

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет) (ректор – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор Глыбочко Петр Витальевич).

Научные руководители:

доктор медицинских наук
кандидат медицинских наук

Поликарпова Светлана Борисовна
Вишневская Яна Владимировна

Официальные оппоненты:

Гривцова Людмила Юрьевна, доктор биологических наук, заведующая отделом лабораторной медицины и лабораторией клинической иммунологии Медицинского радиологического научного центра имени А.Ф. Цыба – филиала федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Азимова Рано Боходыровна, кандидат медицинских наук, врач-онколог акционерного общества «Европейский медицинский центр».

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «1» октября 2020 года в 13-00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.017.01 на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24 и на сайте www.gonc.ru.

Автореферат разослан «.....» 2020 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Рак молочной железы (РМЖ) занимает 1 место в структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями у женщин в России. Из более чем 330000 новых случаев злокачественных опухолей, выявляемых ежегодно среди женского населения, доля РМЖ составляет свыше 20% (Каприн А.Д. и др., 2019).

Несмотря на успехи в ранней диагностике и системной терапии, которые значительно улучшили результаты общей и безрецидивной выживаемости больных РМЖ, лечение метастатической болезни остается одной из ключевых задач современной онкологии, поскольку именно метастатическая болезнь является ведущей причиной смерти онкологических больных.

По данным американского онкологического общества, показатели 5-летней общей выживаемости для локализованных стадий составляет 100%, при поражении регионарных лимфатических узлов (ЛУ) – 75-86% (American Cancer Society, 2019). Для точного прогноза выживаемости больных РМЖ также учитываются и другие параметры, которые влияют на определение тактики лечения.

Современные представления о механизме метастазирования, основном этапе эволюции злокачественного роста, включают в себя: отделение опухолевых клеток от первичного узла, интравазация по кровеносным и лимфатическим сосудам, диссеминация по системе кровообращения, формирование ниши для роста и развития вторичного очага. Данная последовательность метастатического каскада универсальна для всех злокачественных новообразований. До сих пор остается неизученным вопрос о том, какой путь предпочтительней в процессе метастазирования – гематогенный или лимфогенный. Считается, что в 80% солидные опухоли метастазируют преимущественно через лимфатическую систему. Регионарные лимфатические узлы (ЛУ) - основные коллекторы лимфооттока, в которых чаще всего обнаруживаются метастазы. Состояние регионарных ЛУ является важным прогностическим фактором при РМЖ. Однако роль и метастатический потенциал микрометастазов и изолированных опухолевых клеток (ИОК) в регионарных ЛУ до сих пор остаются невыясненными. Это вызвано рядом объективных причин: во-первых, определение микрометастазов и ИОК 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 больных РМЖ.

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.

Методы и методология и исследования

В основу работы положено ретроспективное исследование клинико-морфологических 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 в регионарных ЛУ изменений не выявлено (pN0). Во 2 группу включены больные, у которых выявлены макро- и микрометастазы, а также ИОК, обнаруженные при дополнительном ИГХ исследовании (pN1; pN1mi; pN0 (i+)).

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 срезы толщиной 4-5 микрон 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 (ИОК) в ЛУ выявлялись с помощью окраски антителами к 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.

ЦОК выявлялись до начала лечения иммунологически методом проточной цитометрии в 7,5 мл периферической крови. Окрашивание проводилось методом прямой иммунофлюоресценции с моноклональными антителами к панлейкоцитарному антигену CD45, молекуле адгезии эпителиальных клеток Epcam (CD326) и цитокератинам 7 и 8 типов – Cam5.2 (Becton Dickenson, США). Подсчет окрашенных образцов проводился на проточном цитометре FACS Canto II (Becton Dickinson, США). Анализ полученных данных проводился с использованием программного обеспечения Kaluza Analysis (Beckman Coulter, 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.

Научная новизна

В результате проведенного исследования впервые установлена корреляционная связь между клиническим течением, морфологической структурой первичной опухоли и особенностями поражения аксиллярных ЛУ у больных первично-операбельным РМЖ.

Впервые на большом клиническом материале определена значимость субклинических метастазов (микрومتастазов и изолированных опухолевых клеток) в аксиллярных ЛУ у больных первично-операбельным РМЖ.

Обобщены показатели общей и безрецидивной выживаемости больных первично-операбельным РМЖ в зависимости от характера поражения регионарных ЛУ.

Впервые частота выявления ЦОК в периферической крови больных первично-операбельными и местно-распространенными формами РМЖ сопоставлена с морфологическими особенностями опухоли, в частности со статусом аксиллярных ЛУ.

Проанализирована общая и безрецидивная выживаемость больных первично-операбельными и местно-распространенными формами РМЖ в зависимости от количества ЦОК в периферической крови и статуса аксиллярных ЛУ и предложены дополнительные критерии риск-стратификации больных РМЖ.

Теоретическая и практическая значимость

На основании полученных результатов исследования расширены представления о значимости субклинических метастазов в регионарных ЛУ при РМЖ и их влияние на общую и безрецидивную выживаемость.

Оценена возможность использования ЦОК как дополнительного критерия риск-стратификации больных первично-операбельным РМЖ.

Личный вклад

Научные результаты, обобщенные в диссертационной работе Пономарева В.Е., получены им самостоятельно на базе кафедры онкологии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Автор изучил клинико-морфологические особенности больных первично-операбельным РМЖ, значение циркулирующих опухолевых клеток как возможного дополнительного критерия риск-стратификации больных раком молочной железы, активно работал с научной литературой как российских авторов, так и зарубежных. Статистическая обработка ретро- и проспективного материала, а также его анализ, были проведены лично автором с использованием статистических программ, сформулированы выводы и оформлена диссертационная работа.

Соответствие паспорту специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.01.12 – Онкология («медицинские науки») и области исследований п.2 «Исследования по изучению этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии и др.)».

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 ОБ 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 ОБ 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.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследований используются в работе онкологического отделения хирургических методов лечения №2 и лаборатории иммунологии гемопоэза НИИ клинической онкологии им. академика РАН и РАМН Н. Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава России, а также в учебном процессе на базе кафедры онкологии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Апробация

Диссертация апробирована 29 августа 2019 года на научной конференции кафедры онкологии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) с участием отделений и лабораторий НИИ клинической онкологии им. академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Результаты диссертационной работы были представлены в рамках XVI International Conference Nematopoesis Immunology (г. Тбилиси, Грузия, 2019 г.), I Научно-практической конференции «Парадигмы лекарственной терапии у онкологических больных», (Москва, 2019 г).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 3 научные работы в журналах, рекомендованных перечнем ВАК при Минобрнауки России.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа имеет традиционное построение и состоит из введения, обзора литературы, трех глав, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Объем работы составляет 110 страниц машинописного текста, содержит 42 таблицы и 23 иллюстрации. Список литературы содержит 179 источников, из которых 13 отечественные и 166 зарубежные.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Характеристика материалов и методов исследования

В основу работы положено ретроспективное исследование клинико-морфологических 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 в регионарных ЛУ изменений не выявлено (pN0). Во 2 группу включены больные, у которых выявлены макро- и микрометастазы, а также ИОК, обнаруженные при дополнительном ИГХ исследовании (pN1; pN1mi; pN0 (i+)).

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%) пациентки с отрицательным статусом ЛУ по клиническим и морфологическим критериям. Средний возраст составил 54 года (от 28 до 82 лет, медиана 55 лет). Во 2 группу вошли 188 (34,8%) пациентки с положительным статусом ЛУ по клиническим и морфологическим критериям. Средний возраст - 53 года (от 46 до 61 лет, медиана 53).

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

Распределение больных 1 группы по клиническим стадиям было следующим: IA – 207 (58,6%), IА – 146 (41,4%). Для 2 группы распределение по клиническим стадиям составило: IА – 85 (45,2%), IВ – 103 (54,8%).

Всем пациентам на первом этапе проводилось хирургическое лечение. Среди видов хирургического лечения соотношение радикальной мастэктомии (РМЭ) и радикальной резекции (РР) в 1 группе было примерно одинаковым: РМЭ – 187 (53%), РР – 166 (47%). Для 2 группы РМЭ выполнена у 104 (55,3%), РР – 84 (44,7%).

Комбинированное лечение получили 180 (33,3%) больных, комплексное – 336 (62,1%), только хирургическое – 25 (4,6%). Химиотерапия (ХТ), гормонотерапия, таргетная и лучевая терапия применялись как в составе комбинированного, так и комплексного лечения.

Локорегионарные рецидивы выявлены у 22 больных (4,9%). Частота рецидивов в 1 группе составила 10 (2,8%), во 2 группе – 12 больных (6,4%), соответственно. Послеоперационный рубец был единственной локализацией рецидива у всех больных 1 группы. Во 2 группе локорегионарный рецидив выявлен у 11 больных (5,8%), в аксиллярной области у 1 пациентки (10,5%).

Отдаленные метастазы выявлены у 87 больных (16,1%). Отдаленные метастазы для 1 группы выявлены у 49 пациенток (13,9%). Основными локализациями отдаленных метастазов являлись: печень - 6 (12,2%), легкие - 10 (20,4%), кости - 9 (18,4%), множественные локализации – 24 (49%). Во 2 группе отдаленные метастазы выявлены у 38 пациенток (20,2%). Распределение отдаленных метастазов для 2 группы следующее: печень - 6 (15,8%), легкие – 12 (31,6%), кости - 5 (13,2%), надключичные ЛУ – 4 (10,5%), множественные локализации – 11 (28,9%).

Морфологическая характеристика опухолей больных первично-операбельным РМЖ

Среди морфологических критериев оценивались следующие параметры: число опухолевых узлов, размер первичной опухоли, гистологический тип опухоли, молекулярно-биологический подтип, рак *in situ* в окружающей ткани, степень злокачественности опухоли, ЛВИ, периневральный рост, ИОЛ (инфильтрирующая опухоль лимфоциты), число метастатически пораженных ЛУ, число ЛУ с прорастанием капсулы.

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

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

Во 2 группе молекулярно-биологический подтип был определен у 176 (93,6%) больных. Распределение молекулярных подтипов опухолей РМЖ для этой группы составило: люминальный А – 59 (33,5%); люминальный В HER2-негативный – 42 (23,9%); люминальный В HER2-позитивный – 12 (6,8%) больных; HER2-позитивный – 12 (6,8%) больных; ТН РМЖ – 51 (29,0%).

Большинство опухолей имело унифокальный характер – 490 пациенток (90,6%). Наличие мультицентричности выявлено у 23 (6,5%) и 27 (14,4%) пациенток 1 и 2 группы, соответственно. По данным литературы, опухоли молочной железы с мультицентрической формой роста чаще метастазируют в регионарные ЛУ, по сравнению с унифокальными.

Средний размер опухоли составил 2,2 см (от 0,2 до 5,0 см, медиана – 2,0 см).

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

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

Рак *in situ* в окружающей ткани диагностирован у 112 (31,7%) пациенток 1 группы и у 43 (22,9%) - 2 группы. Рак *in situ* не обнаружен у 241 (68,3%) и 145 (77,1%) пациенток 1 и 2 групп, соответственно.

Степень злокачественности опухоли в 1 группе составила: G1 – 49 (13,9%), G2 – 257 (72,8%), G3 – 47 (13,3%). Во 2 группе: G1 – 4 (2,1%), G2 – 149 (79,3%), G3 – 35 (18,6%).

ЛВИ опухоли в 1 группе составила: 148 (41,9%), во второй группе - 115 (61,1%).

В 1 группе периневральный рост опухоли обнаружен у 23 пациенток (6,5%), во 2 группе - у 7 (3,7%).

Методика определения ЦОК в периферической крови

Жидкостная биопсия как неинвазивный метод позволяет использовать значения ЦОК в сравнении с основными клинико-морфологическими характеристиками больных злокачественными новообразованиями.

Решая поставленные перед нами задачи, мы выделили 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.

На цитограмме А (Рисунок 1) 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.

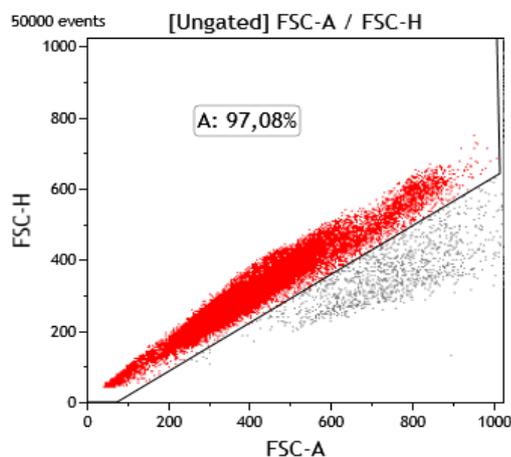


Рисунок 1 – Обработка результатов проточной цитометрии

На цитограмме Б (Рисунок 2) 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).

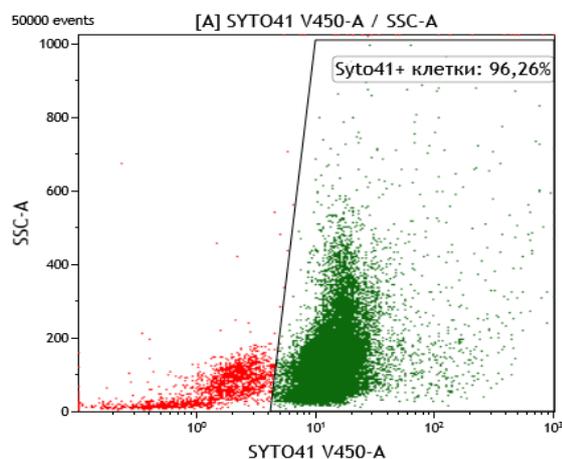


Рисунок 2 – Анализ ядродержащих клеток

На цитограмме В (Рисунок 3) опухолевые клетки выявлены на основании отсутствия экспрессии панлейкоцитарного антигена CD45 - ось x и отчетливой экспрессии молекулы ЕрСам - ось y. В 7,5 мл периферической крови выявлено 72 клетки с иммунофенотипом CD45-ЕрСам+ (фиолетовый цвет).

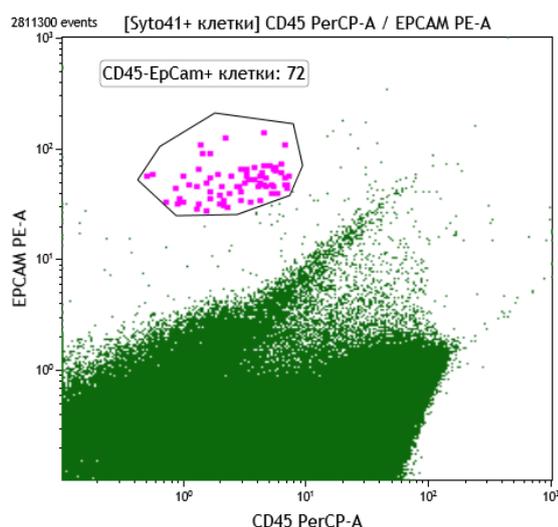


Рисунок 3 – Анализ экспрессии панлейкоцитарного антигена CD45 и молекулы EpCam.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

При сравнительном анализе установлено, что у пациенток моложе 55 лет метастазы в ЛУ выявлялись достоверно чаще ($p < 0,01$).

При сравнительной оценке частоты метастатического поражения ЛУ в зависимости от менструального статуса отличий не было. Тем не менее в группе больных с менопаузой менее 5 лет метастатическое поражение ЛУ наблюдалось достоверно чаще. Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Сравнительная оценка частоты метастатического поражения ЛУ в зависимости от менструального статуса и длительности менопаузы у больных первично-операбельным РМЖ

| Клиническая 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 (ХТ) назначали больным с метастатическим поражением ЛУ - 151 (80,3%) больная получила ХТ в адьювантном режиме ($\chi^2=61,0$; $p < 0,001$).

Частота местных рецидивов была достоверно выше в группе больных с метастатическим поражением аксиллярных ЛУ. Основной вид хирургического лечения этих пациенток - 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 2.

Таблица 2 – Сравнительная оценка частоты возникновения местного рецидива и отдаленных метастазов в зависимости от наличия метастатического поражения ЛУ у больных первично-операбельным РМЖ

| Клиническая 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%) | | |

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], $p < 0,05$).

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], $p < 0,05$).

У пациенток с метастатически пораженными ЛУ при морфологическом исследовании достоверно чаще обнаруживался ИР НСТ ($\chi^2=7,5$; $p < 0,05$), иных различий не выявлено.

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

Высокая степень злокачественности опухоли (G3) достоверно чаще встречалась у пациенток с пораженными ЛУ.

При сравнительном анализе больных с метастазами в ЛУ достоверных отличий в частоте обнаружения опухолей G2 и G3 не было ($p > 0,3$). Степень злокачественности G1 чаще

регистрировалась среди пациенток 1 группы.

ЛВИ достоверно чаще ($p < 0,001$) обнаруживалась у пациенток с метастатически пораженными ЛУ: 1 группа - 148 пациенток (41,9%), 2 группа - 115 (61,2%).

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

При сравнительном анализе выявлено, что инфильтрация опухолевыми лимфоцитами (ИОЛ) не имеет статистически 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 - у 26 (35,6%) и 1 (7,7%) пациентки, соответственно; умеренная степень инфильтрации - у 15 (20,6%) и 2 (15,4%) больных, соответственно; очаговая инфильтрация - только у 2 (15,4%) пациенток 2 группы.

При анализе отличий внутри группы выявлено, что выраженная степень инфильтрации ИОЛ чаще наблюдается в группе с метастатическим поражением ЛУ ($\chi^2 = 4,0$; $p < 0,05$).

Молекулярно-биологический подтипы и, отдельно, экспрессия белка HER2 в опухоли не имеют статистически значимой взаимосвязи со статусом ЛУ у больных РМЖ при сравнительном анализе обеих групп ($p = 0,06$).

При сравнительном анализе результатов, посвященных оценке выживаемости в зависимости от статуса аксиллярных ЛУ у больных первично-операбельным РМЖ с прослеженностью 10 лет, установлено, что показатели общей 3-, 5-, 10-летней выживаемости среди пациенток с отрицательным статусом ЛУ и наличием микро- и макрометастазов в 1-2 ЛУ достоверно не различались ($p > 0,05$). Данные представлены в таблице 3 и на рисунке 4.

Таблица 3 – 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 |
| микрометастазы | 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 |

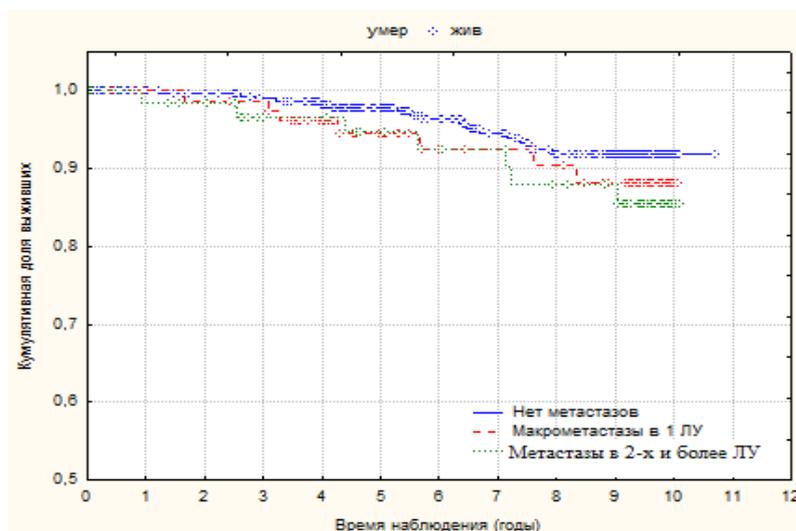


Рисунок 4 – ОВ больных первично-операбельным РМЖ в зависимости от поражения регионарных ЛУ. (Для наглядности графика выживаемости ось ординат начинается от 50%)

При анализе установлено отсутствие достоверных различий в показателях 3-, 5-, 10-летней БРВ среди пациенток с отрицательным статусом ЛУ и наличием микро- и макрометастазов в одном и более ЛУ ($p > 0,05$). Данные представлены в таблице 4 и на рисунке 5.

Таблица 4 – 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 |

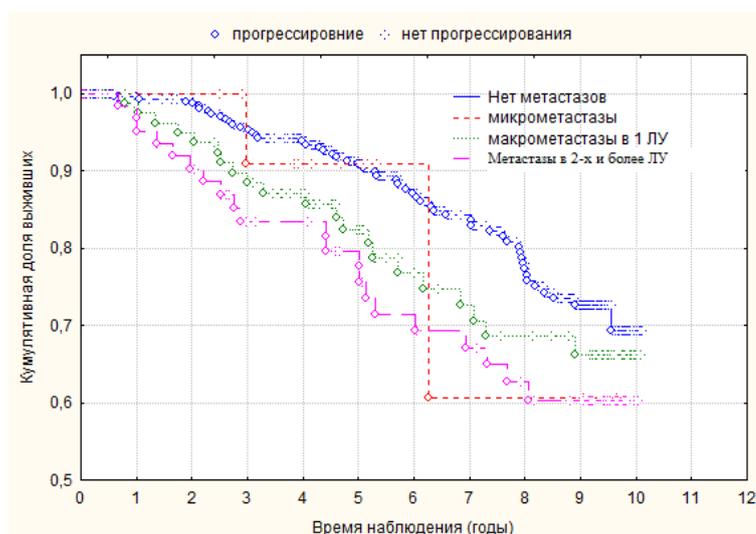


Рисунок 5 – БРВ больных первично-операбельным РМЖ в зависимости от поражения регионарных ЛУ. (Для наглядности графика выживаемости ось ординат начинается от 50%)

При сравнительном анализе признаков прорастания капсулы ЛУ при метастатическом поражении установлено, что наилучшие показатели 10-летней ОВ прослеживались у больных при отсутствии прорастания капсулы ЛУ ($p < 0,014$). Данные представлены в таблице 5 и на рисунке 6.

Таблица 5 – 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 |

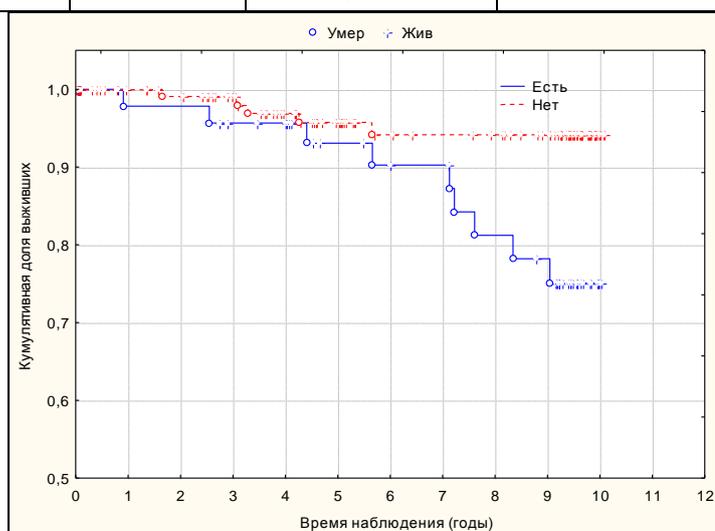


Рисунок 6 – ОВ больных первично-операбельным РМЖ в зависимости от прорастания капсулы ЛУ. (Для наглядности графика выживаемости ось ординат начинается от 50%)

При сравнительном анализе признаков 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 6 и на рисунке 7.

Таблица 6 – 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 |

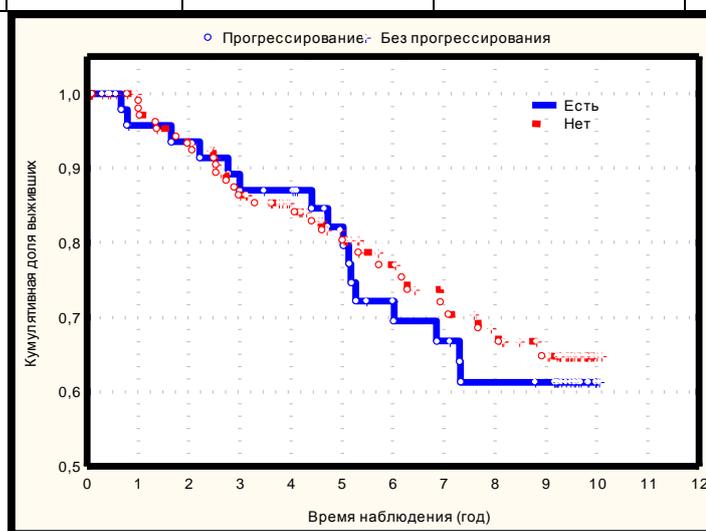


Рисунок 7 – БРВ больных первично-операбельным РМЖ в зависимости от прорастания капсулы ЛУ. (Для наглядности графика выживаемости ось ординат начинается от 50%)

С помощью ИГХ-метода дополнительно проведены исследования парафиновых срезов регионарных ЛУ у 100 больных с отрицательным статусом ЛУ. При ИГХ-исследовании всего в 2 случаях выявлены изолированные опухолевые клетки, а в 2 - микрометастазы. При анализе показатели 3-летней ОВ и БРВ у больных с ИОК и микрометастазами по сравнению с непораженными ЛУ достоверно не отличались ($p>0,05$) (Рисунок 8).

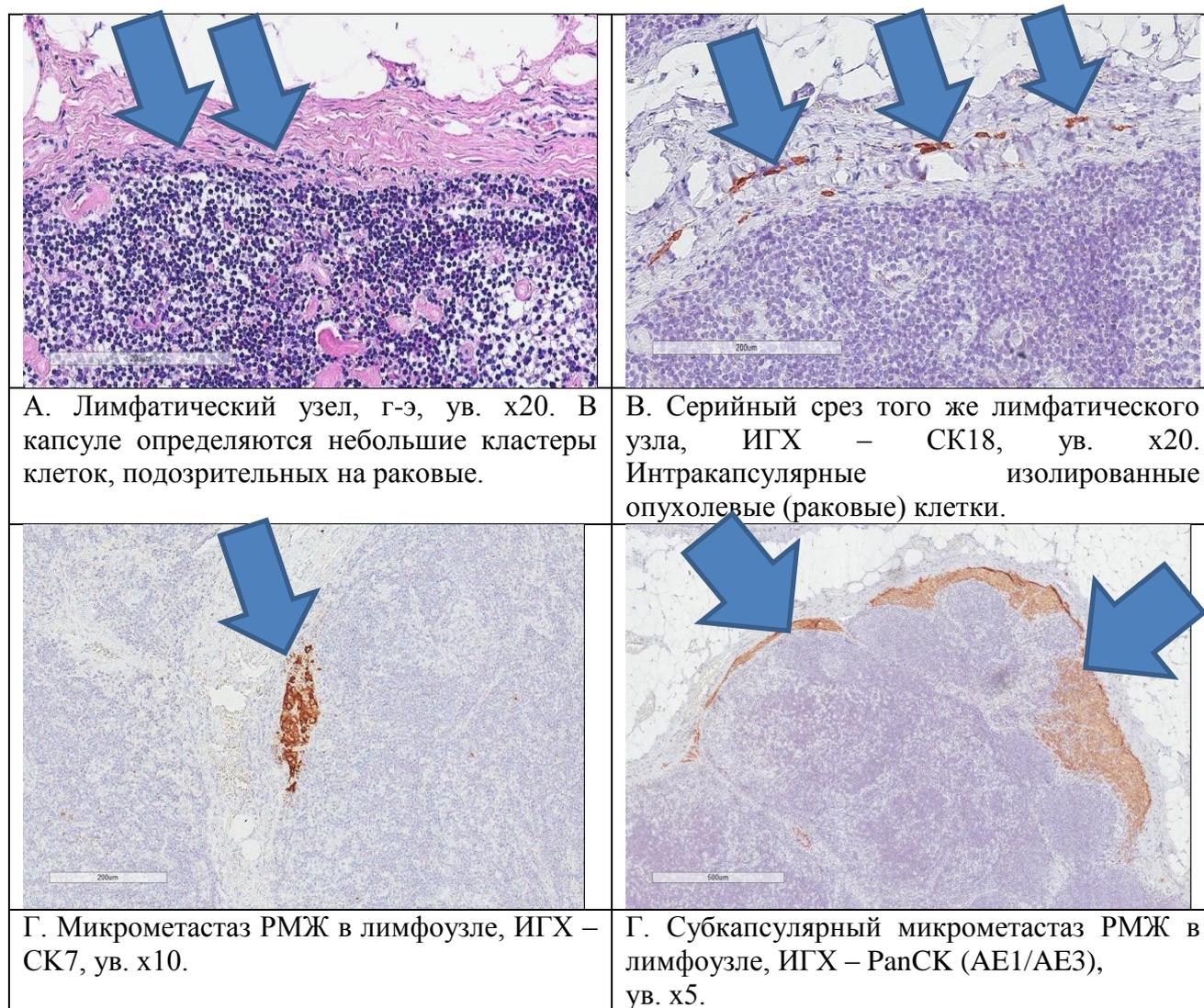


Рисунок 8 – Микрометастазы и изолированные опухолевые клетки в регионарных ЛУ

Таким образом, у больных первично-операбельным РМЖ при однофакторном анализе метастатическое поражение регионарных ЛУ достоверно сопряжено со следующими морфологическими критериями: ИР НСТ, мультицентрическая форма роста, лимфоваскулярная инвазия, высокая степень злокачественности, рак *in situ* в окружающей ткани. Данные представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Морфологические критерии первичной опухоли, ассоциированные с положительным статусом регионарных ЛУ

| Морфологический критерий | Значение p |
|--|------------|
| <u>Размер опухоли</u> | $<0,05$ |
| <u>Гистологический тип (ИР НСТ)</u> | $<0,05$ |
| <u>Мультицентрический рост опухоли</u> | $<0,001$ |
| Периневральный рост | 0,25 |
| <u>Лимфоваскулярная инвазия</u> | $<0,001$ |
| ИОЛ | 0,47 |

| | |
|---|------------------|
| <u>Высокая степень злокачественности (G3)</u> | <u><0,001</u> |
| <u>Рак <i>in situ</i> в окружающей ткани</u> | <u><0,05</u> |
| Молекулярно-биологический подтип | 0,08 |

Клиническая оценка больных I-III стадий РМЖ с ЦОК

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

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

Менструальная функция была сохранена у всех больных, 1 группы (ЦОК не обнаружены). Во 2 группе менструальная функция сохранена у 18 (45,0%) пациенток, 22 (55,0%) находились в менопаузе.

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

Добавление пациенток с местно-распространенными стадиями необходимы были для увеличения статистической силы выборки и сравнения частоты выявления ЦОК у пациенток с первично-операбельными формами РМЖ.

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. Различия статистически недостоверны ($p > 0,05$).

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%) данный клиничко-морфологический критерий отсутствовал.

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

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

Преобладали опухоли только со степенью злокачественности G2 – у 34 (72,3%) и G3 – у 13 (27,6%).

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

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

Лимфатические узлы поражены у 29 (61,7%) пациенток: 1 группа – 4 (57,1%), 2 группа – 25 (62,5%).

Молекулярные подтипы РМЖ были определены у всех 47 пациенток: люминальный А - 7 (14,9%), люминальный В HER2-негативный - 25 (53,19%), люминальный В HER2-позитивный - 6 (12,76%), ТН РМЖ - 9 (19,14%).

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 (85,1%).

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

При сравнительном анализе возраста и количества ЦОК достоверных отличий не выявлено ($p>0,05$).

При сравнительной оценке менструального статуса установлено, что достоверно чаще ЦОК отсутствуют при сохраненном менструальном статусе ($p=0,008$). Более половины больных с ЦОК находились в менопаузе (55%).

Чаще всего мультицентрическая форма роста опухоли определялась в группе с ЦОК-позитивным статусом (85,7%). Однако различия статистически недостоверны ($p>0,05$).

При сравнительном анализе размера первичной опухоли в обеих группах достоверных отличий не выявлено. Данные представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Сравнительная характеристика больных с ЦОК в периферической крови в зависимости от размера первичной опухоли

| Морфологическая характеристика | | n | ЦОК- (n,%) | ЦОК+ (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 9.

Таблица 9 – Сравнительная характеристика больных с ЦОК в периферической крови в зависимости от гистологического типа

| Морфологическая характеристика | | n | ЦОК - (n,%) | ЦОК + (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 <i>in situ</i> | 10 | 1 (14,3%) | 9 (22,5%) | | |

В группе больных с выявленными ЦОК отмечена тенденция к увеличению опухолей со степенью злокачественности G2 – 72,5% ($p=0,05$).

В группе больных с ЦОК лимфоваскулярная инвазия выявлялась чаще (87,5%), чем в группе с отрицательным статусом ЦОК (12,5%). Однако при сравнительном анализе двух групп статистически достоверных отличий получено не было ($p>0,05$).

Метастатическое поражение лимфатических узлов имело следующую характеристику: у 18 (38,3%) больных отсутствовали изменения в регионарных ЛУ, у 29 (61,7%) 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 10. У 11 (45,8%) больных первично-операбельным РМЖ с непораженными аксиллярными ЛУ, ЦОК были выявлены в 10 (90,9%) случаях.

Таблица 10 – Сравнительная характеристика больных с ЦОК в периферической крови в зависимости от поражения аксиллярных ЛУ

| Морфологическая характеристика | | n | ЦОК- (n,%) | ЦОК+ (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 молекулярно-биологического подтипа у этих групп статистически достоверных отличий выявлено не было ($p>0,05$). Однако при внутригрупповом анализе выявлено, что у 25 (53,2%) больных с люминальным В HER2-негативным подтипом ЦОК выявлялись достоверно чаще, чем при других молекулярно-биологических подтипах ($p=0,05$). Данные представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Сравнительная характеристика больных с ЦОК в зависимости от молекулярного подтипа

| Морфологическая характеристика | | n | ЦОК- (n,%) | ЦОК+ (n,%) | □2 | P |
|----------------------------------|----------------------|----|---------------|---------------|------|-----|
| Молекулярно-биологический подтип | Люминальный А | 7 | 1 (14,3%) | 6 (15,0%) | 1,88 | 0,6 |
| | Люминальный В HER2 - | 25 | 3 (42,8%) | 22 (55,0%) | | |
| | Люминальный В HER2+ | 6 | 2 (28,6%) | 4 (10,0%) | | |
| | Трижды негативный | 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+ статусом (82,5%). Однако при сравнительном анализе двух групп статистических достоверных отличий получено не было ($p>0,05$).

При сравнительном анализе результатов, посвященных оценке ЦОК и 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 получено ($p>0,05$). Все пациенты с отдаленными метастазами из группы с местно-распространенным РМЖ. Полученные нами данные представлены на рисунке 9.

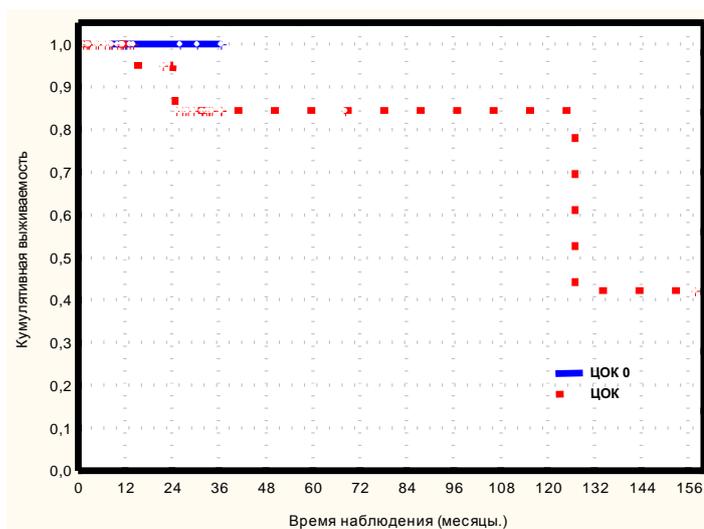


Рисунок 9 – БРВ у больных РМЖ с выявленными ЦОК

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. Присутствие ЦОК связано с некоторыми морфологическими характеристиками РМЖ, что требует проведения дальнейших исследований с большей выборкой.

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 (микрметастазы 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 выявления 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 (окраска гематоксилин-эозин), необходимо указывать данный признак в заключительном диагнозе.

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 требуются дальнейшие рандомизированные исследования.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Пономарев, В.Е. Клиническое значение метастазов в аксиллярных лимфоузлах при первично-операбельном раке молочной железы / В.Е. Пономарев, Я.В. Вишневская, Н.И. Мехтиева, С.Б. Поликарпова и др. // Вестник уральской медицинской академической науки — 2018. — Т.15. — №1 — С. 116-123.

2. Шагина, Н.Ю. Тройной негативный рак молочной железы. Современные представления о клинических и биологических особенностях заболевания / Н.Ю. Шагина, И.К. Воротников, Н.И. Мехтиева, С.Б. Поликарпова, В.Е. Пономарев и др. // Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи — 2018. — № 3 — С. 59-64.

3. Пономарев, В.Е. Первично-операбельный рак молочной железы: молекулярно-биологические подтипы и морфологические факторы прогноза/ В.Е. Пономарев, С.Б. Поликарпова, Н.И. Мехтиева, Н.Ю. Шагина и др. // Сеченовский вестник. — 2019. — Т.10. — №2 — С. 12-20.