает двусторонний и многоочаговый, чем другие гистологические типы. Этот тип РМЖ чаще встречается у пожилых пациентов, он имеет большой размер опухолевого узла, положительный по РЭ и РП и отрицательный по HER2 статусу.

В исследовании Ashturkar et al. [90] показано, что при ИДР поражение регионарных ЛУ было чаще по сравнению с ИР НСТ, тубулярный и слизистый рак. Это подчеркивает тот факт, что гистологический тип опухоли может быть использован в качестве полезного маркера для прогнозирования статуса аксиллярных ЛУ. К гистологическим подтипам РМЖ с благоприятным прогнозом, при которых чаще всего отсутствует поражение регионарных ЛУ, относятся тубулярный, коллоидный, медуллярный и крибриформный рак [91]. Кроме того, в этом исследовании [90] была зависимость между степенью злокачественности опухоли и метастазами в подмышечных ЛУ. У больных РМЖ с опухолями G2 и G3 достоверно чаще определялось поражение аксиллярных ЛУ, чем у пациентов с G1. Для оценки степени злокачественности использовалась

Ноттингемская комбинированная гистологическая система [92]. Также отмечено увеличение частоты метастазирования и риска смерти от диссеминированной формы заболевания по сравнению с пациентами с опухолью низкой степенью злокачественности.

1.7 Рецепторный статус

Эстроген и прогестерон являются двумя важными эндокринными молекулами, которые отвечают за нормальное развитие и функционирование всей репродуктивной системы, молочной железы и играют критическую роль в онкогенезе [93-95]. Уровень РЭ и РП в клетках РМЖ имеет прямую связь с возрастом пациента и обратную с гистологическим типом, скоростью пролиферации и гиперэкспрессией HER2 [96-97]. Оценка РЭ и РП является обязательным компонентом морфологической оценки РМЖ [98-101]. Основная клиническая польза этих маркеров заключается в прогнозировании реакции на гормональную терапию.

Отрицательный рецепторный статус опухоли в значительной степени связан с низким риском метастазирования в аксиллярные ЛУ. Наличие рецепторов стероидных гормонов в опухоли представляет собой относительно слабый прогностический фактор для пациентов больных РМЖ. В одном из исследований [102] выявлено, что частота поражения сторожевого ЛУ не зависела от негативного рецепторного статуса. В другом исследовании [103] показано, что уровни РЭ и РП не влияли на частоту метастатического поражения аксиллярных ЛУ.

1.8 Оценка экспрессии HER2

Крупные исследования показали, что амплификация гена *HER2* и избыточная экспрессия ассоциированного с ним белка присутствуют в 15–20% случаев РМЖ и ассоциированы с высокой гистологической степенью злокачественности, отрицательным статусом РЭ, высокой скоростью пролиферации и агрессивным клиническим течением с неблагоприятным исходом [97-102]. У пациентов с HER2 -положительной опухолью прогноз значительно

хуже, чем у пациентов без экспрессии HER2. Однако HER2 не имеет достаточного прогностического значения для использования в клинической практике в качестве прогностического фактора. Важность определения Her2 в клинической практике была подчеркнута разработкой анти-Her2 терапии [104-108].

В исследовании Ahmed et al. [109] доказано, что экспрессия HER2 ассоциируется со значительно более высоким риском метастазирования в аксиллярные ЛУ независимо от размера опухоли, степени злокачественности, гормонального статуса или молекулярно-биологического подтипа.

1.9 Индекс пролиферации

Способность опухоли к пролиферации является одним из важных ее биологических характеристик и отражает дисбаланс клеточной пролиферации и апоптоза. Существует много различных методов оценки пролиферации опухолей: митотическое число, индекс мечения тимидином, клеточная фракция в S-фазе клеточного цикла, ИГХ определение специфических антигенов клеточного цикла, таких как Ki-67, ядерный антиген пролиферирующих клеток, альфа-топоизомераза II, митозин и циклины [103]. Количество митозов обычно выражается числом митозов при световой микроскопии (x400, в 10 полях зрения). Некоторые технические и аналитические факторы, такие как фиксация тканей, влияют на подсчет фигур митоза, однако многие исследования показали, что это является независимым прогностическим фактором. Подсчет фигур митоза является наиболее экономически эффективным и простым методом оценки пролиферации опухоли, и учитывается в классификации РМЖ.

ИГХ метод определения индекса пролиферации является основным и имеет ряд преимуществ. Индекс мечения Ki-67 представляет собой процент опухолевых клеток, которые являются позитивными по ядерному окрашиванию данного белка. Ki-67 коррелирует с клеточной фракцией в S-фазе и митотической активностью, поэтому является независимым прогностическим фактором для РМЖ. Высокий индекс Ki-67 при постановке диагноза обычно связан с менее благоприятными факторами прогноза и клиническим течением [110-111].

Несмотря на то, что определение пролиферации дает важную прогностическую информацию, оптимальный метод для использования в клинической практике не был определен. Из-за отсутствия стандартизации методов оценки, ни CAP, ни ASCO не одобряют специальный тест для оценки пролиферации опухоли. Предельное значение для Ki-67 остается неопределенным.

1.10 Молекулярно-биологические подтипы

В 2000 году Peru et al. [112] исследовали молекулярную панель РМЖ, продемонстрировав, что молекулярная сигнатура РМЖ определяется экспрессией набора генов в каждой опухоли, и что характерные генетические признаки могут предсказывать клинический исход заболевания. Sorlie et al. [112] подразделили РМЖ на следующие молекулярные подтипы: люминальный А, люминальный В, HER2-положительный, базальноподобный. Они продемонстрировали, что молекулярные подтипы были прогностическими, при этом опухоли люминального А подтипа имели лучший прогноз, а базальноподобные и HER2-позитивные подтипы имели неблагоприятный прогноз [113].

Люминальные типы рака молочной железы имеют индолентное клиническое течение. У них низкий процент отдаленных метастазов, даже через 10–15 лет после установления диагноза, однако люминальный В подтип имеет более агрессивное клиническое течение и требует такого же подхода к лечению, обычно требующего как гормональной терапии, так и химиотерапии. HER2-позитивный подтип РМЖ имеет неблагоприятное клиническое течение, однако они очень хорошо реагируют на анти-HER2 терапию. Базальные типы рака молочной железы имеют плохой прогноз; они имеют тенденцию рецидивировать в течение первых 3 лет после постановки диагноза, и в настоящее время нет конкретных целевых методов лечения для них.

В исследовании Si et al. [114] было показано, что вовлечение аксиллярных ЛУ является неотъемлемой характеристикой молекулярного подтипа РМЖ. Так, ТН РМЖ и люминальный В HER2-позитивный подтип имеют наибольшую и наименьшую вероятность метастазирования в подмышечные ЛУ, соответственно.

1.11 Диссеминированные и циркулирующих опухолевых клетки как факторы прогноза

В клинической практике у больных с первично-операбельными формами РМЖ и низким риском развития локорегиональных рецидивов и отдаленных метастазов все же отмечаются случаи прогрессирования болезни, несмотря на относительно благоприятные клинические и морфологические характеристики после проведения адъювантного лечения. С другой стороны, у пациентов с высоким риском развития неблагоприятных исходов болезни после проведения системного и/или местного лечения таких события может и не наблюдаться. Существующее большое число прогностических факторов не могут в полном объеме ответить на эти вопросы. Поэтому до сих пор продолжается поиск новых факторов прогноза для выявления ранних рецидивов и отдаленных метастазов у больных РМЖ.

В настоящее время, для определения опухолевой нагрузки до лечения и остаточной минимальной болезни после проведенного лечения, существует удобная и неинвазивная диагностическая опция, как определение диссеминированных опухолевых клеток (ДОК) в костном мозге и/или циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) в периферической крови.

ДОК - эпителиальные клетки в костном мозге, которые также расцениваются как микрометастазы в костном мозге. ДОК наблюдаются примерно у 30% пациентов с ранней стадией РМЖ. Опухолевые клетки, которые циркулируют в периферической крови больных раком, называются ЦОК. ЦОК - это клетки, которые вышли в периферическое кровообращение после отделения от первичной опухоли или ее метастазов. ДОК и ЦОК можно использовать для прогнозирования БРВ и ОВ, а также ответа на лечение [115].

1.12 Определение микрометастазов в костном мозге

В костном мозге ДОК представлены эпителиальными клетками, которые интерпретируются как микрометастазы, и стадируются как М1. ИГХ метод является самым распространенным методом, используемым для выявления

микрометастазов в костном мозге. Морфологически ДОК представлены большими клетками с крупным гиперхромным ядром и множественными нуклеолами, но чаще всего это недифференцированные клетки неясного происхождения, что заставляет морфолога сделать предположение о их негемопозитической природе данных клеток. Положительная реакция как минимум одной клетки на цитокератины (СК) в костном мозге расценивается как ДОК [116].

Прогностическое значение ДОК, обнаруженных в костном мозге после адьювантной ХТ, связано с плохим прогнозом и отрицательной корреляцией с выживаемостью пациентов [117]. Эти результаты подкреплялись исследованиями, в которых пациентам проводилась адьювантная и неoadьювантная ХТ [118-119].

Обнаружение ДОК до хирургического вмешательства на ранней стадии заболевания также является независимым прогностическим фактором и связано с ухудшением ОВ [121-123]. Большинство исследований продемонстрировали корреляцию между ДОК и другими прогностическими факторами, такими как размер опухоли, степень дифференцировки и поражение ЛУ.

По данным мета-анализа, включающего данные 4703 пациентов, частота выявления ДОК у больных РМЖ составляет приблизительно 31% [123]. Эти пациенты, как правило, имели большие размеры опухолевого узла, отрицательный рецепторный статус и наличие метастазов в ЛУ. Наличие микрометастазов в костном мозге у пациентов с начальными стадиями заболевания до начала проведения лечения было независимым неблагоприятным прогностическим фактором для БРВ и ОВ. Уровень смертности у пациентов с микрометастазами в 2,4 раза выше, чем у пациентов без микрометастазов [124].

Однако не во всех исследованиях обнаружена прогностическая ценность ДОК в костном мозге.

Molino et al. обнаружили, что 10-летняя ОВ и БРВ пациентов, у которых определялись микрометастазы в первом образце аспирата костного мозга, не отличались у пациентов без микрометастазов [125].

В исследовании Falck et al., проведенном в Швеции, ДОК были обнаружены в костном мозге у 38 % из 401 пациентов [126]. Характеристики опухоли были схожи у пациентов с обнаруженными ДОК и без них. Обнаружение ДОК не являлось прогностическим фактором, влияющим на БРВ и ОВ. Эти результаты не подтверждают результаты предыдущих исследований. В исследовании, выполненном Hartkopf et al., были проанализированы данные 3141 пациентов. ДОК были обнаружены у 26% пациентов. У пациентов с положительными ДОК в костном мозге наблюдались большой размер опухолевого узла, поражение аксиллярных ЛУ, а также экспрессия HER2/neu. Наличие ДОК до хирургического вмешательства приводит к уменьшению показателей ОВ и БРВ. Обнаружение ДОК на ранней стадии у больных РМЖ оказалось независимым прогностическим фактором ОВ и БРВ. Однако ДОК не были обнаружены приблизительно у половины пациентов, и возникновение рецидива может случиться у пациентов без выявленных ДОК [123].

В исследовании Naume et al. была определена корреляция между молекулярно-биологическими подтипами РМЖ и наличием ДОК в костном мозге [120]. Наличие ДОК у больных с люминальным А подтипом коррелирует с худшими показателями ОВ и БРВ по сравнению с другими группами. Самый низкие показатели наблюдались у больных с базальноподобным подтипом. Однако для всех подтипов риск рецидива был значительно выше у пациентов с положительными ДОК, чем в группе, где ДОК не определялись.

Прогностическое значение микрометастазов в костном мозге при РМЖ проиллюстрировано в таблице 4.

Таблица 4 – Прогностическая значение микрометастазов в костный мозг

	Год	N	Метод	Значимость (%)	Прогностическое значение	Результат
Braun et al. [120]	2005	4703	ИГХ	31	БРВ, ОБРВ, ОВ	положит.
Bidard et al. [118]	2008	621	ИГХ	15	ВБП, ОВ	положит.

Molino et al. [122]	2008	125	ИГХ	31	БРВ, ОВ	отрицат.
Falck et al. [123]	2012	401	ИФ, ИГХ	38	ОБРВ, ОВ	отрицат.
Hartkopf et al. [124]	2014	3141	ИГХ	26	БРВ, ОВ	положит.

Несмотря на данные о том, что микрометастазы в костном мозге являются прогностическим фактором выживаемости, в настоящее время клиническая ценность ДОК остается неясной.

1.13 Диссеминированные и циркулирующие опухолевые клетки

Аспирационная биопсия костного мозга, которая используется для выявления ДОК, является инвазивной процедурой и зачастую болезненной. Альтернативным методом исследования опухолевых клеток в костном мозге, стало исследование ЦОК в периферической крови. Однако остается неясным, являются ли ДОК теми же самыми клетками, что и ЦОК. На настоящий момент достоверность этой гипотезы была установлена в клинических исследованиях [127-129], в которых была показана положительная корреляция между ДОК и ЦОК.

Данные результаты были подтверждены в недавно проведенном исследовании, где для определения ЦОК использовался AdnaTest [130]. Даже если эти результаты подтверждают возможность того, что ДОК и ЦОК могут быть одними и теми же клетками, доказательства этого остаются недостаточными.

1.14 Определение ЦОК при РМЖ

Увеличивающийся объем данных свидетельствует о том, что небольшая популяция ЦОК имеет характеристики стволовых опухолевых клеток [115, 123]. Эти стволовые ЦОК могут обладать специфическими особенностями, позволяющими им выживать в кровотоке и вызывать метастатические поражения [123]. ЦОК в периферической крови у пациентов со злокачественными новообразованиями впервые были описаны в 1869 году Томасом Эшворфом

(Thomas Ashworth). В настоящее время исследователями большое внимание уделяется молекулярным характеристикам и прогностическому значению ЦОК при различных опухолях [131]. Следует также отметить, что определение ЦОК может помочь лучше понять биологию опухолей и процессы метастазирования у онкологических больных [132-133]. Первичное определение ЦОК может дать полезную информацию о прогнозе и эффективности лечения.

Потенциальными преимуществами выявления ЦОК являются:

- Оценка риска метастазирования или опухолевой прогрессии
- Мониторинг эффективности лечения
- Идентификация механизмов устойчивости
- Понимание биологии метастазирования
- Прогноз ОВ и БРВ

Однако многие вопросы, включая вопрос об оптимальном методе определения количества и характеристик ЦОК, остаются без ответа [134].

Система CellSearch (Veridex LLC, Raritan, NJ, USA), полуавтоматический метод обнаружения и подсчета ЦОК при РМЖ, колоректального рака и рака предстательной железы, одобренная Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA) [135-137]. Для выявления ЦОК достаточно 7,5 мл образца периферической крови. ЦОК подвергаются детекции с использованием антител, направленных на взаимодействие с тремя белками: цитокератином (СК), адгезивной молекулой эпителиальных клеток (ЕpCAM), и CD45. Кроме того, ядра клеток флуоресцентно окрашиваются ядерным красителем DAPI (4', 6-диамидино-2-фенилиндола). ЦОК определяются как положительные клетки, экспрессирующие ядерные и эпителиальные антигены к молекулам адгезии эпителиальных клеток (ЕpCAM) и СК, но отрицательные по экспрессии к CD45. Обнаружение, по крайней мере, одной ЦОК на 7,5 мл образца крови считается положительным результатом. Преимущества и недостатки определения ЦОК приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Преимущества и недостатки определения ЦОК

Преимущества	Недостатки
Минимальная инвазивность процедуры взятия анализа	Дороговизна исследования
Мониторинг ответа на лечение	Трудность выделения опухолевых клеток
Использование в качестве прогностического маркера	Требуется опытный персонал и специальное оборудование
	Диагностическое значение не определено

В настоящее время существуют большое количество методик определения ЦОК, однако они не одобрены ни FDA, ни в нашей стране. К этим технологиям относятся: AdnaTest (AdnaGen AG, Langerhagen, Germany), MACS (magnetic activated cell sorting system), MagSweeper [138-139]. При использовании AdnaTest, ЦОК определяются с помощью антител к EpCAM and MUC1 [140]. Muller et al. обнаружили, что система CellSearch превосходит AdnaTest у пациентов с метастатическим РМЖ [141]. В то же время, другое исследование продемонстрировало, что системы CellSearch и CTC-Chip были одинаково эффективны [142]. Несмотря на то, что ЦОК могут привести к получению прогностической информации у больных РМЖ, их ценность в качестве прогностического маркера также не ясна. Исследования, посвященные прогностическому значению ЦОК, были сфокусированы на всех стадиях РМЖ. ЦОК были обнаружены в крови даже у тех пациентов, у которых не обнаружены метастазы по данным инструментальных методов исследования. Прогностическое значение обнаружения ЦОК у больных РМЖ показано в таблице 6.

Таблица 6 – Прогностическое значение обнаружения ЦОК у больных РМЖ

Авторы	Год	N	Метод	Частота обнаружения (%)	Прогностическая ценность	Результат
Не метастатический РМЖ						
Xenidis et al. [140]	2006	167	ПЦР	22	БРВ, ОВ	Прогностический и предиктивный фактор
Ignatiadis et al. [141]	2007	444	ПЦР	41	БРВ, ОВ	Предиктивный фактор
Pierga et al. [117]	2008	118	CellSearch	23	БРВ	Прогностический фактор для ранних рецидивов
Rack et al. [142]	2010	2026	CellSearch	22	БРВ, ОВ	Прогностический фактор
Bidard et al. [143]	2010	115	CellSearch	23	БРВ, ОВ	Предиктивный фактор
Franken et al. [144]	2012	404	CellSearch	19	БРВ	Прогностический фактор
Lucci et al. [145]	2012	302	CellSearch	24	БПВ, ОВ	Прогностический фактор
Метастатический РМЖ						
Cristofanilli et al. [132]	2004	177	CellSearch	49	БПВ, ОВ	Предиктивный фактор
Hayes et al. [146]	2006	177	CellSearch	54	БПВ, ОВ	Предиктивный фактор БПВ
Giuliano et al. [147]	2011	235	CellSearch	40	БПВ, ОВ	Прогностический фактор
Müller et al. [138]	2012	254	CellSearch	50	БПВ, ОВ	Предиктивный фактор
			AdnaTest	40		
Giordano et al. [148]	2012	517	CellSearch	40	БПВ, ОВ	Предиктивный фактор
Pierga et al. [149]	2012	267	CellSearch	44	БПВ, ОВ	Предиктивный фактор
Wallwiener et al. [150]	2013	468	CellSearch	42	БПВ, ОВ	Прогностический фактор
Jiang et al. [151]	2013	294	CellSearch	77	БПВ, ОВ	Прогностический фактор
Smerage et al. [152]	2014	595	CellSearch	54	БПВ, ОВ	Прогностический фактор
Wallwiener et al. [153]	2014	393	CellSearch	34	БПВ, ОВ	Предиктивный фактор
Giuliano et al. [154]	2014	492	CellSearch	62	ОВ	Предиктивный фактор

1.15 Определение ЦОК при ранних стадиях РМЖ

ЦОК могут быть обнаружены на ранних стадиях заболевания РМЖ, и их наличие коррелирует с высоким риском рецидивирования заболевания [145, 158-160]. Многочисленные клинические исследования установили прогностическое значение ЦОК на ранних стадиях РМЖ. Эти исследования были проведены среди пациентов, получавших неоадъювантную и адъювантную ХТ. В исследованиях наличие ЦОК в периферической крови коррелирует с ухудшением показателей ОВ и БРВ [143, 161-162]. В эти исследования были включены пациенты, получавшие ХТ как в неоадъювантном, так и адъювантном режиме. Наличие ЦОК ≥ 1 был прогностическим маркером в прогнозировании ОВ у пациентов, получивших неоадъювантную ХТ [118]. Наличие ЦОК ≥ 5 в 7,5 мл периферической крови было предиктором снижения показателей ОВ в группе люминального В подтипа (HER2-негативный), которые получали адъювантную ХТ [144]. Кроме того, наличие ЦОК было связано с ранним рецидивом и снижением ОВ у больных, которые не получали ХТ [148].

В большом многоцентровом проспективном рандомизированном исследовании SUCCESS Rack et al. [119] использовали систему CellSearch для выявления ЦОК до и после проведения ХТ. Исходно ЦОК были обнаружены у 21,5% из 2026 пациентов на ранних стадиях РМЖ до проведения ХТ, и у 22,1% из 1492 пациентов после завершения ХТ. Авторы пришли к выводу, что не было никакой связи между наличием ЦОК и такими характеристиками опухоли как, размер первичной опухоли, степень дифференцировки и рецепторный статус. Тем не менее, они показали, что наличие ЦОК до системной ХТ было независимым прогностическим фактором для ОВ и БРВ, и что наличие ЦОК было связано с плохим прогнозом. У ЦОК-положительных пациентов показатель БРВ составил 88,1%, тогда как у ЦОК-отрицательных пациентов он составил 93,7% (период наблюдения 36 месяцев). Аналогичным образом, показатель смертности был значительно выше у ЦОК-положительных пациентов, чем у ЦОК-негативных пациентов (40,9% против 20,8%, соответственно). Кроме того, эти авторы также проанализировали прогностическую ценность ЦОК у пациентов с ранним РМЖ.

Показатели ОВ и БРВ после завершения ХТ были достоверно ниже у ЦОК-позитивных пациентов, чем в негативной группе по ЦОК (85,9% против 93,9% для БРВ и 92,8% против 97,6% для ОВ, соответственно).

Кроме того, прогностическое значение ЦОК определялось у пациентов на ранних стадиях РМЖ до хирургического лечения в двух разных исследованиях [147-148].

В исследовании Franken В, было включено 404 больных РМЖ I-III стадии, ЦОК были обнаружены примерно в 20% случаев до хирургического лечения [147]. В другом исследовании Lucci et al. ЦОК определялись до операции у 24% пациентов [148]. Оба исследования показали, что наличие ЦОК до операции связано с увеличением частоты раннего рецидива и повышенным риском смерти. Эти результаты были подтверждены в многочисленных небольших исследованиях. ЦОК были обнаружены в 18–30% случаев на ранних стадиях РМЖ [146, 159, 163-164]. Частота обнаружения ЦОК на ранних стадиях РМЖ ниже, чем у пациентов с метастатической болезнью [119, 135, 165].

Наличие ЦОК и его прогностическое влияние также оценивались у пациентов с местно-распространенным РМЖ, получавших ХТ в неоадьювантном режиме. В двух исследованиях III фазы, GeparQuattro и GeparQuinto, была изучена взаимосвязь между лечебным ответом опухоли на неоадьювантную ХТ и наличием ЦОК [165-166]. В обоих этих исследованиях ЦОК присутствовали примерно у 22% пациентов. Оказалось, что не существует корреляции между наличием ЦОК и лечебным ответом опухоли после проведения неоадьювантной ХТ. Во исследовании REMAGUS02 наличие ЦОК коррелирует с показателями ОВ пациентов, также получавших неоадьювантную ХТ [167]. В проведенном мета-анализе, включающем данные о пациентах с местнораспространенным РМЖ, прошедших курс неоадьювантной ХТ, изменение значения числа ЦОК не имело связи со степенью лечебного ответа опухоли, но имело тенденцию к уменьшению показателей ОВ и БРВ [168].

1.16 ЦОК у больных с метастатической формой РМЖ

Прогностическая роль ЦОК у пациентов с метастатическим РМЖ была изучена во многих исследованиях. Cristofanilli et al. показали, что обнаружение пяти ЦОК в 7,5 мл периферической крови у больных РМЖ является независимым прогностическим фактором для БРВ и ОВ при прогрессировании [135]. Повышение количества ЦОК было связано со значительно более коротким периодом до прогрессирования и ухудшением показателей ОВ по сравнению с ЦОК количеством менее пяти клеток, что позволяет прогнозировать результаты лечения. Несмотря на споры о соответствующем значении для ЦОК, эти же значения были подтверждены в дополнительных исследованиях [149, 169-170]. Наличие ЦОК после ХТ связано с худшим прогнозом и более короткой ВВП и ОВ [171-172]. Количество ЦОК на исходном уровне является независимым прогностическим фактором для ВВП и ОВ при метастатическом РМЖ [154]. Данная тенденция особенно отчетлива наблюдается у больных с HER2-позитивным РМЖ, несмотря на проведенное лечение.

Прогностическая ценность ЦОК связана не только с диссеминацией метастатических очагов, но и с определением микрометастатической болезни. [157, 155 - 157, 151, 173]. Результаты ретроспективного исследования, включающего 492 больных на поздних стадиях, показали, что число метастатических очагов коррелирует с повышением уровня ЦОК ≥ 5 [150]. Авторы сделали вывод о том, что у пациентов с более высоким начальным количеством ЦОК, данный анализ можно использовать в качестве индикатора метастатического потенциала.

Тем не менее, остается неясным, достаточно ли только однократное определение ЦОК для прогнозирования течения заболевания и ответа на лечение. Некоторые клинические исследования указывают на то, что для прогнозирования следует проводить последовательное измерение ЦОК в процессе лечения [149, 152, 156, 157, 174-175].

Wallwiener et al. показали, что последовательное измерение ЦОК было более эффективным в качестве прогностического показателя и полезными для

терапевтического мониторинга метастатического РМЖ [153]. Авторы обнаружили, что ОВ и БРВ были значительно выше у ЦОК-негативных пациентов по сравнению с ЦОК-позитивными после одного курса лечения. Они рекомендовали, чтобы мониторинг ЦОК проводился до и после очередного курса ХТ. Ухудшение показателей ОВ было отмечено в группе больных, у которых после химиотерапии не наблюдалось снижения количества ЦОК. В исследовании II фазы авторы оценили прогностическую роль ЦОК у HER2-позитивных пациентов с метастазами в головной мозг. ЦОК определялись до лечения и после окончания 1 курса ХТ Лапатинибом и Капецитабином [176]. Доля пациентов с определяемыми ЦОК снизилась с 49 до 18% только после одного курса ХТ. Ответ на ХТ был значительно выше у пациентов, у которых не было выявлено ЦОК на третьей неделе, и общая годовая выживаемость у этих пациентов (84%) была значительно выше, чем у пациентов с ЦОК ≥ 1 (43%).

1.17 ЦОК и молекулярно-биологические подтипы

В своем исследовании Rack et al. показали отсутствие корреляции между наличием ЦОК, гистологическими типами и молекулярными подтипами, включая люминальный, базальноподобный и HER2-позитивный рак [175]. Тем не менее, наличие ЦОК на исходном уровне также было независимым прогностическим фактором, влияющим на БРВ. Во всех подтипах показатели БРВ были значительно хуже у пациентов с поражением лимфоузлов. В исследованиях SUCCESS и EUDRA-CT ЦОК обнаруживались у пациентов с метастазами в ЛУ [177]. Эти исследования показали, что метастатическое поражение ЛУ является независимым прогностическим фактором выживаемости в многофакторном анализе.

В исследование SWOG S0500 было включено 595 пациенток с метастатическим РМЖ. У 276 больных обнаружено незначительное количество ЦОК (менее 5 клеток) и они составили группу А, которая получала 6-8 курсов запланированной ХТ первой линии. Высокое содержание ЦОК в крови перед началом терапии было обнаружено у 319 больных, из них повторное определение ЦОК на 21 день (перед вторым курсом ХТ) было выполнено у 286. Из них у 163

пациенток отмечалось снижение числа ЦОК, и они продолжали получать 6-8 курсов изначально запланированной ХТ (группа В). У 123 больных отмечено повышение количества ЦОК на 21 день по сравнению с исходным, и они были рандомизированы на две группы. Одна группа (группа С1 – 64 больных) продолжала запланированную химиотерапию несмотря на рост ЦОК, а другой (группа С2 – 59 больных) проводили смену режима ХТ. Критериями эффективности были медиана времени до прогрессирования и продолжительность жизни.

Больные с низким содержанием ЦОК продемонстрировали наилучшие отдаленные результаты с медианой продолжительности жизни 35 месяцев для группы А. В группе с высоким содержанием ЦОК и снижением их количества на 21 день (группа В) продолжительность жизни составила 23 месяца. В группе С, в которой наблюдалось повышение ЦОК на 21 день ХТ, продолжительность жизни была наихудшей и составила 12 месяцев. Смена режима ХТ не привела к достоверному улучшению результатов лечения: медиана времени до прогрессирования в группе С1 и С2 составила 3,5 и 4,6 месяцев и статистически не различалась.

Таким образом, авторы сделали вывод, что определение динамики ЦОК на фоне проведения ХТ не может сегодня служить основанием для смены режима ХТ, а высокое содержание ЦОК достоверно ухудшает прогноз у больных метастатическим РМЖ.

Тем не менее ЦОК остаются потенциальным маркером прогноза и эффективности лечения. Вероятно, важно не столько количество, сколько качество ЦОК, которое может быть охарактеризовано с помощью определения фенотипа клеток (содержание рецепторов стероидных гормонов, HER2 статус) [155].

Таким образом, выявление ДОК и ЦОК характеризует наличие минимальной остаточной болезни при РМЖ и связаны с ОБ и БРВ. В отсутствие явных отдаленных метастазов, обнаружение ДОК и ЦОК является сравнимым фактором с такими морфологическими параметрами как размер первичной

опухоли, степень дифференцировки, поражение ЛУ, HER2 и рецепторный статус. Необходимы дальнейшие исследования и научные доказательства, подтверждающие природу и связь ДОК и ЦОК между собой у больных РМЖ.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Дизайн исследования

В основу работы положено ретроспективное исследование клинико-морфологических характеристик 541 больной первично-операбельным РМЖ (Т0-2 – N0-1 – M0), находившихся на обследовании и лечении в ФГБУ «НМИЦ онкологии им Н.Н. Блохина» Минздрава России с 2007 по 2012 гг.

Дизайн исследования включал в себя разделение всех больных на 2 группы в зависимости от поражения аксиллярных ЛУ.

В 1 группу вошли больные, у которых при гистологическом исследовании не было выявлено никаких изменений в регионарных ЛУ (pN0). Во 2 группу включены больные, у которых были выявлены макро- и микрометастазы, а также ИОК, обнаруженные при дополнительном ИГХ исследовании (pN1; pN1mi; pN0 (i+)). Дизайн исследования представлен на рисунке 2.



Рисунок 2 – Дизайн исследования

2.2 Техника выполнения гистологического исследования

С помощью ИГХ метода дополнительно проведены исследования парафиновых срезов регионарных ЛУ у 100 больных первично-операбельным РМЖ с отрицательным статусом ЛУ для выявления субклинических метастазов (микрочелюстных метастазов и ИОК). Для выявления субклинических метастазов с помощью ИГХ метода дополнительно проведены исследования срезов всех удаленных регионарных ЛУ у 100 больных первично-операбельным РМЖ с отрицательным статусом ЛУ. Для ИГХ исследования с парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 4-5 микрон, которые помещали на стеклах, обработанных поли-L-лизинном. Затем материал обрабатывался по общепринятой стандартной методике с использованием полимерных систем детекции и применением антител фирмы CellMarque (Sigma-Aldrich США): PanCK, CK18, ER, PR, HER2, Ki67.

Микрочелюстные метастазы и изолированные опухолевые клетки в ЛУ выявлялись с помощью окраски кератинами (PanCK, CK18). Оценка суррогатного молекулярного подтипа проводилась по результатам ИГХ исследования с ER, PR, HER2, Ki67 в соответствии с версией, представленной на международной конференции в St. Gallen в 2013 году.

2.3 Клиническая характеристика больных первично-операбельным РМЖ

Среди клинических параметров в нашем исследовании рассматривались:

- возраст,
- менструальный статус,
- стадирование по системе TNM,
- виды лечения,
- наличие местных рецидивов,
- наличие отдаленных метастазов.

В 1 группу вошли 353 (65,2%) больных с отрицательным статусом ЛУ по клиническим и морфологическим критериям. Средний возраст больных составил 54 года (от 28 до 82 лет, медиана 55 лет).

Во 2 группу вошли 188 (34,8%) больных с положительным статусом ЛУ по клиническим и морфологическим критериям. Средний возраст больных составил 53 года (от 46 до 61 лет, медиана 53).

По состоянию менструальной функции больные из 1 группы распределились следующим образом: у 133 (37,7%) больных менструальная функция была сохранена, а 220 (62,3%) больных находились в менопаузе. Менопауза более 5 лет отмечена в 12,2% случаев (43 больных). Менее 5 лет наблюдалась в 50,1% случаев (177 больных). Таким образом, в исследованной группе преобладали больные с сохранной менструальной функцией и менопаузой менее 5 лет.

Во 2 группе менструальная функция сохранена у 75 больных (39,9%), 113 (60,1%) находились в менопаузе. В данной группе преобладал только менопаузальный период менее 5 лет. Данные представлены на рисунке 3.

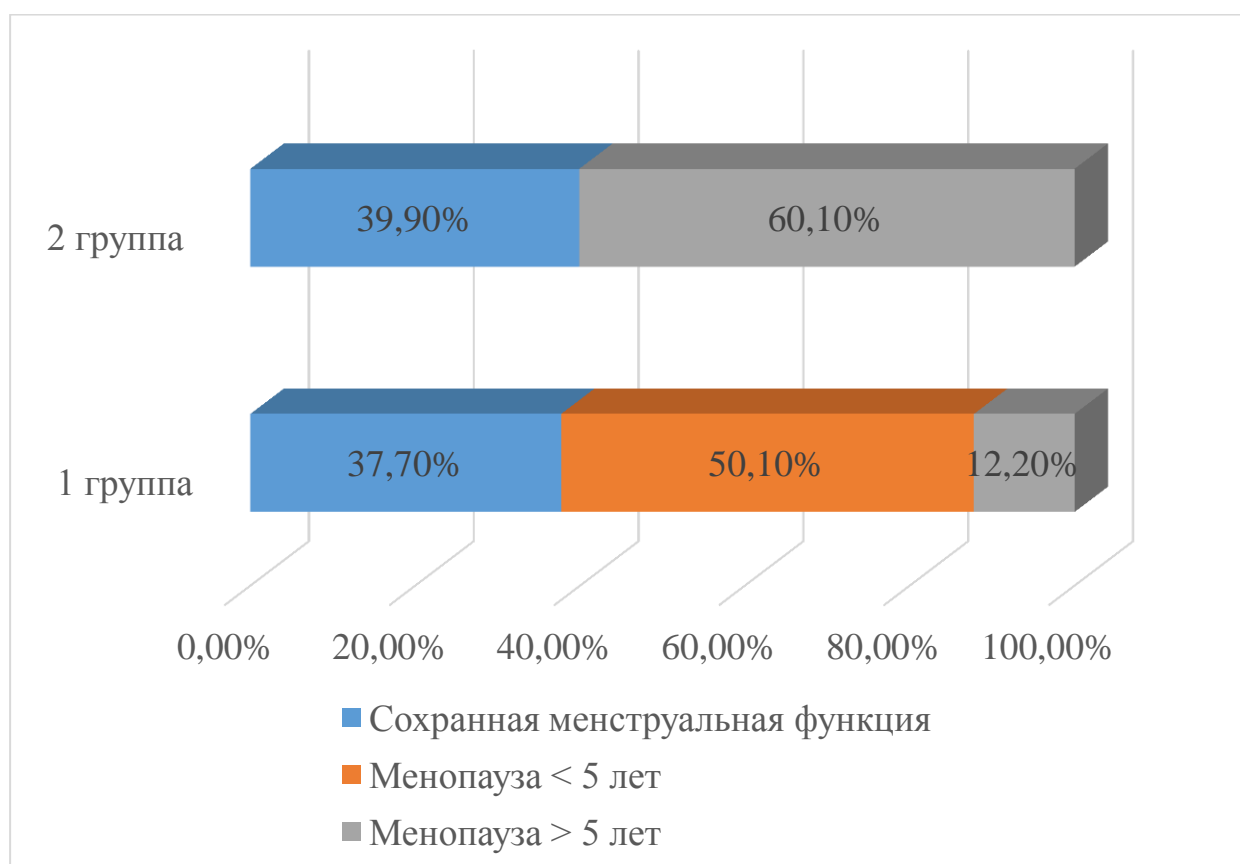


Рисунок 3 – Распределение больных первично-операбельным РМЖ в зависимости от репродуктивного статуса

Распределение больных 1 группы по клиническим стадиям было следующим: IA стадия – 207 (58,6%) больных, ПА стадия – 146 (41,4%) больных. Для 2 группы распределение по клиническим стадиям составило: ПА стадия – 85 (45,2%) больных, ПВ стадия – 103 (54,8%) больных. Распределение больных первично-операбельным РМЖ по системе TNM для 1 и 2 группы представлено в таблице 7.

Таблица 7 – Распределение больных первично-операбельным РМЖ в зависимости от стадии по системе TNM

Стадия TNM	Количество больных			
	1 группа		2 группа	
	Абс.	%	Абс.	%
T1miN0M0	4	1,1	-	-
T1aN0M0	4	1,1	-	-
T1bN0M0	44	12,5	-	-
T1cN0M0	155	43,9	-	-
T1N1M0	-	-	85	45,2
T2N0M0	146	41,4	-	-
T2N1M0	-	-	103	54,8

Всем пациентам на первом этапе лечения проводилось хирургическое лечение.

Среди видов хирургического лечения распределение радикальной мастэктомии (РМЭ) и радикальной резекции (РР) в 1 группе было примерно одинаковы. РМЭ – 187 (53%) больных, РР – 166 (47%) больных. Во второй группе доля РМЭ составила 55,3% (104 больных), РР – 44,7% (84 больных).

Доля комбинированного лечения составила 33,3% (180 больных), комплексного лечения – 62,1% (336 больных), только хирургическое лечение – 4,6% (25 больных).

Химиотерапия, гормонотерапия, таргетная и лучевая терапия применялись как в составе комбинированного, так и комплексного лечения.

Распределение больных по отдельным видам лечения представлено в таблице 8.

Таблица 8 – Виды терапии у больных первично-операбельным РМЖ, входящие в состав комплексного и комбинированного лечения

Вид лечения	1 группа				2 группа			
	Абс.		%		Абс.		%	
	Да	Нет	Да	Нет	Да	Нет	Да	Нет
Химиотерапия	159	194	45,0	55,0	151	37	80,3	19,7
Гормонотерапия	257	96	72,8	27,2	132	56	70,2	29,8
Таргетная терапия	21	332	6,0	94,0	11	177	5,9	94,1
Лучевая терапия	150	203	42,5	57,5	94	94	50,0	50,0

Местные рецидивы были выявлены всего у 22 (4,9%) больных. Частота рецидивов для 1 группы составила 2,8% (10 больных), для 2 группы – 6,4% (12 больных), соответственно.

Послеоперационный рубец был единственной локализацией рецидива у всех больных 1 группы. Для 2 группы частота местного рецидива в послеоперационном рубце составила 5,8% (11 больных), в аксиллярной области – 0,5% (1 больной).

Отдаленные метастазы выявлены у 87 (16,1%) больных. Частота отдаленных метастазов для 1 группы составила 13,9% (49 больных). Основными локализациями отдаленных метастазов являлись: печень - 12,2% (6 больных), легкие - 20,4% (10 больных), кости - 18,4% (9 больных), множественные локализации – 49% (24 больных).

Для 2 группы частота метастазов составила 20,2% (38 больных). Распределение отдаленных метастазов для 2 группы следующее: печень - 15,8% (6

больных), легкие – 31,6% (12 больных), кости - 13,2% (5 больных), надключичные ЛУ – 10,5% (4 больных), множественные локализации – 28,9% (11 человек). Данные по частоте местных рецидивов и отдаленных метастазов представлены на рисунке 4.

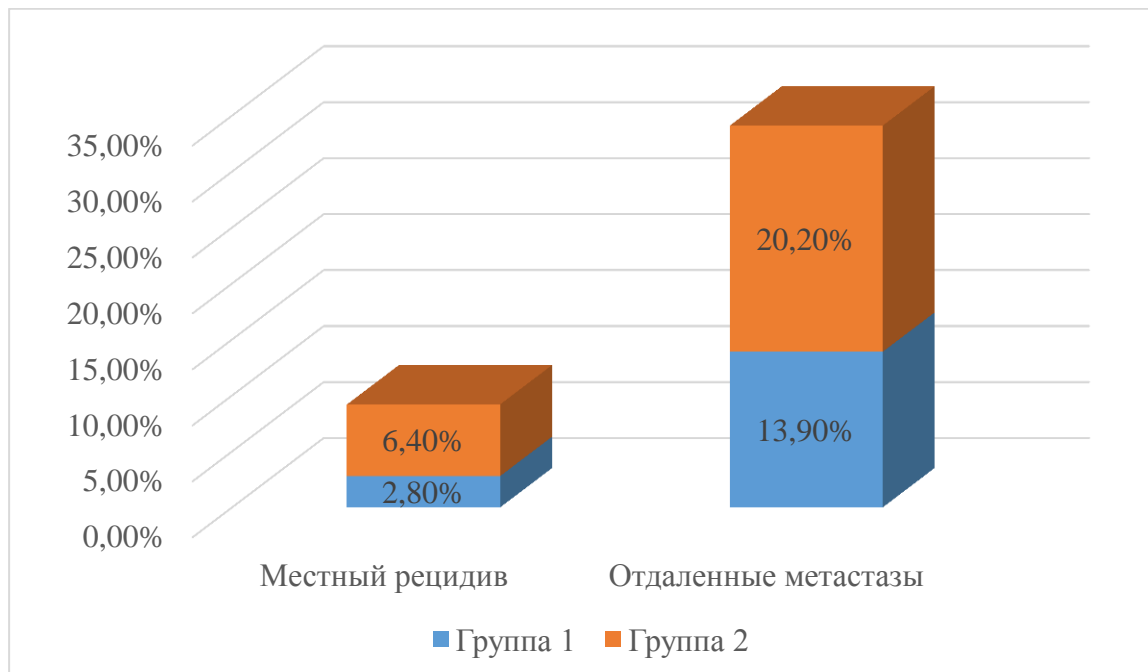


Рисунок 4 – Распределение больных первично-операбельным РМЖ с местными рецидивами и отдаленными метастазами.

2.4 Морфологическая характеристика опухолей больных первично-операбельным РМЖ

Среди морфологических критериев оценивались следующие параметры:

1. число опухолевых узлов,
2. размер первичной опухоли,
3. гистологический тип опухоли,
4. рак *in situ* в окружающей ткани,
5. степень злокачественности опухоли,
6. лимфоваскулярная инвазия,
7. периневральный рост,
8. ИОЛ (инфильтрирующие опухоль лимфоциты),
9. число метастатически пораженных лимфоузлов,

10. число лимфоузлов с прорастанием капсулы.

Оценка молекулярно-биологических особенностей включала в себя определение суррогатного подтипа РМЖ.

Опухоли молочной железы с мультицентрической формой роста по сравнению с унифокальными опухолями, по данным литературы, чаще метастазируют в регионарные ЛУ.

Большинство опухолей имело унифокальный характер – 90,6% (490 больных).

В 1 группе у 330 (93,5%) больных отсутствовала мультицентрическая форма роста. Во 2 группе - у 161 (85,6%) больных. Наличие мультицентричности выявлено у 23 (6,5%) и 27 (14,4%) больных, соответственно.

Средний размер опухоли составил 2,2 см (от 0,2 до 5,0 см, медиана – 2,0 см). Распределение опухолей по размеру представлены на рисунке 5.

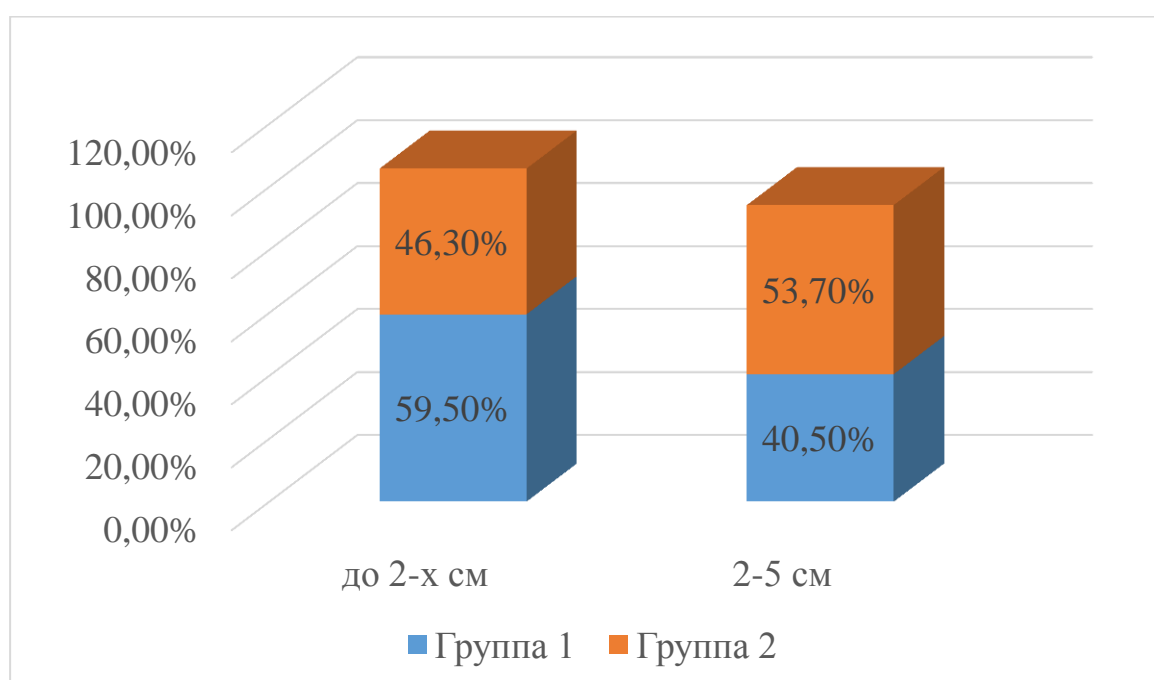


Рисунок 5 – Распределение больных первично-операбельным РМЖ в зависимости от размера опухоли

Среди гистологических типов в 1 группе преобладали: ИР НСТ - 230 (65,2%) больных, ИДР – 59 (16,7%) наблюдений, смешанный рак - 11 (3,1%) больных, редкие формы - 53 (15,0%) больных.

Во 2 группе распределение гистологических типов РМЖ было следующее: ИР НСТ - 144 (76,6%) больных, ИДР - 27 (14,4%) случаев, смешанный рак - 5 (2,6%), редкие формы - 12 (6,4%) больных. Данные представлены на рисунке 6.

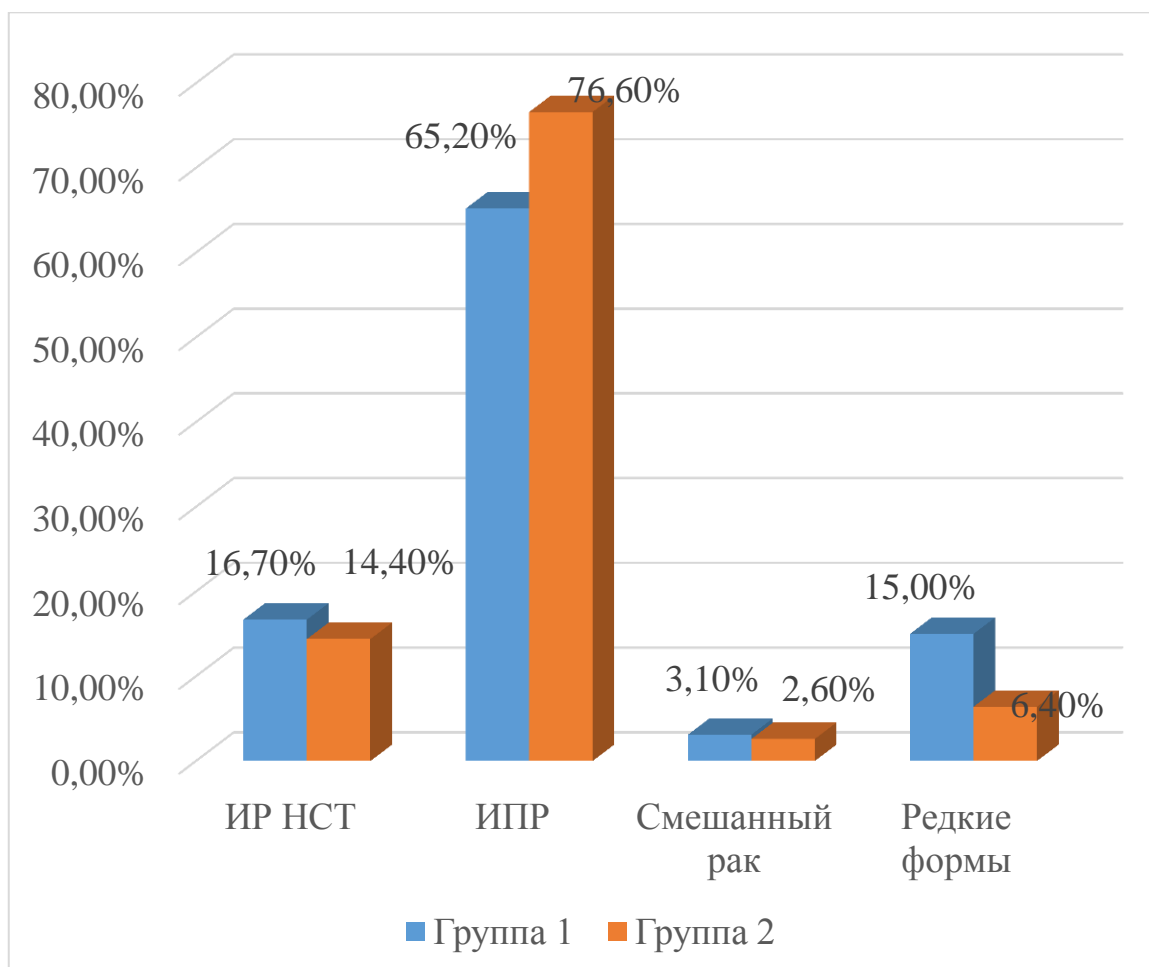


Рисунок 6 – Распределение больных первично-операбельным РМЖ в зависимости от гистологического типа опухоли

Рак in situ в окружающей ткани у больных первично-операбельным РМЖ диагностирован у 112 (31,7%) больных из 1 группы, а из 2 группы у 43 (22,9%) больных. Отсутствие данных изменений распределено в обеих группах следующим образом: у 241 (68,3%) и 145 (77,1%) больных, соответственно.

Степень злокачественности опухоли в 1 группе составила: G1 – 49 (13,9%) больных, G2 – 257 (72,8%) больных, G3 – 47 (13,3%) больных.

Во 2 группе распределение составило: G1 – 4 (2,1%) больных, G2 – 149 (79,3%) больных, G3 – 35 (18,6%) больных. Данные представлены на рисунке 7.

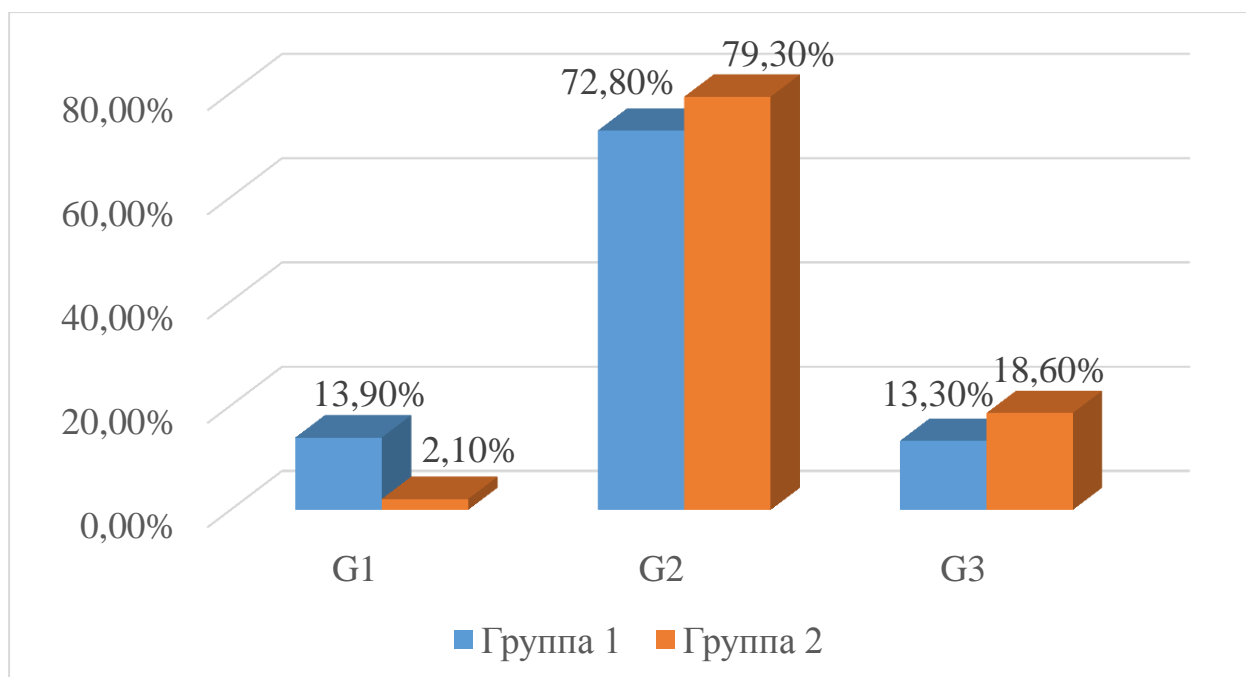


Рисунок 7 – Распределение больных первично-операбельным РМЖ в зависимости от степени злокачественности опухоли.

Частота инвазии опухолевых клеток в кровеносные и лимфатические сосуды распределилась следующим образом среди больных 2-х групп. Данные представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Распределение больных первично-операбельным РМЖ в зависимости от вида сосудистой инвазии

Инвазия опухолевых клеток	1 группа				2 группа			
	Абс.		%		Абс.		%	
	Есть	Нет	Есть	Нет	Есть	Нет	Есть	Нет
Кровеносные сосуды	31	322	8,8	91,2	8	180	4,3	95,7
Лимфатические сосуды	145	208	41,1	58,9	113	75	60,1	39,9
Лимфоваскулярная инвазия	148	205	41,9	58,1	115	73	61,1	38,9

Частота выявления периневрального роста у больных первично-операбельным РМЖ в 1 группе составила 6,5% случаев (23 больных), во 2 группе - 3,7% (7 больных).

Инфильтрирующие опухоль лимфоциты (ИОЛ)

Среди ИОЛ выделяли стромальные ИОЛ, расположенные между опухолевыми клетками, и интратуморальные ИОЛ, находящиеся в прямом контакте с опухолевыми клетками. Для уточнения степени выраженности лимфоцитарной инфильтрации и распределения лимфоцитов в опухоли применяли ИГХ исследование с использованием CD45.

Частота ИОЛ для 1 группы составила 20,7% (73 больных), а для 2 группы всего лишь 6,9 % (13 больных). Степень выраженности ИОЛ в группах сравнения представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Распределение больных первично-операбельным РМЖ в зависимости от степени выраженности ИОЛ

Степень выраженности ИОЛ	1 группа		2 группа	
	Абс.	%	Абс.	%
Слабая (до 5%)	26	35,6	1	7,7
Умеренная (5-30%)	15	20,6	2	15,4
Выраженная (более 30%)	32	43,8	8	61,5
Очаговая	-	-	2	15,4

Количество пораженных аксиллярных ЛУ при гистологическом исследовании варьировало от 1 до 5.

Изменения в метастатических ЛУ представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Распределение больных первично-операбельным РМЖ в зависимости от поражения регионарных ЛУ

Изменения в ЛУ	Количество больных	
	Абс.	%
Микрометастазы	15	8,0
МТС в 1 ЛУ	96	51,0
МТС в 2-х и более ЛУ	77	41,0

Признаки прорастания капсулы ЛУ выявлены у 56 (29,8%) больных. Все они отнесены во 2 группу. Данные представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Распределение больных первично-операбельным РМЖ в зависимости от поражения капсулы ЛУ

Изменения капсулы ЛУ	Количество больных	
	Абс.	%
Прорастание капсулы	12	21,4
Интракапсулярная инвазия	17	30,4
Транскапсулярная инвазия с инфильтрацией перинодальной клетчатки	27	48,2

Молекулярный подтип был определен у 336 (62,1%) больных. Распределение молекулярных подтипов опухолей РМЖ 1 группы составило: люминальный А – 155 (46,1%) больных; люминальный В HER2-негативный – 61 (18,2%) больной; люминальный В HER2-позитивный – 16 (4,8%) больных, HER2-позитивный подтип – 23 (6,8%) больных, ТН РМЖ – 81 (24,1%) больной.

Во 2 группе молекулярный подтип был определен у 176 (93,6%) больных. Распределение молекулярных подтипов опухолей РМЖ для этой группы представлено следующим образом: люминальный А – 59 (33,5%) больных; люминальный В HER2-негативный – 42 (23,9%) больных; люминальный В HER2-позитивный – 12 (6,8%) больных; HER2-позитивный – 12 (6,8%) больных; ТНМ РМЖ – 51 (29,0%) больной. Данные представлены на рисунке 8.

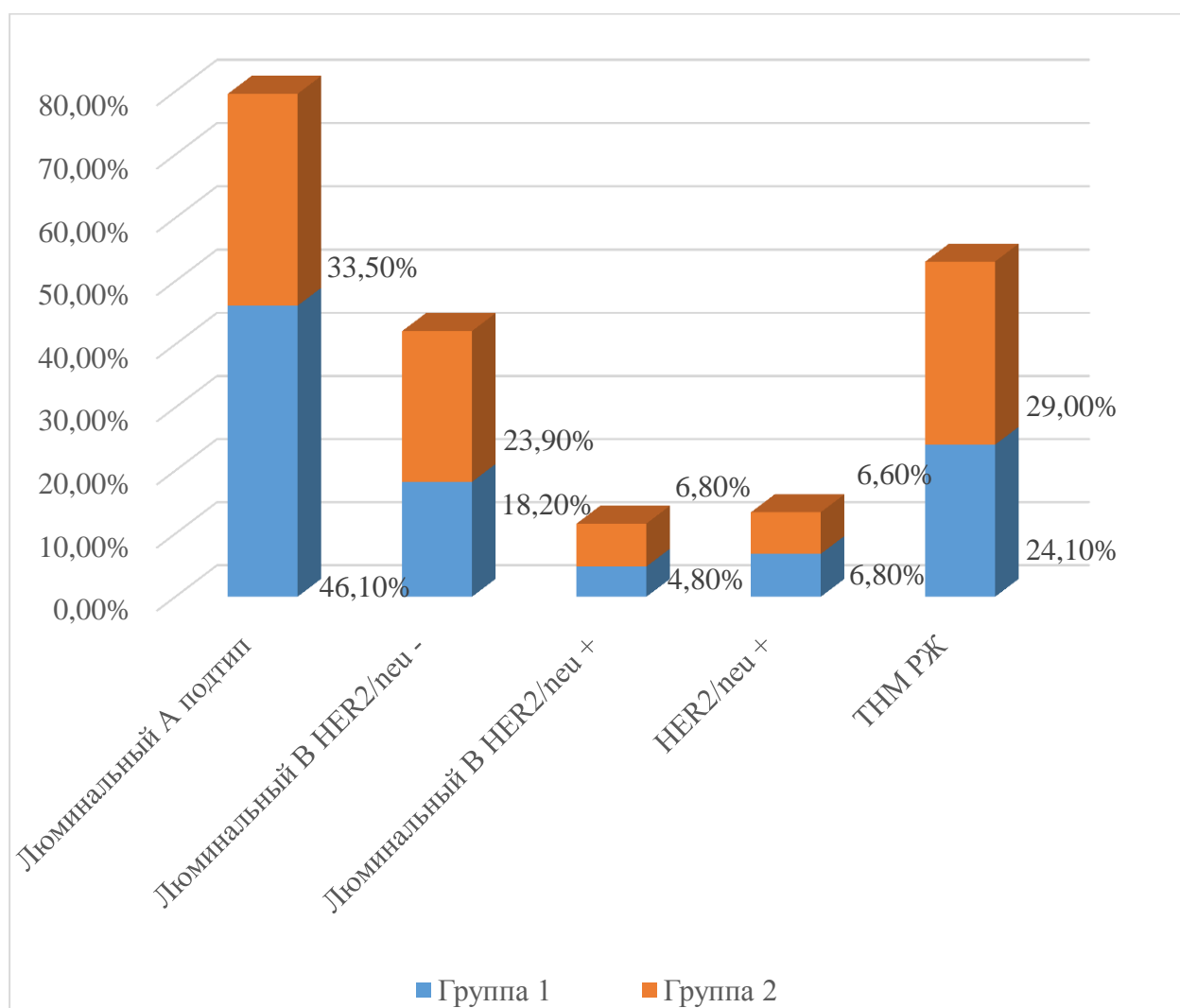


Рисунок 8 – Распределение больных первично-операбельным РМЖ в зависимости от молекулярно-биологического подтипа

2.5 Методика определения ЦОК в периферической крови

Применение жидкостной биопсии, как неинвазивного метода, позволяет использовать значения ЦОК и сравнивать их с основными клинико-

морфологическими характеристиками больных злокачественными новообразованиями.

Решая поставленные перед нами задачи, мы получили клинико-морфологические характеристики 47 больных I-III стадий РМЖ, находившихся на обследовании и лечении в ФГБУ «НМИЦ онкологии им Н.Н. Блохина» Минздрава России с 2015 по 2018 гг. ЦОК определялись у больных до начала лечения.

Анализ ЦОК проводился в 7,5 мл периферической крови, из которой опухолевые клетки выделяются на растворе Фикола (плотность 1,077 г/см³, ООО НПФ «ПанЭко»). Выделенные клетки центрифугируются в 10 мл фосфатно-солевого буфера (рН 7,2-7,6, «ЭкоСервис»). К осадку добавляется 100 мкл блокирующего раствора и инкубируется 30 мин при температуре +2 С. Далее клетки центрифугируются в 5 мл фосфатно-солевого буфера. К осадку добавляются моноклональные антитела к пан-лейкоцитарному антигену CD45 и молекуле эпителиальной адгезии EpCam (CD326) фирмы Becton Dickinson (США) и инкубируются 20 мин при температуре +2 С. Далее клетки центрифугируются в 5 мл фосфатно-солевого буфера. К осадку добавляется 500 мкл пермеабилзирующего раствора (BD FACS Permeabilizing Solution 2, Becton Dickinson, США) и инкубируется 10 минут при комнатной температуре. Далее клетки центрифугируются в 5 мл фосфатно-солевого буфера. К осадку добавляются моноклональные антитела к цитокератинам (KL1 или Cam5.2) фирмы Becton Dickinson (США) и инкубируются 20 мин при температуре +2 С. Далее клетки центрифугируются в 5 мл фосфатно-солевого буфера. К осадку добавляется 1 мл фосфатно-солевого буфера для счета на проточном цитометре (FACS Canto 2, Becton Dickinson (США) или Attune, ThermoFisher Scientific, США).

Ниже представлена схема выявления ЦОК в 7,5 мл периферической крови.

На цитограмме А (Рисунок 9) на основании параметров бокового светорассеяния (FSC-H – ось y vs FSC-A – ось x) выявлены клетки (97,08% от всех

проанализированных событий), представляющие собой единичные события (т.н. Синглеты) – гейт А, красный цвет.

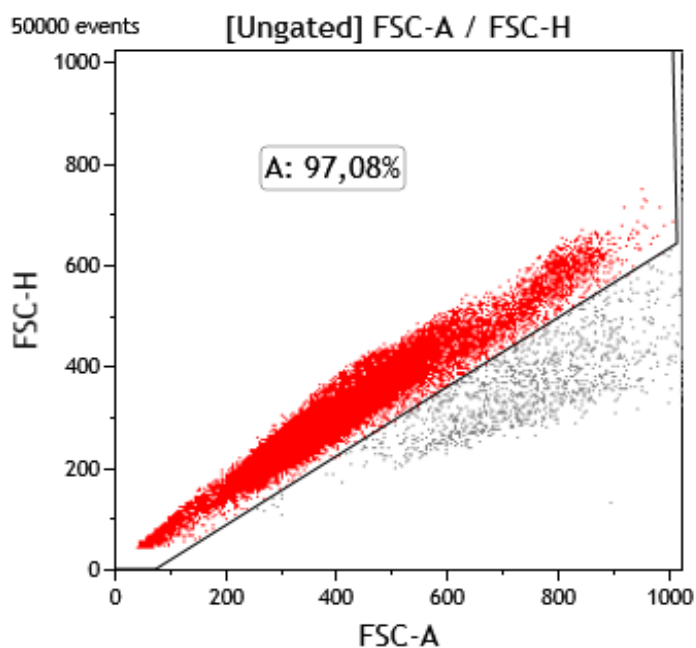


Рисунок 9 – Обработка результатов проточной цитометрии

На цитограмме Б (Рисунок 10) среди синглетов выявлены ядродержащие клетки (гейт Syto41+, зеленый цвет) по яркой экспрессии нуклеотропного красителя семейства Syto (Syto41 - ось x vs параметры бокового светорассеяния - ось y).

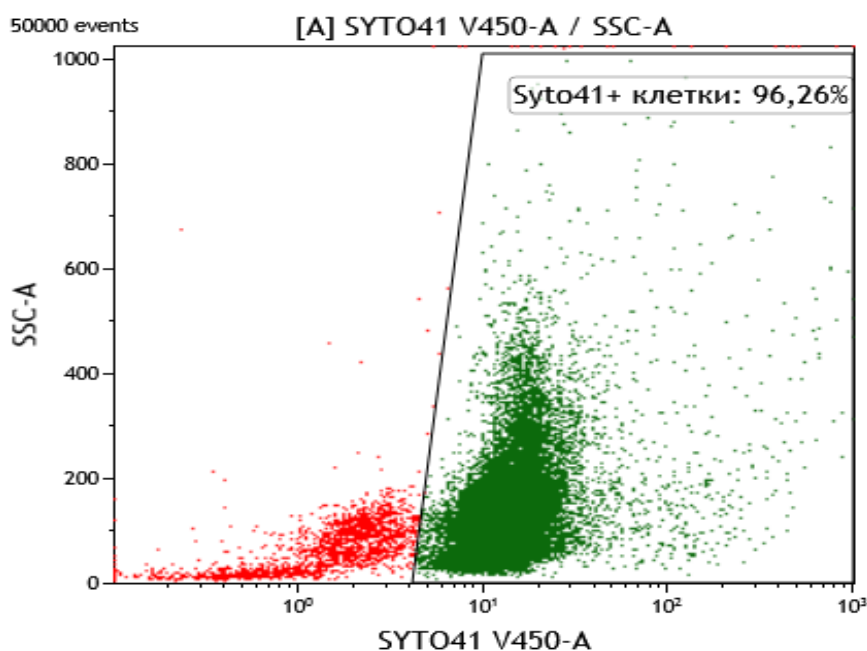


Рисунок 10 – Анализ ядродержащих клеток

На цитограмме В (Рисунок 11) опухолевые клетки выявлены на основании отсутствия экспрессии панлейкоцитарного антигена CD45 - ось x и отчетливой экспрессии молекулы ЕpСam - ось y. В 7,5 мл периферической крови выявлено 72 клетки с иммунофенотипом CD45-ЕpСam+ (фиолетовый цвет).

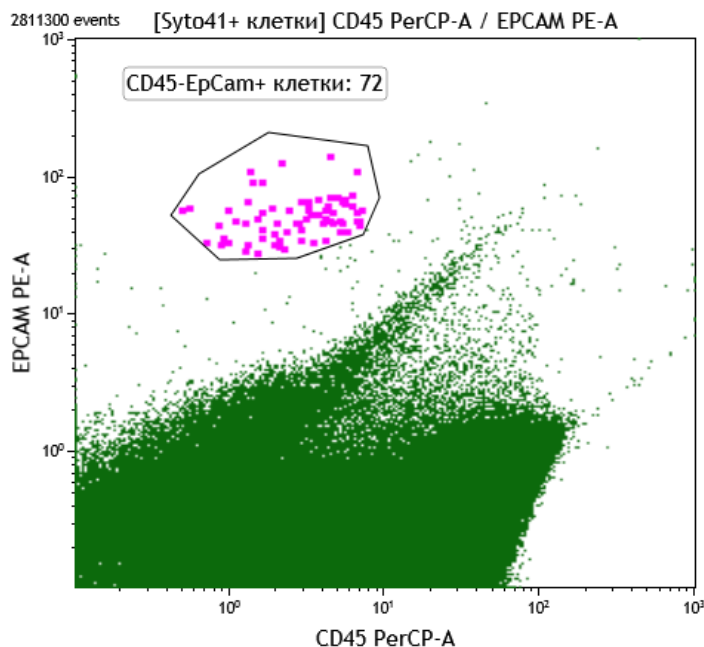


Рисунок 11 – Анализ экспрессии панлейкоцитарного антигена CD45 и молекулы ЕpСam

2.6 Методы статистической обработки

Статистическая обработка данных, полученных в исследовании, производилась с помощью программ: Excel (Microsoft, США) и SAS (версия 11.0, SAS, США). Дескриптивные статистики приведены как частоты для качественных признаков и как среднее и ошибка среднего для количественных. Для сравнения частот изученных признаков использовался критерий хи-квадрат; для малых выборок – точный критерий Фишера. Кривые выживаемости анализировались методом Каплана-Мейера, их сравнение производилось методом log-rank. При проверке нулевых гипотез критическое значение уровня статистической значимости принималось равным 0,05.

**ГЛАВА III. НЕПОСРЕДСТВЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ
БОЛЬНЫХ ПЕРВИЧНО-ОПЕРАБЕЛЬНЫМ РМЖ С
МЕТАСТАТИЧЕСКИМ ПОРАЖЕНИЕМ АКСИЛЛЯРНЫХ ЛУ**

**3.1 Клиническая оценка больных первично-операбельным РМЖ с
метастатическим поражением аксиллярных ЛУ**

При сравнительном анализе выявлено, что у пациентов моложе 55 лет, метастазы в ЛУ выявлялись достоверно чаще, чем у больных 1 группы. Данные представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Сравнительная оценка частоты выявления метастазов в аксиллярных ЛУ в зависимости от возраста

Клинико-морфологическая характеристика		n	1 группа (n,%)	2 группа (n,%)	χ^2	p
Возраст	<55 лет	287	173 (49.0%)	114 (60.6%)	6,2	0,013
	>55 лет	254	180 (51.0%)	74 (39.4%)		

При анализе репродуктивной функции установлено, что в группе больных с менопаузой менее 5 лет метастатическое поражение ЛУ наблюдалось достоверно чаще. При сравнительной оценке частоты метастатического поражения ЛУ в зависимости от менструального статуса отличий не было. Данные представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Сравнительная оценка частоты метастатического поражения ЛУ в зависимости от репродуктивного статуса и длительности менопаузы у больных первично-операбельным РМЖ

Клинико-морфологическая характеристика		n	1 группа (n,%)	2 группа (n,%)	χ^2	p
Менструальный статус	Сохранен	353	220 (66,1%)	133 (63,9%)	0,17	0,68
	Отсутствует	188	113 (33,9%)	75 (36,1%)		

Время менопаузы	<5 лет	290	177 (80,7%)	113 (100,0%)	24.93	<0,001
	>5 лет	43	43 (19,3%)	0		

При сравнительном анализе видов лечения первично-операбельного РМЖ достоверно чаще химиотерапию назначали больным с метастатическим поражением ЛУ - 151 (80,3%) больная получила ХТ в адьювантном режиме. Для других видов лечения достоверных отличий в частоте назначения при метастатическом поражении аксиллярных ЛУ не было. Данные представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Взаимосвязь выбора вида адьювантного лечения в зависимости от статуса регионарных ЛУ у больных первично-операбельным РМЖ

Клинико-морфологическая характеристика		n	1 группа (n,%)	2 группа (n,%)	χ^2	p
Химиотерапия	Да	310	159 (45.0%)	151 (80.3%)	61,0	<0,001
	Нет	231	194 (55.0%)	37 (19.7%)		
Гормонотерапия	Да	389	257 (72.8%)	132 (70.2%)	0.29	0.59
	Нет	152	96 (27.2%)	56 (29.8%)		
Таргетная терапия	Да	32	21 (5.9%)	11 (5.9%)	0.002	0.964
	Нет	509	332 (94.1%)	177 (94.1%)		
Лучевая терапия	Да	244	150 (42.5%)	94 (50.0%)	2,5	0,1
	Нет	297	203 (57.5%)	94 (50.0%)		

Частота местных рецидивов была достоверно выше в группе больных с метастатическим поражением аксиллярных ЛУ. У данной группы пациентов

основным видом хирургического лечения являлась РР молочной железы ($p < 0,001$).

Также определялась тенденция к увеличению числа пораженных регионарных ЛУ в группе больных с отдаленными метастазами. Данные представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Сравнительная оценка частоты метастатического поражения ЛУ в зависимости от местного рецидива и отдаленных метастазов у больных первично-операбельным РМЖ

Клинико-морфологическая характеристика		n	1 группа (n,%)	2 группа (n,%)	χ^2	p
Местный рецидив	Да	22	10 (2,8%)	12 (6,4%)	3,96	0,05
	Нет	519	343 (97,2%)	176 (93,6%)		
Отдаленные метастазы	Да	87	49 (13,9%)	38 (20,2%)	3,64	0,057
	Нет	454	304 (86,1%)	150 (79,8%)		

3.2 Морфологическая оценка операционного материала больных первично-операбельным РМЖ с метастатическим поражением аксиллярных ЛУ

Мультицентрическая форма роста опухоли достоверно чаще наблюдалась в группе больных с метастазами в ЛУ. Данный аспект достоверно увеличивал риск метастатического поражения ЛУ (ОР 1,6; 95% ДИ [1,2-2,2], $p < 0,05$). Данные представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Сравнительная характеристика операционного материала в зависимости от мультицентрической формы роста опухоли у больных первично-операбельным РМЖ

Клинико-морфологическая характеристика		n	1 группа (n,%)	2 группа (n,%)	χ^2	p
Мультицентричность	Да	50	23 (6,5%)	27 (14,4%)	8,01	<0,05

	Нет	491	330 (93.5%)	161 (85.6%)		
--	-----	-----	----------------	----------------	--	--

Размер первичной опухоли от 2-х до 5-ти см достоверно чаще определяется в группе с метастатическим поражением аксиллярных ЛУ. Риск развития метастатического поражения ЛУ статистически достоверно зависит от размера первичной опухоли (ОР 1,2; 95% ДИ [1,06-1,37], $p < 0,05$). Данные представлены в таблице 18.

Таблица 18 – Сравнительная характеристика групп больных первично-операбельным РМЖ в зависимости от размера первичной опухоли.

Клинико-морфологическая характеристика		n	1 группа (n,%)	2 группа (n,%)	χ^2	p
Размер первичной опухоли	до 2-х см	297	210 (59.5%)	87 (46.3%)	8,65	<0,004
	от 2-х до 5-ти см	244	143 (40.5%)	101 (53.7%)		

При сравнении пациентов с метастазами в ЛУ по гистологическим типам достоверно чаще определялся ИР НСТ ($\chi^2 - 7,5$; $p < 0,05$). Среди других типов отличий не было. Данные представлены в таблице 19.

Таблица 19 – Сравнительная характеристика операционного материала в зависимости от гистологического типа опухоли

Клинико-морфологическая характеристика	n	1 группа (n,%)	2 группа (n,%)	χ^2	p
ИР НСТ	374	230 (65,2%)	144 (76,6%)	10.44	0.016
ИДР	86	59 (16,7%)	27 (14,3%)		
Смешанный рак	16	11 (3,1%)	5 (2,7%)		
Редкие формы	65	53 (15,0%)	12 (6,4%)		

Наличие рака *in situ* в окружающей ткани достоверно чаще определялось в группе больных с метастазами в ЛУ. Данные результаты представляются не более чем статистической находкой, так как это противоречит самой сути *in situ* заболевания. Данные представлены в таблице 20.

Таблица 20 – Сравнительная характеристика операционного в зависимости от рака *in situ* в окружающей ткани

Клинико-морфологическая характеристика		п	1 группа (n,%)	2 группа (n,%)	□2	р
Рак <i>in situ</i> в окружающей ткани	Да	155	112 (31,7%)	43 (22,9%)	4,70	0,03
	Нет	386	241 (68,3%)	145 (77,1%)		

Высокая степень злокачественности опухоли достоверно чаще преобладала у пациентов с поражением ЛУ.

При сравнительном анализе больных с метастазами в ЛУ среди опухолей G2 и G3 достоверных отличий не было ($p > 0,3$). Чаще степень злокачественности G1 выявлялась у больных 1 группы. Данные представлены в таблице 21.

Таблица 21 – Сравнительная характеристика операционного материала в зависимости от степени злокачественности опухоли

Клинико-морфологическая характеристика		п	1 группа (n,%)	2 группа (n,%)	□2	р
Степень злокачественности	G 1	53	49 (13,9%)	4 (2,1%)	20,25	<0,001
	G 2	406	257 (72,8%)	149 (79,3%)		
	G 3	82	47 (13,3%)	35 (18,6%)		

Лимфоваскулярная инвазия выявлена у 115 (61,2%) больных с поражением ЛУ. В 1 группе ЛВИ отмечена у 148 больных (41,9%). Достоверно чаще ЛВИ отсутствовала у больных из 1 группы - 205 (58,1%), из 2 группы у 73 (38,8%) больных. У пациентов с поражением ЛУ достоверно чаще выявлялась ЛВИ. При

этом, инвазия опухолевых клеток в лимфатические сосуды определялась достоверно чаще, чем инвазия в кровеносные сосуды. Данные представлены в таблице 22.

Таблица 22 – Сравнительная характеристика операционного материала в зависимости от сосудистой инвазии.

Клинико-морфологическая характеристика		n	1 группа (n,%)	2 группа (n,%)	χ^2	p
Инвазия в лимфатические сосуды	Да	258	145 (41.1%)	113 (60.1%)	17,05	<0,001
	Нет	283	208 (58.9%)	75 (39.9%)		
Инвазия в кровеносные сосуды	Да	39	31 (8.8%)	8 (4.3%)	3,75	0,053
	Нет	502	322 (91.2%)	180 (95.7%)		
Лимфоваскулярная инвазия	Да	263	148 (41.9%)	115 (61.2%)	17,42	<0,001
	Нет	278	205 (58.1%)	73 (38.8%)		

Инвазия опухолевых клеток в лимфатические сосуды достоверно увеличивала риск метастатического поражения ЛУ (ОР 1,6; 95% ДИ [1,3-2,1], $p < 0,05$). Инвазия в кровеносные сосуды, ЛВИ не увеличивали данный риск ($p > 0,05$).

Такой морфологический критерий, как периневральный рост, не являлся статистически значимым при сравнительном анализе обеих групп ($p > 0,05$). Данные представлены в таблице 23.

Таблица 23 – Сравнительная характеристика операционного материала в зависимости от периневрального роста опухоли

Клинико-морфологическая характеристика		n	1 группа (n,%)	2 группа (n,%)	χ^2	p
Периневральный рост	Да	30	23 (6.5%)	7 (3.7%)	1.33	0,25
	Нет	511	330 (93.5%)	181 (96.3%)		

При сравнительном анализе выявлено, что ИОЛ не имеют статистической значимой взаимосвязи со статусом ЛУ. ИОЛ были определены только у 89 (16,5%) больных при плановом гистологическом исследовании. Степень выраженности инфильтрации лимфоцитами распределилась следующим образом: у 32 (43,8%) больных из 1 группы и 8 (61,5%) из 2 группы определена выраженная степень инфильтрации как интратуморально, так и стромально. Слабая степень инфильтрации определена у 26 (35,6%) и 1 (7,7%) больных соответственно; умеренная степень инфильтрации у 15 (20,6%) и 2 (15,4%) больных соответственно; очаговая инфильтрация только у 2 (15,4%) больных 2 группы.

При анализе отличий внутри группы выявлено, что выраженная степень инфильтрации ИОЛ чаще наблюдается в группе с метастатическим поражением ЛУ ($\chi^2 = 4,0$; $p < 0,05$), в то время как очаговая инфильтрация достоверно чаще выявляется у больных без метастазов в ЛУ. Данные представлены в таблице 24.

Таблица 24 – Сравнительная характеристика операционного материала в зависимости от инфильтрации ИОЛ и их степени выраженности в опухоли

Клинико-морфологическая характеристика		п	1 группа (n, %)	2 группа (n, %)	χ^2	р
ИОЛ	Нет	3	3 (3,9%)	0	0.53	0.47
	Да	86	73 (96,0%)	13 (100,0%)		
Степень ИОЛ	Слабая	27	26 (35,6%)	1 (7,7%)	14,86	0,002
	Умеренная	17	15 (20,6%)	2 (15,4%)		
	Выраженная	40	32 (43,8%)	8 (61,5%)		
	Очаговая	2	0	2 (15,4%)		

Молекулярно-биологический подтипы и, отдельно, экспрессия белка HER2 в опухоли достоверно не оказывали влияние на статус аксиллярных ЛУ у больных РМЖ при сравнительном анализе обеих групп, однако наблюдалась тенденция к этому ($p=0,06$). Данные представлены в таблице 25.

Таблица 25 – Сравнительная характеристика опухолей в зависимости от экспрессии белка HER2 и молекулярно-биологического подтипа

Клинико-морфологическая характеристика		n	1 группа (n,%)	2 группа (n,%)	χ^2	p
Экспрессия HER2	0	296	201 (60,2%)	95 (54,0%)	7.815	0.061
	1+	131	85 (25,4%)	46 (26,1%)		
	2+	39	18 (5,4%)	21 (11,9%)		
	3+	44	30 (9,0%)	14 (8,0%)		
Молекулярный подтип	Люминальный А	214	155 (46,1%)	59 (33,5%)	8.2	0.084
	Люминальный В Her2 негативный	103	61 (18,2%)	42 (23,9%)		
	Люминальный В Her2 позитивный	28	16 (4,8%)	12 (6,8%)		
	Her2 позитивный	35	23 (6,8%)	12 (6,8%)		
	ТН РМЖ	132	81 (24,1%)	51 (29,0%)		

При сравнительном анализе результатов исследования, посвященных оценке влияния поражения аксиллярных ЛУ у больных первично-операбельным РМЖ, с прослеженностью 10 лет, установлено, что общая 3-х, 5-ти, 10-ти летняя выживаемость в группе с отрицательным статусом ЛУ и наличием микро- и макрометастазов в одном и 2 ЛУ достоверно не отличалась между собой ($p > 0,05$). Данные представлены в таблице 26 и на рисунке 9.

Таблица 26 – ОВ больных первично-операбельным РМЖ в зависимости от поражения регионарных ЛУ

Изменения в ЛУ	Число больных	Общая выживаемость (%)		
		3-летняя	5-летняя	10-летняя
Отсутствуют метастазы в ЛУ	334	98,9±0.8	97,9±0.9	91,9±2.0
микрочметастазы	14	100	100	100
макрометастазы в 1 ЛУ	93	97,4±1.8	94,4±2.7	88,2±4.3
макрометастазы в 2-х и более ЛУ	76	96,6±2.4	92,5±3.6	85,6±5.1

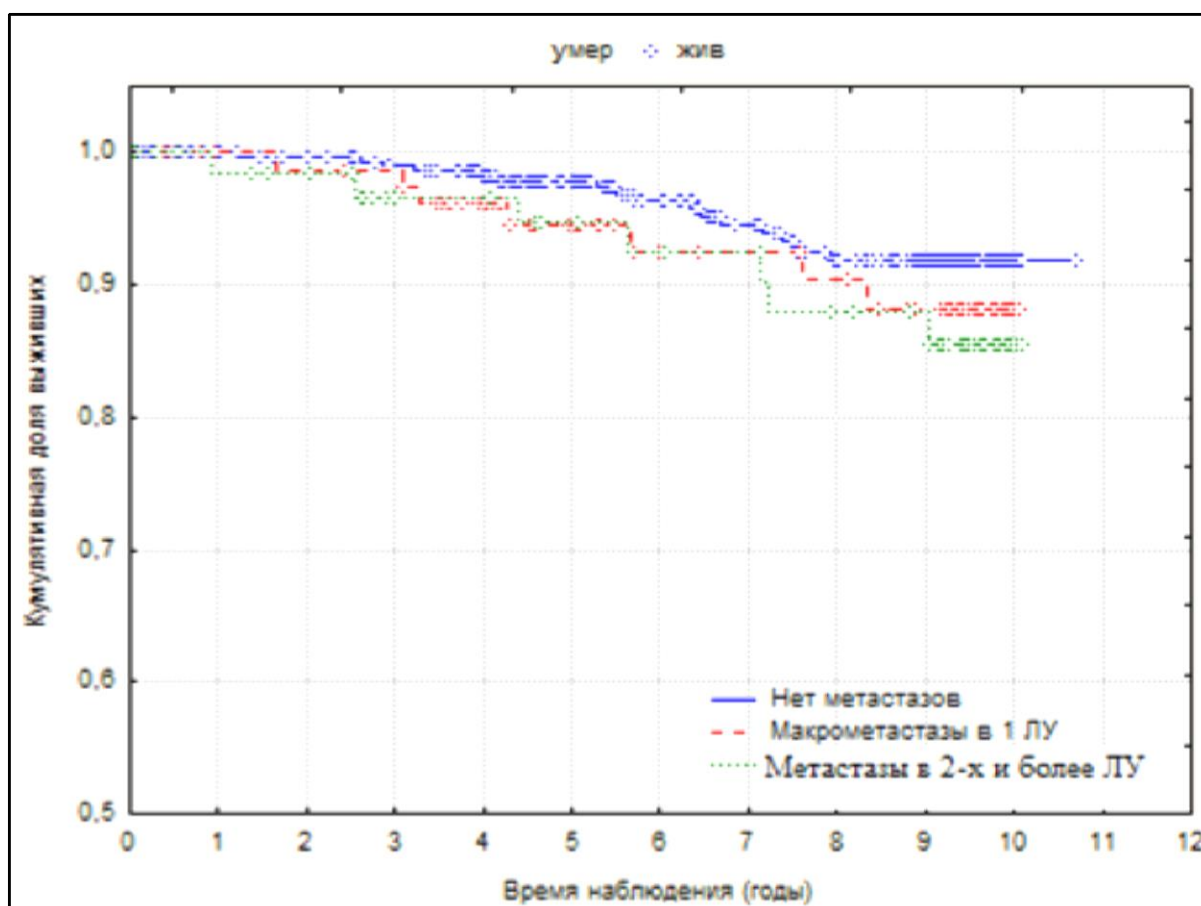


Рисунок 12 – ОВ больных первично-операбельным РМЖ в зависимости от поражения регионарных ЛУ. (Для наглядности графика выживаемости ось ординат начинается от 50%)

При анализе установлено, что общая 3-х, 5-ти, 10-ти летняя БРВ в группе с отрицательным статусом ЛУ и наличием микро- и макрометастазов в одном и более ЛУ также достоверно не отличалась от группы больных с отрицательным статусом ЛУ ($p>0,05$). Данные представлены в таблице 27 и на рисунке 10.

Таблица 27 – БРВ больных первично-операбельным РМЖ в зависимости от поражения регионарных ЛУ

Изменения в ЛУ	Число больных	Безрецидивная выживаемость (%)		
		3-летняя	5-летняя	10-летняя
Отсутствуют метастазы в ЛУ	334	95,2±1.3	91,3±1.7	69,3±4.6
микрометастазы	14	90,9±1.8	90,9±1.8	60,6±25.3
макрометастазы в 1 ЛУ	93	88,4±3.6	82,4±4.5	66,2±6.3
макрометастазы в 2-х и более ЛУ	76	83,4±4.8	77,6±5.5	60,3±6.9

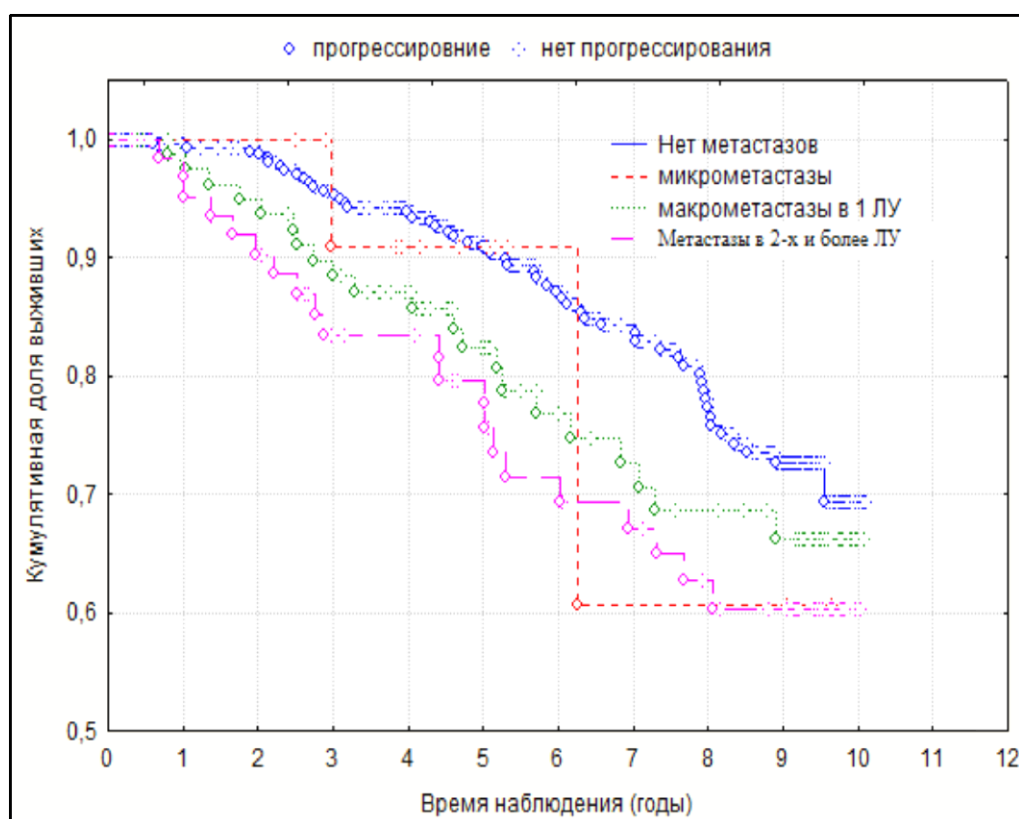


Рисунок 13 – БРВ больных первично-операбельным РМЖ в зависимости от поражения регионарных ЛУ. (Для наглядности графика выживаемости ось ординат начинается от 50%)

При сравнительном анализе прорастания капсулы при метастатическом поражении, установлено, что наилучшие показатели 10-летней ОВ прослеживались у больных с отсутствием прорастания капсулы ЛУ ($p < 0,014$). Данные представлены в таблице 28 и на рисунке 11.

Таблица 28 – ОВ больных первично-операбельным РМЖ в зависимости от прорастания капсулы ЛУ

Прорастание капсулы	Число больных	Общая выживаемость (%)		
		3-летняя	5-летняя	10-летняя
Есть	56	95,7±2.9	93,2±3.8	75,8±7.1
Нет	132	99,0±1.8	95,7±2.1	94,1±2.3

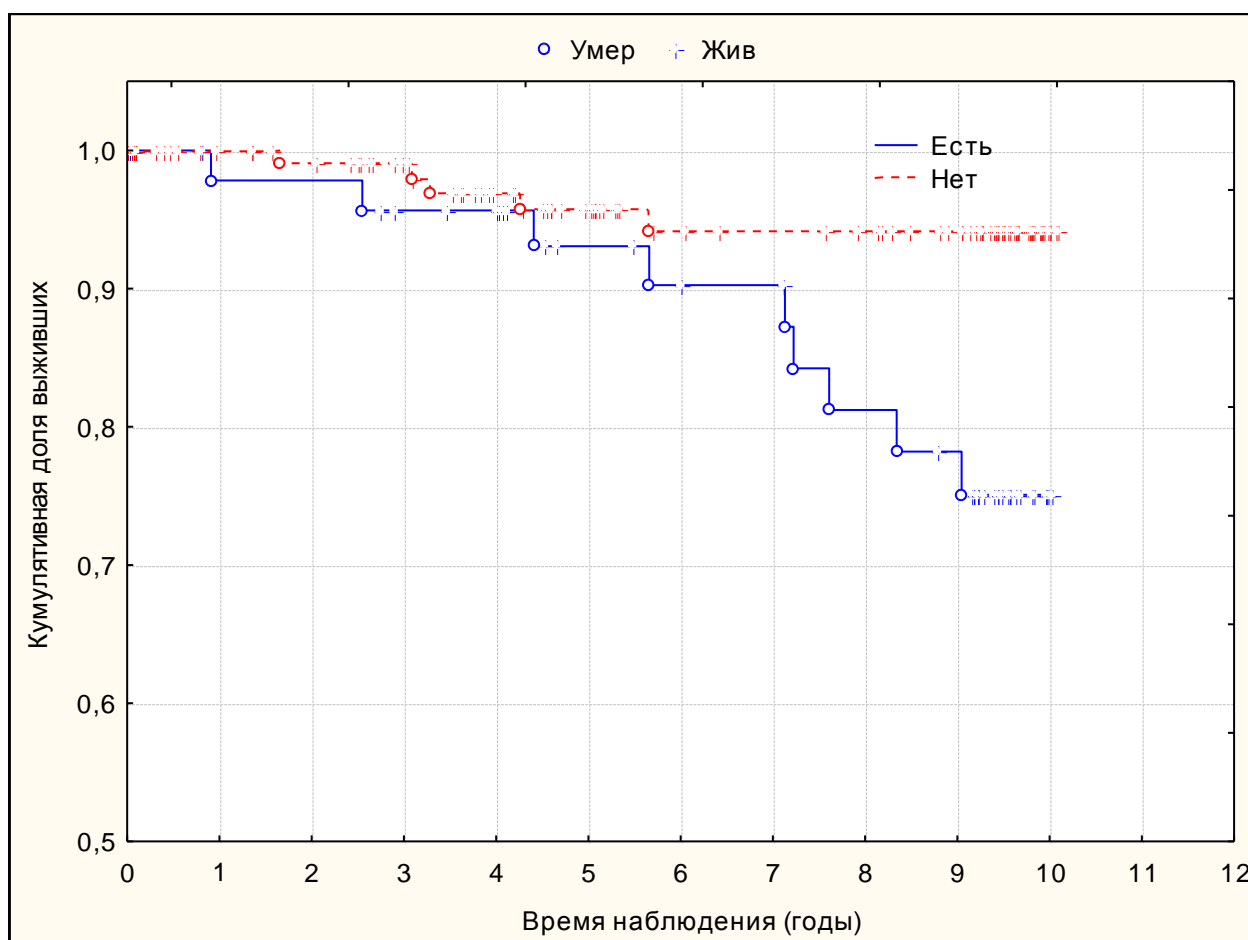


Рисунок 14 – ОВ больных первично-операбельным РМЖ в зависимости от прорастания капсулы ЛУ. (Для наглядности графика выживаемости ось ординат начинается от 50%)

При сравнительном анализе прорастания капсулы при метастатическом поражении регионарных ЛУ установлено, что достоверных отличий между группами при оценке БРВ не получено ($p>0,05$). Данные представлены в таблице 29 и на рисунке 12.

Таблица 29 – БРВ больных первично-операбельным РМЖ в зависимости от прорастания капсулы ЛУ

Прорастание капсулы	Число больных	Безрецидивная выживаемость (%)		
		3-летняя	5-летняя	10-летняя
Есть	56	86,7±4.6	79,2±6.2	60,3±7.8
Нет	132	86,4±3.4	79,0±2.1	61,7±5.7

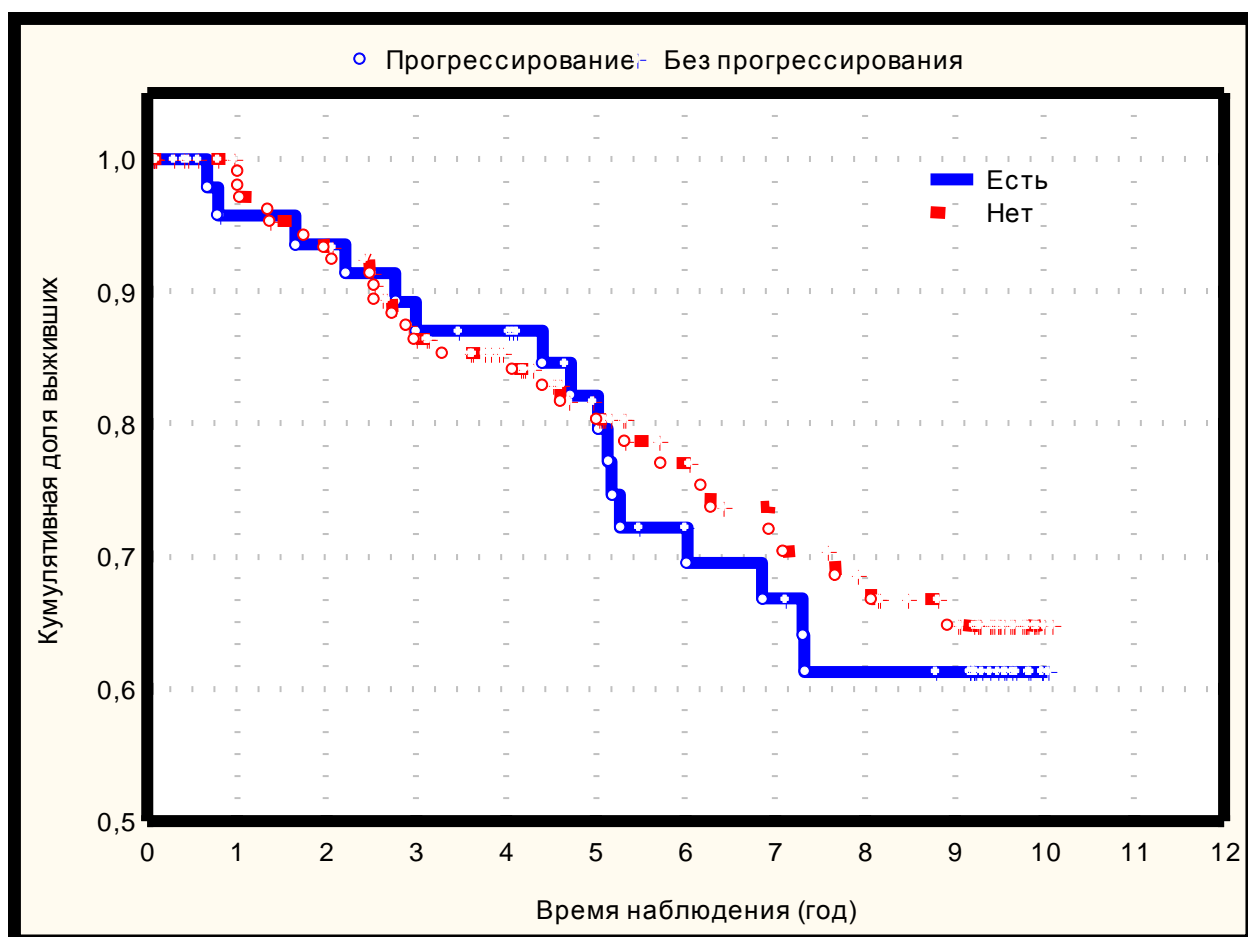


Рисунок 15 – БРВ больных первично-операбельным РМЖ в зависимости от прорастания капсулы ЛУ. (Для наглядности графика выживаемости ось ординат начинается от 50%)

С помощью ИГХ метода дополнительно проведены исследования парафиновых срезов регионарных ЛУ у 100 больных с отрицательным статусом ЛУ. При ИГХ исследовании всего в 2-х случаях выявлены изолированные опухолевые клетки, а в 2-х случаях микрометастазы. При анализе показатели 3-х летней ОВ и БРВ у больных с ИОК и микрометастазами по сравнению с непораженными ЛУ достоверно не отличались ($p > 0,05$) (Рисунок 13).

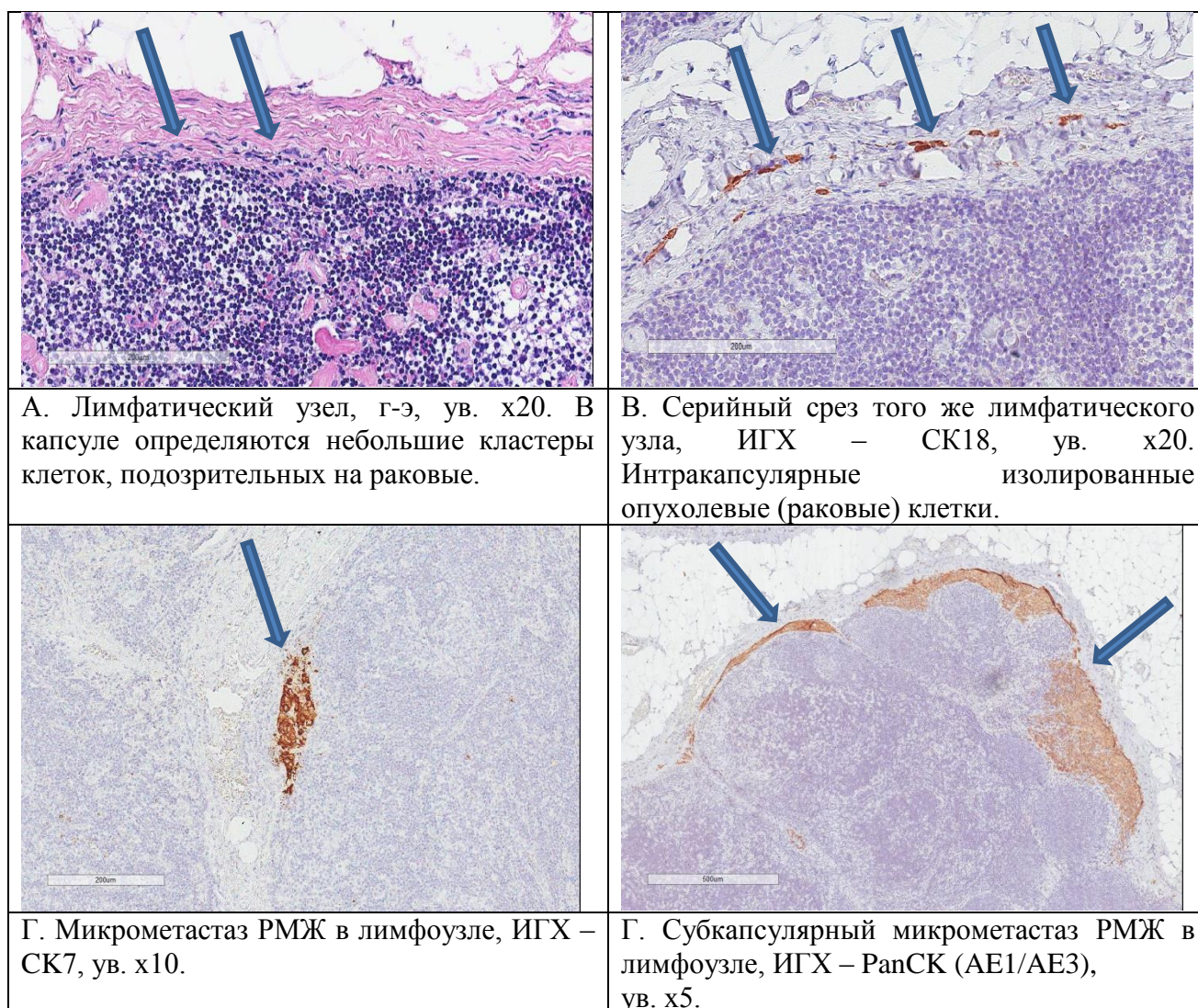


Рисунок 16 – Микрометастазы и изолированные опухолевые клетки в регионарных ЛУ

Таким образом, при однофакторном анализе у больных первично-операбельным РМЖ метастатическое поражение регионарных ЛУ достоверно сопряжено со следующими морфологическими критериями: ИР НСТ, мультицентрическая форма роста, ангиолимфатическая инвазия, высокая степень

злокачественности, рак *in situ* в окружающей ткани. Данные представлены в таблице 30.

Таблица 30 – Морфологические критерии первичной опухоли, ассоциированные с положительным статусом регионарных ЛУ

Морфологический критерий	Значение p
<i>Размер опухоли</i>	<u><0,05</u>
<i>Гистологический тип (ИР НСТ)</i>	<u><0,05</u>
<i>Мультицентрический рост опухоли</i>	<u><0,001</u>
Периневральный рост	0,25
<i>Лимфоваскулярная инвазия</i>	<u><0,001</u>
ИОЛ	0,47
<i>Высокая степень злокачественности</i>	<u><0,001</u>
<i>Рак in situ в окружающей ткани</i>	<u><0,05</u>
Молекулярный подтип	0,08

ГЛАВА IV. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ С ЦОК

4.1 Клиническая оценка больных I-III стадий РМЖ с ЦОК

Все больные были распределены следующим образом: 1 группа – ЦОК не выявлялись (количество ЦОК в периферической крови – 0 клеток), 2 группа – количество ЦОК в 7,5 мл периферической крови - 1 и более опухолевых клеток.

Средний возраст больных составил 51,3 (от 28 до 77 лет), медиана – 51 год. Группу больных до 50 лет составили 22 (46,8%) пациентки, старше 50 лет – 25 (53,2%).

Распределение больных по возрасту представлено на рисунке 17.

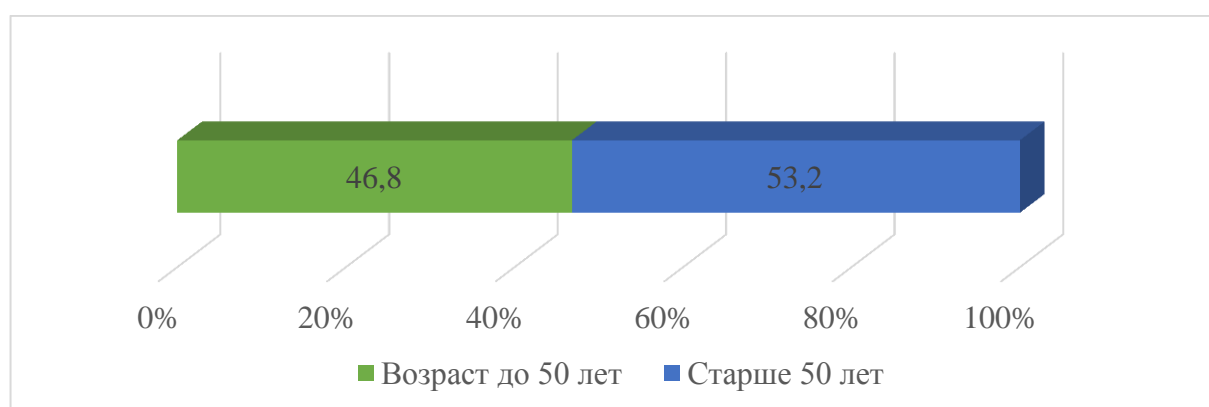


Рисунок 17 – Распределение больных РМЖ с различным статусом ЦОК в периферической крови в зависимости от возраста

Менструальная функция была сохранна у всех больных, где ЦОК не выявлялись. Во 2 группе менструальная функция сохранена у 18 больных (45,0%), 22 (55,0%) находились в менопаузе.

Распределение больных по клиническим стадиям представлено следующим образом: IA стадия – 1 (2,1%), IB стадия – 1 (2,1%), IIA стадия – 12 (25,5%), IIB стадия – 12 (25,5%), IIIA – 6 (12,8%), IIIB – 8 (17,0%), IIIC – 7 (15,0%).

Распределение больных по клиническим стадиям представлено на рисунке 18.

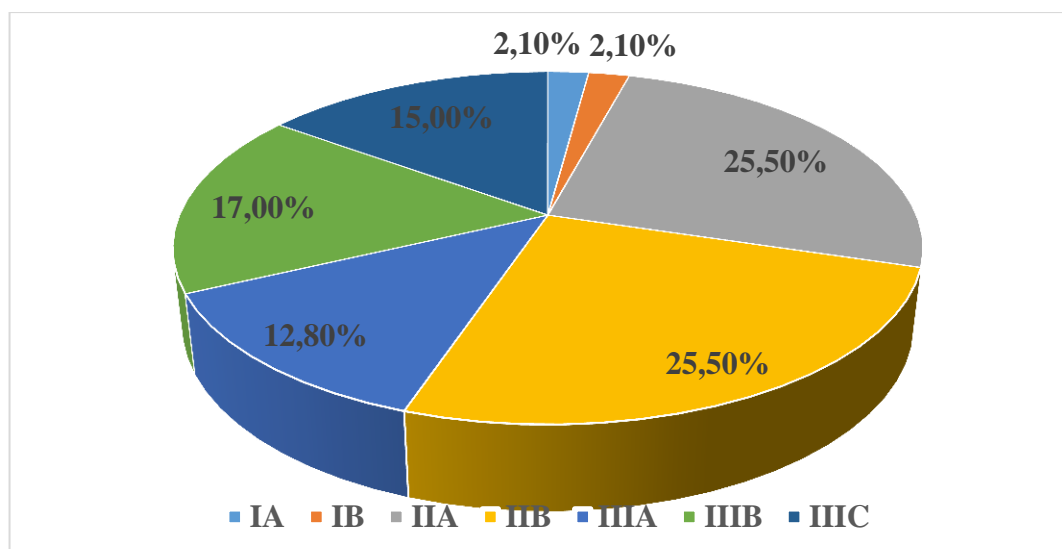


Рисунок 18 – Распределение больных РМЖ с различным статусом ЦОК в периферической крови в зависимости от клинической стадии

Распределение больных РМЖ по системе TNM представлено в таблице 32.

Таблица 32 – Распределение больных с выявленными ЦОК в зависимости от стадии по системе TNM

Стадия TNM	Количество больных	
	Абс.	%
T1cN0M0	1	2,1
T1N1M0	1	2,1
T1N3M0	1	2,1
T2N0M0	12	25,5
T2N1M0	12	25,5
T2N2M0	3	6,4
T2N3M0	2	4,3
T3N1M0	3	6,4
T3N2M0	1	2,1
T4N1M0	5	10,6
T4N2M0	2	4,3
T4N3M0	4	8,6

У больных первично-операбельным и местно-распространенным РМЖ, ЦОК выявлялись приблизительно с одинаковой частотой: у 23 из 26 (88,5%) и 17 из 21 (81,0%), соответственно. Однако различия статистически недостоверны ($p > 0,05$). Данные представлены на рисунке 19.

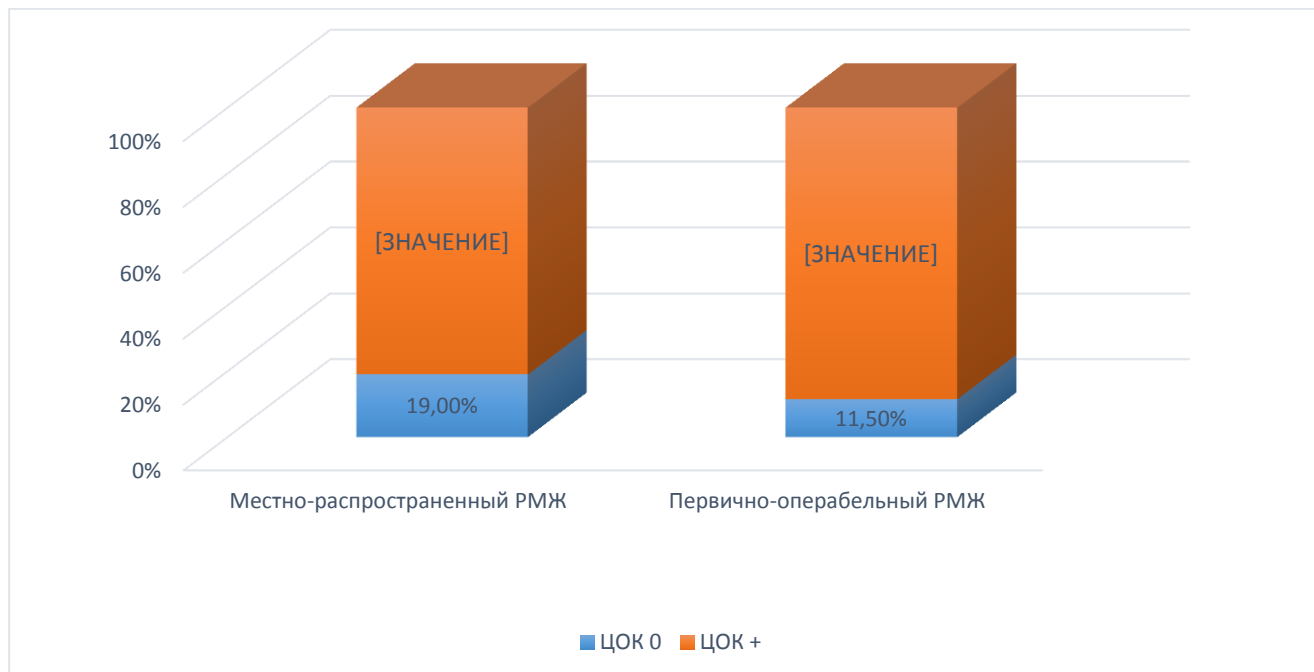


Рисунок 19 – Распределение ЦОК в периферической крови у больных местно-распространенным и первично-операбельным РМЖ

4.2 Морфологическая характеристика операционного материала больных I-III стадий РМЖ с ЦОК

Мультицентрическая форма роста опухоли выявлена у 7 (14,9%) больных, у 40 (85,1%) больных отсутствовал данный клинико-морфологический критерий.

Средний размер опухоли при гистологическом исследовании составил 3,72 см (от 1,5 до 14,0 см), медиана — 2,7 см.

Среди гистологических типов преобладал ИР НСТ– 29 (61,7%) больных. Реже встречался ИДР – 8 (6,4%) больны. Доля ИР НСТ с фокусами рака *in situ* – 10 (21,3%) больных. Данные представлены на рисунке 20.

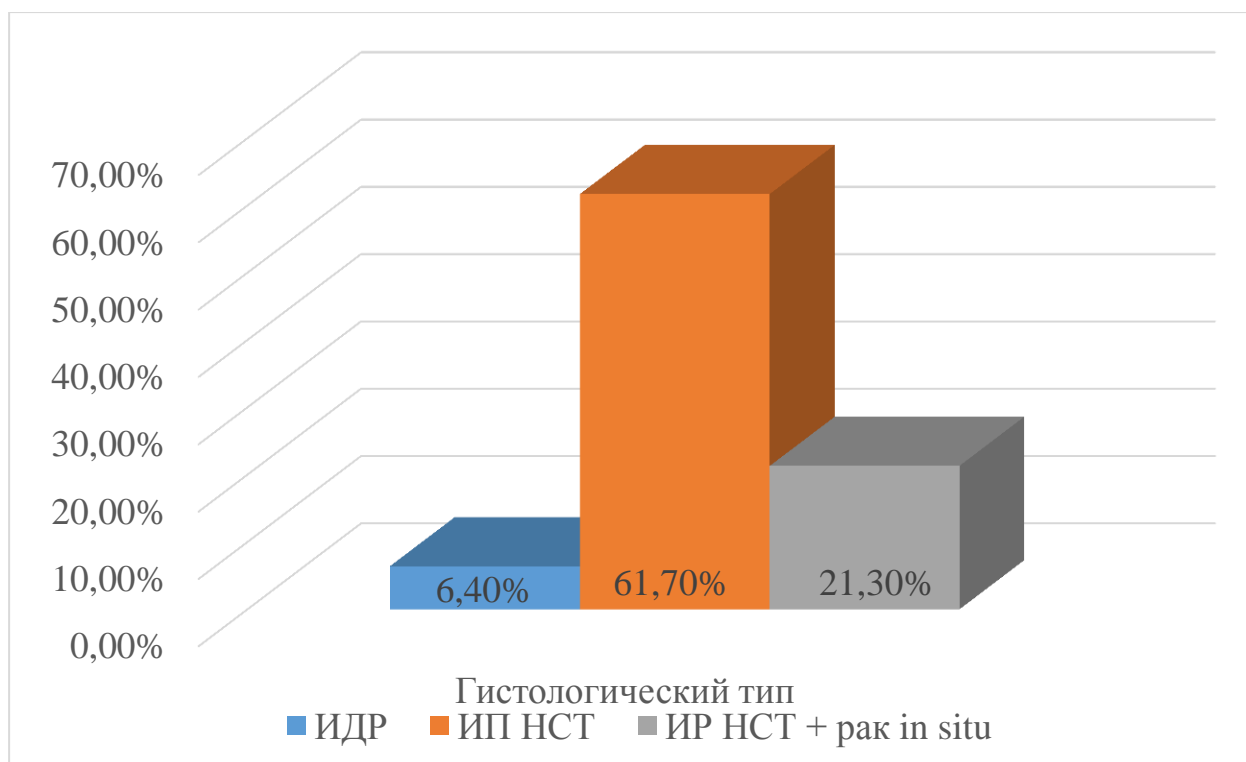


Рисунок 20 – Распределение больных РМЖ с ЦОК в периферической крови в зависимости от гистологического типа

В большинстве случаев преобладали опухоли со степенью злокачественности G2 – у 34 (72,3%), G3 – у 13 (27,6%) больных.

ЛВИ определена у 6 (12,8%) больных, у 41 (87,2%) данный морфологический признак отсутствовал.

У всех больных при гистологическом исследовании периневральная инвазия отсутствовала, ИОЛ не определялись.

Лимфатические узлы поражены всего у 29 (61,7%) больных. В 1 группе – у 4 (57,1%), во 2 группе – у 25 (62,5%) больных.

Молекулярные подтипы РМЖ были определены у всех 47 пациенток: у 7 больных (14,9%) – люминальный А, у 25 больных (53,19%) – люминальный В HER2-негативный, у 6 больных (12,76%) – люминальный В HER2-позитивный, у 9 (19,14%) больных – ТН РМЖ. В данной группе отсутствовали больные с HER2-позитивным подтипом (Рисунок 21).

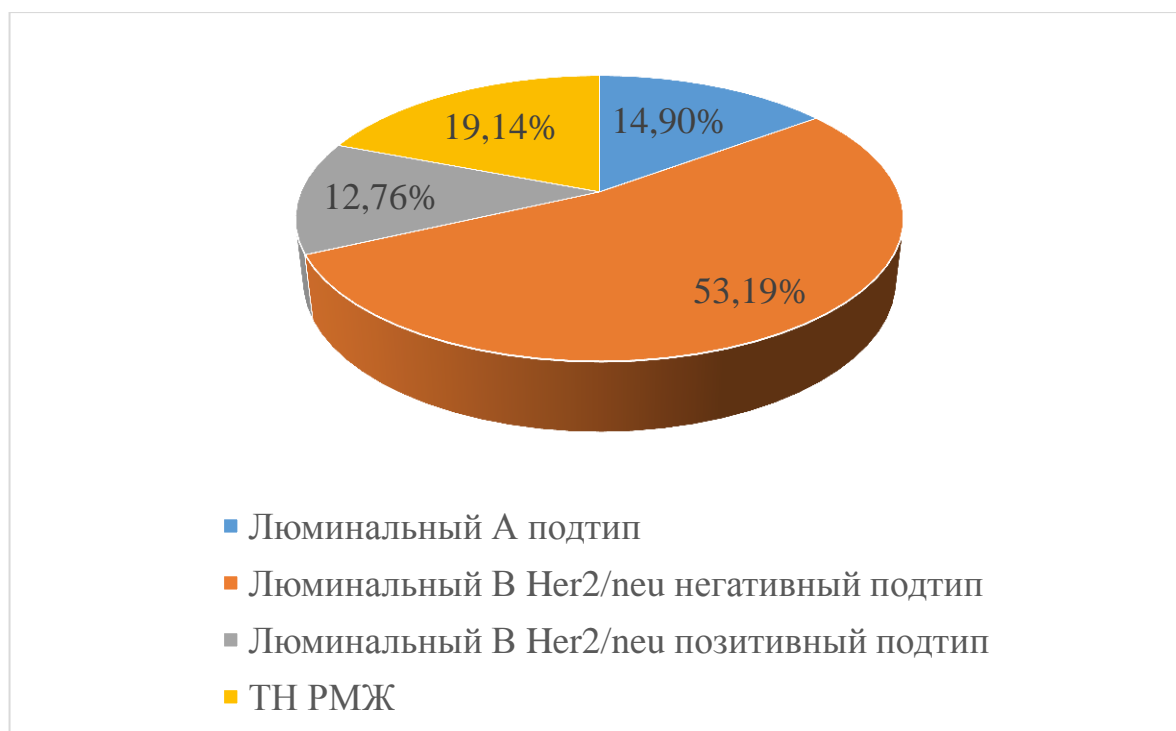


Рисунок 21 – Распределение больных РМЖ с ЦОК в периферической крови в зависимости от молекулярного подтипа

Экспрессия белка пролиферации опухолевых клеток Ki – 67 составила 49% (от 6 до 90%), медиана — 45%

Экспрессия Ki – 67 <20% определена у 7 больных (14,9%), Ki – 67 >20% - у 40 больных (85,1%). Данные представлены на рисунке 22.

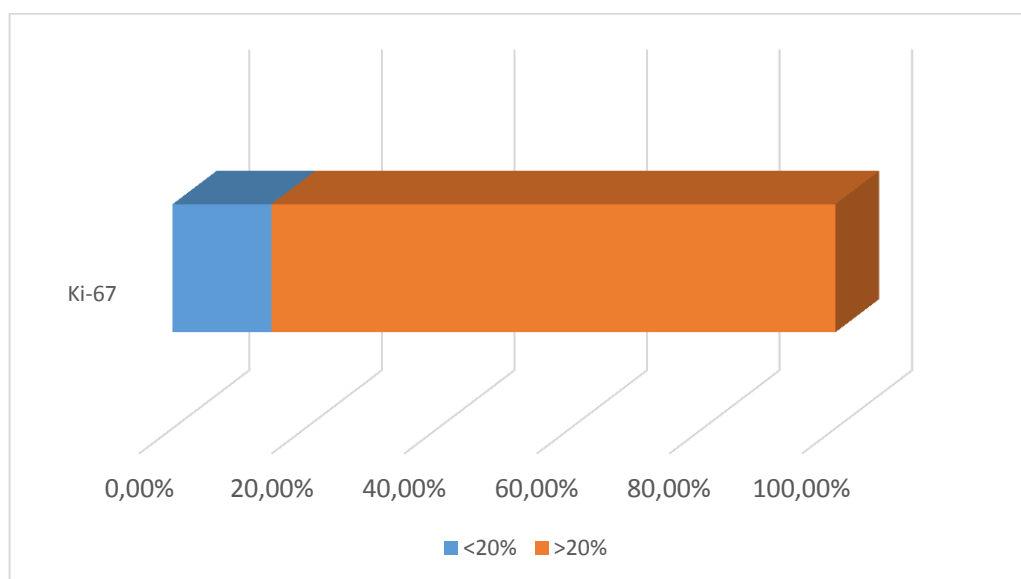


Рисунок 22 – Распределение больных РМЖ с ЦОК в периферической крови в зависимости от экспрессии Ki-67

4.3 Сравнительный анализ клинико-морфологических характеристик больных с I-III стадий РМЖ с ЦОК

При сравнительном анализе выявлено, что возраст и наличие/отсутствия ЦОК не имели статистически достоверных отличий. Данные представлены в таблице 33.

Таблица 33 – Сравнительная характеристика больных с ЦОК в зависимости от возраста.

Клинико-морфологическая характеристика		п	Группа с ЦОК негативным статусом (n,%)	Группа с ЦОК позитивным статусом (n,%)	χ^2	р
Возраст	<50 лет	21	3 (42,9%)	19 (47,5%)	0,05	0,8
	>50 лет	25	4 (57,1%)	21 (52,5%)		

При сравнительной оценке менструального статуса было установлено, что ЦОК отсутствуют у больных с сохраненным менструальным статусом достоверно чаще. Более половины больных с ЦОК находились в менопаузальном периоде. Данные представлены в таблице 34.

Таблица 34 – Сравнительная характеристика больных с ЦОК в зависимости от менструального статуса

Клинико-морфологическая характеристика		п	Группа с ЦОК негативным статусом (n,%)	Группа с ЦОК позитивным статусом (n,%)	χ^2	р
Менструальный статус	Сохранен	353	7 (100,0%)	18 (45,0%)	7,2	0,008
	Отсутствует	188	0	22 (55,0%)		

Чаще всего мультицентрическая форма роста опухоли определялась в группе с ЦОК позитивным статусом. Однако при анализе статистически достоверных отличий не установлено. Данные представлены в таблице 35.

Таблица 35 – Сравнительная характеристика больных с ЦОК в периферической крови в зависимости от мультицентрической формы роста

Клинико-морфологическая характеристика		n	Группа с ЦОК негативным статусом (n,%)	Группа с ЦОК позитивным статусом (n,%)	χ^2	P
Мультицентрическая форма роста	Нет	40	17 (94,4%)	23 (79,3%)	2,0	0,16
	Есть	7	1 (5,6%)	6 (20,7%)		

Размер первичной опухоли при сравнительном анализе обеих групп не имел статистически достоверных отличий. Данные представлены в таблице 36.

Таблица 36 – Сравнительная характеристика больных с ЦОК в периферической крови в зависимости от размера первичной опухоли

Клинико-морфологическая характеристика		n	Группа с ЦОК негативным статусом (n,%)	Группа с ЦОК позитивным статусом (n,%)	χ^2	P
Размер первичной опухоли	до 2-х см	8	0	8 (20,0%)	1,85	0,4
	от 2-х до 5-ти см	30	5 (71,4%)	25 (62,5%)		
	более 5 см	9	2 (28,6%)	7 (17,5%)		

ИР НСТ преобладал среди остальных гистологических подтипов в группе с ЦОК-позитивным статусом – 24 (60%) больных. При сравнении этих больных в зависимости от статуса ЦОК различия были статистически не значимы. Данные представлены в таблице 37.

Таблица 37 – Сравнительная характеристика больных с ЦОК в периферической крови в зависимости от гистологического типа

Клинико-морфологическая характеристика		n	Группа с ЦОК негативным статусом (n,%)	Группа с ЦОК позитивным статусом (n,%)	χ^2	P
Гистологический тип	ИДР	8	1 (14,3%)	7 (17,5%)	0,35	0,63
	ИР НСТ	29	5 (71,4%)	24 (60,0%)		
	ИР НСТ + рак in situ	10	1 (14,3%)	9 (22,5%)		

В группе больных с выявленными ЦОК отмечена тенденция к увеличению опухолей со степенью злокачественности G2 – 72,3%. Данные представлены в таблице 38.

Таблица 38 – Сравнительная характеристика больных с ЦОК в периферической крови в зависимости от степени злокачественности.

Клинико-морфологическая характеристика		n	Группа с ЦОК негативным статусом (n,%)	Группа с ЦОК позитивным статусом (n,%)	χ^2	P
Степень злокачественности	G2	34	3 (42,8%)	31 (77,5%)	3,57	0,06
	G3	13	4 (57,2%)	9 (22,5%)		

В группе больных с ЦОК лимфоваскулярная инвазия выявлялась чаще, чем в группе с отрицательным статусом ЦОК. Однако при сравнительном анализе двух групп отличий получено не было. Данные представлены в таблице 39.

Таблица 39 – Сравнительная характеристика больных с ЦОК в периферической крови в зависимости от наличия лимфоваскулярной инвазии

Клинико-морфологическая характеристика		n	Группа с ЦОК негативным статусом (n,%)	Группа с ЦОК позитивным статусом (n,%)	χ^2	P
Ангиолимфатическая инвазия	Нет	41	6 (85,7%)	35 (87,5%)	1,4	0,2
	Есть	6	1 (14,3%)	5 (12,5%)		

Метастатическое поражение лимфатических узлов имело следующую характеристику: у 18 (38,3%) больных отсутствовали изменения в регионарных ЛУ, у 29 (61,7%) больных выявлены макрометастазы в 1 и более регионарных ЛУ.

У больных с пораженными ЛУ циркулирующие опухолевые клетки выявлялись чаще, чем при отрицательном статусе ЛУ. При сравнении этих групп в зависимости от статуса ЦОК различия были статистически не достоверны. Данные представлены в таблице 40. У 11 (45,8%) больных первично-операбельным РМЖ с непораженными аксиллярными ЛУ, ЦОК были выявлены в 10 (90,9%) случаях.

Таблица 40 – Сравнительная характеристика больных с ЦОК в периферической крови в зависимости от поражения аксиллярных ЛУ

Клинико-морфологическая характеристика		n	Группа с ЦОК негативным статусом (n,%)	Группа с ЦОК позитивным статусом (n,%)	χ^2	P
Метастазы в ЛУ	Нет	18	3 (42,8%)	15 (37,5%)	0,07	0,78
	Есть	29	4 (57,2%)	25 (62,5%)		

При сравнительной оценке молекулярного подтипа у этих групп статистически достоверных отличий выявлено не было ($p > 0,05$). Однако при внутригрупповом анализе было выявлено, что у 25 (53,2%) больных с

люминальным В HER2-негативным подтипом РМЖ в периферической крови ЦОК выявлялись достоверно чаще, чем у больных с другими молекулярно-биологическими подтипами РМЖ ($p=0,05$). Данные представлены в таблице 41.

Таблица 41 – Сравнительная характеристика больных с ЦОК в периферической крови в зависимости от молекулярного подтипа

Клинико-морфологическая характеристика		n	Группа с ЦОК негативным статусом (n,%)	Группа с ЦОК позитивным статусом (n,%)	χ^2	P
Молекулярный подтип	Люминальный А подтип	7	1 (14,3%)	6 (15,0%)	1,88	0,6
	Люминальный В Her2/neu негативный подтип	25	3 (42,8%)	22 (55,0%)		
	Люминальный В Her2/neu позитивный подтип	6	2 (28,6%)	4 (10,0%)		
	Трижды негативный подтип	9	1 (14,3%)	8 (20,0%)		

В нашей работе экспрессия Ki-67 сравнивалась со статусом ЦОК отдельно. Экспрессия чаще наблюдалась в группе с ЦОК-позитивным статусом. Однако при сравнительном анализе двух групп статистических достоверных отличий получено не было. Данные представлены в таблице 42.

Таблица 42 – Сравнительная характеристика больных с ЦОК в периферической крови в зависимости от экспрессии Ki-67

Клинико-морфологическая характеристика		n	Группа с ЦОК негативным статусом (n,%)	Группа с ЦОК позитивным статусом (n,%)	χ^2	P
Ki-67	<20%	7	0	7 (17,5%)	1,4	0,2
	>20%	40	7 (100,0%)	33 (82,5%)		

При сравнительном анализе результатов исследования, посвященных оценке ЦОК и наличия/отсутствия поражения аксиллярных ЛУ у больных первично-операбельным и местно-распространенным РМЖ, с прослеженностью 3 года, установлено, что медиана ОВ достигнута не была, так как все больные живы.

При анализе БРВ установлено, что в группе больных с положительным статусом ЦОК отмечается увеличение частоты прогрессирования (4 из 40 больных), однако статистически достоверных отличий между группами также не отмечено ($p > 0,05$). Все пациенты с отдаленными метастазами из группы с местно-распространенным РМЖ. Полученные нами данные представлены на рисунке 23.

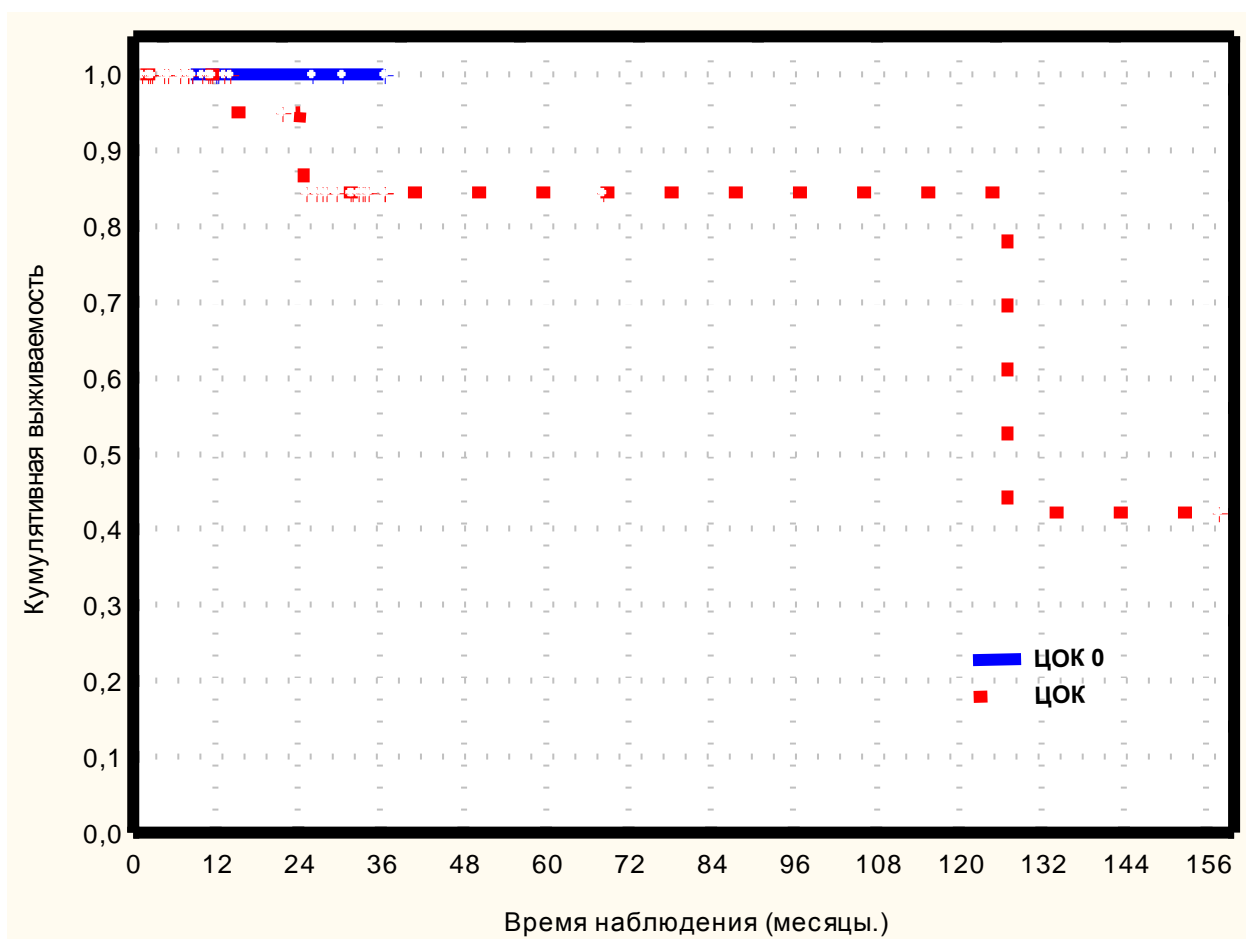


Рисунок 23 – БРВ у больных РМЖ с выявленными ЦОК в периферической крови

Существующие прогностические факторы РМЖ могут быть дополнены определением ЦОК с помощью жидкостной биопсии. Наличие этих клеток в периферической крови у больных первично-операбельным и местно-распространенным РМЖ свидетельствует о возможном первично-диссеминированном процессе. Определение ЦОК имеют взаимосвязь с некоторыми морфологическими характеристиками опухолей РМЖ, что требует проведение дальнейших исследований с большей выборкой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные тенденции анализа успешного лечения больных с первично-операбельным РМЖ заключаются в анализе прогностических факторов заболевания, а также в понимании процессов взаимоотношения опухоли – макроорганизма как на морфологическом уровне, так и на молекулярном, однако результаты лечения отдельных пациентов не всегда являются удовлетворительными.

Важное прогностическое значение, оказывающее влияние на ОВ и БРВ имеют размер опухоли, гистологический тип, степень злокачественности, ЛВИ, периневральный рост, наличие метастазов в аксиллярных ЛУ, молекулярно-биологический подтип опухоли. Прогностическая значимость пролиферативной активности опухолевых клеток, индексов апоптоза, маркеров межклеточной адгезии и белков цитоскелета злокачественных клеток является предметом исследования в настоящее время. Рецепторный статус опухоли и экспрессия человеческого рецептора эпидермального фактора роста 2 (HER2) являются надежными предикторами, которые вошли в клиническую практику для прогнозирования ответа на таргетную терапию при лечении РМЖ.

В нашей работе проанализированы клиничко-морфологические характеристики больных первично-операбельного РМЖ и определены прогностические критерии, ассоциированные с поражением аксиллярных ЛУ и наличием ЦОК в периферической крови.

Среди клинических параметров статистически значимыми оказались: возраст <55 лет и время менопаузального периода <5 лет. РМЖ является гормонозависимым заболеванием, поэтому, вероятнее всего, данные закономерности связаны с эндокринной природой болезни.

Частота местных рецидивов была достоверно выше в группе больных с метастатическим поражением аксиллярных лимфоузлов. В группе больных с пораженными аксиллярными ЛУ определялась тенденция к появлению отдаленных метастазов.

В литературе описана [73] взаимосвязь между размером опухоли и вовлечением аксиллярных ЛУ у пациентов с инвазивным РМЖ. В нашем исследовании подтверждается данная взаимосвязь: размер опухолевого узла ≥ 2 см статистически чаще наблюдался у больных с метастазами в регионарных ЛУ ($p < 0,05$).

В исследовании Sakir et al. [178] доказано, что мультицентрическая форма роста опухоли в значительной степени связана с метастазированием в ЛУ. Полученные нами данные согласуются с зарубежными исследованиями. Данный фактор оказался значимым у больных с pN1 и достоверно увеличивал риск метастазирования в аксиллярные ЛУ (OR 1,6; 95% ДИ [1,2-2,2], $p < 0,05$).

В литературе [91] описано, что гистологический тип опухоли может быть использован в качестве полезного маркера для прогнозирования статуса аксиллярных ЛУ. Инфильтративный рак неспецифического типа, по данным нашего исследования, статистически чаще наблюдался при положительном статусе аксиллярных ЛУ.

Интересным оказался тот факт, что при положительном статусе регионарных ЛУ, рака *in situ* в окружающей ткани определялся достоверно чаще. По данным литературы рак *in situ* в окружающей ткани не является агрессивным морфологическим фактором прогноза и не влияет на процесс метастазирования в ЛУ в связи с биологическими особенностями роста. Данные результаты представляются не более чем статистической находкой, так как это противоречит самой сути *in situ* заболевания.

Другой важный прогностический фактор – степень злокачественности опухоли. В исследовании Ashturkar et al. [90] установлено, что у больных с высокой степенью злокачественностью опухоли, число пораженных ЛУ в подмышечной клетчатке достоверно выше, чем при опухолях с низкой степенью злокачественности. В нашем исследовании эта закономерность подтверждена. Степень злокачественности G2 достоверно чаще преобладала во всех группах – 72,8% и 79,3% соответственно. Опухоли G2 и G3 достоверно чаще присутствуют в группе pN1, тогда как G1 у группы больных с pN0.

ЛВИ является клиническим показателем высокой прогностической ценности при РМЖ и указывает на уровень агрессивности опухоли. Этот фактор оказался значимым в нашем исследовании. Частота выявления данного фактора в группе с pN1 была достоверно выше ($p < 0,05$). Также было установлено, что инвазия в лимфатические сосуды является более достоверным фактором неблагоприятного прогноза метастатического поражения ЛУ, чем инвазия в кровеносные сосуды ($p < 0,001$).

Регионарные ЛУ являются основными участками лимфодренажа из всех областей молочной железы, и степень их участия в прогнозе РМЖ считается достоверным предиктором ОВ и БРВ. Процесс опухолевой диссеминации всегда включает в себя диссоциацию опухолевых клеток, ангиогенез первичной опухоли, интравазацию, выживание и диффузию через системный и лимфатический кровотоки, адгезию к стенкам органов, экстравазацию, образование метастатических очагов в паренхиме органов и, наконец, проявление клинически выраженных метастазов через поколение вторичных опухолей. Значение лимфатической системы на сегодняшний день остается ведущим в процессе метастазирования.

Установлено, что метастатическое поражение ЛУ значительно ухудшает показатели ОВ онкологических больных. Однако такая прямая зависимость обнаруживается при наличии макрометастазов, либо тотального замещения ЛУ опухолевой тканью и прорастании ее капсулы. Вопрос о клинической значимости микрометастазов и степени их опухолевой нагрузки в настоящее время дискутируется.

По данным литературы, у пациентов с I и II клиническими стадиями РМЖ состояние лимфатических узлов является одним из наиболее важных прогностических факторов выживания, независимо от размера опухоли, степени злокачественности и других клинико-патологических параметров.

При анализе показателей 3, 5, 10-летней ОВ и БРВ в зависимости от статуса аксиллярных ЛУ достоверных отличий не выявлено ($p > 0,05$). Прорастание капсулы у больных данной группы составило – 29,8%. Показатели 3, 5, 10-летней

ОВ в зависимости от прорастания капсулы были достоверно лучше в группе, где капсула ЛУ была интактной ($p < 0,05$). Различия показателей 3, 5, 10-летней БРВ выживаемости при данном морфологическом показателе были статистически не достоверны ($p > 0,05$).

Однофакторный анализ ОВ и БРВ выявил, что у больных с ИОК и микрометастазами по сравнению с непораженными ЛУ показатели выживаемости достоверно не отличались ($p > 0,05$).

При сравнительной оценке больных как с отрицательным, так и положительным статусом аксиллярных ЛУ и наличием микрометастазов и изолированных опухолевых клеток было установлено, что микрометастазы достоверно чаще выявляются у больных с положительным статусом ЛУ.

При оценке взаимосвязи молекулярно-биологического подтипа, а также экспрессии белка HER2 в первичной опухоли со статусом ЛУ, статистически достоверных отличий получено не было. Однако определялась тенденция к увеличению метастатического поражения аксиллярных ЛУ.

Перинеуральный рост опухоли, ИОЛ в нашем исследовании не являлись значимыми факторами, оказывающими влияние на статус регионарных ЛУ.

Индивидуализация прогнозирования течения заболевания может быть рассчитана только при сопоставлении нескольких критериев: клинко-морфологических факторов, биологических особенностей опухоли и иммунологической реактивности организма, сдерживающей развитие злокачественного новообразования.

ЦОК как дополнительный критерий риск-стратификации больных РМЖ

В настоящее время для определения опухолевой нагрузки до лечения и остаточной минимальной болезни, после проведенного лечения, существует удобная и неинвазивная диагностическая опция, как определение ДОК в костном мозге и/или ЦОК в периферической крови.

В нашей работе проспективно были изучены клинко-морфологические характеристики 47 больных первично-операбельным и местно-распространенным РМЖ (I-III стадии).

У больных местно-распространенным и первично-операбельным раком молочной железы ЦОК методом проточной цитофлуориметрией выявлялись приблизительно с одинаковой частотой: у 21 из 24 (87,5%) и 19 из 23 (82,6%) больных соответственно, различия статистически недостоверны ($p>0,05$).

ЦОК в группе больных с pN1 выявлялись чаще, чем со статусом pN0 – 62,5% и 57,2% соответственно, однако разница статистически не достоверна ($p>0,05$).

При анализе ОВ у больных РМЖ II-III стадий медиана ОВ достигнута не была, так как все больные живы, период наблюдения составил 3 года. Показатели БРВ у больных с местно-распространенным РМЖ с позитивным статусом ЦОК были хуже, чем в группе с отрицательным статусом, однако достоверных отличий между группами не было ($p>0,05$).

Среди гистологических типов опухоли преобладал ИР НСТ во всех группах – 60%. При сравнительном анализе данный фактор не был значимым при сравнении с ЦОК ($p>0,05$).

Аналогичные результаты были получены и для следующих морфологических факторов: мультицентрической формы роста ($p=0,16$), ангиолимфатической инвазии ($p=0,2$), экспрессии Ki-67 ($p=0,2$).

При анализе степени злокачественности опухоли у больных с ЦОК было выявлено, что степень злокачественности большинства случаев соответствовала G2 и G3 – 72,3% и 27,6%, соответственно. При сравнительном анализе было обнаружена тенденция к увеличению числа опухолей со степенью G2 в группе больных с выявленными ЦОК ($p=0,06$).

При сравнительной оценке молекулярного подтипа у этих групп статистически значимых отличий выявлено не было ($p>0,05$). Однако при внутригрупповом анализе оказалось, что у 25 (53,2%) больных с люминальным В HER2-негативным подтипом РМЖ, ЦОК в периферической крови выявлялись достоверно чаще, чем у больных с другими молекулярно-биологическими подтипами РМЖ (t- критерий, $p=0,05$).

В исследовании Ma et al. [179] установлено, что такие факторы как: размер опухоли, статус аксиллярных ЛУ, молекулярный подтип опухоли (ТН РМЖ) и значение Ki-67 - сопряжены с положительным статусом ЦОК. В нашем исследовании был подтвержден только один фактор – молекулярный подтип опухоли. Однако подтверждение этих закономерностей требует проведение дальнейших научных поисков с большей выборкой.

Таким образом, комплексное использование клинико-морфологических, молекулярно-биологических и лабораторных факторов прогноза необходимо для понимания закономерностей процессов метастазирования и улучшения непосредственных результатов лечения больных первично-операбельным РМЖ.

ВЫВОДЫ

1. У больных с метастатическим поражением аксиллярных ЛУ к неблагоприятным клиническим факторам прогноза относятся: возраст менее 55 лет, длительность менопаузы менее 5 лет ($p < 0,05$). Морфологические факторы неблагоприятного прогноза - размер опухоли ≥ 2 см, ИР НСТ, мультицентрическая форма роста, высокая степень злокачественности, очаговая степень выраженности ИОЛ, наличие ЛВИ и фокусов рака *in situ* в окружающей ткани ($p < 0,05$).

2. Факторами, достоверно увеличивающими риск метастатического поражения аксиллярных ЛУ у больных первично-операбельным РМЖ являются: размер опухоли ≥ 2 см, мультицентрическая форма роста опухоли, инвазия опухолевых клеток в лимфатические сосуды ($p < 0,05$).

3. Субклинические метастазы (микрометастазы и изолированные опухолевые клетки) не являются независимыми прогностическими факторами и не оказывают влияния на показатели ОВ и БРВ ($p > 0,05$).

4. При первично-операбельном РМЖ поражение микро- и макрометастазами 1-2 лимфатических аксиллярных ЛУ не ухудшает как показатели 3,5 и 10-летней ОВ больных: 96,6% и 98,9%; 92,5 и 97,9%; 85,6% и 91,9% ($p > 0,05$), так и 3, 5 и 10-летней БРВ: 83,4% и 95,2%; 77,6% и 91,3%; 60,3% и 69,3% ($p > 0,05$) по сравнению с группой пациентов с отрицательным статусом ЛУ, соответственно.

5. Единственным независимым прогностическим фактором, влияющим на БРВ больных, является прорастание капсулы ЛУ. Показатели 10-летней БРВ больных без прорастания капсулы и при его наличии составили 94,1% и 75,8% соответственно ($p < 0,05$).

6. Частота выявления ЦОК у больных первично-операбельным РМЖ составляет 88,5%. В группе больных с отрицательным статусом аксиллярных ЛУ циркулирующие опухолевые клетки определялись в 90,9% случаев, что свидетельствует о возможном первично-диссеминированном процессе. Данный фактор достоверно не влияет на показатель БРВ ($p > 0,05$).

7. У больных с люминальным В HER2-негативным подтипом РМЖ достоверно чаще (53,2%, $p=0,05$) определялись ЦОК по сравнению с другими подтипами, что позволяет использовать метод выявления ЦОК, как дополнительный критерий риск-стратификации больных РМЖ.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Дополнительные морфологические методы исследования для определения микрометастазов и изолированных опухолевых клеток в аксиллярных ЛУ (ИГХ исследование) не рекомендуются для рутинного исследования в практической онкоморфологии.

2. Учитывая взаимосвязь лимфоваскулярной инвазии и метастатического поражения аксиллярных ЛУ, а также доступность использования в рутинной практике данного маркера с помощью окрашивания Г-Э, необходимо указывать данный признак в заключительном диагнозе для дополнительного клинического типирования РМЖ.

3. Выявление ЦОК в периферической крови возможно использовать как критерий риск-стратификации у больных ранним РМЖ, однако для определения их влияния на течение заболевания и прогноз требуется проведение дальнейших рандомизированных исследований.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- БРВ – безрецидивная выживаемость
- ГТ – гормональная терапия
- Г-Э – окраска срезов гематоксилином и эозином
- ДИ – доверительный интервал
- ДОК – диссеминированные опухолевые клетки
- ИГХ - иммуногистохимия
- ЛВИ – лимфоваскулярная инвазия
- ИДР – инфильтративный дольковый рак
- ИОК – изолированные опухолевые клетки
- ИОЛ – инфильтрирующие опухоль лимфоциты
- ТН РМЖ – трижды негативный рак молочной железы
- ИР НСТ – инфильтративный рак неспецифического типа
- ЛТ – лучевая терапия
- ЛУ – лимфатические узлы
- ОВ – общая выживаемость
- ОР – относительный риск
- ПЛД – подмышечная лимфодиссекция
- РМЖ – рак молочной железы
- РП – рецепторы прогестерона
- РЭ – рецепторы эстрогена
- СЛУ – сторожевой лимфатический узел
- ТГТ – таргетная терапия
- ХТ – химиотерапия
- ЦОК – циркулирующие опухолевые клетки
- СК – цитокератин
- G - гистологическая степень злокачественности
- HER2– человеческий рецептор эпидермального фактора роста 2
- Ki 67 – индекс пролиферации
- PanCK – панцитокератин

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Трошенков, Е.А. Проблемы диагностики и лечения первично операбельного рака молочной железы / Е.А. Трошенков, А.А. Костин // Исследования и практика в медицине. – 2015. – Т. 2(2). – С. 35-43.
2. Семиглазов, В.Ф. Общие рекомендации по адъювантному лечению рака молочной железы / В.Ф. Семиглазов // Материалы IX Российского онкологического конгресса. – М., 2005. – С. 45-50.
3. Stanley P. Leong. Micrometastatic Cancer Cells in LymphNodes, Bone Marrow, and Blood Clinical Significance and Biologic Implications / S.P. Leong, W.W. Tseng // CA Cancer J. Clin. – 2014. – Vol. 64. – P. 195-206.
4. Заридзе, Д.Г. Эпидемиология и скрининг рака молочной железы / Д.Г. Заридзе // Вопросы онкологии. – 2002. – Т. 48, № 4-5. – С. 489-495.
5. Каприн, А.Д. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность) / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова. – Москва.: МНИОИ им. П.А. Герцена, 2018. – (филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России). – илл. – 250 с.
6. Захарова, Н.А. Скрининг рака молочной железы: проблемы и решения / Н.А. Захарова, В.Ф. Семиглазов, S.W. Duffy. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 176 с.
7. Семиглазов, В.Ф. Скрининг для раннего выявления рака молочной железы / В.Ф. Семиглазов // Медицинский альманах. – 2008. – № 4. – С. 63 - 65.
8. Семиглазов, В.Ф. Скрининг рака молочной железы / В.Ф. Семиглазов, В.В. Семиглазов // Практическая онкология. – 2010. – Т. 11. – № 2. – С. 60-65.
9. Семиглазов, В.Ф. Обоснование стандартов лечения рака молочной железы: монография / В.Ф. Семиглазов, В.В. Семиглазов, К.Ш. Нургазиев, 2007. – С. 202-203.
10. Анализ и пути совершенствования онкологической службы Краснодарского края (1999-2008 гг.) / В.А. Порханов, А.Г. Барышев, Л.Г. Тесленко, О.А. Воронова, И.В. Цокур, С.В. Шаров. – Краснодар: Вика-Принт, 2009. – 396 с.

11. Семиглазов, В.Ф. Эпидемиология и скрининг рака молочной железы / В.Ф. Семиглазов, В.М. Мерабишвили., В.В. Семиглазов и др. // *Вопр. онкол.* – 2017. – Т. 63, № 3. – С. 375-384.
12. Чиссов, В.И. Злокачественные новообразования в России в 2010 году / В.И. Чиссов, В.В. Старинский, Г.В. Петрова. – Москва, 2012. – 260 с.
13. Наследственный рак молочной железы: генетическая и клиническая гетерогенность, молекулярная диагностика, хирургическая профилактика в группах риска / Л.Н. Любченко, Е.И. Батенева, И.К. Воротников [и др.] // *Успехи молекулярной онкологии.* – 2014. – № 2. – С.16-25.
14. Stacker, S.A. The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread / S.A. Stacker, M.E. Baldwin, M.G. Achen // *FASEB J.* – 2002. – Vol. 16. – P. 922-934.
15. Sleeman, J.P. Tumor metastasis and the lymphatic vasculature / J.P. Sleeman, W. Thiele // *Int. J. Cancer.* – 2009. – Vol. 125. – P. 2747-2756.
16. Cueni, L.N. New insights into the molecular control of the lymphatic vascular system and its role in disease / L.N. Cueni, M. Detmar // *J. Invest. Dermatol.* – 2006. – Vol. 126. – P. 2167-2177.
17. Wang, Y. Current views on the function of the lymphatic vasculature in health and disease / Y. Wang, G. Oliver // *Genes. Dev.* – 2010. – Vol. 24. – P. 2115-2126.
18. Swartz, M.A. Lymphatic function, lymphangiogenesis, and cancer metastasis / M.A. Swartz, M. Skobe // *Microsc. Res. Tech.* – 2001. – Vol. 55. – P. 92-99.
19. Ran, S. Lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in breast cancer / S. Ran, L. Volk, K. Hall et al. // *Pathophysiology.* – 2010. – Vol. 17. – P. 229-251.
20. Gerli, R. Specific adhesion molecules bind anchoring filaments and endothelial cells in human skin initial lymphatics / R. Gerli, R. Solito, E. Weber et al. // *Lymphology.* – 2000. – Vol. 33. – P. 148-157.
21. Aukland, K. Interstitial-lymphatic mechanisms in the control of extracellular fluid volume / K. Aukland, R.K. Reed // *Physiol. Rev.* – 1993. – Vol. 73. – P. 1-78.

22. Aukland, K. Interstitial fluid volume: local regulatory mechanisms / K. Aukland, G. Nicolaysen // *Physiol. Rev.* – 1981. – Vol. 61. – P. 556-643.
23. Skobe, M. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis / M. Skobe, T. Hawighorst, D.G. Jackson et al. // *Nat. Med.* – 2001. – Vol. 7. – P. 192-198.
24. He, Y. Preexisting lymphatic endothelium but not endothelial progenitor cells are essential for tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis / Y. He, I. Rajantie, M. Ilmonen et al. // *Cancer Res.* – 2004. – Vol. 64. – P. 3737-3740.
25. Salven, P. VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34+ lymphatic/vascular endothelial precursor cells / P. Salven, S. Mustjoki, R. Alitalo et al. // *Blood.* – 2003. – Vol. 101. – P. 168-172.
26. Cueni, L.N. The lymphatic system in health and disease / L.N. Cueni, M. Detmar // *Lymphat. Res. Biol.* – 2008. – Vol. 6. – P. 109-122.
27. Karkkainen, M.J. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins / M.J. Karkkainen, P. Haiko, K. Sainio et al. // *Nat. Immunol.* – 2004. – Vol. 5. – P. 74-80.
28. Baldwin, M.E. Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system / M.E. Baldwin, M.M. Halford, S. Roufail et al. // *Mol. Cell Biol.* – 2005. – Vol. 25. – P. 2441-2449.
29. Schoppmann, S.F. VEGF-C expressing tumor-associated macrophages in lymph node positive breast cancer: impact on lymphangiogenesis and survival / S.F. Schoppmann, A. Fenzl, K. Nagy et al. // *Surgery.* – 2006. – Vol. 139. – P. 839-846.
30. Eifel, P. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: adjuvant therapy for breast cancer, November 1-3, 2000 / P. Eifel, J.A. Axelson, J. Costa et al. // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2001. – Vol. 93(13). – P. 979-989.
31. Mittendorf, E.A. Evaluation of the stage IB designation of the American Joint Committee on Cancer staging system in breast cancer / E.A. Mittendorf, K.V. Ballman, L.M. McCall et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2014. – Vol. 32. – P. 1-10.
32. Goldhirsch, A. Strategies for sub- types – dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the

Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011 / A. Goldhirsch, W.C. Wood, A.S. Coates et al. // *Ann. Oncol.* – 2011. – Vol. 22(8). – P. 1736-1747.

33. Luz, D.A. Carnoy's solution enhances lymph node detection: an anatomical dissection study in cadavers / D.A. Luz, U. Ribeiro, C. Chassot et al. // *Histopathology.* – 2008. – Vol. 53(6). – P. 740-742.

34. Gregurek, S.F. Can GEWF solution improve the retrieval of lymph nodes from colorectal cancer / S.F. Gregurek, H.H. Wu // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2009. – Vol. 133(1). – P. 83-86.

35. Badve, S. Sentinel lymph node biopsy / S. Badve // ed. D.J. Dabbs, *Breast pathology.* – 1st ed. Elsevier / Saunders: Philadelphia, 2012. – P. 93-116.

36. Hoda, S.A. Invasive ductal carcinoma: assessment of prognosis with morphologic and biologic markers / S.A. Hoda // *Rosen's breast pathology.* – 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business, 2014. – P. 413-468.

37. Weaver, D.L. Sentinel node biopsy and lymph node classification in the 7th edition staging manual / D.L. Weaver // ed. F.P. O'Malley, S.E. Pinder, A.M. Mulligan // *Breast pathology.* – 2nd ed. – Philadelphia: Elsevier, 2011. – P. 295-305.

38. Whitworth, P. State-of-the-art lymph node staging for breast cancer in the year 2000 / P. Whitworth, K.M. McMasters, L. Tafra et al. // *Am. J. Surg.* – 2000. – Vol. 180(4). – P. 262-267.

39. Ho, A. The evolution of the locoregional therapy of breast cancer / A. Ho, M. Morrow // *Oncologist.* – 2011. – Vol. 16(10). – P. 1367-1379.

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

41. Dowlatshahi, K. Occult metastases in sentinel nodes of 200 patients with operable breast cancer / K. Dowlatshahi, M. Fan, J.M. Anderson et al. // *Ann. Surg. Oncol.* – 2001. – Vol. 8(8). – P. 675-681.

42. Rao, R. Axillary node interventions in breast cancer: a systematic review / R. Rao, D. Euhus, H.G. Mayo et al. // *JAMA.* – 2013. – Vol. 310(13). – P. 1385-1394.

43. Thompson, A.M. New standards of care in the management of the axilla / A.M. Thompson // *Curr. Opin. Oncol.* – 2012. Vol. 24(6). – P. 605-611.
44. Zarebczan Dull, B. Management of the axilla / B. Zarebczan Dull, H.B. Neuman // *Surg. Clin. North Am.* – 2013. – Vol. 93(2). – P. 429-444.
45. Noguchi, M. The changing role of axillary lymph node dissection for breast cancer / M. Noguchi, E. Morioka, Y. Ohno et al. // *Breast Cancer.* – 2013. – Vol. 20(1). – P. 41-46.
46. Giuliano, A.E. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial / A.E. Giuliano, K.K. Hunt, K.V. Ballman et al. // *JAMA.* – 2011. – Vol. 305(6). – P. 569-575.
47. Krag, D.N. Sentinel-lymph-node resection compared with conventional axillary-lymph-node dissection in clinically node-negative patients with breast cancer: overall survival findings from the NSABP B-32 randomized phase 3 trial / D.N. Krag, S.J. Anderson, T.B. Julian et al. // *Lancet Oncol.* – 2010. – Vol. 11(10). – P. 927-933.
48. Weaver, D.L. Pathology evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer: protocol recommendations and rationale / D.L. Weaver // *Mod. Pathol.* – 2010. – Vol. 23. – Suppl. 2. – S26-32.
49. Fritzsche, F.R. Pathological processing techniques and final diagnosis of breast cancer sentinel lymph nodes / F.R. Fritzsche, T. Reineke, L. Morawietz et al. // *Ann. Surg. Oncol.* – 2010. – Vol. 17. – P. 2892-2898.
50. Weaver, D.L. Metastasis detection in sentinel lymph nodes: comparison of a limited widely spaced (NSABP protocol B-32) and a comprehensive narrowly spaced paraffin block sectioning strategy / D.L. Weaver, U.P. Le, S.L. Dupuis et al. // *Am. J. Surg. Pathol.* – 2009. – Vol. 33. – P. 1583-1589.
51. Singletary, S.E. Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual / S.E. Singletary, J.L. Connolly // *CA Cancer J. Clin.* – 2006. – Vol. 56. – P. 37-47.

52. Kim, T. Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in early-stage breast carcinoma: a metaanalysis / T. Kim, A.E. Giuliano, G.H. Lyman // *Cancer*. – 2006. – Vol. 106. – P. 4-16.
53. Lyman, G.H. American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer / G.H. Lyman, A.E. Giuliano, M.R. Somerfield et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2005. – Vol. 23. – P. 7703-7720.
54. Chen, S.L. The prognostic significance of micrometastases in breast cancer: a SEER population-based analysis / S.L. Chen, F.M. Hoehne, A.E. Giuliano // *Ann. Surg. Oncol.* – 2007. – Vol. 14. – P. 3378-3384.
55. Pepels, M.J. Regional Recurrence in Breast Cancer Patients With Sentinel Node Micrometastases and Isolated Tumor Cells / M.J. Pepels, M. de Boer, P. Bult et al. // *Ann. Surg.* – 2012. – Vol. 255(1). – P. 116-121.
56. Weaver, D.L. Effect of occult metastases on survival in node-negative breast cancer / D.L. Weaver, T. Ashikaga, D.N. Krag et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2011. – Vol. 364. – P. 412-421.
57. Weaver, D.L. Metastasis detection in sentinel lymph nodes: comparison of a limited widely spaced (NSABP protocol B-32) and a comprehensive narrowly spaced paraffin block sectioning strategy / D.L. Weaver, U.P. Le, S.L. Dupuis et al. // *Am. J. Surg. Pathol.* – 2009. – Vol. 33. – P. 1583-1589.
58. Giuliano, A.E. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial / A.E. Giuliano, K.K. Hunt, K.V. Ballman et al. // *JAMA*. – 2011. – Vol. 305(6). – P. 569-575. doi: 10.1001/jama.2011.90.
59. Hieken, T.J. Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with sentinel-node micrometastases: commentary on the IBCSG 23-01 Trial / T.J. Hieken, J.C. Boughey // *Gland Surg.* – 2013. – Vol. 2. – P. 128-132.
60. Krag, D.N. Sentinel lymph-node resection compared with conventional axillary lymph-node dissection in clinically node-negative patients with breast cancer:

overall survival findings from the NSABP B-32 randomised phase 3 trial / D.N. Krag, S.J. Anderson, T.B. Julian et al. // *Lancet Oncol.* – 2010. – Vol. 11. – P. 927-933.

61. Chen, S.L. The prognostic significance of micrometastases in breast cancer: a SEER population-based analysis / S.L. Chen, F.M. Hoehne, A.E. Giuliano // *Ann. Surg. Oncol.* – 2007. – Vol. 14. – P. 3378-3384.

62. Wu, Y. Occult axillary lymph node metastases do not have prognostic significance in early stage breast cancer / Y. Wu, E.A. Mittendorf, C. Kelten et al. // *Cancer.* – 2012. – Vol. 118(6). – P. 1507-1514.

63. Sahin, A.A. Identification and biologic significance of micrometastases in axillary lymph nodes in patients with invasive breast cancer / A.A. Sahin, M. Guray, K.K. Hunt // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2009. – Vol. 133(6). – P. 869-878.

64. Galimberti, V. Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with sentinel-node micro-metastases (IBCSG 23–01): a phase 3 randomized controlled trial / V. Galimberti, B.F. Cole, S. Zurrada et al. // *Lancet Oncol.* – 2013. – Vol. 14(4). – P. 297-305.

65. In Edge, S.B. *AJCC cancer staging manual* / ed. S.B. Edge, D.R. Byrd, C.C. Compton et al. – 7th ed. – New York: Springer, 2010.

66. Blamey, R.W. ONCOPOOL: a European database for 16,944 cases of breast cancer / R.W. Blamey, B. Hornmark-Stenstam, G. Ball et al. // *Eur. J. Cancer.* – 2010. – Vol. 46. – P. 56-71.

67. Michaelson, J.S. Predicting the survival of patients with breast carcinoma using tumor size / J.S. Michaelson, M. Silverstein, J. Wyatt et al. // *Cancer.* – 2002. – Vol. 95. – P. 713-723.

68. Laura, S. Tumour size as a predictor of axillary node metastases in patients with breast cancer / S. Laura, N. Coombs, O. Ung et al. // *ANZ J. Surg.* – 2006. – Vol. 76. – P. 1002-1006.

69. Yu, K.D. Difference between observed and expected number of involved lymph nodes reflects the metastatic potential of breast cancer independent to intrinsic subtype / K.D. Yu, Y.Z. Jiang, Z.M. Shao // *Oncotarget.* – 2015. – Vol. 6. – P. 16686-16697.

70. Foulkes, W.D. Tumor size and survival in breast cancer—a reappraisal / W.D. Foulkes, J.S. Reis-Filho, S.A. Narod // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2010. – Vol. 7. – P. 348-353. doi: 10.1038/nrclinonc.2010.39.
71. Yu, K.D. Effect of large tumor size on cancer-specific mortality in node-negative breast cancer / K.D. Yu, Y.Z. Jiang, S. Chen et al. // *Mayo Clin. Proc.* – 2012. – Vol. 87. – P. 1171-1180.
72. Zheng, Y.Z. Effect of tumor size on breast cancer-specific survival stratified by joint hormone receptor status in a SEER population-based study / Y.Z. Zheng, L. Wang, X. Hu et al. // *Oncotarget.* – 2015. – Vol. 6. – P. 22985-22995.
73. Orang, E. Predictive Role of Tumor Size in Breast Cancer with Axillary Lymph Node Involvement - Can Size of Primary Tumor be used to Omit an Unnecessary Axillary Lymph Node Dissection? / E. Orang, E. Marzony, A. Afsharfard // *Asian Pacific J. Cancer Prev.* – 2013. – Vol. 14 (2). – P. 717-722.
74. Shatat, L. Microinvasive breast carcinoma carries an excellent prognosis regardless of the tumor characteristics / L. Shatat, N. Gloyeske, R. Madan et al. // *Hum. Pathol.* – 2013. – Vol. 44(12). – P. 2684-2689.
75. Lee, A.H. Prognostic value of lymphovascular invasion in women with lymph node negative invasive breast carcinoma / A.H. Lee, S.E. Pinder, R.D. Macmillan et al. // *Eur. J. Cancer.* – 2006. – Vol. 42. – P. 357-362.
76. Van den Eynden, G.G. Distinguishing blood and lymph vessel invasion in breast cancer: a prospective immunohistochemical study / G.G. Van den Eynden, I. Van der Auwera, S.J. Van Laere et al. // *Br. J. Cancer.* – 2006. – Vol. 94. – P. 1643-1649.
77. Shen, S.D. Correlation of lymphovascular invasion with clinicopathological factors in invasive breast cancer: a meta-analysis / S.D. Shen, S.Z. Zhong, C.Z. Wang et al. // *Int. J. Clin. Experimental Med.* – 2015. – Vol. 8(10). – P. 17789-17795.
78. Lakhani, S.R. World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of the breast and female genital organs / ed. S.R. Lakhani, I.O. Ellis, S.J. Schnitt et al. – 4th ed. – Lyon: IARC Press, 2012.

79. Kulkarni, N. Rare breast cancer: 933 adenoid cystic carcinomas from the National Cancer Data Base / N. Kulkarni, C.M. Pezzi, J.M. Greif et al. // *Ann. Surg. Oncol.* – 2013. – Vol. 20(7). – P. 2236-2241.
80. Thompson, K. Adenoid cystic breast carcinoma: is axillary staging necessary in all cases? Results from the California Cancer Registry / K. Thompson, J. Grabowski, S.L. Saltzstein et al. // *Breast J.* – 2011. – Vol. 17(5). – P. 485-489.
81. Cao, A.Y. Tumor characteristics and the clinical outcome of invasive lobular carcinoma compared to infiltrating ductal carcinoma in a Chinese population / A.Y. Cao, L. Huang, J. Wu et al. // *World J. Surg. Oncol.* – 2012. – Vol. 10. – P. 152.
82. Tang, F. Invasive mammary carcinoma with neuroendocrine differentiation: histological features and diagnostic challenges / F. Tang, B. Wei, Z. Tian et al. // *Histopathology.* – 2011. – Vol. 59(1). – P. 106-115.
83. Vingiani, A. 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.
84. Walsh, M.M. Invasive micropapillary carcinoma of the breast: eighty cases of an under-recognized entity / M.M. Walsh, I.J. Bleiweiss // *Hum. Pathol.* – 2001. – Vol. 32. – P. 583-589.
85. Zekioglu, O. Invasive micropapillary carcinoma of the breast: high incidence of lymph node metastasis with extranodal extension and its immunohistochemical profile compared with invasive ductal carcinoma / O. Zekioglu, Y. Erhan, M. Ciris et al. // *Histopathology.* – 2004. – Vol. 44. – P. 18-23.
86. Nassar, H. Clinicopathologic analysis of invasive micropapillary differentiation in breast carcinoma / H. Nassar, T. Wallis, A. Andea et al. // *Mod. Pathol.* – 2001. – Vol. 14. – P. 836-841.
87. DownsKelly, E. Matrix-producing carcinoma of the breast: an aggressive subtype of metaplastic carcinoma / E. DownsKelly, K.M. Nayeemuddin, C. Albarracin et al. // *Am. J. Surg. Pathol.* – 2009. – Vol. 33. – P. 534-541.

88. Lee, H. Metaplastic breast cancer: clinicopathological features and its prognosis / H. Lee, S.Y. Jung, J.Y. Ro et al. // *J. Clin. Pathol.* – 2012. – Vol. 65(5). – P. 441-446.
89. Tse, G.M. Metaplastic carcinoma of the breast: a clinico-pathological review / G.M. Tse, P.H. Tan, T.C. Putti et al. // *J. Clin. Pathol.* – 2006. – Vol. 59. – P. 1079-1083.
90. Ashturkar, A.V. Factors predicting the axillary lymph node metastasis in breast cancer: is axillary node clearance indicated in every breast cancer patient?: factors predicting the axillary lymphnode metastases in breast cancer / A.V. Ashturkar, G.S. Pathak, S.D. Deshmukh et al. // *Indian J. Surg.* – 2011. – Vol. 73(5). – P. 331-335.
91. Tan, L.G. Predictors of Axillary Lymph Node Metastases in Women with Early Breast Cancer in Singapore / L.G. Tan, Y.Y. Tan, D. Heng et al. // *Singapore Med. J.* – 2005. – Vol. 46. – P. 693-697.
92. Shatat, L. Microinvasive breast carcinoma carries an excellent prognosis regardless of the tumor characteristics / L. Shatat, N. Gloyeske, R. Madan et al. // *Hum. Pathol.* – 2013. – Vol. 44(12). – P. 2684-2689.
93. Tot, T. Assessment of the most important prognostic factors // ed. T. Tot, L. Tabar, P. Dean // *Practical breast pathology.* – New York: Thieme Medical Publishers. – 2002. – P. 125-135.
94. Anderson, E. The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis / E. Anderson // *Breast Cancer Res.* – 2002. – Vol. 4. – P. 197-201.
95. Allred, CD. Commentary: hormone receptor testing in breast cancer: a distress signal from Canada / CD. Allred // *Oncologist.* – 2008. – Vol. 13. – P. 1134-1136.
96. Blamey, R.W. Guidelines on endocrine therapy of breast cancer EUSOMA / R.W. Blamey // *Eur. J. Cancer.* – 2002. – Vol. 38. – P. 615-634.
97. Cui, X. Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy / X. Cui, R. Schiff, G. Arpino et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2005. – Vol. 23. – P. 7721-7735.

98. Hammond, M.E. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer / M.E. Hammond, D.F. Hayes, M. Dowsett et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2010. – Vol. 28. – P. 2784-2795. Erratum in *Clin Oncol.* – 2010. – Vol. 28. – P. 3543.

99. Goldstein, N.S. Minimum formalin fixation time for consistent estrogen receptor immunohistochemical staining of invasive breast carcinoma / N.S. Goldstein, M. Ferkowicz, E. Odish et al. // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2003. – Vol. 120. – P. 86-92.

100. Harris, L. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer / L. Harris, H. Fritsche, R. Menell et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2007. – Vol. 25. – P. 5287-5312.

101. Umemura, S. Immunohistochemical evaluation of hormone receptors in breast cancer: which scoring system is suitable for highly sensitive procedures? / S. Umemura, J. Itoh, H. Itoh et al. // *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* – 2004. – Vol. 12. – P. 8-13.

102. Viale, G. Predicting the status of axillary sentinel lymph nodes in 4351 patients with invasive breast carcinoma treated in a single institution / G. Viale, S. Zurrada, E. Maiorano et al. // *Cancer.* – 2005. – Vol. 103. – P. 492-500.

103. Pavlista, D. Complications of axillary dissection in breast carcinoma / D. Pavlista, M. Dusková, J. Novotný et al. // *Ceská Gynekol.* – 2002. – Vol. 67(6). – P. 333-337.

104. Ross, J.S. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine / J.S. Ross, E.A. Slodkowska, W.F. Symmans et al. // *Oncologist.* – 2009. – Vol. 14(4). – P. 320-368.

105. Sauter, G. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations / G. Sauter, J. Lee, J.M.S. Bartlett et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2009. – Vol. 27. – P. 1323-1333.

106. Piccart-Gebhart, M.J. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer / M.J. Piccart-Gebhart, M. Procter, B. Leyland-Jones et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2005. – Vol. 353. – P. 1659-1672.

107. Wolff, A.C. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer / A.C. Wolff, M.E. Hammond, J.N. Schwartz et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2007. – Vol. 25. – P. 1-28.

108. Wolff, A.C. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update / A.C. Wolff, M.E. Hammond, D.G. Hicks et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2013. – Vol. 31. – P. 3997-4013.

109. Ahmed, AR. HER2 expression is a strong independent predictor of nodal metastasis in breast cancer / A.R. Ahmed // *J. Egypt. Natl. Canc. Inst.* – 2016. – Vol. 28. – P. 219-227.

110. Polley, M.Y. An international study to increase concordance in Ki67 scoring / M.Y. Polley, S.C. Leung, D. Gao et al. // *Mod. Pathol.* – 2015. – Vol. 38. – P. 1-9.

111. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomized trials. *Lancet.* – 2005. – Vol. 365(9472). – P. 1687-1717.

112. Sorlie, T. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications / T. Sorlie, C.M. Perou, R. Tibshirani et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. – Vol. 98(19). – P. 10869-10874.

113. Goldhirsch, A. Strategies for sub- types – dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011 / A. Goldhirsch, W.C. Wood, A.S. Coates et al. // *Ann. Oncol.* – 2011. – Vol. 22(8). – P. 1736-1747.

114. Si, C. Association between molecular subtypes and lymph node status in invasive breast cancer / C. Si, Y. Jin, H. Wang et al. // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* – 2014. – Vol. 7(10). – P. 6800-6806.

115. Vincent-Salomon, A. Bone marrow micrometastasis in breast cancer: review of detection methods, prognostic impact and biological issues / A. Vincent-Salomon, F.C. Bidard, J.Y. Pierga // *J. Clin. Pathol.* – 2008. – Vol. 61. – P. 570-576.
116. Fehm, T. A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation / T. Fehm, S. Braun, V. Muller et al. // *Cancer.* – 2006. – Vol. 107. – P. 885-892.
117. Naume, B. Persistence of isolated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients predicts increased risk for relapse -- a European pooled analysis / B. Naume, T. Fehm, G. Wiedswang et al. // *Cancer Res.* – 2009. – Vol. 69. – abstr. 304.
118. Pierga, J.Y. Circulating tumor cell detection predicts early metastatic relapse after neoadjuvant chemotherapy in large operable and locally advanced breast cancer in a phase II randomized trial / J.Y. Pierga, F.C. Bidard, C. Mathiot et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2008. – Vol. 14. – P. 7004-7010.
119. Rack, B.K. Prognostic relevance of circulating tumor cells (CTCs) in peripheral blood of breast cancer patients before and after adjuvant chemotherapy / B.K. Rack, C. Schindlbeck, A. Schneeweiss et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2008. – Vol. 26. – abstr. 503.
120. Naume, B. Presence of bone marrow micrometastasis is associated with different recurrence risk within molecular subtypes of breast cancer / B. Naume, X. Zhao, M. Synnestvedt et al. // *Mol. Oncol.* – 2007. – Vol. 1. – P. 160-171.
121. Bidard, F.C. Disseminated tumor cells of breast cancer patients: a strong prognostic factor for distant and local relapse / F.C. Bidard, A. Vincent-Salomon, S. Gomme et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2008. – Vol. 14. – P. 3306-3311.
122. Braun, S. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer / S. Braun, K. Pantel, P. Muller et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2000. – Vol. 342. – P. 525-533.
123. Braun, S. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer / S. Braun, F.D. Vogl, B. Naume // *N. Engl. J. Med.* – 2005. – Vol. 353. – P. 793-802.

124. Janni, W. Persistence of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients predicts increased risk for relapse -- a European pooled analysis / W. Janni, F.D. Vogl, G. Wiedswang et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2011. – Vol. 17. – P. 2967-2976.
125. Molino, A. Bone marrow micrometastases in breast cancer patients: a long-term follow-up study / A. Molino, M. Giovannini, R. Micciolo et al. // *Clin. Med. Oncol.* – 2008. – Vol. 2. – P. 487-490.
126. Falck, A.K. Analysis of and prognostic information from disseminated tumour cells in bone marrow in primary breast cancer: a prospective observational study / A.K. Falck, P.O. Bendahl, C. Ingvar et al. // *BMC Cancer.* – 2012. – Vol. 12. – P. 403.
127. Hartkopf, A.D. Prognostic relevance of disseminated tumour cells from the bone marrow of early stage breast cancer patients - results from a large single-centre analysis / A.D. Hartkopf, F.A. Taran, M. Wallwiener et al. // *Eur. J. Cancer.* – 2014. – Vol. 50. – P. 2550-2559.
128. Müller, V. Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity / V. Müller, N. Stahmann, S. Riethdorf et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2005. – Vol. 11. – P. 3678-3685.
129. Pierga, J.Y. Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients / J.Y. Pierga, C. Bonneton, A. Vincent-Salomon et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2004. – Vol. 10. – P. 1392-1400.
130. Fehm, T. Presence of apoptotic and nonapoptotic disseminated tumor cells reflects the response to neoadjuvant systemic therapy in breast cancer / T. Fehm, S. Becker, G. Becker-Pergola et al. // *Breast Cancer Res.* – 2006. – Vol. 8. –R60.
131. Lianidou, E.S. Circulating tumor cells as promising novel biomarkers in solid cancers / E.S. Lianidou, A. Strati, A. Markou // *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* – 2014. – Vol. 51. – P. 160-171.

132. Lianidou, E.S. Clinical challenges in the molecular characterization of circulating tumour cells in breast cancer / E.S. Lianidou, D. Mavroudis, V. Georgoulas // *Br. J. Cancer.* – 2013. – Vol. 108. – P. 2426-2432.

133. Lianidou, E.S. Molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer: challenges and promises for individualized cancer treatment / E.S. Lianidou, A. Markou, A. Strati // *Cancer Metastasis Rev.* – 2012. – Vol. 31. – P. 663-671.

134. Parkinson, D.R. Considerations in the development of circulating tumor cell technology for clinical use / D.R. Parkinson, N. Dracopoli, B.G. Petty et al. // *J. Transl. Med.* – 2012. – Vol. 10. – P. 138.

135. Cristofanilli, M. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer / M. Cristofanilli, G.T. Budd, M.J. Ellis et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2004. – Vol. 351. – P. 781-791.

136. Cohen, S.J. Isolation and characterization of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer / S.J. Cohen, R.K. Alpaugh, S. Gross et al. // *Clin. Colorectal Cancer.* – 2006. – Vol. 6. – P. 125-132.

137. Okegawa, T. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with hormone refractory prostate cancer / T. Okegawa, K. Nutahara, E. Higashihara // *J. Urol.* – 2009. – Vol. 181. – P. 1091-1907.

138. Mostert, B. Circulating tumor cells (CTCs): detection methods and their clinical relevance in breast cancer / B. Mostert, S. Sleijfer, J.A. Foekens // *Cancer Treat. Rev.* – 2009. – Vol. 35. – P. 463-474.

139. Talasz, A.H. Isolating highly enriched populations of circulating epithelial cells and other rare cells from blood using a magnetic sweeper device / A.H. Talasz, A.A. Powell, D.E. Huber et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2009. – Vol. 106. – P. 3970-3975.

140. Allan, A.L. Circulating tumor cell analysis: technical and statistical considerations for application to the clinic / A.L. Allan, M. Keeney // *J. Oncol.* – 2010. – 2010:426218.

141. Müller, V. Prognostic impact of circulating tumor cells assessed with the Cell Search System™ and AdnaTest Breast™ in cancer patients: the DETECT study / V. Müller, S. Riethdorf, B. Rack et al. // *Breast Cancer Res.* – 2012. – Vol. 14. – R118.
142. Punnoose, E.A. Molecular biomarker analyses using circulating tumor cells / E.A. Punnoose, S.K. Atwal, J.M. Spoerke et al. // *PLoS One.* – 2010. – Vol. 5. – e12517.
143. Xenidis, N. Predictive and prognostic value of peripheral blood cytokeratin-19 mRNA-positive cells detected by real-time polymerase chain reaction in node-negative breast cancer patients / N. Xenidis, M. Perraki, M. Kafousi et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2006. – Vol. 24. – P. 3756-3762.
144. Ignatiadis, M. Different prognostic value of cytokeratin-19 mRNA positive circulating tumor cells according to estrogen receptor and HER2 status in early-stage breast cancer / M. Ignatiadis, N. Xenidis, M. Perraki et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2007. – Vol. 25. – P. 5194-5202.
145. Rack, B.K. Use of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood of breast cancer patients before and after adjuvant chemotherapy to predict risk for relapse: the SUCCESS trial / B.K. Rack, C. Schindlbeck, U. Andergassen et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2010. – Vol. 28. – Suppl. 15. – P. 1003.
146. Bidard, F.C. Single circulating tumor cell detection and overall survival in nonmetastatic breast cancer / F.C. Bidard, C. Mathiot, S. Delaloge et al. // *Ann. Oncol.* – 2010. – Vol. 21. – P. 729-733.
147. Franken, B. Circulating tumor cells, disease recurrence and survival in newly diagnosed breast cancer / B. Franken, M.R. de Groot, W.J. Mastboom et al. // *Breast Cancer Res.* – 2012. – Vol.14. – R133.
148. Lucci, A. Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study / A. Lucci, C.S. Hall, A.K. Lodhi et al. // *Lancet Oncol.* – 2012. – Vol. 13. – P. 688-695.
149. Hayes, D.F. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival

/ D.F. Hayes, M. Cristofanilli, G.T. Budd et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2006. – Vol. 12. – P. 4218-4224.

150. Giuliano, M. Circulating tumor cells as prognostic and predictive markers in metastatic breast cancer patients receiving first-line systemic treatment / M. Giuliano, A. Giordano, S. Jackson et al. // *Breast Cancer Res.* – 2011. – Vol. 13. – R67.

151. Giordano, A. CTCs in metastatic breast cancer / A. Giordano, M. Cristofanilli // *Recent Results Cancer Res.* – 2012. – Vol. 195. – P. 193-201.

152. Pierga, J.Y. High independent prognostic and predictive value of circulating tumor cells compared with serum tumor markers in a large prospective trial in first-line chemotherapy for metastatic breast cancer patients / J.Y. Pierga, D. Hajas, T. Bachelot et al. // *Ann. Oncol.* – 2012. – Vol. 23. – P. 618-624.

153. Wallwiener, M. The prognostic impact of circulating tumor cells in subtypes of metastatic breast cancer / M. Wallwiener, A.D. Hartkopf, I. Baccelli et al. // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2013. – Vol. 137. – P. 503-510.

154. Jiang, Z.F. Circulating tumor cells predict progression-free and overall survival in Chinese patients with metastatic breast cancer, HER2-positive or triple-negative (CBCSG004): a multicenter, double-blind, prospective trial / Z.F. Jiang, M. Cristofanilli, Z.M. Shao et al. // *Ann. Oncol.* – 2013. – Vol. 24. – P. 2766-2772.

155. Smerage, J.B. Circulating tumor cells and response to chemotherapy in metastatic breast cancer: SWOG S0500 / J.B. Smerage, W.E. Barlow, G.N. Hortobagyi et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2014. – Vol. 32. – P. 3483-3489.

156. Wallwiener, M. Serial enumeration of circulating tumor cells predicts treatment response and prognosis in metastatic breast cancer: a prospective study in 393 patients / M. Wallwiener, S. Riethdorf, A.D. Hartkopf et al. // *BMC Cancer.* – 2014. – Vol. 14. – P. 512.

157. Giuliano, M. Circulating tumor cells as early predictors of metastatic spread in breast cancer patients with limited metastatic dissemination / M. Giuliano, A. Giordano, S. Jackson et al. // *Breast Cancer Res.* – 2014. – Vol. 16. – P. 440.

158. Krishnamurthy, S. Detection of minimal residual disease in blood and bone marrow in early stage breast cancer / S. Krishnamurthy, M. Cristofanilli, B. Singh et al. // *Cancer*. – 2010. – Vol. 116. – P. 3330-3337.

159. Riethdorf, S. Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial / S. Riethdorf, V. Muller, L. Zhang et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2010. – Vol. 16. – P. 2634-2645.

160. Xenidis, N. Clinical relevance of circulating CK-19 mRNA-positive cells detected during the adjuvant tamoxifen treatment in patients with early breast cancer / N. Xenidis, V. Markos, S. Apostolaki et al. // *Ann. Oncol.* – 2007. – Vol. 18. – P. 1623-1631.

161. Xenidis, N. Cytokeratin-19 mRNA- positive circulating tumor cells after adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer / N. Xenidis, M. Ignatiadis, S. Apostolaki et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2009. – Vol. 27. – P. 2177-2184.

162. Saloustros, E. Cytokeratin-19 mRNA- positive circulating tumor cells during follow-up of patients with operable breast cancer: prognostic relevance for late relapse / E. Saloustros, M. Perraki, S. Apostolaki et al. // *Breast Cancer Res.* – 2011. – Vol. 13. – R60.

163. Sandri, M.T. Changes in circulating tumor cell detection in patients with localized breast cancer before and after surgery / M.T. Sandri, L. Zorzino, M.C. Cassatella et al. // *Ann. Surg. Oncol.* – 2010. – Vol. 17. – P. 1539-1545.

164. Biggers, B. Circulating tumor cells in patients undergoing surgery for primary breast cancer: preliminary results of a pilot study / B. Biggers, S. Knox, M. Grant et al. // *Ann. Surg. Oncol.* – 2009. – Vol. 16. – P. 969-971.

165. Fehm, T. HER2 status of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: a prospective, multicenter trial / T. Fehm, V. Muller, B. Aktas et al. // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2010. – Vol. 124. – P. 403-412.

166. Untch, M. Lapatinib versus trastuzumab in combination with neoadjuvant anthracycline-taxane- based chemotherapy (GeparQuinto, GBG 44): a randomised

phase 3 trial / M. Untch, S. Loibl, J. Bischoff et al. // *Lancet Oncol.* – 2012. – Vol. 13. – P. 135-144.

167. Bidard, F.C. Time-dependent prognostic impact of circulating tumor cells detection in non-metastatic breast cancer: 70-month analysis of the REMAGUS02 study / F.C. Bidard, L. Belin, S. Delaloge et al. // *Int. J. Breast Cancer.* – 2013. – 2013:130470.

168. Fei, F. Are changes in circulating tumor cell (CTC) count associated with the response to neoadjuvant chemotherapy in local advanced breast cancer? A meta-analysis / F. Fei, Y. Du, G. Di et al. // *Oncol. Res. Treat.* – 2014. – Vol. 37(5). – P. 250-254.

169. Dawood, S. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: from prognostic stratification to modification of the staging system? / S. Dawood, K. Broglio, V. Valero et al. // *Cancer.* – 2008. – Vol. 113. – P. 2422-2430.

170. Zhang, L. Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells in breast cancer / L. Zhang, S. Riethdorf, G. Wu et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2012. – Vol. 18. – P. 5701-5710.

171. Martin, M. Circulating tumor cells following first chemotherapy cycle: an early and strong predictor of outcome in patients with metastatic breast cancer / M. Martin, S. Custodio, M.L. de Las Casas et al. // *Oncologist.* – 2013. – Vol. 18. – P. 917-923.

172. Budd, G.T. Circulating tumor cells versus imaging-predicting overall survival in metastatic breast cancer / G.T. Budd, M. Cristofanilli, M.J. Ellis et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2006. – Vol. 12. – P. 6403-6409.

173. Giordano, A. Circulating tumor cells in immunohistochemical subtypes of metastatic breast cancer: lack of prediction in HER2-positive disease treated with targeted therapy / A. Giordano, M. Giuliano, M. De Laurentiis et al. // *Ann. Oncol.* – 2012. – Vol. 23. – P. 1144-1150.

174. Giordano, A. Clinical value of circulating tumor cells (CTC) in first-line metastatic breast cancer according to type of treatment and immunohistochemical

molecular subtype / A. Giordano, M. Giuliano, B.C. Handy et al. // San Antonio Breast Cancer symposium, 2010. – Abstracts, PD04-02.

175. Liu, M.C. Circulating tumor cells: a useful predictor of treatment efficacy in metastatic breast cancer / M.C. Liu, P.G. Shields, R.D. Warren et al. // J. Clin. Oncol. – 2009. – Vol. 27. – P. 5153-5159.

176. Pierga, J.Y. Circulating tumor cells and brain metastasis outcome in patients with HER2-positive breast cancer: the LANDSCAPE trial / J.Y. Pierga, F.C. Bidard, C. Cropet et al. // Ann. Oncol. – 2013. – Vol. 24(12). – P. 2999-3004.

177. Rack, B. Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients / B. Rack, C. Schindlbeck, J. Jückstock et al. // J. Natl. Cancer Inst. – 2014;106(5). pii: dju066. doi: 10.1093/jnci/dju066

178. Cakir, M. Axillary lymph node status in multicentric breast tumors and breast tumors with nipple involvement / M. Cakir, A. Tekin, T. Kücükartallar et al. // Breast care (Basel, Switzerland). – 2012. – Vol. 7(5). – P. 394-396.

179. Ma, S. Predictive Value of Circulating Tumor Cells for Evaluating Short- and Long-Term Efficacy of Chemotherapy for Breast Cancer / S. Ma, F. Ling, A. Gui et al. // Med. Sci. Monit. – 2017. – Vol. 23. – P. 4808-4816.