

НАО «Медицинский Университет Караганды»

УДК 618.19-006.005-085

На правах рукописи

**ЖУМАКАЕВА АЙНУРА МАРАТОВНА**

**Роль экспрессии H-Ras онкобелка в эффективности неoadьювантной химиотерапии рака молочной железы**

6D110100 – Медицина

Диссертация на соискание степени  
доктора философии (PhD)

Научные консультанты  
доктор медицинских наук,  
профессор  
И.М. Омарова

доктор медицинских наук,  
профессор, академик НАН РК  
К.Д. Рахимов

доктор медицинских наук,  
профессор,  
член-корреспондент РАН  
Д.А. Сычев

Республика Казахстан  
Караганда, 2020

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ</b> .....	3
<b>ОПРЕДЕЛЕНИЯ</b> .....	4
<b>ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ</b> .....	5
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	7
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	12
1.1 Биология рака молочной железы.....	12
1.2 Роль семейства RAS в онкогенезе злокачественных новообразований.....	18
1.3 H-Ras при раке молочной железы.....	21
1.4 РМЖ и ингибиторы фарнезилпротеинтрансферазы.....	26
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	34
2.1 Характеристика клинического материала.....	34
2.2 Дизайн исследования.....	35
2.3 Исследование морфологических образцов рака молочной железы на определение экспрессии H-Ras.....	38
2.4 Характеристика лекарственных препаратов для неоадьювантной лекарственной терапии.....	39
2.5 Оценка непосредственной эффективности неоадьювантной терапии..	40
2.6 Оценка лекарственного патоморфоза опухоли.....	40
2.7 Оценка безрецидивной выживаемости.....	41
2.8 Построение прогностической модели безрецидивной выживаемости.....	41
2.9 Статистическая обработка полученных данных.....	41
<b>3 ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ H-RAS ОНКОБЕЛКОВ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ТЕРАПИИ У ПАЦИЕНТОВ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ</b> .....	43
3.1 Экспрессия H-Ras онкобелков у пациентов раком молочной железы до лечения.....	43
3.2 Связь иммуногистохимических маркеров РМЖ с уровнем экспрессии H-Ras онкобелков.....	48
3.3 Непосредственные результаты неоадьювантной терапии рака молочной железы.....	52
3.4 Влияние экспрессии H-Ras на показатели безрецидивной выживаемости пациентов РМЖ.....	60
3.5 Анализ прогнозирования безрецидивной выживаемости на основании построения обобщенной линейной модели GLM.....	67
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....	72
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ</b> .....	82
<b>ПРИЛОЖЕНИЯ</b> .....	98

## НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:

Клинический протокол диагностики и лечения «Злокачественное новообразование молочной железы (С50)»: утв. протоколом заседания Экспертного совета «Республиканского центра развития здравоохранения» Министерства здравоохранения Республики Казахстан от 1 марта 2019 года, №56.

ГОСТ 7.32-2001. (Межгосударственный стандарт) Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления.

ГОСТ 7.1-2003. Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления.

ГОСТ 7.9-95 (ИСО 214-76). Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Реферат и аннотация. Общие требования.

ГОСТ 7.12-93. Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическая запись. Сокращение слов на русском языке. Общие требования и правила.

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей диссертации применяются следующие термины с соответствующими определениями:

**Антиген** – молекула, способная связаться с антителом.

**Вторичные антитела** – вторые антитела, использующиеся в процессе окраски; реагируют с первичными антителами, являющимися для них антигенами, и формируют мостики между первичными антителами и последующими реагентами, если таковые имеются.

**Моноклональные антитела** – иммунохимические антитела, секретированные одной плазматической клеткой, которая прореагировала со специфическим эпитопом на антигене.

**Окраска** – технология окрашивания (контрастирования) тканевых срезов, основанная на химических и других реакциях, проводимых непосредственно в тканевом срезе (*in situ*), и имеющая своей целью сделать тканевой срез пригодным для микроскопического изучения (микроскопия); включает в себя процедуры депарафинизации, доведения до воды, непосредственно окрашивание (постановка реакции, определение), просветление, обезвоживание, заключение под покровное стекло и высушивание.

**Отрицательный тканевой контроль** – образец ткани того же органа, не содержащий целевого антигена, обработанный первичными антителами.

**Положительный контроль ткани** – образец ткани, доказано положительно окрашивающийся при использовании первичных антител. При этом неспецифическое фоновое окрашивание должно быть сведено к минимуму.

**Титр** – в иммуногистохимии, максимальное разведение иммунной сыворотки, обеспечивающее оптимальное специфическое окрашивание с минимальным фоном.

**Фоновое окрашивание** – под фоновым окрашиванием подразумевают любое неспецифическое артификальное окрашивание. Фоновое окрашивание может включать «нежелательное» окрашивание, возникшее в результате диффузии антигена.

**Хромоген** – химическое соединение, которое может образовывать цветной осадок или может быть выявлено при помощи специфических реакций.

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АС	– адриабластин+циклофосфан
АКТ	– фосфорилированная протеинкиназа Б
COSMIC	– каталог соматических мутаций при раке
EGFR	– рецептор эпидермального фактора роста
ER	– рецепторы эстрогена
FGFR	– рецептор фактора роста фибробластов
FTI (ИФТ)	– ингибиторы фарнезилпротеинтрансферазы
GDP	– гуанозиндифосфат
GTP	– гуанозинтрифосфат
HER1 (EGFR/ErbB1)	– представитель семейства рецепторов эпидермального фактора роста
Her2/neu (ERBB2)	– представитель семейства рецепторов эпидермального фактора роста 2
HER3 (ErbB3)	– представитель семейства рецепторов эпидермального фактора роста 3
HER4 (ErbB4)	– представитель семейства рецепторов эпидермального фактора роста 4
H-Ras	– онкобелок, продукт гена HRAS
HRAS (p21 Ras, с-Ha-Ras)	– онкоген гомолог вируса саркомы Харвей рас
JAK	– гиперактивные янускиназы
Ki-67 (MKI 67)	– индекс пролиферативной активности опухоли
MAPK	– активированная митогеном протеинкиназа
Mtor	– мишень рапамицина
NF-kB	– ядерный фактор kB
PDGFR	– рецептор фактора роста тромбоцитов
PI3-киназа	– фосфоинозитид-3-киназа или фосфатидилинозитол-3-киназа
PIK3CA	– фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат3-каталитическая киназа
PKC	– протеинкиназа С
PR	– рецепторы прогестерона
PTEN	– фосфатаза с двойной субстратной специфичностью, продукт гена PTEN
RAF киназа	– протоонкоген Серин/треонин-протеинкиназа
RAS	– семейство онкогенов/онкобелков RAS
RECIST	– критерии оценки ответа солидных опухолей
STAT	– активаторы транскрипции
TGF b	– трансформирующий фактор роста бета
TNF	– фактор некроза опухоли
TNM	– международная классификация стадий злокачественных новообразований

WT гена K-ras	– дикий тип гена KRAS
белок RasGAP	– белки-активаторы гуанозинтрифосфатазы
ВОЗ	– всемирная организация здравоохранения
Ген ER	– ген рецептора эстрогенов
Ген TOP2A	– топоизомераза ДНК 2 альфа
Ген TP53	– транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл
ИГХ	– иммуногистохимический метод исследования
ЛС	– лекарственное средство
МРМЖ	– местно-распространенный рак молочной железы
НХТ	– неоадьювантная химиотерапия
ПХТ	– полихимиотерапия
РМЖ	– рак молочной железы
ТН РМЖ	– трижды негативный рак молочной железы

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность исследования.** В структуре онкологической заболеваемости у женщин рак молочной железы (РМЖ) на протяжении многих лет занимает лидирующие позиции.

Республика Казахстан не является исключением. Заболеваемость в Казахстане в зависимости от региона проживания варьирует от 27,4‰ (Южно-Казахстанская область) до 59,5‰ (Алматы) [1].

Как и во всем мире, так и в нашей стране отмечается неуклонный рост заболеваемости, если в 2008 году показатель составил 36,1‰, то к 2018 году он составил 43,0‰ [2, 3].

Прогноз РМЖ зависит не только от распространенности опухолевого процесса, но и от биологических свойств опухоли. За последние десятилетие результаты лечения РМЖ улучшились благодаря углубленному изучению биологических свойств РМЖ и появлению персонализированной медицины [4].

Однако РМЖ все еще остается лидирующей причиной смерти среди женщин. Поэтому проводятся активные исследования молекулярно-генетических особенностей этой опухоли и белковых структур, вовлеченных в обеспечение высокой жизнеспособности злокачественных клеток с целью определения перспектив использования подобных белков в качестве диагностических и прогностических биологических маркеров и молекулярных мишеней назначения лекарственных средств целенаправленного действия [5].

Белки семейства RAS (H-Ras, K-Ras и N-Ras) представляют собой небольшие GTP азы, которые участвуют в передаче сигнала к ядру. По данным, имеющимся в базе данных COSMIC ([www.sanger.ac.uk](http://www.sanger.ac.uk)), мутации в гене KRAS связаны с самым высоким процентом всех раковых заболеваний человека – 21,6%, за которым следует NRAS – 8,0% и HRAS всего – 3,3% [6, 7].

Активация мутаций онкогенов RAS может приводить к злокачественной трансформации и обнаруживается во многих раковых опухолях человека, включая 90% опухолей поджелудочной железы, 50% рака толстой кишки, 50% рака щитовидной железы и 5% рака молочной железы. Низкий процент мутации RAS при раке молочной железы привел к тому, что они являлись не значимыми в патогенезе злокачественных новообразований до недавнего времени [8-11].

Согласно данным различных авторов, H-Ras является наиболее изученным геном семейства RAS и частота мутации в нем минимальна, в результате чего заинтересованность исследователей постепенно уменьшалась до тех пор, пока Spandidos DA et. al. в своей работе впервые не показали, что злокачественные опухоли молочной железы имеют повышенную экспрессию онкогена H-Ras [12].

Для выполнения своей функции онкобелку H-Ras нужно приобрести соответствующую структуру и присоединиться к внутренней поверхности мембраны, с помощью фермента фарнезилтрансферазы. Без процесса фарнелизации RAS теряет способность фосфорилироваться, и передавать

сигналы от рецептора к ядру клетки. С этой точки зрения лекарственная терапия, направленная на ингибирование фанезилтрансферазы представляет собой перспективное направление современной онкологии [13, 14].

Онкобелки H-Ras, играют не маловажную роль в усилении пролиферации и устойчивости опухолевых клеток молочной железы к апоптозу [15]. Также RAS белки активируются через механизмы восходящего потока, поскольку некоторые рецепторы факторов роста, передают свои сигналы с помощью RAS и могут экспрессироваться при раке молочной железы. К рецепторам факторов роста относятся рецептор эпидермального фактора роста EGFR и рецептор тирозинкиназы Her/2neu, которые сверхэкспрессируются от 20 до 50% случаев рака молочной железы [16-19]. В ряде исследований было показано значительное снижение экспрессии EGFR после неoadьювантной химиотерапии, что клинически проявлялось улучшением показателей непосредственной эффективности и увеличением показателей общей и безрецидивной выживаемости РМЖ [20, 21].

Таким образом, изучение экспрессионной способности онкобелков H-Ras при РМЖ, а также их способность в совокупности с другими молекулярными маркерами влиять на прогноз РМЖ является актуальным.

Исследования будут способствовать более углубленному изучению патогенетических механизмов участвующих в прогрессировании данного заболевания и откроют возможности для разработки и внедрения в клиническую практику новых таргетных препаратов.

**Цель исследования:** оценить влияние экспрессии H-Ras онкобелков на эффективность неoadьювантной терапии рака молочной железы.

**Задачи исследования:**

1 Определить уровень экспрессии H-Ras онкобелков до начала лечения у пациентов раком молочной железы и определить корреляцию между экспрессией H-Ras онкобелков с основными тканевыми маркерами (Her2neu, ER, PR, Ki 67) определяющими фенотип опухоли.

2 Оценить влияние экспрессии H-Ras онкобелков на показатели непосредственной эффективности неoadьювантной химиотерапии у пациентов раком молочной железы.

3 Изучить влияние экспрессии H-Ras онкобелков на показатели безрецидивной выживаемости пациентов, получивших неoadьювантную химиотерапию.

4 Разработать прогностическую модель безрецидивной выживаемости рака молочной железы в зависимости от иммуногистохимических особенностей.

**Научная новизна:**

1 Впервые изучена экспрессия H-Ras онкобелков у пациентов РМЖ и определена ее корреляция с Her2neu позитивным типом РМЖ и высоким индексом пролиферативной активности Ki 67 (свидетельство о государственной регистрации прав на объект авторского права, выданное комитетом Министерства юстиции РК №3990 от 11 июня 2019).



2 Впервые было установлено, что положительная экспрессия Н-Ras белков не влияла на показатели непосредственной эффективности неоадьювантной терапии по схемам: АС, АС+арглабин, арглабин у пациентов РМЖ.

3 Впервые было показано, что неоадьювантная терапия с включением препарата Арглабин улучшала показатели безрецидивной выживаемости пациентов РМЖ с положительной экспрессией Н-Ras белков.

4 Впервые была разработана прогностическая модель безрецидивной выживаемости пациентов с диагнозом РМЖ с учетом экспрессионного статуса Н-Ras онкобелков.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1 Экспрессия Н-Ras онкобелков зависит от наличия в опухоли тканевого маркера Her2neu и высокого уровня индекса пролиферативной активности Ki-67.

2 Положительная экспрессия Н-Ras онкобелков оказывает отрицательное влияние на результаты непосредственной эффективности неоадьювантной лекарственной терапии с включением препарата Арглабин у пациенток с РМЖ.

3 Показатели безрецидивной выживаемости существенно отличаются в зависимости от экспрессионного статуса Н-Ras онкобелков у пациентов с РМЖ: при положительной экспрессии Н-Ras период выживаемости без прогрессирования выше, чем при отрицательной экспрессии при монотерапии Арглабином и при комбинации стандартной терапии с Арглабином.

4 Построенная прогностическая модель периода безрецидивной выживаемости пациентов с диагнозом РМЖ является дополнительным диагностическим инструментом для предсказания возникновения рецидива заболевания.

#### **Практическая значимость работы:**

Определение экспрессии Н-Ras онкобелков у пациентов с положительным статусом тканевого маркера Her2neu и высоким уровнем индекса пролиферативной активности Ki-67 свидетельствует о более агрессивном типе РМЖ и требует особого подхода в лечении.

Определен вид комбинированной неоадьювантной терапии рака молочной железы, имеющий наибольшую эффективность при положительной экспрессии Н-Ras онкобелков. Комбинация стандартного режима АС (адриабластин+циклофосфан) с ингибитором фарнезилтрансферазы препаратом арглабин статистически значимо увеличивает период безрецидивной выживаемости пациентов с РМЖ.

Определение периода безрецидивной выживаемости пациентов с РМЖ на основании прогностической модели в зависимости от экспрессии иммуногистохимических показателей (Her2neu, Ki-67, Н-Ras) позволяет определить возникновение рецидива индивидуально для каждого пациента и заранее продумать дальнейшую тактику диспансерного наблюдения.

### **Внедрение в практику.**

По материалам диссертации получено 1 свидетельство о регистрации прав на объект авторского права №3930 от 11 июня 2019 года «Иммуногистохимические особенности H-Ras онкобелков при раке молочной железы после комбинированного лечения» (Приложение А). Имеются акты внедрения результатов научно-исследовательской работы в практическую деятельность (Приложение Б).

### **Апробация работы.**

Основные положения и результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на XIV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием имени А.Ю. Барышникова «Отечественные противоопухолевые препараты» (Москва 16-17 марта 2017); VI Съезде онкологов и радиологов Республики Казахстан (Алматы, 27-28 апреля 2017); Международной научном симпозиуме «Астана Биотех-2018» (Астана, 12-13 июня 2018); Конференции молодых ученых «Наука и здоровье», посвященной 70-летию члена-корреспондента НАЕН Республики Казахстан, профессора Дюсупова А.З. и ассоциированного профессора Дюсуповой Б.Б. (Семей, 5 октября 2018); IV Международной научно-практической конференции «Global science and innovation 2019: Central Asia» (Астана, 21 января 2019); II Российской Зимней Школы молодых ученых и врачей по фармакогенетике, фармакогеномике и персонализированной терапии (Москва, 12-15 февраля 2019); XVI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием имени А.Ю. Барышникова «Отечественные противоопухолевые препараты» (Екатеринбург 10-14 марта 2019); кафедральном заседании онкологии от 26.06.2019, протокол №2.

### **Список научных трудов, опубликованных по теме диссертации.**

По материалам диссертации опубликовано 13 научных работ, из них: 3 в научных изданиях рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки МОН РК; 2 публикации в международном научном издании, входящем в информационную базу Scopus – «Georgian Medical News», «Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences»; 5 публикации в материалах международных конференции; 3 публикации в материалах зарубежных конференции.

### **Личный вклад автора.**

Автором определены цель и задачи научной работы, разработан дизайн исследования, проведен поиск и анализ литературы, осуществлен ретроспективный анализ 100 пациентов с диагнозом рак молочной железы. Автор участвовал в проведении иммуногистохимического исследования. Основные положения диссертации, заключения и выводы сформулированы и написаны лично автором.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 97 страницах компьютерного текста, состоящего из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследования, обсуждения, заключения и приложений. Диссертация иллюстрирована 20 таблицами и 37 рисунками.

Список использованных источников включает 218 источников отечественной, русскоязычной и англоязычной литературы.

## **1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **1.1 Биология рака молочной железы**

Рак молочной железы является актуальной проблемой здравоохранения во все мире. По данным The Global Cancer Observatory в 2018 году было зарегистрировано 18.078.957 новых случаев онкологических заболеваний (женщин – 8.622.539), и 9.555.027 (женщин – 4.169.387) пациентов погибли от них [22].

Из числа женщин заболевших раком в 2018 году у 24,2% (2.088.849 случаев) выявлен рак молочной железы. Среди женщин, погибших от рака в 2018 году, пациентки с диагнозом рак молочной железы составили 15,0% (629.679 случаев) [23].

Следует отметить, что количество впервые диагностированного РМЖ увеличивается в зависимости от региона и страны проживания. В Азии отмечается наибольшее количество впервые выявленного РМЖ – 911.014 случаев за 2018 год, тогда как в странах Евросоюза заболеваемость составляет 522.513 случаев, а в Северной Америке – 262.347 случаев [23].

В Республике Казахстан впервые выявленные случаи злокачественных новообразований в 2018 году составили 34.629 из которых РМЖ – 4.603 случая (13,2%) [24, 25].

Недостаточное функционирование репродуктивной системы, раннее наступление менархе, частые прерывания беременностей, первые роды после тридцати лет, позднее наступление менопаузы, присутствие организма в длительном стрессе, применение гормональных противозачаточных препаратов, воздействие длительного ионизирующего излучения и факторов вредного производства (тяжелые металлы, асбест и др.) существенно повышают вероятность развития неопластического процесса в молочной железе. Среди этиологических факторов, способствующих возникновению рака молочной железы большую роль играют наследственные нарушения, такие как мутации, ассоциированные с BRCA1 и BRCA2 [26-29].

Во многих странах показатель смертности снижается, в частности среди лиц молодой и средней возрастной категории, вследствие улучшения терапевтических подходов и совершенствования скрининговой системы. Однако РМЖ по-прежнему является главной причиной высокой летальности среди женского населения [30-33].

Высокая гетерогенность РМЖ делает принципиально важным аспектом молекулярную природу злокачественных клеток, которая связана с биологическим поведением опухоли и характеризует скорость их роста, способность к инвазии и метастазированию, а также оказывают влияние на прогноз заболевания [34, 35].

Особенности деления опухолевых клеток молочной железы обеспечиваются системой регуляторов, которые при наличии деструктивных изменений могут запустить апоптотический механизм [36].

Процесс регуляции жизнедеятельности клеток молочной железы может активизироваться в результате внеклеточных сигналов, таких как факторы пролиферации клетки, некоторые стероидные гормоны, факторы, стимулирующие клеточную дифференцировку. А также существует многоуровневая система мониторинга процессов репликации внутри клетки [37].

Известно, что онкогены обеспечивают клеточный гомеостаз посредством баланса процессов пролиферации и апоптоза. Нарушения экспрессии онкогенов и кодируемых ими ферментов, а также рецепторов и медиаторов способствует изменению патологических процессов в молочной железе. Безусловно, идентификация морфологических и биохимических маркеров апоптоза и пролиферации клеток будет способствовать как углубленному пониманию патогенеза опухолей молочной железы, так и совершенствованию диагностики и методов лекарственного воздействия [38].

Существуют неспецифические системы подавления клеточной пролиферации, так называемые гены - супрессоры опухоли, которые способны ограничивать рост и пролиферацию в злокачественных поражениях молочных желез. Основной функцией данных генов является кодирование белков RB (белок ретинобластомы) и p53 (белок p53). Торможение процессов чрезмерного роста опухолевых клеток, путем контроля интра- и экстрацеллюлярных сигналов и включения механизма ингибирования клеточного цикла, обеспечивается благодаря онкосупрессорной функции белка ретинобластомы. Активация белка p53 возникает в результате возникновения повреждений в генетическом аппарате опухолевой клетки молочной железы и вызывает остановку клеточного деления в периоде G1, в результате запускается механизм репарации ДНК или апоптоза [39].

Наличие мутации в гене p53 также имеет первостепенное значение, поскольку при сопутствующих неблагоприятных прогностических факторах таких как, отрицательный гормональный статус, гиперэкспрессия Her2neu, высокий индекс пролиферации Ki-67, низкая степень дифференцировки, может привести к снижению показателей безрецидивной и общей выживаемости. Наибольшая частота мутации в гене p53 встречается при базальноподобном варианте (трижды негативном) РМЖ, которая составляет почти 90%, тогда как в других типах встречается она реже и колеблется в промежутке от 20 до 50% [40].

В крупном исследовании Done S.J. et. al. участием 6000 пациентов с РМЖ, было продемонстрировано, что мутация в гене p53 напрямую связана с плохим прогнозом РМЖ [41].

Клинические проявления и молекулярные профили РМЖ настолько разнородны, что ответ на проводимую одинаковую терапию может существенно различаться [42, 43].

При исследовании патогенетических механизмов развития опухолей молочной железы были установлены особенности течения рака молочной железы. Появившиеся в последнее десятилетие сведения указывают на

необходимость выявления новых опухолевых маркеров, позволяющих персонафицировать лекарственную терапию по принципу «правильный маркер» правильное лекарство [44].

Серьезный прорыв был сделан Perou С.М. и Sorlie Т. et al. в 2000 году, которые при молекулярно-генетическом исследовании более 8000 тысяч пациентов определили основные тканевые маркеры, что позволило выделить биологические типы РМЖ в зависимости от экспрессии эстрогена, прогестеронов, Her2neu и Ki-67 [45].

Впервые была изучена взаимосвязь выделенных молекулярно-биологических маркеров рака молочной железы с показателями общей и безрецидивной выживаемости, которые оказались самыми высокими при гормонозависимых опухолях и наихудшими при опухолях с гиперэкспрессией Her2neu [46, 47].

Однако, методы генетического анализа довольно трудоемкие и экономически затратные, что затрудняло применение их в ежедневной практической работе. Ситуация коренным образом изменилась после публикации в 2009 году работы М.С.У. Cheang et al. в которой приводилось сравнение прогностической значимости методов генетического типирования и основных маркеров опухолей в результате иммуногистохимических методов исследования. Авторами было доказано соответствие подтипов опухоли на основании данных иммуногистохимического определения рецепторов эстрогена и прогестерона, Her2neu и Ki-67 с продемонстрированными ранее генетическими анализами [48, 49].

Результатом проведенных исследований стала разработка классификации рака молочной железы (Сант-Галлен, 2011) [50].

В основу данной классификации были положены патогенетические особенности опухоли РМЖ: гормональный статус эстрогена, прогестерона, рецепторов тирозинкиназы Her2neu, индекса пролиферативной активности Ki-67 [51-53].

Большая часть злокачественных опухолей женской репродуктивной сферы, в частности рак молочной железы, являются гормонозависимыми. Доказано, что повышенное содержание эстрогенов запускает процессы пролиферации и трансформации в опухолевую клетку, а так же активирует канцерогенез [54].

Гормонозависимый РМЖ встречается до 70% случаев, из которых около 15% составляет люминальный В фенотип. Люминальный подтип А и люминальный подтип В без экспрессии Her2neu характеризуется благоприятным течением. Her2neu позитивный подтип Люминального В РМЖ отличаются худшим прогнозом и высокой вероятностью к метастазированию. Клиническими особенностями данной опухоли являются: молодой возраст, большой размер опухоли и частое поражение региональных лимфатических узлов. Также для него характерно наличие кластеров генов: HRAS, ERBB2, ESR1, CCNB1, CCNE1, MYBL, GRB7 [55, 56].

При изучении семейства тирозинкиназных рецепторов было обнаружено четыре гомологичных белка: Her1 (EGFR/ErbB1), Her2 (ErbB2/Neu), Her3 (ErbB3) и Her4 (ErbB4). Тирозинкиназные рецепторы состоят из внеклеточного домена, одиночного гидрофобного трансмембранного сегмента и прилежащего к мембране внутриклеточного киназного домена с С-концевым хвостом [57, 58]. Белки этого семейства синтезируются на мембране клетки и выполняют функцию передатчика каскада клеточных сигналов, а также контролируют рост и дифференцировку клеток эпителиального происхождения. В результате правильной работы тирозинкиназных белков происходит дальнейшая трансдукция сигнала с начала к мембрано-ассоциированным белкам (например, RAS, Src) и дальше к MAP-киназным каскадам с последующей передачей сигнала либо цитозольным субстратам, либо ядерным транскрипционным факторам [59-62].

В настоящее время Her2neu играет важную роль в канцерогенезе рака молочной железы. Активация Her2neu происходит при его гетеродимеризации с Her1 и Her3 и вследствие произошедших внеклеточных реакции возникает аутофосфорилирование тирозиновых остатков внутрицитоплазматического домена и инициация различных сигнальных путей, где принципиальную роль играют MAPK (митоген активированные протеинкиназы), PI3K (фосфатидилинозитол-4,5- бифосфат 3-киназа) и PKC (протеинкиназа C) [63].

Димерные комплексы, которые содержат Her2neu, имеют наивысшую способность связываться с лигандом. Также учитывая тот факт, что Her2neu находится в открытой конформации и имеет уникальную способность легко взаимодействовать с другими внеклеточными агентами, в результате этих реакции усиливается потенциал передачи клеточного сигнала. Например, гетеродимер HER2-HER3 в большей степени активировывает PI3K-Akt каскад, играющий ключевую роль в выживании и дифференцировке опухолевых клеток. Более того, димеризация Her2neu вызывает нарушение локализации и деградацию ингибитора клеточного цикла, что также ведет к прогрессии клеточного цикла [64].

Относительно недавно стало известно, что около 30% Her2neu позитивных опухолей молочной железы имеет усеченную форму рецептора Her2neu (p95HER2) массой 100-115 kDa, содержащего несколько С-терминальных фрагментов. Таким образом, несмотря на потерю внеклеточного домена, Her2neu (p95HER2) имеет способность запускать процессы пролиферации через активацию нижестоящих мишеней. В таком случае применение антител против Her2neu будет недостаточно эффективным и может стать причиной резистентности к таргетным препаратам [65].

На сегодняшний день среди Her2neu положительных опухолей различают еще два подтипа. В одной подгруппе была выявлена высокая экспрессия EGFR. Вторая подгруппа отличалась высокой экспрессией кластера генов GATA3, BCL2 и ESR1, характерных для Люминального типа [66].

Her2-положительные опухоли имеют также высокую частоту мутаций PTEN, RAS. Другие варианты семейства HER включают такие мутации как HER2 и HER3 [67].

Таким образом, эпигенетические, генотоксические химические факторы внешней среды, терминальные мутации в генах приводят к нарушениям в механизме передачи клеточных сигналов, и как следствие происходит онкогенная перестройка клеток молочной железы [68].

Амплификация Her2neu ассоциируется с повышенной клеточной пролиферацией, усиленным ангиогенезом, сниженной способностью к апоптозу и высоким потенциалом к метастазированию. Гиперэкспрессия Her2neu является независимым прогностическим фактором более частого развития метастазов в головной мозг от 25 до 53% случаев, а также коррелирует с отсутствием экспрессии эстрогеновых и прогестероновых рецепторов в опухоли [69, 70].

В последние годы появились публикации, в которых описываются экспрессии андрогеновых рецепторов (AR) при люминальном В типе РМЖ. Андрогеновые рецепторы относятся к часто экспрессируемым эпидермальным рецепторам. В проведенных ретроспективных исследованиях показано, что в эстроген и прогестерон позитивных опухолях экспрессия андрогеновых рецепторов широко варьирует от 10 до 50% [71, 72].

В исследовании L.A. Niemeier et al. было показано, что у более 10% больных с положительным статусом рецепторов эстрогена и прогестерона также обнаружили высокий уровень экспрессии андрогеновых рецепторов [73].

В исследовании Y.S. Tsang et al. проведенном в 2014 году, анализировалась экспрессия андрогеновых рецепторов 1144 случаев первичного инвазивного РМЖ. Экспрессия AR была обнаружена в основном в гормоноположительных опухолях и ассоциировалась с экспрессией прогестерона, низкой степенью злокачественности и вовлечением в процесс лимфатических узлов [74].

В результате генетических исследований были обнаружены повышенные уровни рецепторов андрогена и мутации в гене R132CA, наличие которых стало особенностью люминального андроген-рецептор позитивного типа. Частота встречаемости ЛАР при ТНРМЖ не велика и составляет всего около 11%. Однако, последние данные подтверждают тот факт, что активация сигнальных путей, связанных с протеинкиназой С, является основной причиной в прогрессировании и метастазировании ЛАР, что может способствовать поиску новых терапевтических мишеней [75].

Поиск факторов, способных оценить пролиферативный статус опухоли, а также спрогнозировать ответ на терапию вызывает повышенный интерес у исследователей. Одним из таких прогностических маркеров является белок Ki-67 [76].

В многочисленных исследованиях было показано, что повышение экспрессии Ki-67 при РМЖ происходит в 20-50% случаев и коррелирует с разным исходом заболевания. Повышенная экспрессия Ki-67 встречается у



пациентов РМЖ с агрессивным течением и повышенной способностью к метастазированию. Интересен, тот факт, что Ki-67 практически отсутствует при люминальном А типе [77, 78].

Данные двух метаанализов свидетельствуют о том, что высокий уровень Ki-67 связан с частыми рецидивами РМЖ и низкой выживаемостью данной категории больных [79, 80].

Е. Luporsi et al. отмечают, что уровень Ki-67 оказывает влияние на отдаленные результаты у больных с РМЖ. Высокий уровень Ki-67 в результате предоперационной химиотерапии был связан с худшим прогнозом заболевания при котором 5-летняя выживаемость составила 51% ( $p < 0,01$ ) [81].

Экспрессию Ki-67 следует определять до и после неoadъювантной терапии, так как уровень Ki-67 может быть использован и для прогноза чувствительности больных к химиотерапии [82-85].

М. Matsubara et al. обнаружили различия в частоте высокой экспрессии Ki-67 в зависимости от этнических и расовых различий. Высокие показатели Ki-67 у японских пациенток с РМЖ при поражении подмышечных лимфатических узлов связаны с неблагоприятным прогнозом в отношении безрецидивной и общей выживаемости [86].

Возможности геномных исследований демонстрируют интерес к трижды негативному РМЖ (ТНРМЖ), как одному из самых злокачественных видов, поскольку при данном типе обнаружено до 90% мутации и амплификации в генетическом аппарате [87-92].

Авторами показаны исследования 597 случаев ТНРМЖ, в результате которых обнаружили шесть подгрупп с уникальными экспрессионными особенностями среди которых: базальноподобный первый и второй типы, мезенхимальный, мезенхимально-стволовой, иммуномодулирующий и люминальный андроген-рецептор позитивный тип (ЛАР) [93, 94].

Мезенхимальный и мезенхимально-стволовой типы ТНРМЖ схожи между собой в экспрессионной способности ростовых факторов, таких как трансформирующий фактор роста бета (TGF $\beta$ ), рецепторы фактора роста тромбоцитов (PDGFR), рецепторы фактора роста фибробластов (FGFR) а также путями сигнальной трансдукции, такими как фосфатидилинозитол-3-киназа (PI3K) и мишень рапамицина в клетках млекопитающих (mTOR) [95-97].

Но существуют характеристики, по которым данные типы отличаются между собой, например, при мезенхимальном типе отмечается высокая экспрессия белков, регулирующих клеточную пролиферацию белков Ki-67, а при мезенхимально-стволовом типе встречается гиперэкспрессия фосфорилированной протеинкиназы Б (АКТ), мутированной формы PI3K и рецептора эпидермального фактора роста [98].

Согласно исследованиям В.Д. Lehmann et al. при иммуномодулирующем типе ТНРМЖ отмечается выраженная экспрессия патогенетических агентов ответственных за регуляцию иммунной системы, такие как интерфероны, гиперактивные янускиназы (JAK), фактор некроза опухоли (TNF), активаторы транскрипции (STAT) и ядерный фактор kB (NF-kB) [99, 100].

Таким образом, разнообразие молекулярно-генетических мутаций при РМЖ ставит на повестку дня поиск и изучение новых патогенетических маркеров. С этой точки зрения значительный интерес представляет семейство онкобелков RAS, поскольку за последнее десятилетие появились научные исследования, демонстрирующие их важную роль в патогенезе многих онкологических заболеваний [101-103].

### **1.3 Роль семейства RAS в онкогенезе злокачественных новообразований**

Доказано, что мутации и перестройки различных генов приводят к активации сигнальных систем как на уровне факторов роста и их рецепторов, так и на нижестоящем уровне передачи сигнала по каскаду белков в клеточное ядро. Например, онкогенный эффект обусловлен тем, что стандартные мутации гена RAS изменяют структуру его белка, не допуская диссоциации этого активного комплекса. В результате, независимо от участия лиганда и рецептора происходит активация сигнальной системы на нижестоящем уровне [104-107].

Перспективными в области исследования молекулярных маркеров, являются представители семейства Ras, которое включает в себя 36 генов, кодирующих 39 белков. Члены семейства Ras (H-Ras, K-Ras, N-Ras и M-Ras) представляют собой небольшие изоформы, которые активируются косвенно внешними стимулами. Путь Ras-МРК был предпочтительным предметом исследований рака, и он известен как важный путь в начале и в прогрессии злокачественного процесса. Ras является онкопротеином и мутационно активируется у 33% всех видов рака, причем наибольшая частота наблюдается при раке поджелудочной железы (90%), колоректальном раке (50%) и раке легких (30%) [108].

Обширные исследования включали Ras во многих аспектах формирования и прогрессирования опухоли. Мутационная активация генов RAS связана до 30% злокачественных новообразований, что делает его одной из наиболее частых онкогенных мутаций [109, 110].

Мутации в онкогене KRAS составляют – 21,6%, NRAS – 8,0%, HRAS – 3,3%. Мутация KRAS преобладает среди основных форм злокачественных новообразований, занимающих лидирующие позиции по частоте летальных исходов в США за 2010 г. таких как рак легкого, толстой кишки, поджелудочной железы. Более 85% всех мутации KRAS встречается при аденокарциноме поджелудочной железы [111].

Многочисленные исследования онкогенной мутации ras определили 2 горячие локализации, расположенные соответственно вокруг кодонов 12 и 61. Для включения всей информации по генам была создана электронная платформа, которая хранит в себе данные по различным мутациям генов при злокачественных новообразованиях. В настоящее время, центр Сэнгер периодически обновляет всеобъемлющую базу данных с учетом характера и частоты ras-мутации в разных опухолях человека (каталог соматических мутаций при раке: <http://sanger.ac.uk/cosmic>) [112-114].

Рак поджелудочной железы не относятся к числу часто встречающихся опухолей, тем не менее, они составляют группу наиболее агрессивных образований. Эти опухоли содержат самые высокие показатели *ras*-мутаций человека, которые довольно редко встречаются при *H-Ras* или *N-Ras*, а в подавляющем большинстве от 69 до 95% наблюдаются в локусе *K-Ras*. Основная масса зарегистрированных мутаций встречается в 12 кодоне гена *K-Ras*, в котором происходит изменение глицина на аспарагиновую кислоту, что приводит к активации белков *Ras*. Пациенты с мутациями *KRAS G12R* и *G12A* имеют более низкую выживаемость, чем пациенты, имеющие мутации *G12V* или *G12S* [115].

Высокая распространенность мутаций *KRAS* и их возможный вклад в прогрессирование рака поджелудочной железы, способствовали разработке терапевтических подходов с использованием *KRAS* в качестве целевой точки воздействия. Мутации *KRAS* при колоректальном раке обнаружено у 40-45% больных. Большинство мутаций *KRAS* встречаются в кодонах 12 и 13 (80 и 20%, соответственно) [116].

До сих пор не сообщалось о наличии мутации в *H-Ras* при колоректальном раке. Обнаружение мутированных форм гена *KRAS* как при начальных, так и поздних стадиях колоректального рака, могут быть ассоциированы с прогрессированием заболевания. Для опухолей с высоким уровнем экспрессии *EGFR* и диким типом гена *K-ras*, была отмечена значительная клиническая польза до 35% от лечения специфическими моноклональными антителами против *EGFR* (цетуксимаб, панитумумаб). При наличии мутированной формы *K-ras* гена, отмечена незначительная польза (коэффициент ответа до 3%). Кроме того, у пациентов с диким типом *K-ras*, коэффициенты выживаемости без прогрессирования и показатели общей выживаемости статистически выше, чем у тех, которые содержат онкогенные мутации [117].

Однако данные результаты эффективности терапии все еще не достаточно достоверны, поэтому различные клинические испытания тестируют новые дополнительные комбинации анти-*EGFR*, вакцины против мутантов *K-Ras*, ингибиторы нисходящих киназ [118].

Как и при колоректальном раке, немелкоклеточный рак легких (НМРЛ) имеет высокую частоту мутаций *KRAS* и низкие коэффициенты онкогенных изменений в *NRAS* или *HRAS*. Частота мутаций *KRAS* в НМРЛ варьируется от 16 до 40%. Примерно 94% всех мутаций *K-ras* приводят к изменению азотистого остатка *Gly*, закодированного в кодоне 12 дикого типа *KRAS*. Встречаемость полиморфизма *G12C* примерно около 40% от общего количества мутаций, следующие по частоте *G12V* (22%) и *G12D* (16%) [119].

Мутационный статус *KRAS* очень важен при выборе терапевтического воздействия при НМРЛ. Например, мутации *G12D* связаны с опухолями, имеющими лучший прогноз, чем, например, мутации в *G12V* или *G12R* [120].

Кроме того, недавние исследования с использованием клеточной линии немелкоклеточного рака легкого показали, что различные аминокислотные

замены могут определять чувствительность к лекарственным средствам. Выживаемость пациентов с НМРЛ при лечении ингибиторами EGFR намного выше, при наличии дикого типа KRAS [121].

Таким образом, специфические моноклональные антитела или другие ингибиторы, блокирующие действие EGFR являются терапевтическим подходом для рака легких без мутаций K-Ras. Однако, существуют клинические испытания, которые пытаются найти новую лекарственную комбинацию, направленную на достижение лучших показателей выживаемости, в отношении опухолей, несущих мутант K-Ras [122].

Меланома, относится к опухолям с высокой смертностью и в которой преобладают мутации NRAS или HRAS. В частности, мутации NRAS находятся в 20-30% образцов злокачественной меланомы. Замена Q61 приходится до 86% всех мутаций N-Ras, тогда как изменения G12 или G13 встречается от 4,5 до 7% и соответственно. Это вероятно, обусловлено образованием дициклобутана на участке Q61 при УФ-облучении, который является важной причиной мутаций в коже, которая приводит к злокачественной меланоме. Также актуальным является, обнаружение при меланоме активированных онкогенов BRAF, поскольку, BRAF является эффектором Ras и существуют исследования, показывающие взаимосвязь мутации BRAF и NRAS [123].

Тем не менее, недавние наблюдения пролили новый свет на механизмы, участвующие в опосредованном HRAS онкогенезе, которые подчеркивают важность активности HRAS. Среди трех генов Ras (H-, K- и NRAS) HRAS обычно мутирует в опухолях, происходящих из многослойных эпителиальных тканей, включая плоскоклеточный рак кожи, головы и шеи, а также рак мочевого пузыря [124].

Гистологические подтипы также могут играть важную роль, например, существуют исследования, в которых показано, что высокая частота мутаций HRAS встречается при уротелиальной папилломе. Кроме того, мутации HRAS, по-видимому, чаще встречаются при плоскоклеточном раке легких (2,8%), чем при аденокарциноме легких (1%) [125].

Понимание относительного вклада в процессы онкогенной трансформаций со стороны сигнальных путей Ras, активации этих генов, является обязательным условием для разработки рационального дизайна терапевтических стратегий при определенных типах рака. Ингибирование или стабилизация Ras - эффекторных взаимодействий для предотвращения нисходящей сигнализации могут дать большие возможности для терапевтического вмешательства. Однако необходимо определить подходящие молекулы, которые способны выполнять эти задачи и сделать их как можно более конкретными для мутированных белков, чтобы минимизировать влияние на нормальную передачу сигналов RAS. Текущие терапевтические стратегии, такие как ингибиторы тирозинкиназы, ингибиторы фарнезилтрансферазы или ингибиторы нижестоящих киназ возможно дадут обнадеживающие результаты в ближайшее время [126].

Таким образом, роль RAS генов при злокачественных опухолях имеет многогранный характер, поскольку они участвуют процессах пролиферации различных опухолевых клеток. Современная таргетная терапия уже имеет определенные успехи при RAS ассоциированном колоректальном раке, меланоме, раке поджелудочной железы [127]. Однако это только начало пути и в дальнейшем предстоит выяснить роль этого семейства при других злокачественных опухолях, в том числе и при РМЖ.

#### 1.4 H-Ras при раке молочной железы

H-RAS является небольшим G-белком в семействе RAS белков. После связывания с гуанозинтрифосфатом H-Ras активирует киназу RAF, подобную c-RAF, на следующем этапе в пути MAPK-ERK. H-Ras действует как молекулярный выключатель; как только он включен, он рекрутирует и активирует белки, необходимые для распространения сигнала рецептора, такие как c-RAF и PI3-киназа. H-Ras связывается с GTP (гуанозинтрифосфатом) в активном состоянии и обладает внутренней ферментативной активностью, которая расщепляет концевой фосфат этого нуклеотида, превращает его в GDP (гуанозиндифосфат). После преобразования в неактивную форму GDP, H-Ras переходит в неактивное состояние (рисунок 1). Измененный белок H-Ras постоянно активируется внутри клетки. Этот сверхактивный белок заставляет клетку расти и делиться в отсутствие внешних сигналов, что приводит к неконтролируемому делению клеток и образованию опухоли [128, 129].

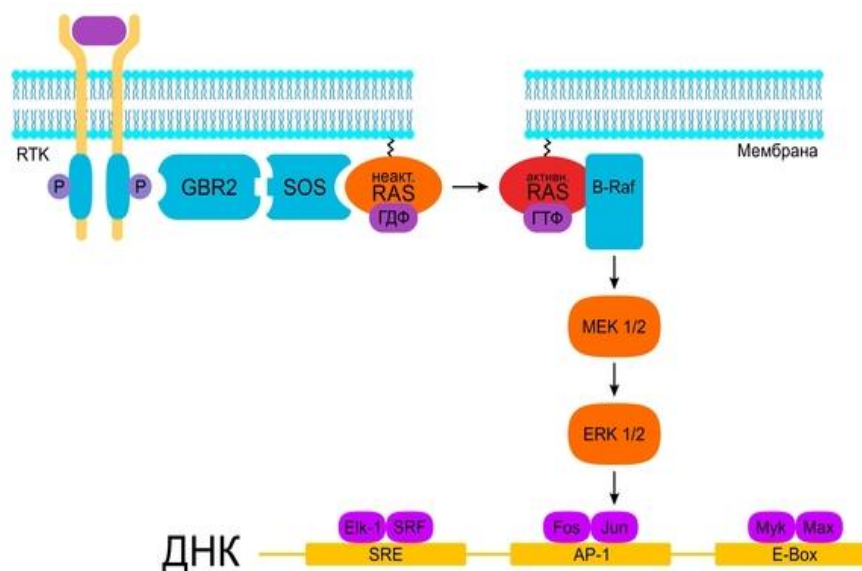


Рисунок 1 – Классическая последовательность развития пути MAPK-ERK

Примечание – Составлено по источнику [130]

Недавние исследования показывают, что нарушение регуляции H-Ras часто встречается при раке щитовидной железы, слюнных протоков, эпителиально-миоэпителиальном раке и раке почки. Однако при раке молочной железы Ras мутирует только в 5% случаев. Несмотря на то, что Ras редко

мутирует при раке молочной железы, он способен активироваться различными регуляторами восходящего потока, включая семейство рецепторов эпидермального фактора роста, в частности EGFR (ErbB1) и HER2 (ErbB2) [131, 132].

Согласно данным различных авторов, H-Ras является наиболее изученным геном RAS и частота мутации в нем минимальна, в результате чего заинтересованность исследователей постепенно уменьшалась до тех пор, пока Spandidos D. et. al. в своей работе впервые не показали, что злокачественные опухоли молочной железы имеют повышенную экспрессию онкогена HRAS [133]. Позднее авторами была обнаружена связь между высокой экспрессии онкогена p21 Ras при раке молочной железы с агрессивным течением заболевания [134, 135].

Существуют исследования, в которых авторы провели сравнительный анализ экспрессии онкогена HRAS с клинико-патологическими параметрами рака молочной железы и показали, что высокая экспрессия онкогена p21Ras у пациентов была связана с агрессивным течением заболевания и частым метастазированием [136, 137].

A. Demetrios et. al. провели иммуногистохимическое исследование 75 случаев доброкачественных и злокачественных заболеваний молочной железы и определяли экспрессию белка p21 H-Ras. Большинство сложных кистозных заболеваний, гиперпластических фиброаденом и всех типов карцином молочной железы показали высокую экспрессию p21 H-Ras. Эти результаты показывают, что повышенная экспрессия p21 H-Ras может играть важную роль в развитии некоторых предраковых и злокачественных поражений молочной железы [138].

При изучении экспрессии H-Ras (p21ras – моноклональное антитело 235-1.7.1) у 297 пациентов с карциномой молочной железы было обнаружено 58% H-Ras позитивных опухолевых клеток. Также было продемонстрировано, что высокая экспрессия онкобелков H-Ras (p21ras) коррелировала с наибольшим размером опухолевой ткани, наличием регионарного метастазирования и высоким индексом пролиферативной активности Ki-67, а также с опухолями, имеющими отрицательный гормональный статус. Обнаружение позитивной экспрессии H-Ras (p21ras) также коррелировало с более благоприятным прогнозом у пациентов, не имеющих метастазов в регионарных лимфоузлах [139].

Исследователями также было показано, что высокая частота экспрессии белков Ras и Her2neu при раке молочной железы связана с прогрессированием заболевания [140].

Кроме того, было показано, что внеклеточная экспрессия Ras в эстроген зависимой клеточной линии MCF-7 способствует эстроген – независимому росту [141]. Активированные формы Ras повышаются как при раке молочной железы, так и в клеточных линиях при наличии экспрессии EGFR или HER2. Следовательно, Ras может активироваться в опухолях молочной железы при

отсутствии прямой мутационной активации Ras и достигать от 20 до 50% случаев [142].

Другой механизм, с помощью которого Ras может активироваться при раке молочной железы, связан со снижением экспрессии регуляторного белка RasGAP. Мутации в гене NF1 при нейрофиброматозе, способствуют недостаточному образованию нейрофибромина RasGAP, поэтому женщины с данной патологией имеют повышенный риск развития рака молочной железы [143, 144].

В предыдущем исследовании было показано, что H-Ras экспрессировался в 60% случаев рака молочной железы, однако мутации в нем занимают от 5 до 10%, возможно это связано с механизмами посттранскрипционной регуляции [145].

Относительно недавно был открыт механизм повышенной экспрессии H-Ras при раке молочной железы, который показал, что экспрессия микроРНК let-7, отрицательного регулятора экспрессии белка H-Ras, снижается в раковых стволовых клетках и в клинических образцах. Исследования также показали, что восстановление экспрессии let-7 снижает экспрессию H-Ras, пролиферацию клеток и метастазирование [146].

Недавняя работа Gong C et. al. выявила механизм, при котором экспрессия H-Ras повышается в клетках рака молочной железы. Они показали, что экспрессия микроРНК let-7, отрицательного регулятора экспрессии белка H-Ras, снижается в клетках опухоли молочной железы. Они также показали, что восстановление экспрессии let-7 уменьшает экспрессию H-Ras, клеточную пролиферацию, что приводило к уменьшению образования и снижало риск метастазирования. Проведенное исследование показало, что экспрессию белка с-Ha-Ras (H-Ras) можно использовать в качестве маркера для прогнозирования прогрессирования рака молочной железы, а также стратифицировать пациентов в зависимости от экспрессионного статуса и риска развития метастазирования для проведения предоперационных курсов химиотерапии [147].

Существуют исследования с использованием полногеномного секвенирования, которые демонстрируют наличие мутации в PIK3CA или AKT1 при аденомиоэпителиомах имеющих положительные рецепторы эстрогена (ER), в то время как ER-негативные аденомиоэпителиомы содержат высоко рецидивирующие мутации кодона Q61 HRAS. Результаты данного исследования показывают, что аденомиоэпителиомы являются генетически гетерогенными и определяют мутации гене HRAS, которые достаточно редки при других гистологических типах рака молочной железы [148].

В исследовании Lin Tong et al. были изучены гены AKT1, BRAF, EGFR, HRAS, KRAS и PIK3CA в 120 раковых опухолях молочной железы. Обнаружено, что 2,5% образцов имели мутации KRAS, что намного ниже, чем при колоректальных карциномах. При исследовании генов BRAF, AKT1 и HRAS мутаций не были обнаружены [149].

В исследовании трижды негативного рака молочной железы не было обнаружено мутации HRAS [150]. Однако в 1 из 45 случаев папиллярного новообразования молочной железы была показана мутация HRAS [151].

De Oliveira Taveira M. et al. ретроспективно проанализировали данные микрочипов Gene Chip у 22 из 47 пациентов Her2-положительного метастатического рака молочной железы у пациентов получивших комбинацию трастузумаба и эверолимуса. Было обнаружено, что 10 из 22 пациентов имели мутации PIK3CA (45,4%) и еще пять генов гиперэкспрессирующего рака молочной железы Her2neu имели мутации CTNNB1, HRAS, KRAS, NF2 и SMARCB1. Таким образом, было показано, что активация пути MAPK-ERK посредством мутаций в EGFR, BRAF или KIT может опосредовать устойчивость к трастузумабу [152].

В исследовании Geyer FC et al. продемонстрировано посредством целого экзомного и целевого анализа секвенирования, что, в то время как аденомиоэпителиомы РМЖ, положительные в отношении рецепторов эстрогена (ER), демонстрируют активирующие мутации PIK3CA или AKT1, ER-негативные аденомиоэпителиомы содержат высоко рецидивирующие мутации кодона Q61 H-RAS, которые происходят вместе с PIK3 мутации PIK3R1. Результаты авторов демонстрируют, что ER-негативные аденомиоэпителиомы являются генетически гетерогенными и определяют мутации в HRAS гене, которые крайне редки при раке молочной железы общего типа [153].

В следующем исследовании авторы стремились изучить молекулярный профиль аденомиоэпителиомы молочной железы. Опухолевую ткань из 19 аденомиоэпителиом секвенировали и анализировали с использованием панели Ion AmpliSeq Cancer Hotspot, охватывающей приблизительно 2800 мутаций COSMIC в 50 генах, связанных с раком. Исследователи подтвердили, что аденомиоэпителиомы молочной железы являются генетически гетерогенными. Мутации HRAS происходят одновременно с мутациями PIK3CA в ER-негативных аденомиоэпителиом и могут быть связаны с клинически агрессивным поведением опухоли. PIK3CA, AKT1 и HRAS могут служить потенциальными действующими терапевтическими мишенями в клинически агрессивных аденомиоэпителиомах молочных желез [154].

В исследовании GeparSepto была оценена значимость геномных изменений в ответ на неоадьювантную химиотерапию РМЖ. Было проведено секвенирование 851 биопсийных образцов перед неоадьювантной терапией на наличие 16 мутации. Наиболее распространенными геномными изменениями были мутации TP53 (38,4%) и PIK3CA (21,5%) и 8 различных амплификаций (TOP2A 34,9%; ERBB2 30,6%; ZNF703 30,1%; TP53 21,9%; PIK3CA 24,1%; CCND1 17,7%; PAK1 14,9%; FGFR 12,6%). Все остальные изменения имели распространенность менее 5%. Наибольшая частота полного патологического ответа наблюдалась при PIK3CA-мутированном HER2-позитивном раке молочной железы (PIK3CAmut: 23,0% по сравнению с диким типом 38,8%,  $P < 0,0001$ ). Повышенный ответ на терапию паклитакселом наблюдался только



при раке молочной железы с диким типом PIK3CA ( $P = 0,009$ ) и при трижды негативном РМЖ ( $P=0,013$ ). Исследование показало, что мутации PIK3CA могут быть основным медиатором резистентности к терапии рака молочной железы [155].

Фаза I исследования QLNC120, нового ингибитора EGFR и HER2 киназы (регистрация испытания: NCT01931943), у предварительно пролеченных пациентов с HER2-позитивным раком молочной железы показала, что у девяти из пятнадцати пациентов (60%) была обнаружена мутация в экзоне HRAS. Пациенты с мутацией HRAS достигли более высоких показателей выживаемости без прогрессирования заболевания (24,9 против 12,9 недель,  $p=0,023$ ) на фоне применения QLNC120. Мутация HRAS коррелировала с противоопухолевой активностью QLNC120 [156].

Также были исследованы гены-кандидаты, функционирующие в качестве биомаркеров для дифференциации тройного негативного рака молочной железы. При анализе экспрессии 203 блоков опухолевой ткани, в каждом образце изучали 250 предполагаемых генов и определили 7 ключевых. Уровни экспрессии этих генов были использованы для распределения каждого пациента в группу риска (низкий или высокий). Увеличение экспрессии пяти генов (SMAD2, H-RAS, KRT6A, TP63 и ETV6) и снижение экспрессии двух генов (NFKB1 и MDM4) были связаны с благоприятным прогнозом. Отдаленная безрецидивная выживаемость (наличие рецидива через 10 лет) в группе с низким риском была значительно выше, чем в группе с высоким риском ( $p < 0,001$ ) для ранней стадии (I и II) и поздней стадии (III) опухоли. Полученные в результате исследования гены могут быть использованы в качестве прогностической модели для прогнозирования безрецидивной выживаемости у пациентов с тройным негативным РМЖ после адьювантной химиотерапии [157].

В работе Kiessling M.K. et al. обнаружили, что ингибиторы MEK индуцируют апоптоз в мутантных клеточных линиях HRAS, но не в клеточных линиях без мутаций RAS. Результаты исследования показывали, что мутации HRAS при раке активируют пути RAS и mTOR, которые могут служить терапевтическим вариантом для пациентов с опухолями, имеющими мутации HRAS [158].

Murugan A.K. et al. в своем литературном обзоре сообщают о том, что в настоящее время воздействовать на H-Ras можно с помощью ингибиторов фарнезилтрансферазы. Основным преимуществом ингибиторов RAS является то, что они могут облегчить петлю обратной связи в предшествующих рецепторах факторов роста. Хотя онкогенные мутации генов RAS, BRAF и MEK являются взаимоисключающими в этом MAPK-пути, комбинированная терапия может быть необходима, если ингибиторы RAS используются в клиниках для преодоления сопутствующей мутации BRAF-MEK [159].

Многочисленные исследования белков H-Ras при РМЖ, показали что, данные биологические структуры играют важную роль в процессах пролиферации и прогрессирования заболевания РМЖ [160-162].

Однако до настоящего времени роль экспрессии H-Ras при РМЖ до конца не изучена и таким образом её дальнейшее изучение представляет собой актуальную проблему.

#### **1.4 РМЖ и ингибиторы фарнезилпротеинтрансферазы**

На сегодняшний день актуальными являются исследования, направленные на разработку средств способных целенаправленно воздействовать на молекулярно-генетическую мишень раковой клетки и оказывать максимально эффективное действие. С этой точки зрения препараты которые могут ингибировать H-Ras онкобелки в злокачественных новообразованиях рака молочной железы представляют собой значительный интерес.

Перспективы ингибиторов фарнезилтрансферазы при лечении солидных опухолей пока остаются неясными и связаны, в первую очередь, с разработкой селективных препаратов, способных ингибировать фарнелизацию всего семейства мутированных белков RAS [163, 164].

Было создано три стратегии воздействия на aberrантный путь онкобелков Ras.

Первая стратегия направлена на блокирование активации Ras по восходящей линии у рецепторов клеточной поверхности рецепторов эстрогена, Her2neu, EGFR и других тирозинкиназных рецепторов [165].

Вторая направлена на онкобелки Ras путем ингибирования экспрессии гена Ras или прерывания деятельности белков фарнезилтрансферазы и геранилгеранилтрансферазы [166].

Третье терапевтическое направление связано с ингибированием нисходящих эффекторных путей таких как, ингибиторы Raf киназы или MEK [167].

Ингибиторы фарнезилтрансферазы первоначально были разработаны для блокирования локализации Ras при опухолевом процессе. Большинство доклинических и клинических исследований сфокусированы на ингибировании проренилирования Ras/G белком с ингибиторами фарнезилтрансферазы (FTI) [168].

Ras синтезируется в цитоплазме как биологически неактивный цитозольный пропептид (Pro-Ras) и претерпевает ряд тесно связанных посттрансляционных модификаций путем ковалентного добавления неполярной фарнезильной группы к COOH-концу, тем самым увеличивая ее гидрофобность. С-концевой триплет аминокислот отщепляется, оставляя фарнезильированный, метилированный остаток цистеина в карбоксиконце. Затем Ras локализуется на внутренней поверхности плазматических мембран, где циклически переходит из неактивного состояния GDP к активному GTP-связанному состоянию. Оказавшись в GTP-связанной форме, Ras активирует несколько нижестоящих эффекторных путей, которые обеспечивают повышенную транскрипцию генов и обеспечивают быструю клеточную пролиферацию (рисунок 2) [169].

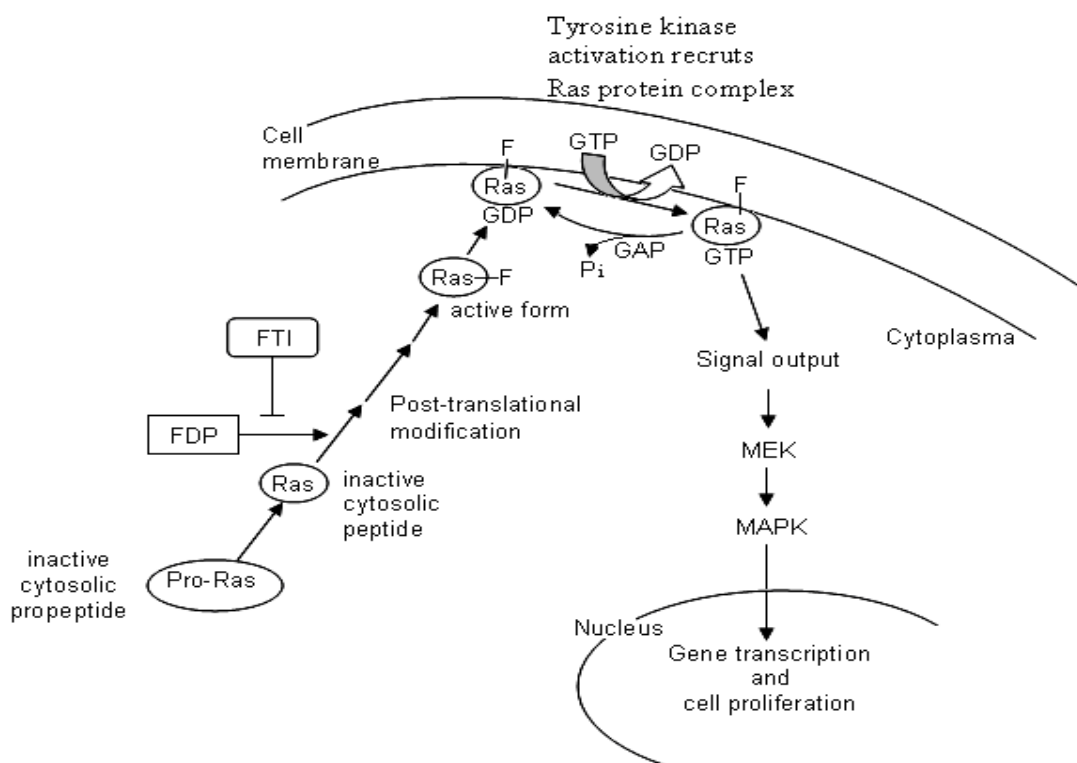


Рисунок 2 – Ras-зависимая трансдукция сигнала с мишенью ингибитора фарнезилтрансферазы (ИФТ)

Примечание – Составлено по источнику [170]

Ингибиторы фарнезилтрансферазы были классифицированы в три подкласса в зависимости от механизма действия.

1 Непептидомиметики, фарнезилпирофосфатные аналоги, которые конкурируют с изопреноидными субстратами фарнезилтрансферазы.

2 Ингибиторы пептидомиметиков, которые встраиваются в структуру СААХ-части онкобелков Ras и препятствуют связыванию с фарнезилтрансферазой.

3 Бисубстратные аналоги, которые сочетают в себе свойства как пептидомиметиков, так и не пептидомиметиков.

Ингибиторы фарнезилтрансферазы не в равной степени блокируют фарнелизацию различных представителей Ras-белков. В частности, белок К-Ras в среднем в два раза менее чувствителен к ингибированию фарнезилтрансферазой по сравнению с белком Н-Ras [171, 172].

В Соединенных Штатах Америки было разработано несколько ингибиторов фарнезилтрансферазы: типифарниб (R115777, Zarnestra™, США) и лонафарниб (SCH66336, Sarasar R, США), которые были наиболее широко изучены в клинических испытаниях (таблица 1).

Таблица 1 – Ингибиторы фарнезилтрансферазы участвующие в клинических исследованиях

Лекарства	Фаза исследования
R115777 (Zarnestra)	Фаза III: лейкоз, колоректальный рак Фаза II: рак мочевого пузыря, головного мозга, молочной железы, злокачественная глиома, колоректальный рак, лимфома, меланома, миелома, поджелудочная железа, саркома, гематологические злокачественные новообразования
SCH-66336 (Sarasar)	Фаза II: рак головного мозга, рак молочной железы, рак головы и шей
BMS-214662	Фаза II: гематологические злокачественные новообразования
Диметиламиноарглабин (Арглабин)	Фаза II: рак печени, легкого, желудка, молочной железы, прямой кишки, пищевода, яичника, поджелудочной железы, подчелюстной слюнной железы, лимфосаркома Фаза III: рак молочной железы

Наибольшую эффективность при раке молочной железы проявил типифарниб, как в монорежиме, так и в сочетании с гормональной терапией и химиотерапией [173, 174].

Доклинические исследования продемонстрировали противоопухолевую эффективность ингибиторов фарнезилтрансферазы в условиях *in vitro* и *in vivo*. Типифарниб в 100% случаях ингибировал рост всех шести клеточных линий несущих мутации HRAS, в 82% случаях у тридцати трех клеточных линий с NRAS генами дикого типа и в 50% случаев в четырнадцати клеточных линиях с мутациями KRAS [175-177].

Ингибиторы фарнезилтрансферазы также блокируют рост ксенотрансплантатов рака молочной железы MCF-7 с диким типом Ras, вызывая остановку клеточного цикла в фазе G2/M или G1 и индуцировать апоптоз. Интересно отметить, что ингибиторы фарнезилтрансферазы также блокирует сигнализацию mTOR [178, 179].

Путь Ras-Raf играет важную роль в резистентности к цитотоксической терапии. Повышенная активность онкогенного пути Ras-Raf-1-MEK-MARK была обнаружена в устойчивой к доксорубину и паклитакселу клеточной линии MCF-7, а также сопровождалась экспрессией гена и белка множественной лекарственной устойчивости (MDR, MRP). Сочетание ИФТ с доксорубином или паклитакселом приводит к аддитивной или синергической цитотоксичности в условиях *in vitro*. Ингибиторы фарнезилтрансферазы синергически увеличивают антимиотическое и проапоптотическое действие паклитаксела путем увеличения ацетилирования тубулина (маркера стабильности микротрубочек) [180-184].

Непептидомиметик типифарниб (Zarnestra, ранее R115777) был исследован в неoadьювантном режиме со стандартной химиотерапией АС

(адриабластин, циклофосфан) с включением паклитаксела у пациенток с эстроген положительными, трижды негативными, Her2neu положительными типами рака молочной железы. Однако заявленного патоморфологического ответа до 35% (pCR) комбинация с типифарнибом не достигла [185].

Johnston S.R.D. et al. в исследовании фазы II сравнивали безопасность и эффективность типифарниба при непрерывной дозировке (400 или 300 мг два раза в день) у 41 пациента и у 35 пациентов в циклическом режиме (300 мг два раза в день в течение 21 дня с 7 дневным перерывом). Циклический режим препаратом типифарниб значительно улучшал терапевтические показатели и снижал нейротоксичность, гематологическую, дерматологическую токсичность [186].

Lebowitz P.F. et al. в исследовании I фазы, использовали типифарниб (200 или 300 мг два раза в день в течение 21 из 28 дней) с добавлением тамоксифена (20 мг один раз в день, который был начат после 1 недельной монотерапии типифарнибом) у пациентов с метастатическим гормоноположительным РМЖ. В дозе 300 мг типифарниб отмечались различные профили токсичности, в том числе сыпь, общая слабость, нейтропения, тошнота 2 степени и диарея 3 степени. Однако при дозировке в 200 мг наблюдается минимальная токсичность, поэтому данная дозировка способна поддерживать терапевтическую эффективность и низкую токсичность у пациентов с РМЖ [187].

В дальнейшем, было показано, что комбинация типифарниба (200 мг два раза в день, в течение 6 дней) с внутривенной инфузией доксорубицина+циклофосфамида (доксорубин 60 мг/м<sup>2</sup> и циклофосфамид 600 мг/м<sup>2</sup>) до четырех циклов является безопасной при местнораспространенном РМЖ. Серийные биопсии у пяти пациентов продемонстрировали, что активность фермента фэрнезилтрансферазы ингибируется по меньшей мере на 50% после терапии с препаратом типифарниб [188, 189].

Andreopoulou E. et al. в своем исследовании проводили химиотерапию доксорубицином-циклофосфамидом у пациентов с местнораспространенной формой РМЖ у HER2 - отрицательных пациентов при II-III стадиях. Пациенты получали 12-недельные курсы паклитаксела (80 мг/м<sup>2</sup>) затем доксорубин-циклофосфамид (60/600 мг/м<sup>2</sup>) каждые 2 недели и филграстим), в сочетании с типифарнибом (100 или 200 мг внутрь или перорально в дни 1-3 каждого цикла введения паклитаксела и 200 мг со 2 по 7 дни каждого цикла доксорубин-циклофосфамид). Частота полного патоморфологического ответа наблюдалась у 18% пациентов (95% ДИ, 7-36%) [190].

Li et al. провели исследование II фазы по безопасности и эффективности совместного лечения типифарнибом и фулвестрантом при метастатическом гормоноположительном РМЖ. Женщины в постменопаузе получили фулвестрант 250 мг в 1 день (внутримышечно) в комбинации с типифарнибом 300 мг два раза в день с 1 по 21 дни перорально. Результаты показали, что эффективность режима составила 51,6%. [95% ДИ, 34,0–69,2%] у 31 пациента [191].

Johnston S.R. et al. при сравнении режима летрозол 2,5 мг по 1 таблетке 1 раз в день +типифарниб 200 мг 2 раза в день с 1 по 14 день каждый 21 дневный курс при люминальном РМЖ, продемонстрировали высокую частоту объективного ответа по сравнению с монотерапией летрозолом, также были отмечены более высокие показатели общей выживаемости [192].

Лонафарниб (SCH66336), является селективным и мощным ингибитором фарнезилпротеинтрансферазы с эффективной пероральной биодоступностью и фармакокинетическими характеристиками на разных моделях животных. Есть несколько исследований продемонстрировавших, что комбинация лонафарниба с другими противоопухолевыми агентами повышает эффективность лечения РМЖ. Было показано, что лонафарниб усиливает действие тамоксифена и анастрозола, за счет увеличения клеток G1 и как следствие остановка цикла и апоптоза в линии клеток РМЖ. В соответствии с клеточными результатами, лонафарниб усиливал противоопухолевую активность тамоксифена и анастрозола у мышей с любым из родительских MCF-7 или трансфицированные ароматазой ксенотрансплантатов опухоли молочной железы MCF-7Ca [193].

Также лонафарниб (SCH66336), был отмечен в качестве проводника, стабилизирующего микротрубочки за счёт процессов ацетилирования. SCH66336 более эффективен в комбинации с паклитакселом, усиливая ацетилирование тубулина, маркер стабильности микротрубочек, ингибируется деацетилазная активность гистондеацетилазы 6 (HDAC6), что приводит к остановке митоза и гибели клеток [194].

Лонафарниб (SCH66336) ингибирует ранезирование Rheb и сигнализацию mTOR. В исследовании I фазы EORT: лонафарниб (SCH66336) в сочетании с трастузумабом и паклитакселом в Her2neu сверхэкспрессирующем раке молочной железы показал противоопухолевую активность у 58% пациентов и лонафарниб можно безопасно комбинировать с полными дозами паклитаксела и трастузумаба [195].

Кроме того, Kerklaan K. et al. провели I фазу исследования безопасности максимально переносимой дозы лонафарниба (SCH66336) в комбинации с трастузумабом и паклитакселом в HER2-положительном метастатическом РМЖ. Максимально переносимая доза и рекомендуемая доза для испытаний II фазы лонафарниб составила: 250 мг/день (125 мг/2 раза в день) непрерывно. Осложнение началось во время первого цикла лечения и включало в себя нейтропению, артралгию, миалгию, сенсорную невропатию и алопецию [196].

В Республике Казахстан был создан препарат диметиламиноарглабин (Арглабин), который также ингибирует фермент фарнезилтрансферазу. Механизм действия изучен совместно с лабораториями клиники MD Anderson и компании Nu Oncology Labs (Хьюстон, США). Выявлено, что Арглабин является конкурентным ингибитором фарнезилирования RAS-онкобелков, снижает экспрессию RAS-генов и содержание АТФ, вызывает апоптоз опухолевых клеток [197-199].

Препарат арглабин в период с 1994 по 1999 годы прошел две фазы предрегистрационных клинических испытаний на базах клиник Казахского научно-исследовательского института онкологии и радиологии, Карагандинского областного онкологического центра, Актюбинского онкодиспансера [200-202].

Первая фаза клинических испытаний арглабина проведена в Карагандинском областном онкологическом центре на 53 больных с III-IV стадией злокачественного процесса по 11 локализациям. Однократная доза находилась в диапазоне от 240 до 600 мг в день. При дозах более 600 мг у пациентов отмечались тошнота, рвота, кожный зуд, вкус полыни во рту. Симптомы самостоятельно купировались после снижения дозировок [203, 204].

Вторая фаза – на 72 больных с IV стадией опухолевого процесса различной локализации (рак печени, легкого, желудка, молочной железы, прямой кишки, пищевода, яичника, поджелудочной железы, подчелюстной слюнной железы, лимфосаркома и др.). Доза препарата варьировала от 240 до 600 мг в день. При этом объективный положительный эффект в виде уменьшения размера опухоли и метастазов получен у 44% больных, субъективный – у 28%. Оценка объективного эффекта монокимиотерапии препаратом проведена по критерию, рекомендованному ВОЗ и Международным противораковым союзом. Наиболее выраженный эффект препарат показал в случае первичного рака печени, молочной железы, легких и яичников [205].

Дальнейшее основательное изучение противоопухолевой активности арглабина было проведено в рамках III фазы клинических испытаний у пациентов со злокачественными поражениями печени, молочной железы и легкого. При исследовании опухолевых поражений печени, больные были разделены на 4 группы в зависимости от проводимой паллиативной терапии: 1 группе проведена монокимиотерапия арглабином (20 больных); 2 группе – арглабин + 5-фторурацил (20 больных); 3 группе - арглабин + 5-фторурацил + платинол (22 больных); 4 группе – 5-фторурацил + платинол (22 больных). Медиана выживаемости больных по группам составила: 6,7 месяца в 1 группе; 7,4 месяца во 2 группе; 44,5 месяца в 3 группе; 6,3 месяца в 4 группе соответственно. Самая высокая продолжительность жизни наблюдалась в группе больных, получавших полихимиотерапию в сочетании с арглабином [206, 207].

При изучении эффективности терапии в рамках РКИ пациенты РМЖ были разделены на три группы с использованием метода рандомизации. Первую группу составили 15 больных, получивших монокимиотерапию арглабином из расчета 6 мг/кг веса или 222 мг/м<sup>2</sup>. Вторую группу – 15 больных, получивших арглабин в комбинации со схемой CMF. Третью группу – 15 больных, получивших химиотерапию по схеме CMF. Оценка лечения показала, что в группе, получавшей только арглабин, у 1 больного наблюдалась частичная регрессия, у 7 – стабилизация, у 7 – прогрессирование процесса. В группе, получавшей арглабин + CMF, у 7 больных фиксировали частичную

регрессию, у 8 – стабилизацию процесса. В группе, получавшей химиотерапию по схеме CMF, у 3 пациенток отмечена частичная регрессия, у 7 – стабилизация процесса, у 5 – прогрессирование процесса. Таким образом, наиболее высокий процент частичной регрессии (46,6%) и стабилизации (53,3%) наблюдался в группе, получавшей комбинацию арглабин + CMF, где также не отмечено прогрессирования заболевания. При этом необходимо отметить, что арглабин в виде монокимиотерапии подключали больным, не чувствительным к полихимиотерапии по схеме CMF при прогрессировании заболевания [208, 209].

Также проведено рандомизированное контролируемое исследование арглабина при лечении 92 больных местнораспространенным РМЖ II-III стадии, одной группе которых на фоне предоперационной лучевой терапии интратуморально вводили 2% раствор арглабина из расчета 2 мг на 1 см<sup>3</sup> опухоли под контролем УЗИ, другой вводили внутривенно 2% раствор арглабина из расчета 5 мг/кг. Эффективность стандартного лучевого лечения у больных местнораспространенным раком молочной железы с использованием арглабина оказалась на 30% выше, чем у больных контрольной группы. При применении арглабина на фоне ЛТ получен равномерный регресс опухоли, причем объем опухоли у больных, получавших арглабин интратуморально, уменьшился в 5,5 раза, внутривенно – в 8,5 раза, а в контрольной группе – в 2,8 раза [210, 211].

Препарат «Арглабин» изучался в ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Клинические испытания, проведенные на 20-ти больных местнораспространенным раком молочной железы (МРМЖ) показали, что арглабин обладает выраженным радиосенсибилизирующим эффектом, приводящим к увеличению частоты полных регрессий опухоли до 20% в сравнении с контролем 5%. При этом достоверно повышается вероятность лучевого патоморфоза опухоли III-IV степени [212].

Применении арглабина на фоне лучевой терапии уменьшило объем опухоли в 5,5 раз при интратуморальном введении препарата, в 8,5 раз при внутривенном, а в контрольной группе опухоль уменьшилась всего в 2,8 раз. Использование Арглабина значительно чаще приводит к выраженному лучевому патоморфозу опухоли, соответствующий III-IV степени: при интратуморальном введении в 64% случаев, при внутривенном введении – в 50% и при лучевом лечении – в 37%. Внутривенное введение Арглабина при ЛТ оказывает положительное влияние на отдаленные результаты комплексного лечения больных местнораспространенным РМЖ: показатели двух, трехлетней выживаемости составили 93 и 90% соответственно, что достоверно выше, чем при проведении только лучевой терапии (63 и 53% соответственно) [213].

Доклинические и клинические исследования свидетельствуют о том, что ингибиторы фarnезилтрансферазы активны при раке молочной железы с повышенной экспрессией онкогена HRAS. Поэтому прогностические биомаркеры, такие как экспрессия H-Ras белка позволит оптимально подобрать



пациентов, которые могут получить максимальную выгоду от терапии ингибитором фарнезилтрансферазы.

Таким образом, можно с уверенностью сказать, что ингибиторы фарнезилтрансферазы не потеряли своей актуальности при лечении РМЖ. К сожалению, на сегодняшний день не существует четких рекомендации по назначению этих препаратов при H-Ras экспрессирующем раке молочной железы, однако имеющиеся исследования доказывают необходимость дальнейшего изучения и проведения, клинических испытаний в этой области.

## 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Характеристика клинического материала

Набор клинического материала проводился в соответствии с правилами, принятыми Этической комиссией Карагандинского Государственного Медицинского Университета.

В исследование было включено 100 пациентов в возрасте от 29 до 78 лет с установленным диагнозом рак молочной железы II и III стадией заболевания ( $T_{2-4}N_{0-2}M_0$ ), получившие комплексную терапию в Карагандинском областном онкологическом диспансере с 2012 по 2014 годы.

Критерии включения в исследование:

- возраст старше 18 лет;
- морфологически верифицированный рак молочной железы;
- иммуногистохимически определенный тип рака молочной железы;
- пациенты без сопутствующей патологии со стороны сердца, легких, органов желудочно-кишечного тракта, мочевыделительной и нервной системы;
- пациенты без сопутствующего метастатического или синхронного рака другой локализации;
- отсутствие в анамнезе проведенной химиотерапии и лучевой терапии.

У всех пациентов был иммуногистохимически и морфологически верифицирован рак молочной железы (таблица 2).

Таблица 2 – Характеристика клинического материала

Биологические типы рака молочной железы	Количество пациентов	Стадия процесса		Возраст
		II	III	
Люминальный А	29	24	5	59 (32-78)
Люминальный В, Her2neu-отрицательный	2	-	2	70 (42-75)
Люминальный В, Her2neu положительный	13	9	4	57 (38-78)
Her2neu положительный (не люминальный)	37	23	14	55 (29-77)
Тройной негативный	19	12	7	61 (39-78)
Итого	100	67	33	60 (50-69)

До проведения неoadьювантной лекарственной терапии определена экспрессия H-Ras онкобелков и в зависимости от её уровня проведено распределение пациентов на 2 группы лечения: группа сравнения (с отрицательной экспрессией H-Ras) и исследуемая группа (с положительной экспрессией H-Ras).

Для выбора схемы неoadьювантной терапии и распределения на группы лечения пациентам было проведено слепое рандомизированное исследование.

В группу сравнения вошли 55 пациентов с отрицательной экспрессией H-Ras онкобелков.

Люминальный тип А опухоли установлен у 27 пациентов, люминальный В Her2neu-положительный – 6, Her2neu-положительный нелюминальный – 8, тройной негативный – 14 (таблица 3).

Таблица 3 – Биологические типы рака молочной железы в группах исследования

Биологические типы рака молочной железы	Группа сравнения n=55	Исследуемая группа n=45
Люминальный А	27	2
Люминальный В, Her2neu -отрицательный	0	2
Люминальный В, Her2neu положительный	6	7
Her2neu положительный (нелюминальный)	8	29
Тройной негативный	14	5

В группе сравнения с отрицательной экспрессией H-Ras неoadьювантную химиотерапию по схеме AC (доксорубин+циклофосфамид) получили 23 пациента, AC+Арглабин – 18 и Арглабин в монорежиме – 14 (таблица 4).

Таблица 4 – Схемы неoadьювантной лекарственной терапии в группах исследования

Схемы неoadьювантной лекарственной терапии	Группа сравнения n=55	Исследуемая группа n=45
AC (доксорубин+циклофосфамид)	23	16
AC+Арглабин (доксорубин+циклофосфамид+арглабин)	18	12
Арглабин	14	17

В исследуемую группу включено 45 пациентов с положительной экспрессией H-Ras онкобелков.

Люминальный тип А опухоли установлен у 2 пациентов, люминальный В Her2neu-отрицательный – 2, люминальный В Her2neu-положительный – 7, Her2neu-положительный нелюминальный – 29, тройной негативный – 5.

В исследуемой группе неoadьювантную химиотерапию по схеме AC (адриабластин+циклофосфамид) получили 16 пациентов, AC+Арглабин – 12 и Арглабин в монорежиме – 17.

## 2.2 Дизайн исследования

Исследование проведено в три этапа.

На первом этапе всем пациентам проведены морфологическая и иммуногистологическая верификации, анализ уровня экспрессии H-Ras, распределение на группу сравнения и исследуемую группы, а также на режим неoadьювантной терапии.

На втором этапе проведена неоадьювантная терапия оценена ее непосредственная эффективность и определен уровень H-Ras после лечения.

На заключительном этапе проведена оценка отдаленных результатов лечения и построена прогностическая модель неблагоприятного прогноза РМЖ (рисунок 3).

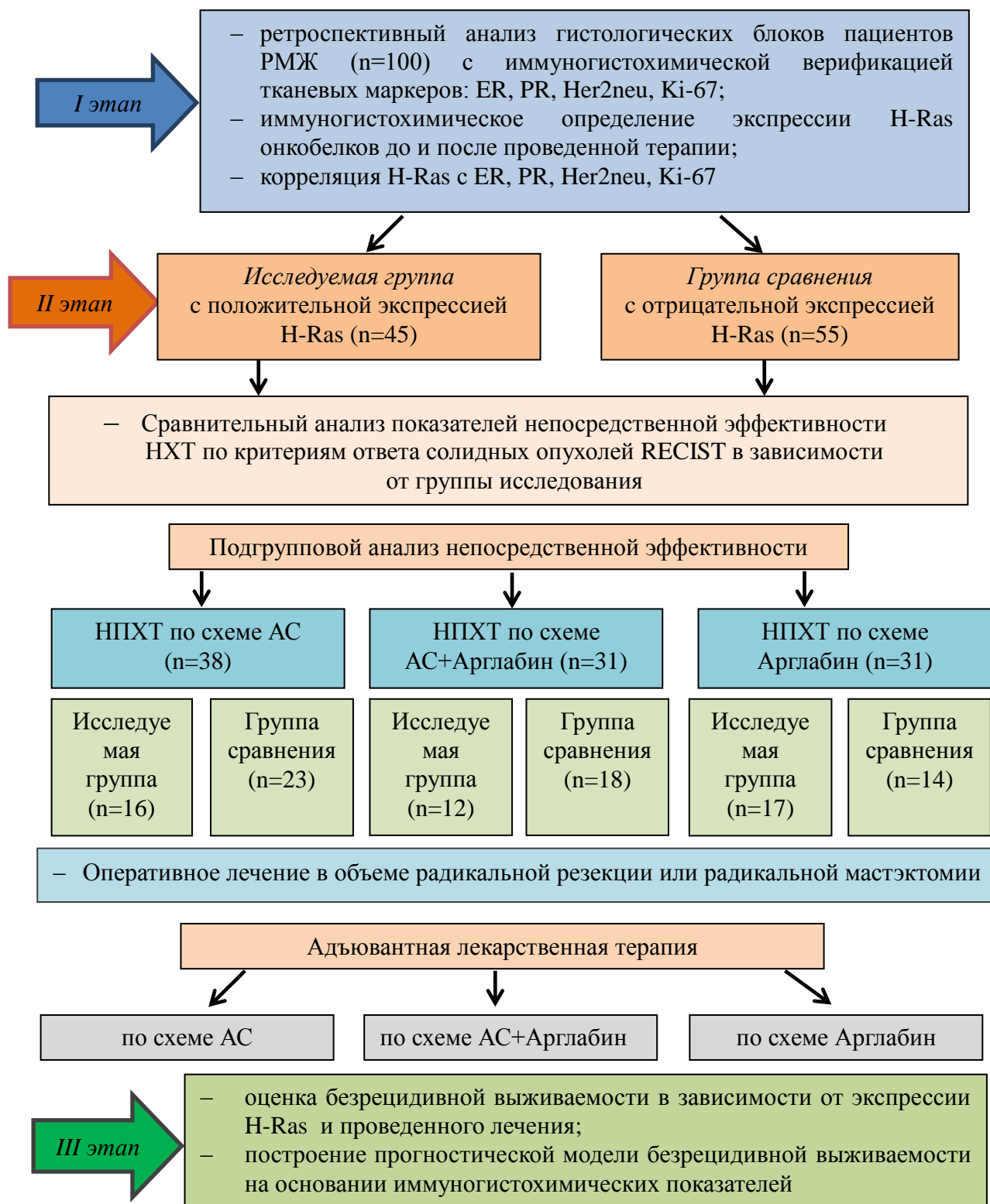


Рисунок 3 – Дизайн исследования

Все пациенты получили комплексное лечение включающее: 4 курса неоадьювантной лекарственной терапии затем оперативное лечение в объеме радикальной мастэктомии или радикальной секторальной резекции молочной железы. После оценки лекарственного патоморфоза опухоли пациентам проведено 4 курса адьювантной лекарственной терапии и лучевая по показаниям. При гормонозависимом раке проводилась адьювантная гормональная терапия.

Для выбора схемы неоадьювантной терапии и распределения на группы лечения пациентам было проведено слепое рандомизированное исследование.

Лекарственная терапия проведена по одной из ниже указанных схем:

Полихимиотерапия по схеме AC – доксорубин  $60 \text{ мг/м}^2$  и циклофосфамид  $600 \text{ мг/м}^2$  внутривенно в 1 день каждого 21 дневного цикла.

Монотерапия препаратом Арглабин  $370 \text{ мг/м}^2$  с 1 по 7 дни каждого 21 дневного цикла.

Лекарственная терапия (химиотерапия по схеме AC+Арглабин) доксорубин  $60 \text{ мг/м}^2$ , циклофосфамид  $600 \text{ мг/м}^2$  внутривенно в 1 день и «Арглабин»  $370 \text{ мг/м}^2$  с 1 по 7 дни каждого 21 дневного цикла.

Через 2 недели после завершения курсов неоадьювантной терапии проведена оценка непосредственной эффективности и проведено оперативное лечение в объеме радикальной мастэктомии или секторальной резекции молочной железы.

Затем проведено морфологическое исследование остаточной опухоли и регионарных лимфатических узлов, оценен опухолевый лекарственный патоморфоз по Лавниковой Г.А. [214] и повторно определен уровень экспрессии H-Ras.

В зависимости от уровня лекарственного патоморфоза опухоли проведена адьювантная лекарственная терапия.

При опухолевом патоморфозе 3-4 степени лекарственная терапия проводилась по той же схеме, что и в неоадьювантном режиме, всего 4 курса.

При отсутствии лекарственного патоморфоза или при его минимальном проявлении (1-2 степень) схема адьювантной терапии изменялась:

Схема AC на доцетаксел в монорежиме  $100 \text{ мг/м}^2$  внутривенно в 1 день каждого 21 дневного курса, всего 4 курса.

Арглабин в моно режиме на схему AC (адриабластин (доксорубин)  $60 \text{ мг/м}^2$  и циклофосфамид  $600 \text{ мг/м}^2$  внутривенно в 1 день каждого 21 дневного цикла), всего 4 курса.

Химиотерапия по схеме AC+Арглабин на доцетаксел в монорежиме  $100 \text{ мг/м}^2$  внутривенно в 1 день каждого 21 дневного курса, всего 4 курса.

При гиперэкспрессии Her2neu дополнительно к химиотерапии назначалась таргетная терапия трастузумаб  $8 \text{ мг/кг}$  внутривенно в 1 введение и далее  $6 \text{ мг/кг}$  каждый 21 день – всего 18 введений.

### **2.3 Исследование морфологических образцов рака молочной железы на определение экспрессии H-Ras**

Исследование морфологического материала на определение экспрессии H-Ras проводилось на базе КГП «Областной онкологический диспансер», г. Карагада в период с сентября 2017 г. по октябрь 2018 г. в рамках грантового проекта (№AP05130956) Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан «Фармакогенетическое изучение терпеноидных молекул и молекулярные механизмы их действия» в условиях АО «Международного-научно производственного холдинга «Фитохимия», г. Караганда (Приложение В, Г).

Экспрессия H-Ras проводилась иммуногистохимическим методом.

Определение экспрессии H-Ras онкобелков проведено в 100 образцах архивного морфологического материала пациентов, со злокачественным новообразованием молочной железы включенных в исследование до и после проведения неoadьювантной лекарственной терапии.

Интенсивность и распространенность экспрессии H-Ras оценивалась с помощью модифицированной шкалы иммунореактивности Remmele и Stegner (IRS) [215].

Шкала иммунореактивности (IRS) клеток молочной железы высчитывалась посредством умножения балла интенсивности иммуноокрашивания и распространенности позитивно окрашенных опухолевых клеток.

Интенсивность окраски оценивалась по следующим показателям:

- 0 = реакция отсутствует;
- 1 = слабая;
- 2 = умеренная;
- 3 = сильная реакция.

Процент позитивно окрашенных ЭК был оценен следующим образом:

- 0 = реакция отсутствует;
- 1 = <10% опухолевых клеток;
- 2 = 11-50% опухолевых клеток;
- 3 = 51-80% опухолевых клеток;
- 4 = >81% окрашенных опухолевых клеток.

Общий балл IRS составляет от 0 до 12. Шкала оценки IRS:

- 0-2 балла - негативная реакция;
- 3-4 балла - слабая реакция;
- 6-8 баллов - умеренная реакция;
- 9-12 баллов - реакция высокой степени.

Экспрессия оценивалась в процентном соотношении положительно окрашенных клеток в 10 полях зрения на 1000 клеток при увеличении x 200. Положительной считалась окраска на мембране и цитоплазме опухолевых клеток. За негативный иммунофенотип принималась экспрессия H-Ras баллом IRS (0-2 балла), в  $\leq 20\%$  окрашенных опухолевых клеток.

Для иммуногистохимического исследования изготавливались гистологические парафиновые срезы толщиной 5 мкм, далее проводилось депарафинирование, срезы дегидратировались и промывались в натриево-цитратном буфере (PBS, sc-294091, Santa Cruz). Иммуногистохимическое окрашивание подготовленных срезов проведено с использованием авидин-биотиновой системы детекции антигена ImmunoCruz® ABC Kit (sc-516216) в соответствии с инструкциями производителя. Для визуализации положительной реакции в качестве хромогена был использован 3,3-диаминобензидин тетрагидрохлорида (DAB, sc-24982).

При проведении исследования использованы мышинные моноклональные антитела анти-IgG<sub>1</sub> против белка H-Ras (sc-29, Santa Cruz) мышинового, крысиного и человеческого происхождения, характеризующиеся позитивной реакцией в цитоплазме опухолевых клеток. Для негативного контроля первичные антитела против H-Ras были, замещены буфером (PBS) или не иммунным анти-Ig G<sub>1</sub>.

Для определения прогностической значимости H-Ras онкобелков в комплексной терапии рака молочной железы было проведено ретроспективное сравнительное иммуногистохимическое исследование биопсийного материала до лечения и гистологических образцов рака молочной железы в результате лекарственного воздействия различными режимами предоперационной терапии.

#### **2.4 Характеристика лекарственных препаратов для неoadьювантной лекарственной терапии**

Доксорубин (адриабластин) – лиофилизат (красный кристаллический порошок или пористая масса) для изготовления раствора для внутривенных и внутрисосудистых инъекций во флаконах по 10 или 50 мг гидрохлорида доксорубина.

Доксорубин – антибиотик антрациклинового ряда, выделенный из культуры *Streptomyces peuceticus* var. *caesius*., подавляет синтез ДНК и РНК: интеркалирует в двойную спираль ДНК между парами азотистых оснований (нарушается матрица и изменяется пространственная структура) и вызывает расщепление ДНК вследствие образования свободных радикалов. Помимо этого противоопухолевое действие возможно обусловлено изменением клеточных функций в результате связывания с липидами клеточных мембран и взаимодействием с топоизомеразой II.

Циклофосфамид – порошок для приготовления инъекций во флаконах (1 флакон содержит 200, 500 и 1000 мг циклофосфамида). Циклофосфамид относится к группе цитостатических противоопухолевых лекарственных средств, обладающих алкилирующим действием. Является неактивной транспортной формой, распадающейся под действием фосфатаз с образованием активного компонента непосредственно в клетках опухоли, «атакует» нуклеофильные центры белковых молекул, нарушает синтез ДНК и РНК, блокирует митотическое деление.

Арглабин – лиофилизат для приготовления раствора для в/в введения в виде порошка или пористой массы от белого до белого со слегка желтоватым оттенком цвета в ампулах по 40 мг.

Арглабин представляет собой биологически активный сесквитерпеновый лактон, выделенный из полыни гладкой *Artemisia glabella*.

Обладает противоопухолевым и радиосенсибилизирующим действием. Являясь ингибитором фарнезилтрансферазы, препарат препятствует присоединению фарнезиловой группы к клеточным белкам, что приводит к нарушению пренилирования продукта онкогена Ras. Дефарнезилирование Ras-онкогена приводит к апоптозу опухолевой клетки, угнетает рост опухолевых клеток за счет прерывания митотического сигнала к делению клеток, одновременно снижает влияние факторов, неблагоприятно воздействующих на иммунную систему, что приводит к нормализации иммунного статуса организма.

## **2.5 Оценка непосредственной эффективности неоадьювантной терапии**

Непосредственная эффективность проведенной лекарственной терапии оценивалась после 4 неоадьювантных курсов на основании критериев ответа опухолей на лечение – RECIST (response evaluation criteria in solid tumors) [216].

Полный ответ (complete response – CR) – исчезновение всех очагов.

Частичный ответ (partial response – PR) – уменьшение суммы диаметров очагов не менее чем на 30%.

Общая эффективность оценивалась как сумма полного и частичного ответа.

Уровень контроля заболевания рассчитывался как сумма общего эффекта и стабилизации процесса

Прогрессирование заболевания (progressive disease – PD) – увеличение на 20% и более суммы диаметров основных очагов (более 5 мм), появление одного или нескольких новых очагов.

Стабилизация заболевания (stable disease – SD) – все прочие случаи.

## **2.6 Оценка лекарственного патоморфоза опухоли**

После проведения неоадьювантной лекарственной терапии и оперативного лечения оценивался лекарственный патоморфоз опухоли.

Для оценки лечебного патоморфоза использовалась методика Г.А. Лавниковой, основанная на учете изменения общей структуры опухоли на тканевом и клеточном уровне.

Данная классификация выделяет 4 степени ответа опухоли на лекарственное лечение:

I степень – более 50% опухолевой паренхимы сохранено, изменений в общей структуре опухоли нет, имеются полиморфизм и дистрофия клеток, а также подавление митозов.

II степень – сохранено 20-50% опухолевой паренхимы. Несмотря на сохранение основной массы паренхимы, отчетливо видны очаги регрессивных



изменений различного характера при наличии выраженных дистрофических изменений в клетках.

III степень – до 20% паренхимы опухоли сохранилось в виде отдельных очагов. Структура опухоли резко нарушена за счет фиброзного замещения, обширного некроза или круглоклеточной инфильтрации, выраженных в разных опухолях в неодинаковой степени; на этом фоне определяют остатки опухоли в виде разрозненных групп паренхиматозных клеток, обычно с резкими дистрофическими изменениями.

IV степень – полное отсутствие исчезновение паренхиматозных элементов опухоли.

## **2.7 Оценка безрецидивной выживаемости**

Для комплексной оценки результатов лечения применен анализ безрецидивной выживаемости (длительности периода без прогрессирования заболевания).

В работе использован динамический актуариальный метод расчета безрецидивной выживаемости по Каплан-Мейеру с использованием программы «Statistica 10.0» [217].

## **2.8 Построение прогностической модели безрецидивной выживаемости**

Для построения прогностической модели безрецидивной выживаемости использовался метод построения обобщенной линейной модели GLM, который не требует условий линейности взаимосвязи между параметрами. Предсказательная модель считается значимой при коэффициенте детерминации данной модели более 50% [217, с. 459].

## **2.9 Статистическая обработка полученных данных**

С целью репрезентативности исследуемой выборки использован расчет бинарных показателей необходимого числа респондентов.

Условия, которые необходимы при расчёте:

$P_c$  - Безрецидивная выживаемость в контрольной группе 65% (0,65).

$P_t$  - Ожидаемая безрецидивная выживаемость в исследуемой группе 55% (0,55).

Непосредственная эффективность 10% (0,1).

Уровень значимости  $\alpha=0,05$ .

Мощность критерия  $(1-\beta)=0,8$  при  $\beta=0,2$ .

$Z_\alpha = 1,96$  - значение стандартного нормального распределения для  $\alpha$ .

$Z(1-\beta)0,8 = 0,84$  - значение стандартного нормального распределения для  $(1-\beta)$ .

$\lambda$ -отношение рецидива заболевания.

Параметр « $P_c$  - безрецидивная выживаемость в контрольной группе 65%, соответствует статистическим данным по выживаемости стандартной неоадьювантной химиотерапии при раке молочной железы.

Представим, что желаемая непосредственная эффективность при отрицательной экспрессии H-Ras PT=65%, границу «неменьшей эффективности» выбираем в 10% (т.е.  $\delta = -0.1$ ).

Проверяемые гипотезы:

H0: PT-PC  $\leq$  -0,1.

H1: PT-PC  $>$  -0,1.

Объем выборки при сравнении пропорции для исследования с не меньшей эффективностью рассчитывается по методу лог рангового критерия.

В первую очередь оцениваются возможное количество исходов d (рецидив) по формуле:

$$d = (Za + Z1 - b)^2 \times (1 + \lambda / (1 + \lambda))^2.$$

$$d = (1,96 + 0,84)^2 \times (1 + 0,05 / (1 + 0,05))^2 = 66.$$

$$\lambda = ((\ln Pt(\infty) / \ln Pc(\infty))).$$

$$\lambda = ((\ln 0,65(\infty) / \ln 0,55(\infty))) = 0,35.$$

Возможное количество рецидивов d при планировании клинического исследования d=66, показатель  $\lambda$ -отношение рецидива заболевания =0,35.

По ожидаемым показателям безрецидивной выживаемости можно найти объем выборки необходимой для исследования:

$$n = (d/2 - Pt - Pc).$$

$$n = (66/2 - 0,65 - 0,55) = 32.$$

Используя данные вычисления, был определен необходимый объем выборки для получения устойчивых результатов с достаточной степенью уверенности, который составил 32 пациента.

При обработке полученных результатов использованы: метод различий двух показателей определялся по точному критерию Фишера, сравнение двух независимых выборок производилось с помощью непараметрического критерия U Манна-Уитни; сравнение нескольких независимых выборок производилось с помощью непараметрического критерия Краскела-Уоллиса; метод ранговой корреляции Спирмена (rs), для определения безрецидивной выживаемости использовался метод расчета выживаемости по Каплан-Мейеру с целью проверки статистической значимости различий в показателях безрецидивной выживаемости между группами использовался логранговый критерий.

Статистическая обработка данных выполнена с использованием пакетов прикладных программ Statistica 10, Excel. Для описания количественных показателей использовались среднее значение и стандартное отклонение в формате «M  $\pm$  m».

Для расчетов и оформления статистического материала использовали персональный компьютер и пакет прикладных программ SPSS Statistica 10, и табличный процессор Excel из пакета офисных программ Microsoft Office 2010. Расчет прогноза безрецидивной выживаемости проводился в программе Rstatistic. Уровень статистической значимости был зафиксирован на уровне вероятности ошибки  $p < 0,05$ .

### 3 ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ H-RAS ОНКОБЕЛКОВ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ТЕРАПИИ У ПАЦИЕНТОВ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

#### 3.1 Экспрессия H-Ras онкобелков у пациентов раком молочной железы до лечения

Для решения первой задачи до начала проведения неоадьювантной лекарственной терапии проведено иммуногистохимическое исследование экспрессии H-Ras белков.

Проведенное иммуногистохимическое исследование показало, что до начала неоадьювантной лекарственной терапии у 45 (45%) пациентов РМЖ выявлена экспрессия онкобелков H-Ras (таблица 5).

Таблица 5 – Экспрессия H-Ras онкобелков при РМЖ

Уровень экспрессии H-Ras (n=100)			
Сильная Экспрессия (M ± SD)	Умеренная экспрессия (M ± SD)	Всего повышенная экспрессия (M ± SD)	Отрицательная экспрессия (M ± SD)
32 (78,4 ±8,7)	10 (63,0±6,4)	3 (41,0±6,4)	55 (13,5,0±5,2)

Сильная экспрессия была обнаружена у 32 (32%) пациентов с диагнозом рак молочной железы (рисунок 4).

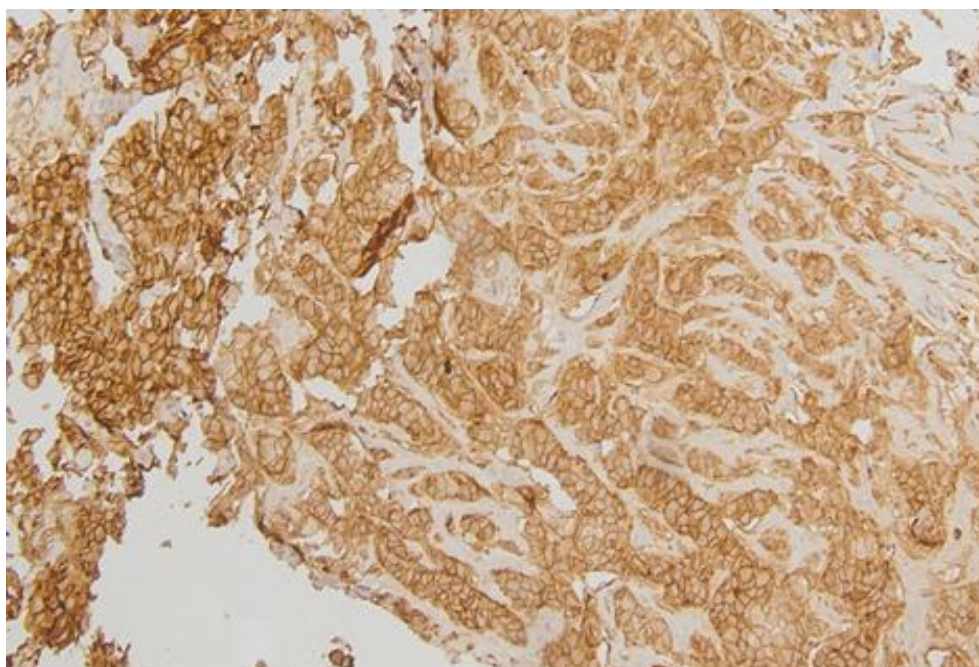


Рисунок 4 – Гиперэкспрессия онкобелков H-Ras (IRS) 9-12 баллов в более чем 50% опухолевых клеток рака молочной железы

Примечание – Окраска авидин-биотиновым методом. Увеличение x 200

При иммуногистохимическом исследовании онкобелков H-Ras у 10 пациентов (10%) раком молочной железы была выявлена умеренная экспрессия изучаемых белков (рисунок 5).

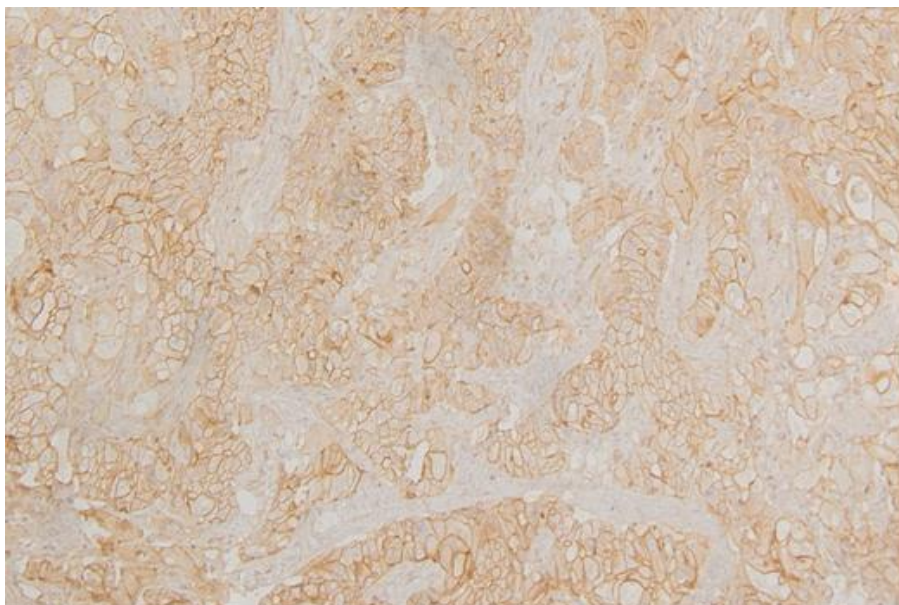


Рисунок 5 – Умеренная экспрессия онкобелка H-Ras (IRS) 6-8 баллов в более чем 30% опухолевых клеток рака молочной железы

Примечание – Окраска авидин-биотиновым методом. Увеличение x 200

Экспрессия H-Ras онкобелков у 55 (55%) пациентов с диагнозом рак молочной железы была отрицательной (рисунок 6).

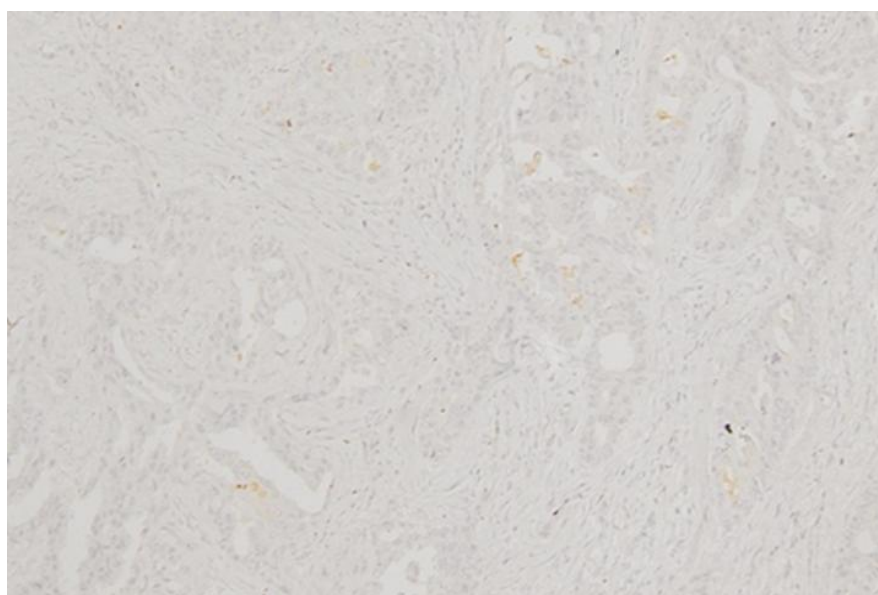


Рисунок 6 – Отрицательная экспрессии H-Ras (IRS) 0-2 балла в клетках рака молочной железы

Примечание – Окраска авидин-биотиновым методом. Увеличение x 200

С целью получения дополнительных данных о тесноте связи между уровнем экспрессии относительного количества Н-Ras и интенсивности экспрессии (IRS) Н-Ras в исследуемых группах пациенток с диагнозом рак молочной железы до лечения был проведен расчет коэффициента корреляции Спирмена (рисунок 7).

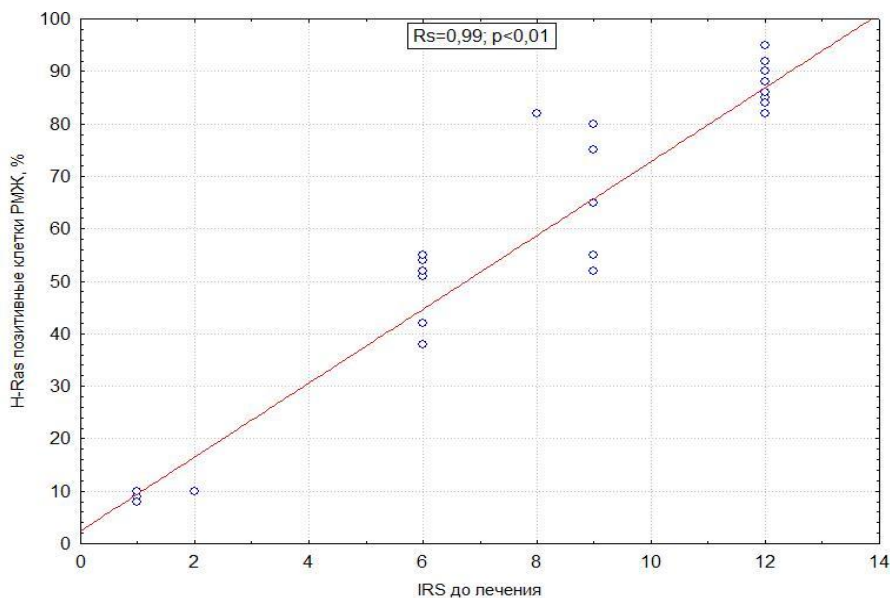


Рисунок 7 – Оценка связи количества Н-Ras в клетках РМЖ и балла иммунореактивности (IRS) Н-Ras до лечения ( $r_s = 0,99$ ,  $p < 0,01$ )

В результате проведенного корреляционного анализа была выявлена линейная зависимость между уровнем экспрессии относительного количества Н-Ras и баллом иммунореактивности (IRS) Н-Ras в клетках рака молочной железы ( $r_s = 0,99$ ,  $p < 0,01$ ).

Таким образом, проведенное иммуногистохимическое исследование показало, что до начала неoadьювантной лекарственной терапии у 45% пациентов РМЖ была выявлена экспрессия Н-Ras, из этого числа у 32% – сильная экспрессия, у 10% – умеренная экспрессия и 3% имели низкую экспрессию изучаемого белка.

Сравнительный анализ экспрессии Н-Ras в зависимости от биологического типа РМЖ представлен в таблице 6.

Таблица 6 – Экспрессия Н-Ras в зависимости от биологического типа РМЖ

Биологические типы РМЖ	Количество пациентов (N)	Уровень экспрессии Н-Ras (n)	
		повышенная экспрессия (% позитивно окрашенных клеток, M ± SD)	отрицательная экспрессия (% позитивно окрашенных клеток, M ± SD)
1	2	3	4
Люминальный А	29	2 (69,2±9,6)	27 (12,1±2,3)
Люминальный В, Her2neu –	2	2 (72,3±5,7)	-



отрицательный			
Продолжение таблицы 6			
1	2	3	4
Люминальный В, Her2neu Положительный	13	7 (53,9±14,4)	6 (16,1±2,4)
Her2neu положительный Нелюминальный	37	29 (78,4±6,8)	8 (14,6±3,8)*
Тройной негативный	19	5 (66,3±5,4)	14 (13,7±7,4)*
Итого	100	45 (75,1±7,3)	55 (14,3±5,1)
* - достоверность по сравнению с люминальным типом А (p<0,05), сведения достоверны			

Изучение экспрессии онкобелков H-Ras у пациентов с люминальным типом А показало, что у 27 (93,1%) пациентов экспрессия H-Ras была отрицательной и только в 2 (6,9%) случаях положительной. Отрицательная экспрессия H-Ras статистически значимо преобладала у пациентов с люминальным типом А (Mann-Whitney U Test=5,46; p=0,04) (рисунок 8).

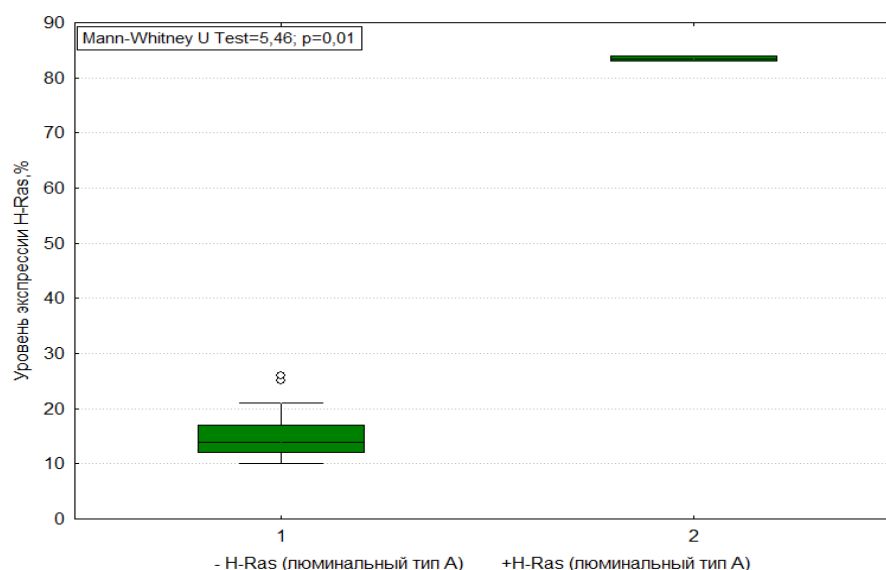


Рисунок 8 – Уровень экспрессии H-Ras у пациентов с люминальным типом А

Анализ экспрессионного статуса онкобелков H-Ras у пациентов Her2neu отрицательным люминальным типом В показал, что во всех случаях, экспрессия была положительной.

При анализе экспрессионного статуса онкобелков H-Ras у пациентов Her2neu – положительным, люминальным типом В РМЖ, экспрессия была обнаружена у 7 пациентов (53,9±14,4%) и отсутствовала у 6 пациентов (46,1±14,4%). Статистически значимых различий в данной группе не выявлено (Mann-Whitney U Test =0,80) при p=0,36 (рисунок 9).

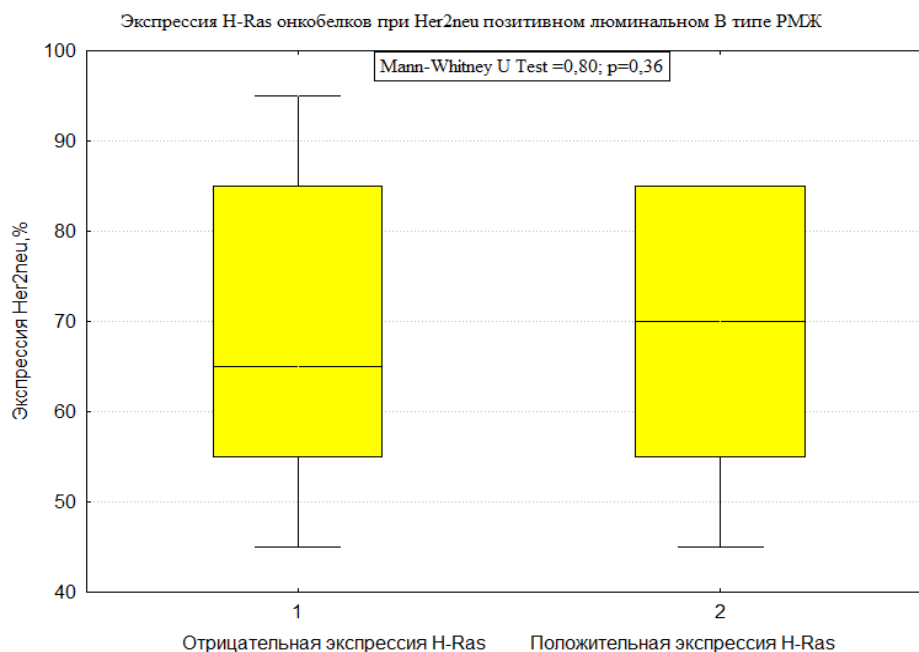


Рисунок 9 – Уровень экспрессии H-Ras у пациентов с Her2neu - положительным, люминальным типом В

Положительная экспрессия H-Ras у пациентов Her2neu позитивным нелюминальным типом составила 29 случаев (78,4%), тогда как отрицательная экспрессия H-Ras наблюдалась у 8 пациентов (21,6%) соответственно. Различия были статистически значимыми, положительная экспрессия встречалась достоверно чаще (Mann-Whitney U Test=9,13),  $p=0,002$  при данном типе (рисунок 10).

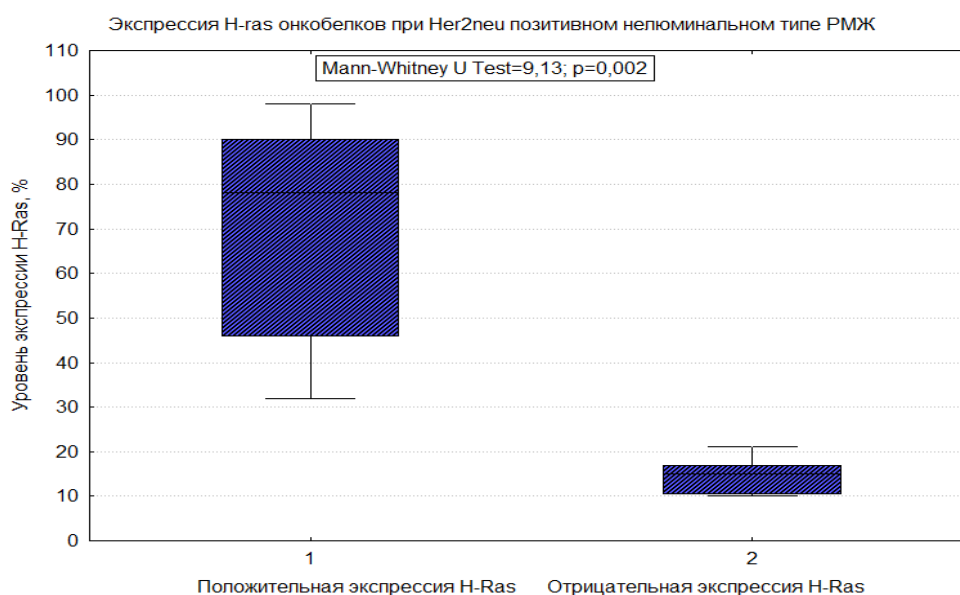


Рисунок 10 – Уровень экспрессии H-Ras у пациентов Her2neu позитивным нелюминальным типом

Анализ экспрессии онкобелков H-Ras у пациентов с трижды негативным типом РМЖ продемонстрировал, что у 14 (73,7%) пациентов экспрессия H-Ras была отрицательной и у 5 (26,3%) случаях положительной. Отрицательная экспрессия H-Ras статистически значимо преобладала у пациентов с трижды негативным типом (Mann-Whitney U Test =5,49) при  $p=0,01$  (рисунок 11).

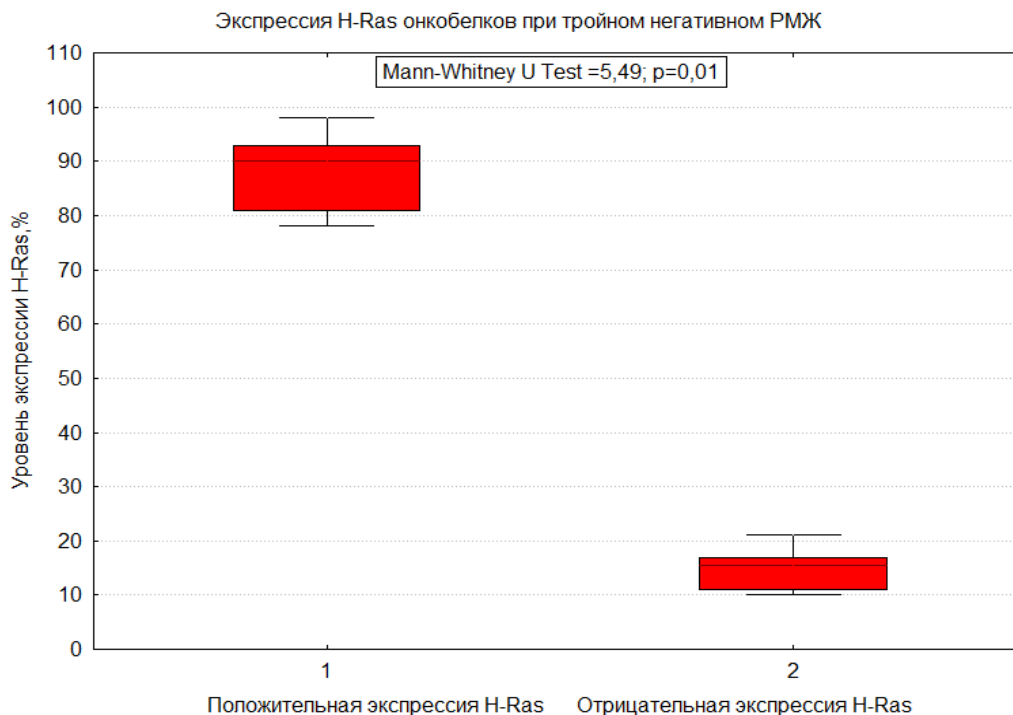


Рисунок 11 – Уровень экспрессии H-Ras у пациентов с трижды негативным типом РМЖ

Сравнительный анализ экспрессионного статуса H-Ras онкобелков у пациентов с различными иммуногистохимическими типами РМЖ показал, что положительная экспрессия H-Ras чаще встречалась у пациентов с Her2neu позитивным раком ( $p=0,002$ ). Отрицательная экспрессия H-Ras статистически значимо преобладала у пациентов с люминальным типом А и трижды негативным типом РМЖ ( $p=0,01$ ).

### 3.2 Связь иммуногистохимических маркеров РМЖ с уровнем экспрессии H-Ras онкобелков

Для оценки связи иммуногистохимических маркеров РМЖ с уровнем экспрессии H-Ras онкобелков был проведен корреляционный анализ между уровнем H-Ras до лечения и основными тканевыми опухолевыми иммуногистохимическими маркерами без привязки к биологическому типу: рецепторами эстрогена ER, прогестерона PR, рецепторами Her2neu, индексом пролиферативной активности Ki 67 (таблица 7).



Таблица 7 – Корреляция Н-Ras онкобелков с иммуногистохимическими маркерами РМЖ

Иммуногистохимические маркеры РМЖ	Коэффициент корреляции Спирмена
Рецепторы эстрогена	-0,13 (p=0,15)
Рецепторы прогестерона	-0,15 (p=0,12)
Рецепторы Her2neu	0,89 (p=0,01)*
Индекс пролиферации Ki-67	0,70 (p=0,02)*
Трижды негативный РМЖ	0,27 (p=0,08)
* - достоверность (p<0,05), сведения достоверны	

Изучение влияния эстрогеновых рецепторов на экспрессию Н-Ras показало, наличие слабой обратной статистически не значимой корреляционной связи между этими показателями ( $r_s=-0,13$ ,  $p=0,15$ ), (рисунок 12).

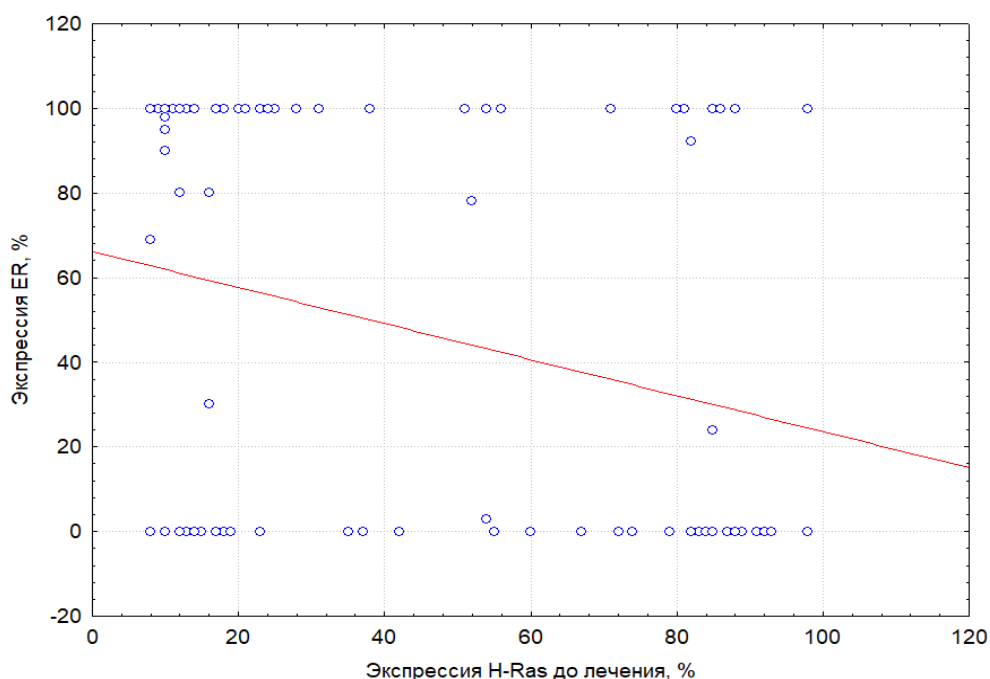


Рисунок 12 – Корреляция Н-Ras и эстрогеновых рецепторов ER

Изучение влияния прогестероновых рецепторов на экспрессию Н-Ras онкобелков также показало, наличие слабой обратной статистически не значимой корреляционной связи между данными показателями ( $r_s=-0,15$ ,  $p=0,12$ ), (рисунок 13).

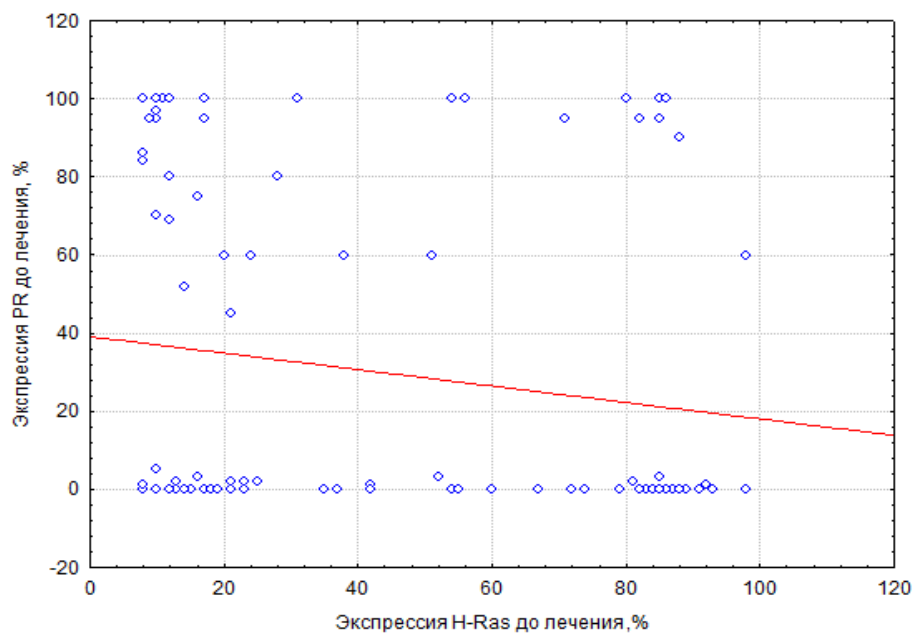


Рисунок 13 – Корреляция H-Ras и прогестероновых рецепторов PR

Таким образом, экспрессия H-Ras не зависела от наличия в опухоли молочной железы рецепторов эстрогена и прогестерона.

Исследование взаимосвязи экспрессии H-Ras и Her2neu до лечения выявило наличие сильной статистически значимой связи ( $R_s=0,89$ ),  $p=0,001$  (рисунок 14).

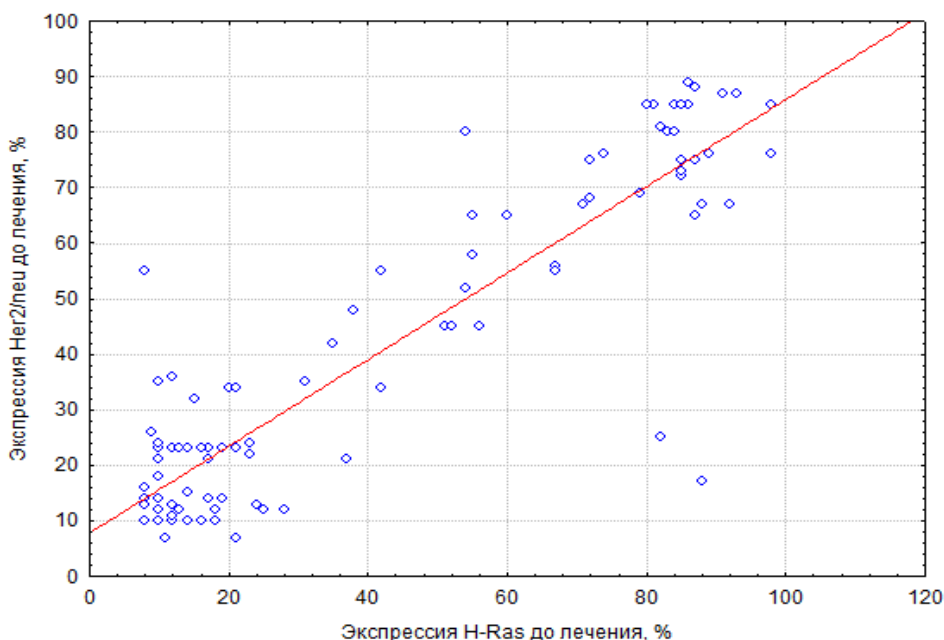


Рисунок 14 – Связь онкобелков H-Ras и Her2neu до лечения

Исследование экспрессии Ki-67 до лечения H-Ras и высоким индексом пролиферации Ki-67 (более 20%), продемонстрировало сильную статистически значимую связь ( $R_s=0,70$ ),  $p=0,001$  (рисунок 15).

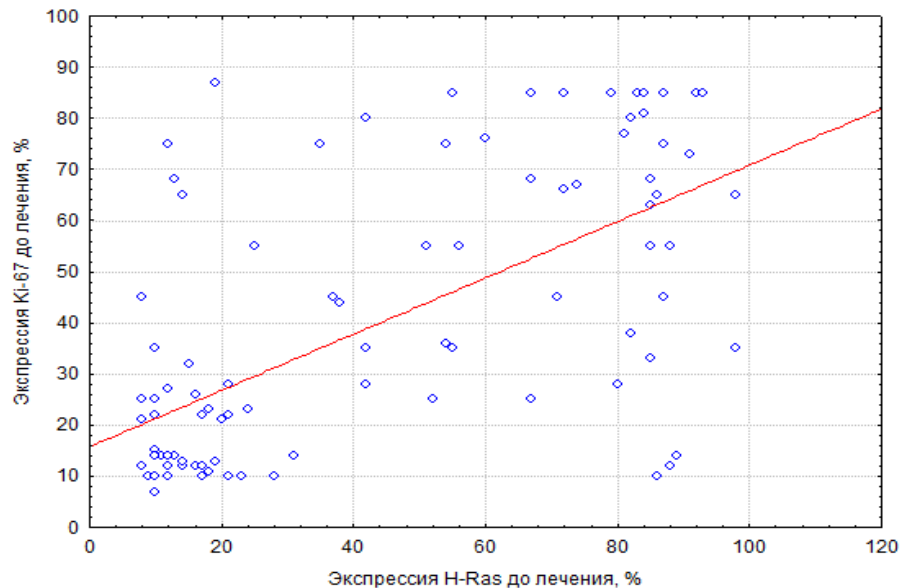


Рисунок 15 – Корреляция онкобелков H-Ras и индекса пролиферации Ki-67

Таким образом, экспрессия H-Ras зависела от наличия в опухоли Her2neu и высокого уровня Ki-67.

Было выявлено отсутствие статистически значимой связи между трижды негативным РМЖ (отрицательная экспрессия ER, PR, Her2neu) и положительной экспрессией H-Ras ( $r_s=0,27$ ,  $p=0,08$ ),  $p>0,05$  (рисунок 16).

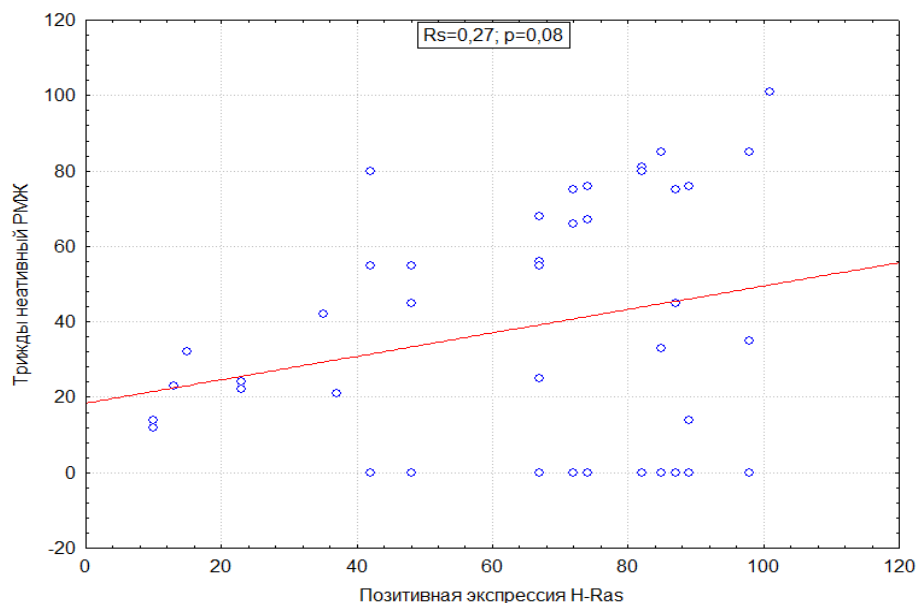


Рисунок 16 – Корреляция H-Ras с отсутствием экспрессии ER, PR, Her2neu, (трижды негативный рак)

Проведенный корреляционный анализ показал, что высокий уровень экспрессии онкобелков H-Ras наиболее часто встречался в опухоли молочной железы с положительными рецепторами Her2neu и высоким индексом пролиферативной активности Ki-67.

### 3.3 Непосредственные результаты неоадьювантной терапии рака молочной железы

Изучение непосредственной эффективности неоадьювантной лекарственной терапии в группе сравнения с отрицательной экспрессией H-Ras показало, что частота общего эффекта составила 81,8%, стабилизация процесса – 14,5%, прогрессирование заболевания – 3,6%.

В подгруппе пациентов, получивших неоадьювантную химиотерапию по схеме AC общий эффект зарегистрирован у 69,6%, стабилизация процесса – 26,1%, прогрессирование заболевания – 4,3%.

В подгруппе пациентов, получивших неоадьювантную химиотерапию по схеме AC+Арглабин общий эффект зарегистрирован у 94,4%, стабилизация процесса – 5,6%, прогрессирование заболевания – не зарегистрировано.

В подгруппе пациентов, получивших неоадьювантную терапию арглабином общий эффект зарегистрирован у 85,6%, стабилизация процесса – 7,2%, прогрессирование заболевания – 7,2% (таблица 8).

Таблица 8 – Показатели непосредственной эффективности неоадьювантной лекарственной терапии у пациентов РМЖ с отрицательной экспрессией H-Ras (группа сравнения)

Режим лекарственной терапии	Эффективность лечения		
	общий эффект	стабилизация процесса	прогрессирование заболевания
AC (n=23)	16 (69,6 %)	6 (26,1 %)	1 (4,3 %)
AC+Арглабин (n=18)	17 (94,4 %)	1 (5,6 %)	-
Арглабин (n=14)	12 (85,6%)	1 (7,2 %)	1 (7,2 %)
Итого (n=55)	45 (81,8%)	8 (14,5 %)	2 (3,6%)

Сравнение показателей непосредственной эффективности в группе сравнения с отрицательной экспрессией H-Ras не выявило достоверных различий эффективности между режимами лекарственной терапии: Kruskal-Wallis=3,30; p=0,19 (рисунок 17).

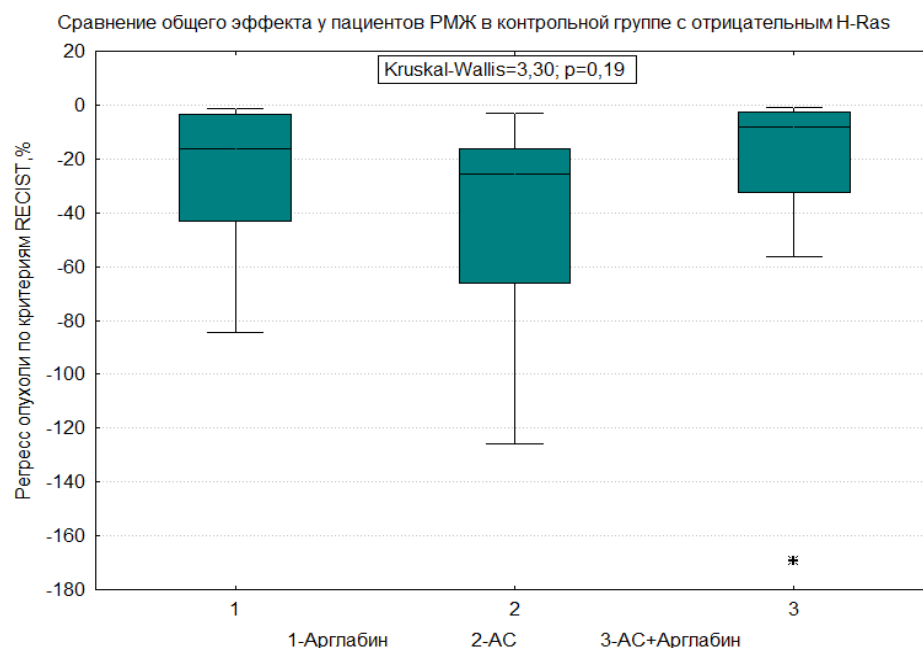


Рисунок 17 – Показатели непосредственной эффективности у пациентов РМЖ с отрицательной экспрессией H-Ras онкобелков в зависимости от режима неoadьювантной терапии

Таким образом, в группе сравнения, режим проводимой неoadьювантной лекарственной терапии не влиял на показатели непосредственной эффективности у пациентов с отрицательной экспрессией H-Ras.

Изучение непосредственной эффективности неoadьювантной лекарственной терапии в исследуемой группе пациентов с положительной экспрессией H-Ras показало, что частота общего эффекта составила 57,7%, стабилизация процесса – 26,6%, прогрессирование заболевания – 15,7% (таблица 9).

Таблица 9 – Показатели непосредственной эффективности неoadьювантной терапии у пациентов РМЖ с положительной экспрессией H-Ras (исследуемая группа)

Схема лекарственной терапии	Эффективность лечения		
	общий эффект	стабилизация	прогрессирование
АС (n=16)	13 (81,2 %)	2 (12,5 %)	1 (6,3 %)
АС+Арглабин (n=12)	8 (66,6 %)	3 (25 %)	1 (8,4 %)
Арглабин (n=17)	5 (29,4 %)	7 (41,2 %)	5 (29,4 %)
Итого (n=45)	26 (57,7 %)	12 (26,6 %)	7 (15,7 %)

В подгруппе пациентов, получивших неоадьювантную химиотерапию по схеме АС общий эффект зарегистрирован у 81,2%, стабилизация процесса – 12,5%, прогрессирование заболевания – 6,3%.

В подгруппе пациентов, получивших неоадьювантную химиотерапию по схеме АС+Арглабин общий эффект зарегистрирован у 66,6%, стабилизация процесса – 25,0%, прогрессирование заболевания – 8,4%.

В подгруппе пациентов, получивших неоадьювантную терапию препаратом арглабин общий эффект зарегистрирован у 29,4%, стабилизация процесса – 41,2%, прогрессирование заболевания – 29,4%.

Изучение эффективности разных режимов неоадьювантной лекарственной терапии в исследуемой группе с положительной экспрессией Н-Ras так же не выявило влияние проводимого режима лекарственной терапии на показатели общего эффекта, статистически достоверных различий не получено Kruskal-Wallis=1,35; p=0,50 (рисунок 18).

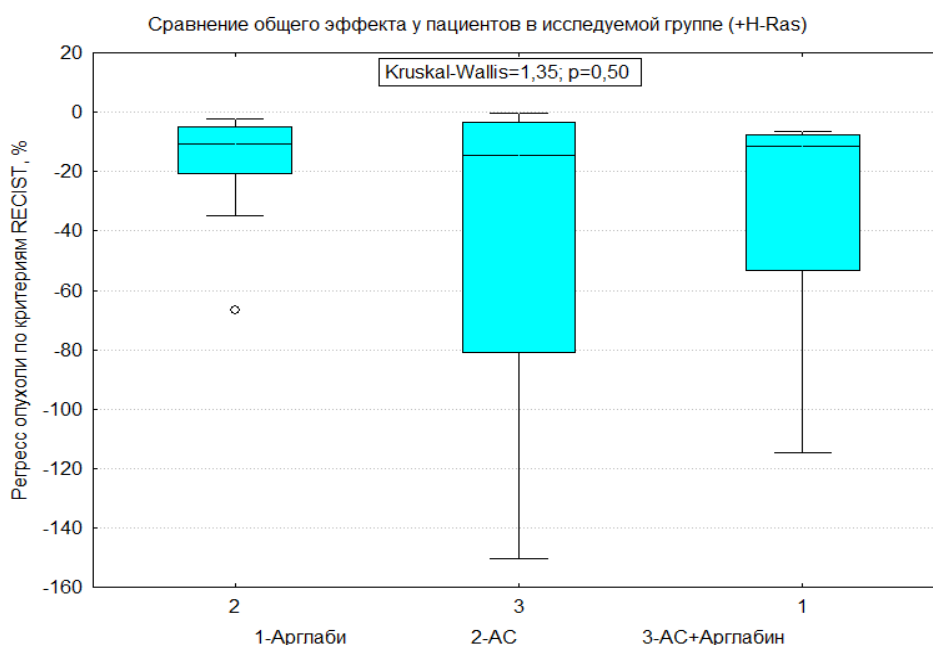


Рисунок 18 – Показатели непосредственной эффективности у пациентов РМЖ с положительной экспрессией Н-Ras онкобелков в зависимости от режима неоадьювантной терапии

Сравнительный анализ показателей непосредственной эффективности между группой сравнения и исследуемой группой показал, что частота общего эффекта была достоверно выше в группе сравнения с отрицательной экспрессией Н-Ras: Mann-Whitney U Test =4,71 при p=0,03 (рисунок 19), а прогрессирование заболевание достоверно чаще регистрировалось в исследуемой группе Mann-Whitney U Test =4,2 при p=0,04 и точный критерий Фишера (таблица 10).

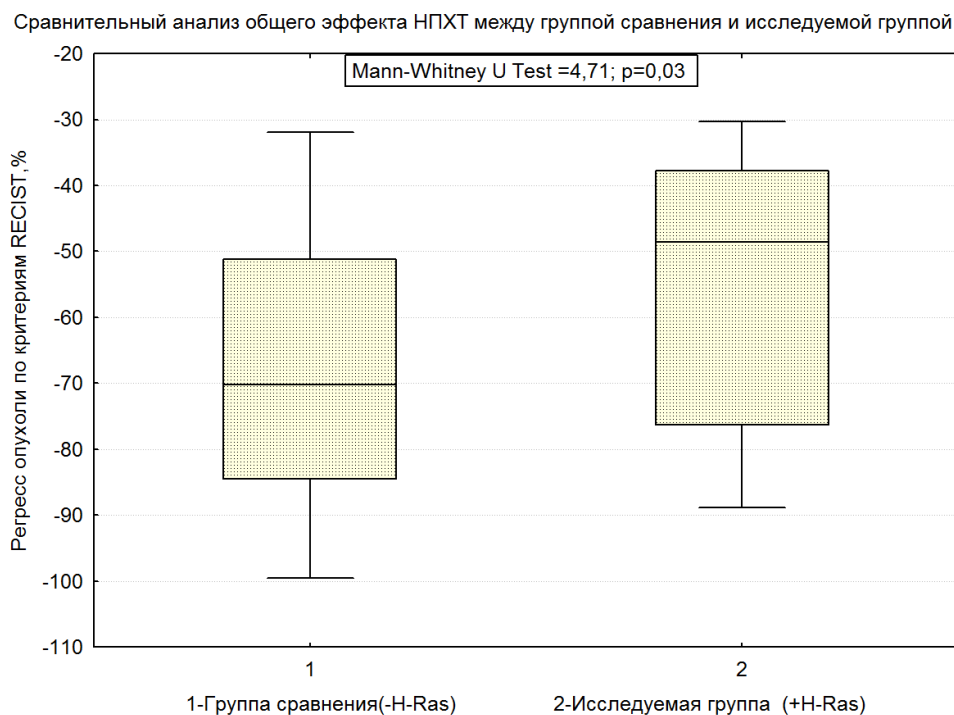


Рисунок 19 – Показатели непосредственной эффективности неoadьювантной терапии в исследуемой и сравниваемой группах

Таблица 10 – Показатели непосредственной эффективности неoadьювантной лекарственной терапии у пациентов РМЖ

Группа лечения	Эффективность лечения		
	общий эффект (M ± SD)	стабилизация процесса (M ± SD)	прогрессирование заболевания (M ± SD)
Отрицательная экспрессия H-Ras (n=55)	45 (12,4±5,7)	8 (11,6±3,2)	2 (12,5±2,4)
Положительная экспрессия H-Ras (n=45)	26 (78,1±4,2)*	12 (66,4±2,6)	7 (82,7±3,7)

\* – достоверность по сравнению с группой сравнения (точный критерий Фишера = 0.028, p<0,05), сведения достоверны

Был проведен сравнительный анализ показателей непосредственной эффективности между группой сравнения и исследуемой группой в зависимости от схемы проводимой лекарственной терапии.

Сравнительный анализ в подгруппе пациентов, получивших неoadьювантную полихимиотерапию по схеме AC, показал, что в группе сравнения общий эффект зарегистрирован у 69,6%, стабилизация процесса – 26,1%, прогрессирование заболевания – 4,3%, в исследуемой группе соответственно – 81,2; 12,5 и 6,3%.

Достоверных различий между группой сравнения с отрицательной экспрессией H-Ras и исследуемой группой с положительной экспрессией H-Ras

в результате проведенной неоадьювантной полихимиотерапии по схеме АС не выявлено (таблица 11).

Таблица 11 – Показатели непосредственной эффективности неоадьювантной лекарственной терапии по схеме АС

Группа лечения	Эффективность проводимого лечения		
	общий эффект (M ± SD)	стабилизация процесса (M ± SD)	прогрессирование заболевания (M ± SD)
Отрицательная экспрессия Н-Ras(n=23)	69,6 % (13,2±4,1)	26,1% (12,3±2,1)	4,3% (14,0±1,1)
Положительная экспрессия Н-Ras (n=16)	81,2% (81,2±3,2)	12,5% (83,4±4,6)	6,3% (16,0±1,1)
* - достоверность по сравнению с группой сравнения (точный критерий Фишера = 0,88, p≥0,05), сведения не достоверны			

В группе сравнения пациентов, получивших неоадьювантную полихимиотерапию по схеме АС+Арглабин, общий эффект зарегистрирован у 94,4%, стабилизация процесса – 5,6%, прогрессирование заболевания – не зарегистрировано. В исследуемой группе соответственно общий эффект составил 66,6%, стабилизация процесса – 25,0%, прогрессирование заболевания – 8,4%.

Различий в частоте общего эффекта между группой сравнения с отрицательной экспрессией Н-Ras и исследуемой группой с положительной экспрессией Н-Ras в результате неоадьювантной терапии по схеме АС+Арглабин не обнаружено: Mann-Whitney U Test =0,69 при p=0,48 (таблица 12, рисунок 20).

Таблица 12 – Показатели непосредственной эффективности неоадьювантной лекарственной терапии по схеме АС+Арглабин

Группа лечения	Эффективность		
	общий эффект (M ± SD)	стабилизация процесса (M ± SD)	прогрессирование заболевания (M ± SD)
Отрицательная экспрессия Н-Ras (n=18)	94,4 % (14,1±2,4)	5,6 % (16,0±0,1)	-
Положительная экспрессия Н-Ras (n=12)	66,6 % (66,7±3,2)	25,0 % (75,4±2,7)	8,4% (82,0±0,1)
* – достоверность по сравнению с группой сравнения (точный критерий Фишера = 0.61, p≥0,05), сведения не достоверны			



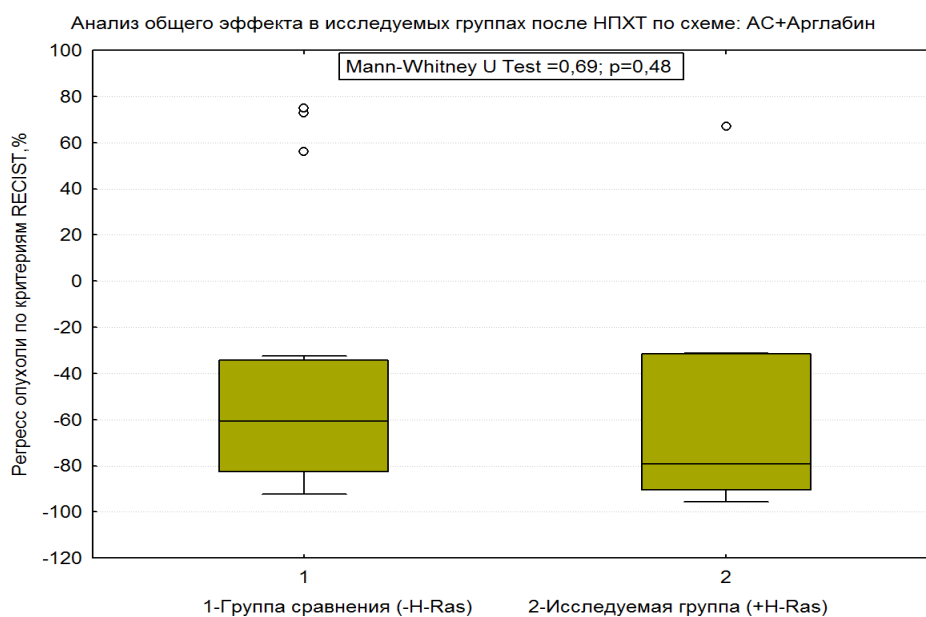


Рисунок 20 – Показатели непосредственной эффективности у пациентов РМЖ, получивших неоадьювантную терапию по схеме АС+Арглабин

В группе сравнения пациентов, получивших неоадьювантную терапию препаратом Арглабин общий эффект зарегистрирован у 85,6%, стабилизация процесса – 7,2%, прогрессирование заболевания – 7,2%

В исследуемой группе пациентов, получивших неоадьювантную терапию арглабином, общий эффект зарегистрирован у 29,4%, стабилизация процесса – 41,2%, прогрессирование заболевания – 29,4%.

Сравнительный анализ показал, что непосредственные результаты неоадьювантной лекарственной терапии препаратом арглабином оказались лучше в группе сравнения с отрицательной экспрессией H-Ras (таблица 13, рисунок 21).

Таблица 13 – Показатели непосредственной эффективности неоадьювантной лекарственной терапии Арглабином

Группа лечения	Эффективность лечения		
	общий эффект	стабилизация	прогрессирование процесса
Отрицательная экспрессия H-Ras (n=14)	12 (16,2±2,6)	1 (17,0±0,1)	1 (15,0±0,1)
Положительная экспрессия H-Ras (n=17)	5 (89,3±4,1)*	7 (72,1±2,1)*	5 (79,4±2,6)*
* - достоверность различия по сравнению с группой сравнения (точный критерий Фишера = 0.022, p<0,05), сведения достоверны			

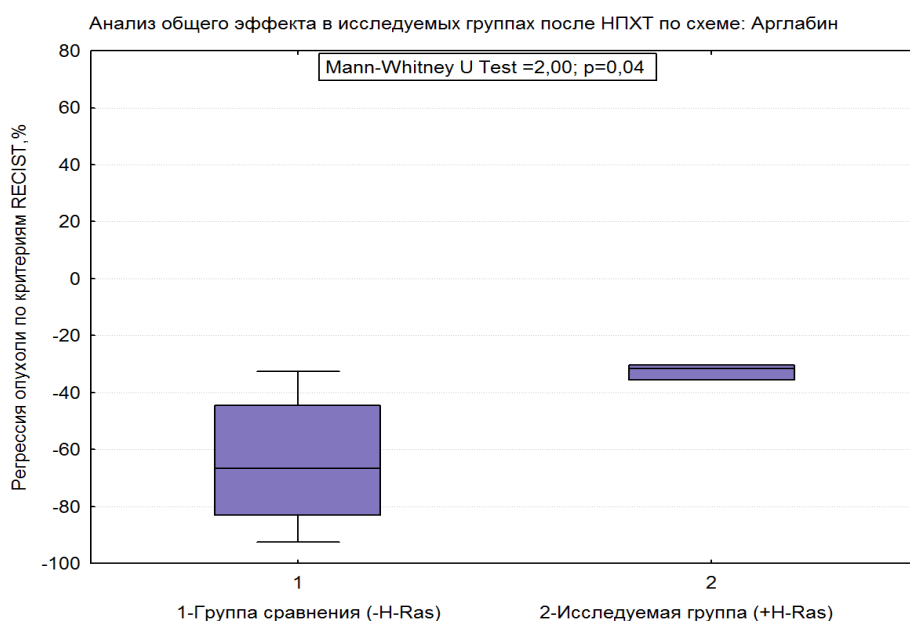


Рисунок 21 – Показатели непосредственной эффективности у пациентов РМЖ, получивших неоадьювантную терапию Арглабином

Таким образом, сравнительный анализ непосредственных результатов неоадьювантной терапии по схеме Арглабин показал, что частота общего эффекта оказалась более эффективной у пациентов в группе сравнения без экспрессии H-Ras: Mann-Whitney U Test =2,00 при  $p=0,04$  (рисунок 22).

После проведенной неоадьювантной лекарственной терапии изучен патоморфоз опухоли (таблица 14).

Таблица 14 – Частота лекарственного патоморфоза у пациентов РМЖ после проведенной неоадьювантной терапии в зависимости от экспрессии H-Ras онкобелков

Группа лечения	Выраженность лекарственного патоморфоза опухоли	
	I-II степень	III-IV степень
Отрицательная экспрессия H-Ras (n=55)	3 (11,8±7,2)	52 (13,2±6,5)
Положительная экспрессия H-Ras (n=45)	6 (64,8±6,8)	39 (71,1±6,8)*

\* - достоверность различий по сравнению с группой сравнения (точный критерий Фишера = 0.001,  $p<0,05$ ), сведения достоверны

В группе сравнения с отрицательной экспрессией H-Ras у отмечался 94,5% выраженный патоморфоз III-IV степени и у 5,5% – патоморфоз I-II степени.

Анализ лекарственного патоморфоза показал, что в исследуемой группе у 86,7 % пациентов отмечался выраженный патоморфоз III-IV степени и у 13,3 % - слабо выраженный патоморфоз I-II степени.

Сравнительный анализ особенностей лекарственного патоморфоза показал, что в исследуемой группе выраженный патоморфоз III-IV степени развивался достоверно чаще, тогда как в контрольной группе соответственно чаще развивался слабый патоморфоз I-II степени (Mann-Whitney U Test=13,15; p=0,0003) (рисунок 22).

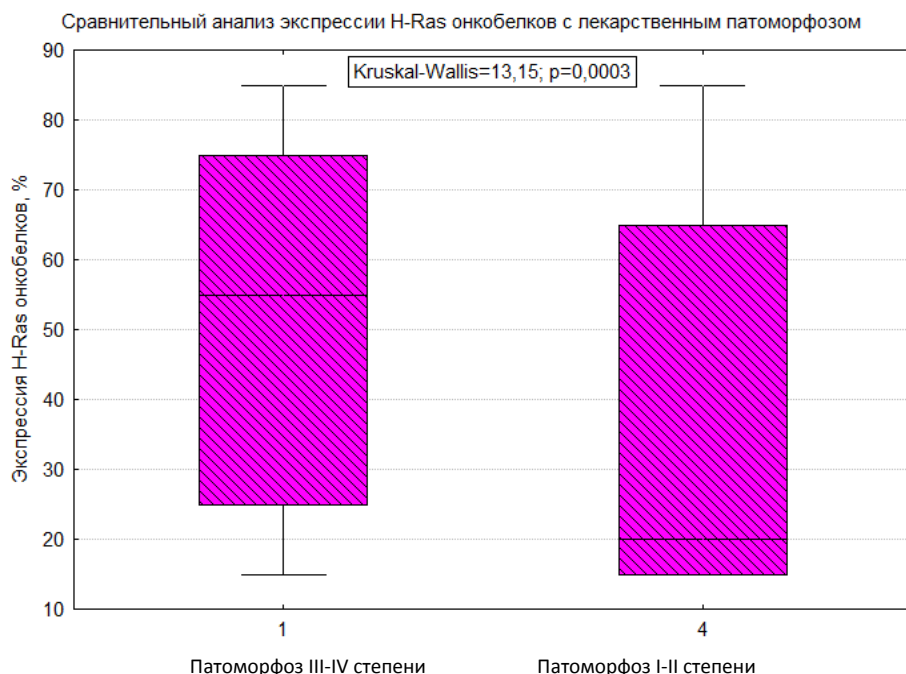


Рисунок 22 – Частота лекарственного патоморфоза у пациентов РМЖ в зависимости от уровня экспрессии H-Ras онкобелков

После проведенной неоадьювантной лекарственной терапии был повторно исследован уровень экспрессии онкобелков H-Ras (таблица 15).

Таблица 15 – Экспрессия H-Ras после неоадьювантной лекарственной терапии

Режим лекарственной терапии	Положительный уровень экспрессии H-Ras		Mann-Whitney U Test
	до неоадьювантной лекарственной терапии	после неоадьювантной лекарственной терапии	
АС (n=16)	16 (66,0±3,6)	12 (62,0±3,2)	P=0,12
АС+Арглабин (n=12)	12 (72,0±3,1)	11 (69,0±3,3)	P=0,15
Арглабин (n=17)	17 (77,0±3,8)	12 (72,0±2,8)	P=0,11
Итого (n=45)	45 (58,1±5,2%)	35 (55,0±4,8)	P=0,09

Сравнительный анализ показал, что ни один из режимов проведенной неоадьювантной лекарственной терапии не продемонстрировал достоверно значимое снижение экспрессии H-Ras после лечения.

### 3.4 Влияние экспрессии H-Ras на показатели безрецидивной выживаемости пациентов РМЖ

Изучение безрецидивной выживаемости показало, что в группе сравнения с отрицательной экспрессией H-Ras медиана безрецидивной выживаемости составила  $33,0 \pm 1,1$  месяцев (рисунок 23).

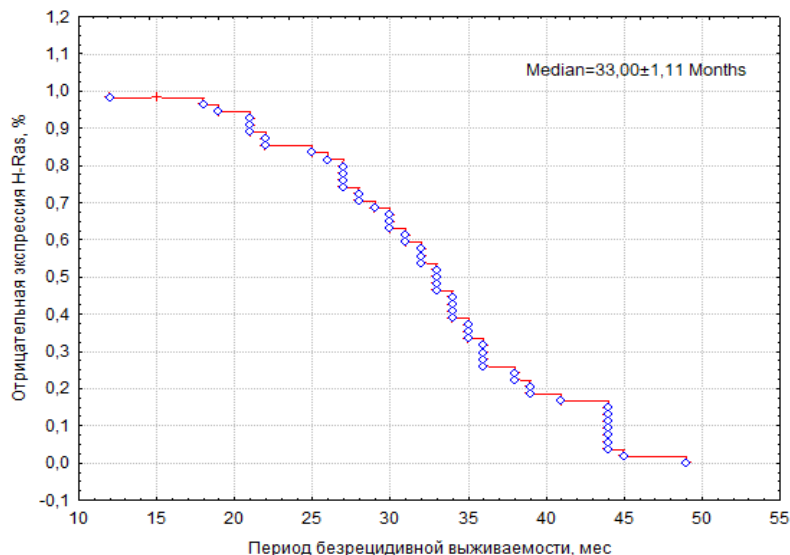


Рисунок 23 – Безрецидивная выживаемость пациентов РМЖ с отрицательной экспрессией H-Ras

Изучение безрецидивной выживаемости в группе пациентов с отрицательной экспрессией H-Ras, получивших неоадьювантную терапию по схеме AC, показало, что этот показатель составил  $33,0 \pm 1,12$  месяцев (рисунок 24).

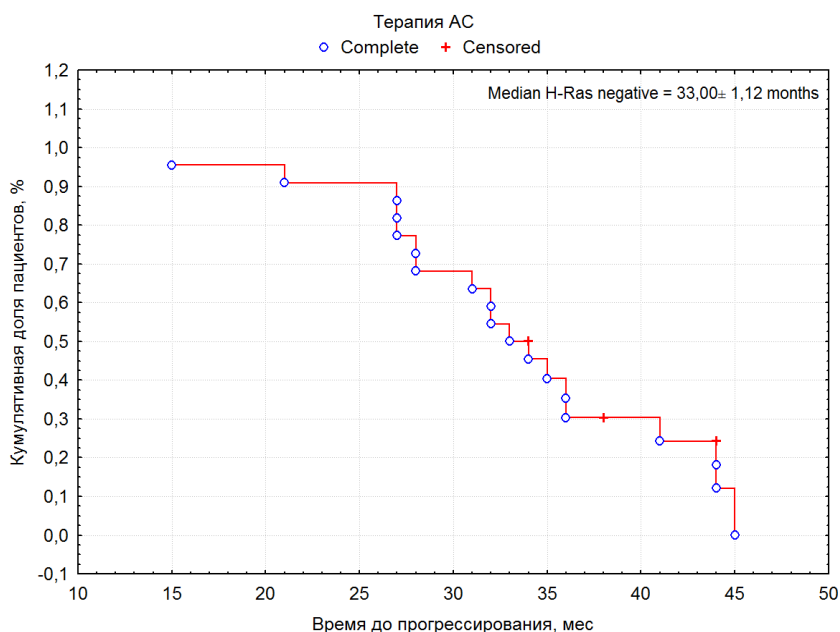


Рисунок 24 – Безрецидивная выживаемость пациентов РМЖ с отрицательной экспрессией H-Ras, получивших неоадьювантную химиотерапию по схеме AC

В группе пациентов с отрицательной экспрессией H-Ras, получивших неоадьювантную химиотерапию по схеме АС+Арглабин этот показатель составил  $34,00 \pm 1,11$  месяцев (рисунок 25).

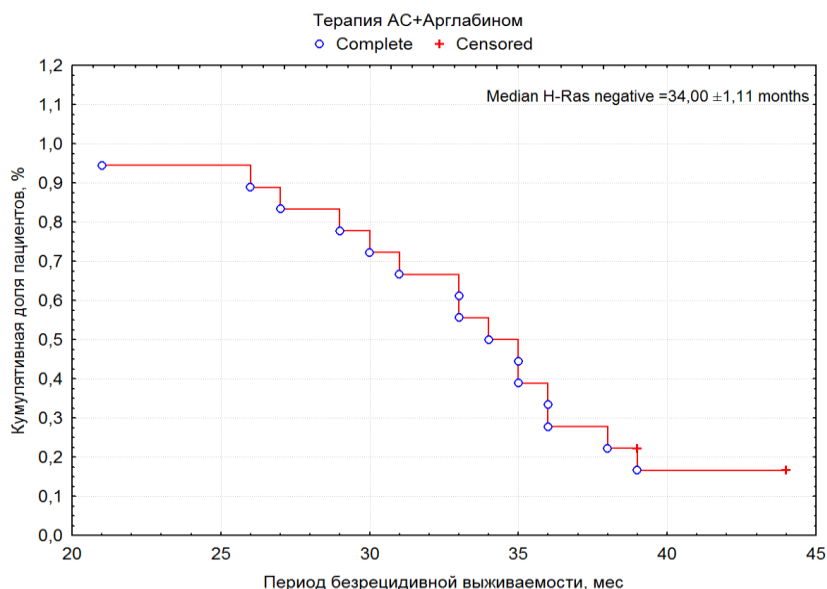


Рисунок 25 – Безрецидивная выживаемость пациентов РМЖ с отрицательной экспрессией H-Ras, получивших неоадьювантную химиотерапию по схеме АС+Арглабин

В группе пациентов с отрицательной экспрессией H-Ras онкобелков, получивших неоадьювантную терапию препаратом Арглабином медиана безрецидивной выживаемости составила  $25,4 \pm 1,0$  месяцев (рисунок 26).

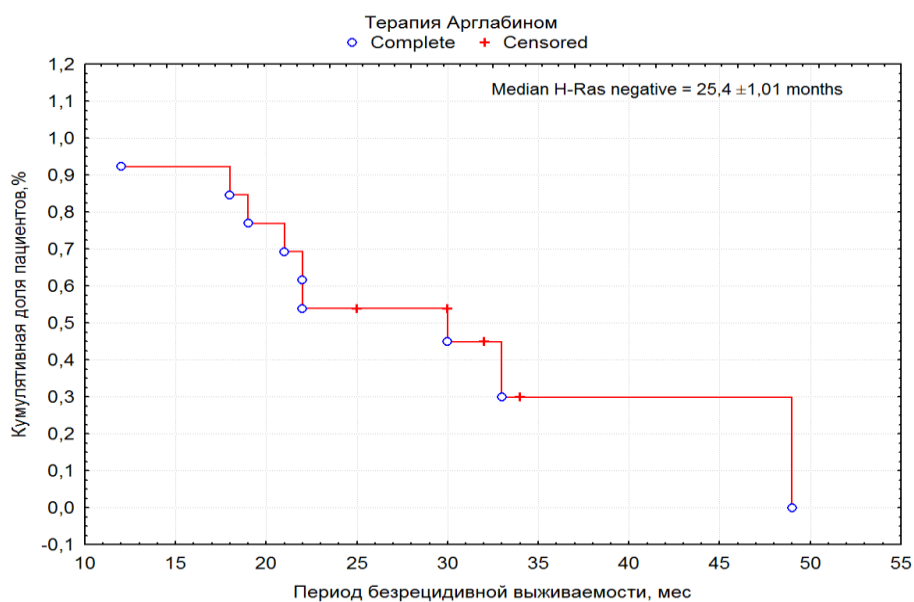


Рисунок 26 – Безрецидивная выживаемость пациентов РМЖ с отрицательной экспрессией H-Ras, получивших неоадьювантную терапию препаратом Арглабин

Подгруппой сравнительный анализ у пациентов с отрицательной экспрессией H-Ras онкобелков продемонстрировал статистически значимое увеличение безрецидивной выживаемости в подгруппах, получивших неоадьювантную химиотерапию по схеме АС и АС+Арглабин, по сравнению с монотерапией Арглабином: Kruskal-Wallis=12,56 при  $p=0,001$  (таблица 16, рисунок 27).

Таблица 16 – Показатели безрецидивной выживаемости, пациентов РМЖ с отрицательной экспрессией H-Ras, получивших неоадьювантную терапию

Подгруппа неоадьювантной лекарственной терапии	Безрецидивная выживаемость
АС (n=23)	33,0±5,19*
АС+Арглабин (n=18)	34,0±5,4*
Арглабин (n=14)	25,4±3,67
* - достоверность $p<0,05$ по сравнению с терапией Арглабином	

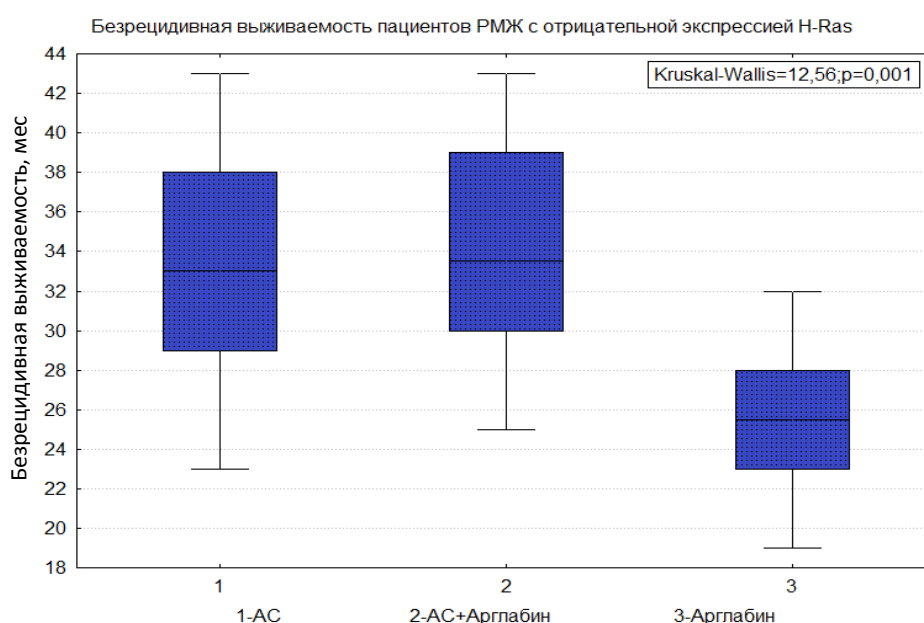


Рисунок 27 – Безрецидивная выживаемость пациентов с отрицательной экспрессией H-Ras в зависимости от режима проводимой лекарственной терапии

Добавление Арглабина к стандартной схеме АС у пациентов с отрицательной экспрессией H-Ras не улучшало показатели безрецидивной выживаемости.

Неоадьювантная терапия Арглабином у пациентов с отрицательной экспрессией H-Ras по показателю безрецидивной выживаемости оказалась менее эффективной по сравнению со стандартным режимом АС.

Безрецидивная выживаемость в исследуемой группе пациентов РМЖ с положительной экспрессией H-Ras, получивших неоадьювантную лекарственную терапию, составила  $16,0 \pm 1,0$  месяцев (рисунок 28).

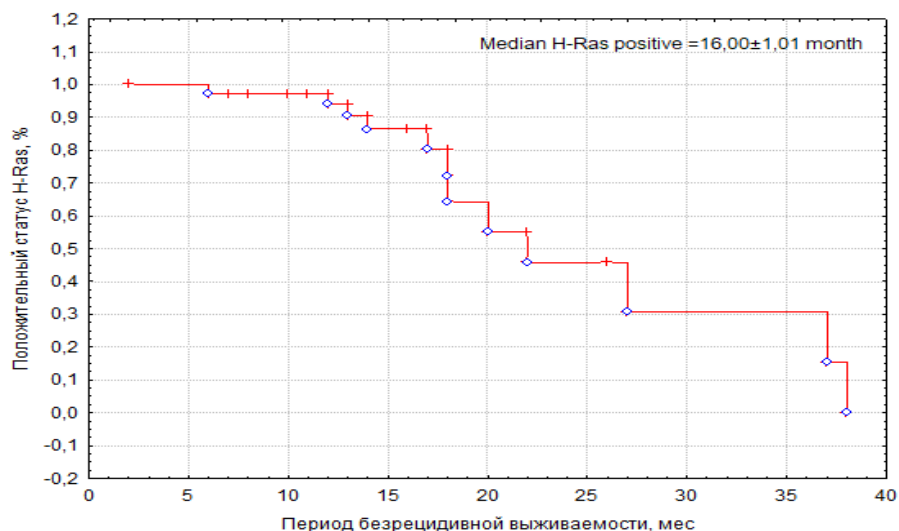


Рисунок 28 – Безрецидивная выживаемость пациентов РМЖ с положительной экспрессией H-Ras в зависимости от режима проводимой лекарственной терапии

Как видно на рисунке 28 безрецидивная выживаемость, составила  $16,0 \pm 1,0$  месяцев.

Изучение безрецидивной выживаемости в группе пациентов с положительной экспрессией H-Ras, получивших неоадьювантную терапию по схеме AC, показало, что медиана составила  $13,5 \pm 1,1$  месяцев (рисунок 29).

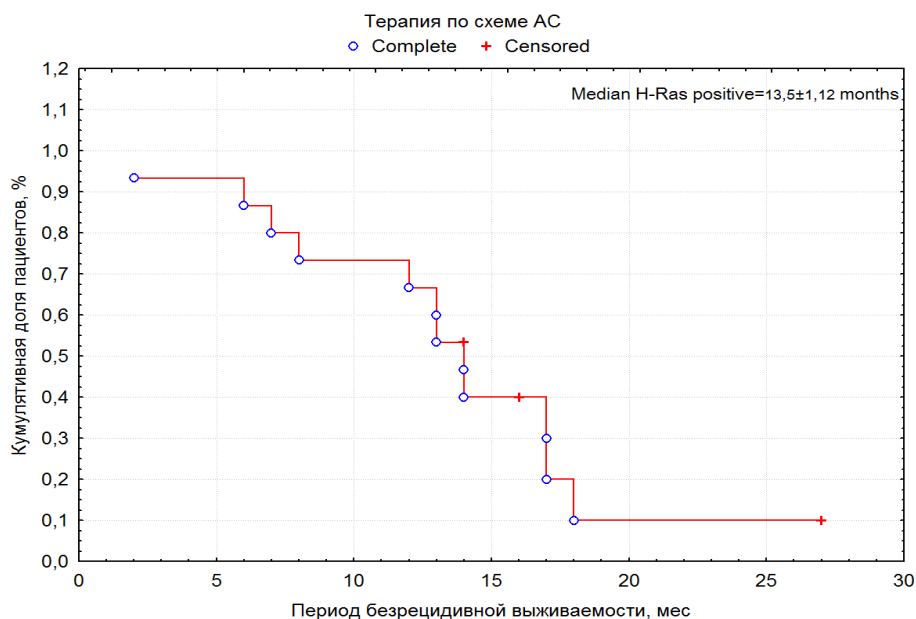


Рисунок 29 – Безрецидивная выживаемость пациентов РМЖ с положительной экспрессией H-Ras (после терапии AC)

В группе пациентов с положительной экспрессией H-Ras, получивших неoadьювантную химиотерапию по схеме AC+Арглабин этот показатель составил  $16,35 \pm 1,2$  месяцев (рисунок 30).

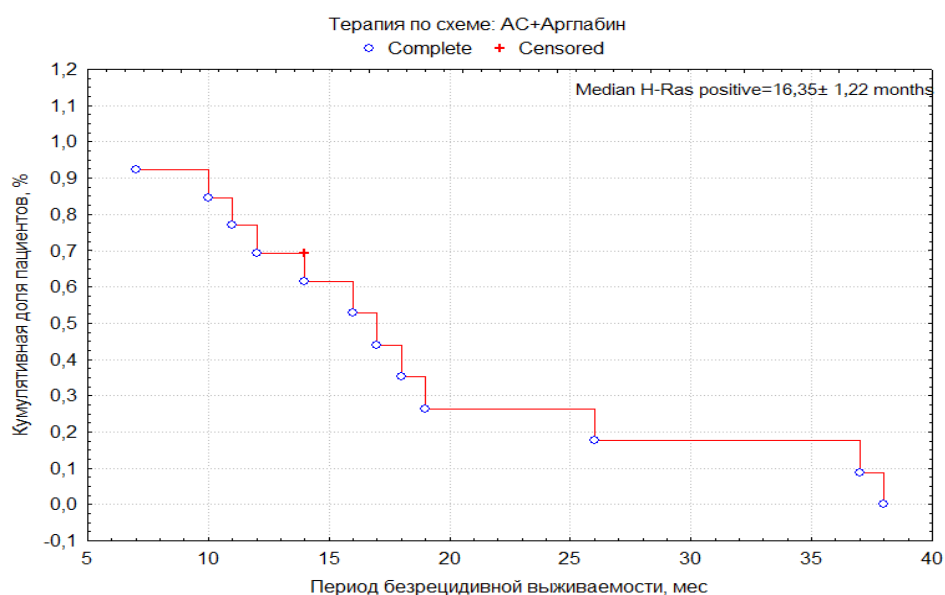


Рисунок 30 – Безрецидивная выживаемость пациентов РМЖ с положительной экспрессией H-Ras (после терапии AC+Арглабин)

В группе пациентов с положительной экспрессией H-Ras, получивших неoadьювантную терапию Арглабином безрецидивная выживаемость соответственно составила  $16,5 \pm 1,1$  месяцев (рисунок 31).

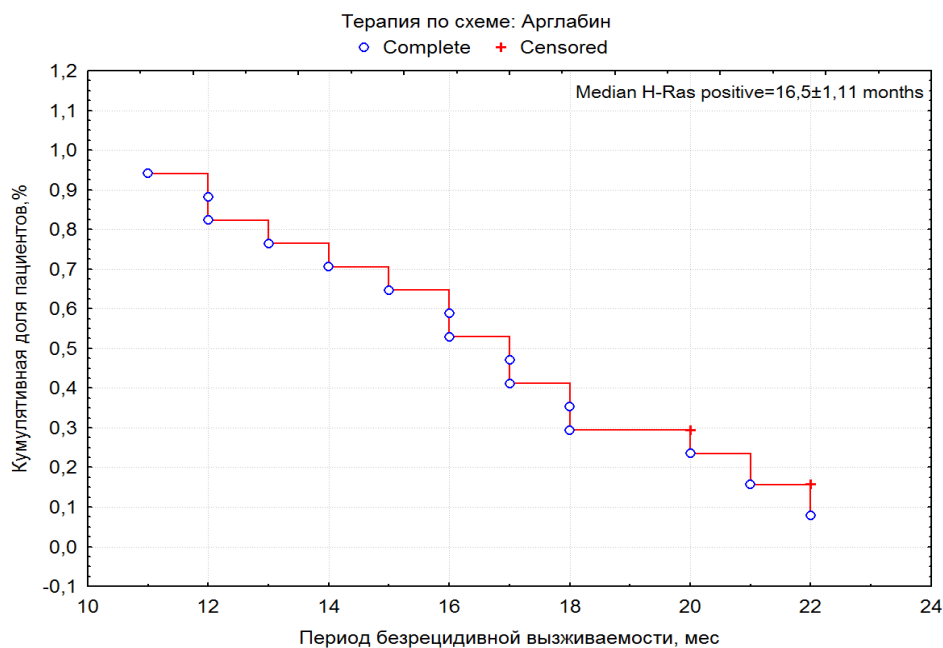


Рисунок 31 – Безрецидивная выживаемость пациентов РМЖ с положительной экспрессией H-Ras (после терапии Арглабином)



Подгруппой сравнительный анализ у пациентов с положительной экспрессией H-Ras, показал, что в подгруппах пациентов получавших Арглабин и АС+Арглабин отмечается статистически значимое увеличение безрецидивной выживаемости по сравнению с подгруппой АС: Kruskal-Wallis=10,96 при  $p=0,004$  (таблица 17, рисунок 32).

Таблица 17 – Показатели безрецидивной выживаемости, пациентов РМЖ с положительной экспрессией H-Ras, получивших неоадьювантную терапию

Подгруппа неоадьювантной лекарственной терапии	Безрецидивная выживаемость
АС (n=16)	13,5±2,75*
АС+Арглабин (n=12)	16,4±2,10*
Арглабин (n=17)	16,5±2,03
* - достоверность $p<0,05$ по сравнению с АС	

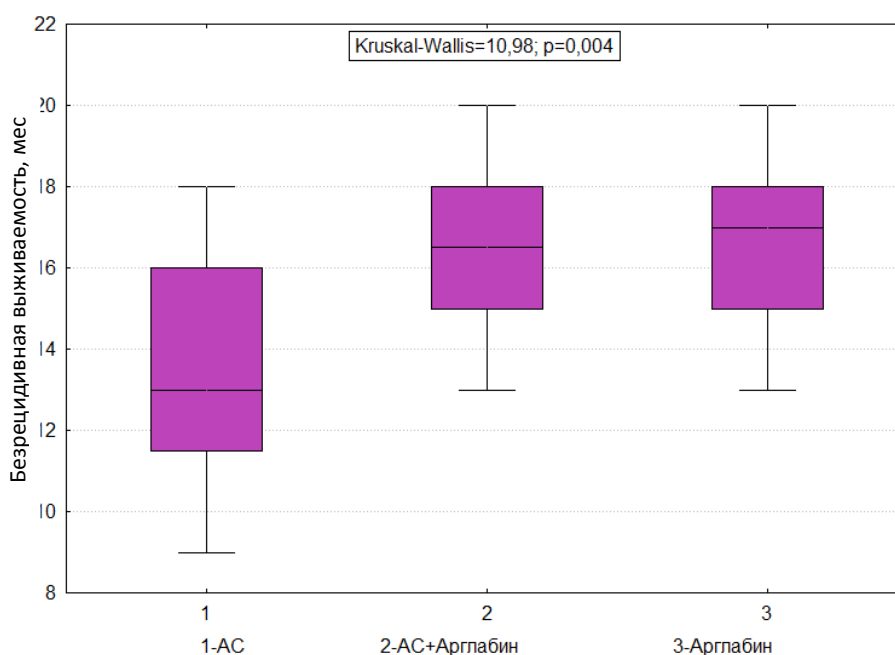


Рисунок 32 – Сравнительный анализ безрецидивной выживаемости у пациентов исследуемой группы с положительной экспрессией H-Ras

Сравнительный анализ показал, что у пациентов РМЖ с отрицательным статусом H-Ras, показатели безрецидивной выживаемости были статистически выше  $p=0,001$  согласно Log-Rank Test (рисунок 33).

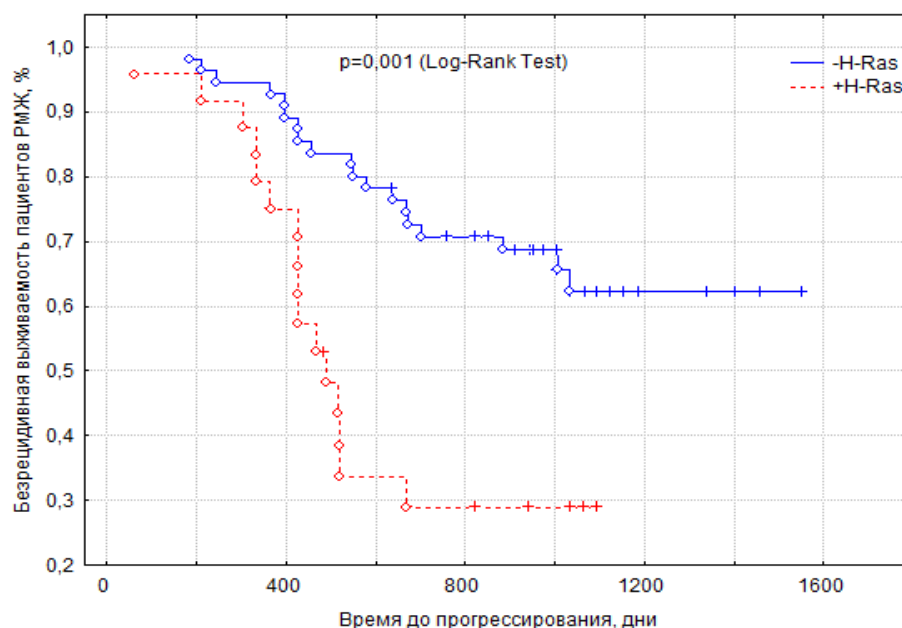


Рисунок 33 – Безрецидивная выживаемость пациентов РМЖ, получивших неоадьювантную лекарственную терапию

Сравнительный подгруппой анализ пациентов РМЖ, получивших неоадьювантную терапию представлен в таблице 18 и рисунке 34.

Таблица 18 – Показатели безрецидивной выживаемости пациентов РМЖ, получивших неоадьювантную терапию, в зависимости от схемы лечения

Группа сравнения		Исследуемая группа	
схема лечения	Безрецидивная выживаемость	схема лечения	безрецидивная выживаемость
АС (n=23)	33,0±5,19*	АС (n=16)	13,5±2,75*
АС+Арглабин (n=18)	34,0±5,4*	АС+Арглабин (n=12)	16,4±2,10*
Арглабин (n=14)	25,4±3,67	Арглабин (n=17)	16,5±2,03
Всего (n=55)	33,0±10,29*	Всего (n=45)	16,0±1,0*
* - достоверность $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой			

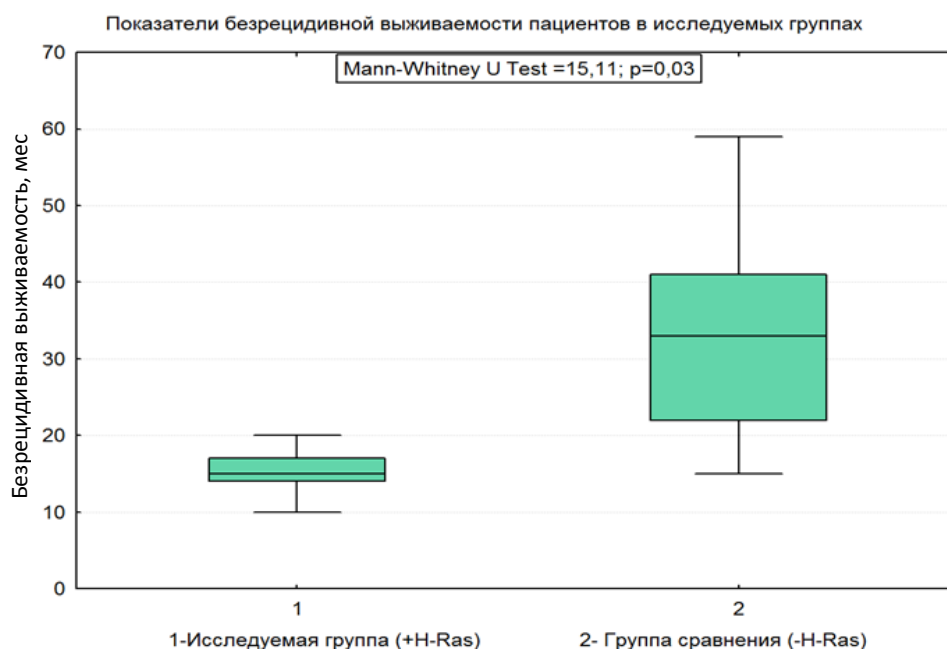


Рисунок 34 – Безрецидивная выживаемость пациентов в исследуемой и сравниваемой группах

Сравнительный анализ показателей безрецидивной выживаемости показал, что в контрольной группе показатели были статистически достоверно выше, чем в исследуемой группе: Mann-Whitney U Test =15,11; p=0,03.

Подгрупповой сравнительный анализ так же показал, что у пациентов с отрицательной экспрессией H-Ras во всех подгруппах в не зависимости от проводимой схемы неoadьювантной терапии показатели безрецидивной выживаемости были выше, чем в группе с положительной экспрессией H-Ras.

Таким образом, проведенное исследование показало, что уровень экспрессии H-Ras зависел от наличия в опухолевого тканевого маркера HER-2new, высокого индекса пролиферации Ki-67.

А так же было установлено, что положительная экспрессия H-Ras негативно влияет не только на непосредственную эффективность неoadьювантной терапии, но и ухудшает показатели безрецидивной выживаемости.

### 3.5 Анализ прогнозирования безрецидивной выживаемости на основании построения обобщенной линейной модели GLM

При изучении зависимости безрецидивной выживаемости от множества клиничко-морфологических факторов использовался метод построения обобщенной линейной модели GLM, который не требует условий линейности взаимосвязи между параметрами. Среди признаков, влияющих на эффективность терапии, были отобраны следующие клиничко-патологические факторы: возраст, стадия, терапия, объем опухолевой ткани до и после терапии, рецепторы эстрогена, прогестерона, H-Ras до и после лечения, Her2neu, Ki 67.

Таблица 19 – Корреляционный анализ периода безрецидивной выживаемости между клинико-морфологическими параметрами

Клинико-морфологические параметры	Корреляция с периодом безрецидивной выживаемости	Уровень значимости, p
Возраст, лет	R=-0,07	P=0,53
Стадия	R=0,04	P=0,78
Терапия	R=0,25	P=0,008*
Объем опухолевой ткани до лечения, мм <sup>3</sup>	R=0,26	P=0,03*
Объем опухолевой ткани после лечения, мм <sup>3</sup>	R=0,07	P=0,07
Рецепторы эстрогена, %	R=0,13	P=0,11
Рецепторы прогестерона, %	R=0,12	P=0,18
Экспрессия H-Ras до лечения, IRS	R=-0,77	P<0,01*
Экспрессия H-Ras после лечения, IRS	R=-0,70	P<0,01*
Her2neu, %	R=-0,70	P<0,01*
Индекс пролиферации Ki 67, %	R=-0,43	P<0,01*
* - Значимые коэффициенты корреляции Спирмена (p<0,05)		

В результате проведенного анализа, были обнаружены значимые коэффициенты корреляции с такими показателями как, терапия (R=0,25; p=0,008); объем опухолевой ткани до лечения (R=0,07; p=0,03), индекс пролиферативной активности Ki 67 (R=-0,43; p<0,01). Однако данные показатели не вошли в прогностическую модель, поскольку имели среднюю корреляционную связь с периодом безрецидивной выживаемости.

Таким образом для прогноза безрецидивной выживаемости были выбраны два иммуногистохимических параметра: Her2/neu (R=-0,70; p<0,01) и экспрессия H-Ras (R=-0,77; p<0,01).

Построение обобщенной линейной модели зависимости периода безрецидивной выживаемости от вышеизложенных параметров основывалось на информационном критерии Акаике (AIC), который применяется для выбора из нескольких статистических моделей.

В результате проведенного исследования была выбрана обобщенная линейная модель для прогнозирования периода безрецидивной выживаемости, которая состояла из двух параметров: экспрессия онкобелков H-Ras и Her2/neu.

Формула (1) прогнозирования периода безрецидивной выживаемости (ПБВ):

$$\text{ПБВ} = 3.4 + (-0.1 * \text{Hras до лечения}) + (-0.007 * \text{Her2/neu}) \quad (1)$$

Таблица 20 – Табличные значения прогностической модели периода безрецидивной выживаемости GLM

Прогностический фактор	Критерии Акаике (AIC)	Стандартная ошибка (SD)	Уровень значимости p
Her2neu	-0.098583	0.147693	0.046026 *
H-Ras до лечения	-0.104275	0.028202	0.000364 ***

Как видно из формулы (1) и таблицы 20, возраст, H-Ras до лечения и Her2/neu имеют обратную корреляционную связь, что означает при увеличении данных параметров, период до развития прогрессирования уменьшается.

В результате проведенного анализа можно сделать следующий вывод, что коэффициент детерминации данной прогностической модели равен  $R^2=0,56$ , поэтому предсказательная способность данного метода при наличии у пациента 2 параметров (экспрессия онкобелков Hras и рецепторов Her2neu), является статистически обоснованной до 50%. Известно, что коэффициент детерминации должен быть не меньше 50%, тогда предсказательная модель считается значимой [218]. Таким образом, в 56 случаях, модель может предсказать точный исход рака молочной железы (рисунок 35, 36 и 37).

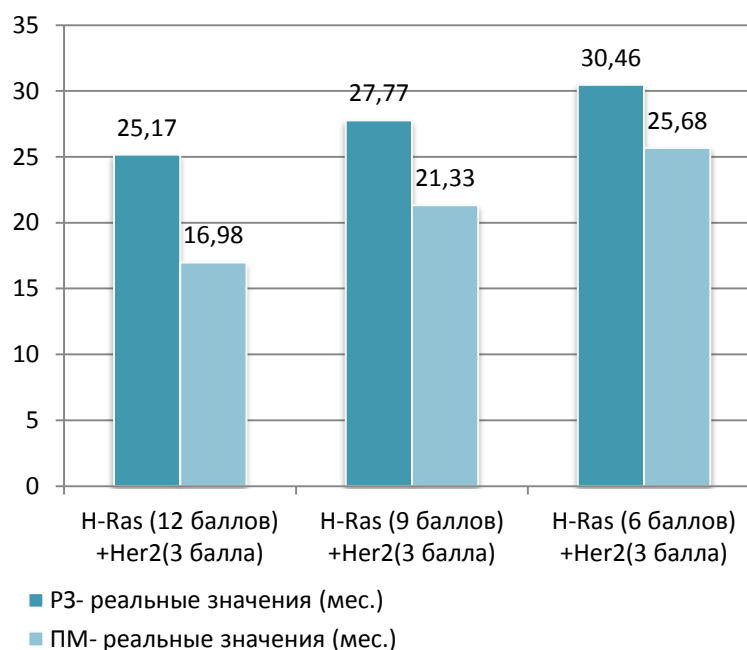


Рисунок 35 – Прогностическая модель безрецидивной выживаемости на основании иммуногистохимических показателей: положительной экспрессии H-Ras и положительных рецепторов Her2neu

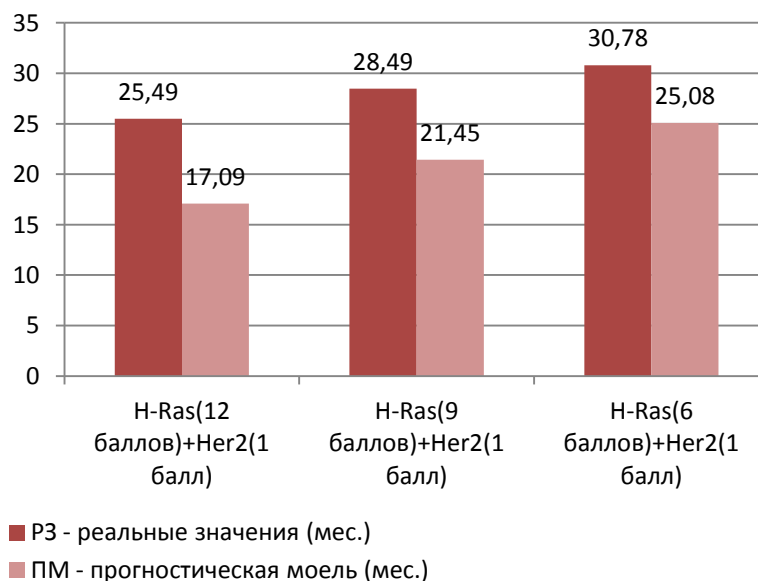


Рисунок 36 – Прогностическая модель безрецидивной выживаемости на основании иммуногистохимических показателей: положительной экспрессии H-Ras и отрицательных рецепторов Her2neu

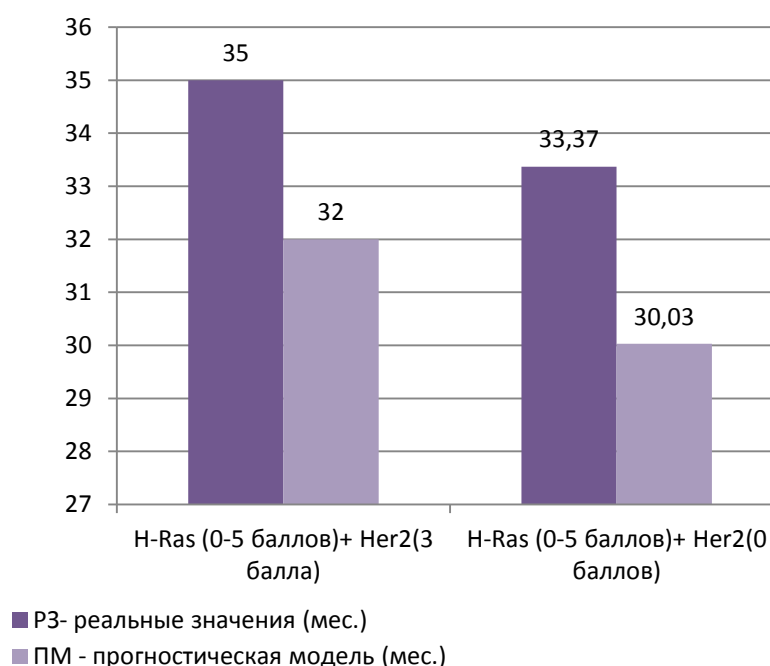


Рисунок 37 – Прогностическая модель безрецидивной выживаемости на основании иммуногистохимических показателей: отрицательной экспрессии H-Ras и положительных и отрицательных рецепторов Her2neu

При положительном Her2neu и высоким уровнем H-Ras (9-12 баллов) период безрецидивной выживаемости составил 16,98 месяцев, при умеренной степени выраженности H-Ras (6-8 баллов) – 21,33 месяца, при низкой степени H-Ras – 25,68 месяцев. Прогностический период безрецидивной выживаемости

при отрицательной экспрессии H-Ras онкобелков (0-3 балла) и положительных рецепторах Her2neu у пациентов с РМЖ составил 32,00 месяца. Отрицательная экспрессия H-Ras в обоих случаях сопровождалась более длительным периодом безрецидивной выживаемости согласно прогностической модели, которая составила 30,00 месяцев.

Таким образом, построенная прогностическая модель периода безрецидивной выживаемости предсказала возникновение рецидива на 3-6 месяцев раньше реальных значений полученных в результате проведенного исследования. Полученные нами данные могут только усилить имеющиеся диагностические процедуры по контролю местно-распространенного рака молочной железы и быть дополнительным диагностическим методом по оценке безрецидивной выживаемости у пациентов с экспрессией H-Ras и Her2neu.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рак молочной железы широко распространен независимо от социально-экономического статуса, расовой и этнической принадлежности или места проживания. Среди всех впервые выявленных случаев удельный вес больных с II и III стадиями рака молочной железы достигает 40%. Больные данной категории относятся к пациентам с местно-распространенной формой заболевания, требующее комплексной терапии [14, p. 2222-2226].

Снижение смертности от РМЖ связано с совершенствованием методов диагностики и лечения. Тем не менее, РМЖ по-прежнему лидирующей причиной смерти от онкологических заболеваний среди женщин и актуальным является поиск новых прогностических биомаркеров, которые способны прогнозировать эффективность проводимой терапии [15, p. 4960-4972].

За последние десятилетия результаты лечения рака молочной железы улучшились благодаря углубленному изучению биологических свойств РМЖ и появлению персонализированной медицины. Исследования в молекулярной биологии открывают новые пути диагностики и терапии рака молочной железы [4, p. 497-506].

Определение молекулярно-биологических маркеров в ткани опухоли может дать дополнительную информацию о скорости ее роста, способности к метастазированию, устойчивости к химиопрепаратам [2, с. 354.; 4, p. 498; 7, p. 252–264; 21, p. 4962; 26, с. 69-72]. Характеризуя биологические особенности каждой конкретной опухоли, они могут помочь в прогнозировании исхода заболевания и в индивидуализации лечения [16, p. 25-29; 32, p. 978-988].

Проводятся активные исследования белков, вовлеченных в обеспечение высокой жизнеспособности злокачественных клеток и определение перспектив использования подобных белков в качестве диагностически значимых биомаркеров и молекулярных мишеней назначения лекарственных средств целенаправленного действия [5, p. 99-114].

Иммуногистохимические методы исследования, позволяют четко определить принадлежность молекулярно-биологических маркеров к опухолевым клеткам, что практически невозможно при использовании других методов. Более того они дают возможность проводить ретроспективные исследования и работать с архивным материалом - парафиновыми блоками даже в тех случаях, когда необходимость исследования биологических маркеров возникла через длительное время после проведенного лечения [33, p. 270-285; 35, p. 37-38].

Изучение новых молекулярных маркеров может быть использовано при разработке новых препаратов, направленно воздействующих на эти молекулы и блокирующих регулируемые ими процессы [23].

В настоящее время в клинической практике при иммуногистохимической диагностике РМЖ используются четыре стандартных биомаркера: рецепторы эстрогена и прогестерона, эпидермального фактора роста Her2neu и Ki67. Однако большинство исследователей, занимающихся изучением РМЖ, на



сегодняшний день сходятся во мнении, что для более точной постановки диагноза и подбора оптимального метода лечения этих данных недостаточно [44, p. 37-38].

Поэтому поиск и внедрение в клинику новых молекулярных агентов позволяющих расширить знания о биологии РМЖ, создать на основе их изучения новые препараты таргетного действия, улучшающие результаты фармакогенетической терапии по принципу «правильный маркер» правильное лекарство становится актуальной проблемой, решение которой позволит улучшить результаты лечения и повысит качество жизни пациентов [55, p. 153].

Для решения этой проблемы нами проведено исследование молекулярных особенностей экспрессии онкобелков H-Ras и их влияния на результаты лечения пациентов РМЖ.

В исследование было включено 100 пациентов в с установленным диагнозом рак молочной железы.

До проведения неоадьювантной лекарственной терапии определена экспрессия H-Ras онкобелков и в зависимости от её уровня проведено распределение пациентов на 2 группы лечения: сравнения (без экспрессии H-Ras) и исследуемую (с положительной экспрессией в зависимости от H-Ras).

По некоторым литературным данным положительная экспрессия онкобелков H-Ras наблюдается до 60% случаев рака молочной железы. Также в опухолях молочной железы может отсутствовать прямой мутационный путь активации Ras, в этом случае и его активация происходит через другие сигнальные пути, при этом положительная экспрессия H-Ras регистрируется в диапазоне от 20 до 50% случаев [138, p. 269-272; 142, p. 11-22; 144, p. 666-668; 145, p. 288-291].

В пользу корректности данного предположения свидетельствуют и полученные нами результаты. Проведенное иммуногистохимическое исследование показало, что до начала неоадьювантной лекарственной терапии у 45,0% пациентов РМЖ была выявлена положительная экспрессия H-Ras.

В рамках исследования изучены особенности экспрессии H-Ras при различных типах РМЖ и их связь с основными иммуногистохимическими маркерами РМЖ.

Изучение экспрессии онкобелков H-Ras у пациентов с люминальным типом А показало, что у 93,1%, пациентов экспрессия H-Ras была отрицательной, аналогичные результаты были получены и у пациентов с трижды негативным типом РМЖ данный показатель соответственно составил 73,7%.

Положительная экспрессия H-Ras у пациентов Her2neu - положительным, люминальным типом В обнаружена у 53,9%, у пациентов Her2neu позитивным нелюминальным типом соответственно составила 78,4%.

Сравнительный анализ экспрессионного статуса H-Ras у пациентов с различными иммуногистохимическими типами РМЖ показал, что положительная экспрессия H-Ras достоверно чаще встречалась у пациентов с

Her2neu позитивным раком ( $p < 0,05$ ). Отрицательная экспрессия H-Ras статистически значимо преобладала у пациентов с люминальным типом А и трижды негативным типом ( $p < 0,05$ ).

Для изучения влияния иммуногистохимических маркеров РМЖ на уровень экспрессии H-Ras онкобелков был проведен корреляционный анализ между уровнем H-Ras до лечения и основными тканевыми опухолевыми иммуногистохимическими маркерами (ER, PR, Her2neu, Ki 67).

Изучение влияния эстрогеновых и прогестероновых рецепторов на экспрессию H-Ras показало, что его экспрессия не зависела от наличия в опухоли молочной железы рецепторов эстрогена и прогестерона, корреляционная связь была слабой и статистически не достоверной ( $p > 0,05$ ).

В работе N.J. Agnantis et al., было продемонстрировано отсутствие связи между высокой экспрессией H-Ras у 297 пациентов с первичной карциномой молочной железы с положительным гормональным статусом [135, p. 67-71].

Эти результаты подтверждают наши наблюдения о том, что высокая экспрессия H-Ras практически отсутствует в опухолях с положительным гормональным статусом.

В ряде исследований было продемонстрировано, что активированные формы Ras повышаются как при раке молочной железы, так и в клеточных линиях при наличии экспрессии EGFR или HER2. Онкобелки Ras способны активироваться различными регуляторами восходящего потока, включая семейство рецепторов эпидермального фактора роста, в частности EGFR (HER1) и Her2neu [20, p. 335-343; 21, p. 4960-4972; 127, p. 5128.; 128, p. 1038-1040].

Это подтверждается и полученными нами данными. Проведенный корреляционный анализ показал, что высокий уровень экспрессии онкобелков H-Ras зависел от наличия в опухоли Her2neu и высокого уровня индекса пролиферативной активности Ki-67, корреляционная связь была сильной и статистически достоверной ( $p < 0,05$ ).

Изучение влияния отрицательной экспрессии ER, PR, Her2neu (трижды негативный рак) на экспрессию H-Ras показало, что его экспрессия не зависела от отсутствия в опухоли молочной железы тканевых маркеров ER, PR, Her2neu, корреляционная связь была слабой и статистически не достоверной ( $p > 0,05$ ).

Полученные нами результаты подтверждаются исследованием Martin et al. где у 48 пациентов с трижды негативным типом рака молочной железы мутации HRAS не были обнаружены ни в одном случае [146, p. 77-82].

В пользу полученных нами результатов свидетельствует и исследование Park Y.H., et. al., в котором была разработана модель рака молочной железы у мышей в результате введения онкогена HRAS (G12V). Образовавшиеся опухолевые клетки имели отрицательные рецепторы эстрогена, прогестерона и Her2. Таким образом больше соответствовали тройному негативному раку молочной железы [157, p. 1976-1984].

Неоадьювантная лекарственная терапия является одним из подходов терапии рака молочной железы. Предоперационная лекарственная терапия

имеет ряд преимуществ: уменьшает опухоль, позволяя проводить менее обширные операции, улучшать косметические результаты и уменьшать послеоперационные осложнения. Кроме того она позволяет получить полный патоморфологический регресс опухоли (pCR) который рассматривается как одна из приоритетных целей, поскольку pCR прогнозирует улучшение отдаленных результатов лечения (безрецидивной и общей выживаемости) [172, p. 3013-3018; 176, p. 87264; 177, p. 323-334].

Изучение непосредственной эффективности неоадьювантной лекарственной терапии в группе сравнения с отрицательной экспрессией H-Ras показало, что частота общего эффекта составила 81,8%, стабилизация процесса – 14,5%, прогрессирование заболевания – 3,6%.

В подгруппе пациентов, получивших неоадьювантную химиотерапию по схеме AC общий эффект зарегистрирован у 69,6%, стабилизация процесса – 26,1%, прогрессирование заболевания – 4,3%.

В подгруппе пациентов, получивших неоадьювантную химиотерапию по схеме AC+Арглабин общий эффект зарегистрирован у 94,4%, стабилизация процесса – 5,6%, прогрессирование заболевания – не зарегистрировано.

В подгруппе пациентов, получивших неоадьювантную терапию арглабином общий эффект зарегистрирован у 85,6%, стабилизация процесса – 7,2%, прогрессирование заболевания – 7,2%.

Сравнение показателей непосредственной эффективности в группе сравнения с отрицательной экспрессией H-Ras не выявило достоверных различий эффективности между режимами лекарственной терапии ( $p>0,05$ ).

Таким образом, в группе сравнения, режим проводимой неоадьювантной лекарственной терапии не влиял на показатели непосредственной эффективности у пациентов с отрицательной экспрессией H-Ras.

Изучение непосредственной эффективности неоадьювантной лекарственной терапии в исследуемой группе пациентов с положительной экспрессией H-Ras показало, что частота общего эффекта составила 57,7%, стабилизация процесса – 26,6%, прогрессирование заболевания.

В подгруппе пациентов, получивших неоадьювантную химиотерапию по схеме AC общий эффект зарегистрирован у 81,2%, стабилизация процесса – 12,5%, прогрессирование заболевания – 6,3%.

В подгруппе пациентов, получивших неоадьювантную химиотерапию по схеме AC+Арглабин общий эффект зарегистрирован у 66,6%, стабилизация процесса – 25,0%, прогрессирование заболевания – 8,4%.

В подгруппе пациентов, получивших неоадьювантную терапию арглабином общий эффект зарегистрирован у 29,4%, стабилизация процесса – 41,2%, прогрессирование заболевания – 29,4%.

Изучение эффективности разных режимов неоадьювантной лекарственной терапии в исследуемой группе с положительной экспрессией H-Ras так же не выявило влияние проводимого режима лекарственной терапии на показатели непосредственной эффективности, статистически достоверных различий ( $p>0,05$ ) не получено.

Сравнительный анализ показателей непосредственной эффективности между группой сравнения и исследуемой группами показал, что частота общего эффекта была достоверно выше в группе контроля ( $p < 0,05$ ), а прогрессирование заболевания достоверно чаще регистрировалось в исследуемой группе ( $p < 0,05$ ).

Был проведен сравнительный анализ показателей непосредственной эффективности между группой сравнения и исследуемой группой в зависимости от схемы проводимой лекарственной терапии.

Сравнительный анализ в подгруппе пациентов, получивших неоадьювантную полихимиотерапию по схеме АС, показал, что достоверных различий между группой сравнения с отрицательной экспрессией Н-Ras и исследуемой группой с положительной экспрессией Н-Ras не выявлено.

Достоверных различий между группой сравнения с отрицательной экспрессией Н-Ras и исследуемой группой с положительной экспрессией Н-Ras, получивших неоадьювантную полихимиотерапию по схеме АС+Арглабин не выявлено.

Сравнительный анализ показал, что непосредственные результаты неоадьювантной лекарственной терапии Арглабином, были достоверно ( $p < 0,05$ ) лучше в группе сравнения.

После проведенной неоадьювантной лекарственной терапии нами изучен лекарственный патоморфоз опухоли.

Сравнительный анализ выраженности лекарственного патоморфоза показал, что в исследуемой группе с положительной экспрессией Н-Ras слабый патоморфоз I-II степени развивался достоверно чаще в исследуемой группе – 13,3 %, чем в группе сравнения 5,5% ( $p = 0,03$ ). В группе сравнения с отрицательной экспрессией Н-Ras достоверных различий между особенностями лекарственного патоморфоза в исследуемой группе не обнаружено: патоморфоз III-IV степени развивался у 86,7 % при отрицательной экспрессии и у 94,5% пациентов при положительной экспрессии ( $p = 0,07$ ).

Изучение уровня экспрессии Н-Ras онкобелков после проведенной неоадьювантной терапии показало, что его положительная экспрессия сохранялась у 35,0% пациентов. Полученные нами данные показали, что ни один из режимов проведенной неоадьювантной лекарственной терапии не продемонстрировал достоверно значимое снижение экспрессии Н-Ras после лечения.

Таким образом, изучение результатов непосредственной эффективности, лекарственного патоморфоза и определение уровня экспрессии Н-Ras онкобелков после проведенной неоадьювантной терапии показало, что у пациентов положительная экспрессии Н-Ras онкобелков сопряжена с худшим прогнозом эффективности неоадьювантной лекарственной терапии.

Полученные нами данные согласуются с результатами клинических исследований, демонстрирующих разную частоту патоморфологического ответа в зависимости от проводимой лекарственной терапии и биологического типа рака молочной железы.

Untch M. et al. в 2019 году представили результаты исследования проведенного в период между 2010 и 2016 годами. В исследовании были представлены результаты лечения 244 пациентов с раком молочной железы, получивших неоадьювантную терапию которых с последующей операцией. Исследователи классифицировали рак молочной железы на люминальный HER2 отрицательный, люминальный HER2 положительный, нелюминальный HER2 положительный и тройной негативный рак. Была оценена непосредственная эффективность и частота полного патоморфологического регресса опухоли pCR [155, p. 2226-2234]. Общий уровень pCR в молочной железе, и pCR в подмышечных лимфатических узлах были значительно ниже у 114 пациентов с люминальным типом А, раком молочной железы HER2, чем у пациентов с другими подтипами. Тем не менее, частота опухолевого ответа существенно не отличались между пациентами разных типов. При анализе подгруппы HER2-отрицательного люминального В рака молочной железы было показано, что более высокая экспрессия Ki67, время получения pCR и время проведения органосохраняющих операций рака молочной железы в значительной степени связаны с ответом опухоли на неоадьювантную терапию [134, p. 465-470; 136, p. 4585-4592; 138, p. 269-272].

Авторами сделаны выводы о том, что, несмотря на низкую частоту pCR у пациентов люминальными HER2-отрицательного типами РМЖ опухолевый ответ и время проведения органосохраняющей операции после НПХТ были сходными с таковыми у других подтипов. Неоадьювантная терапия вызывает быстрое уменьшение размера опухоли и увеличивает количество органосохраняющих операции при люминальных HER2-отрицательных типах РМЖ [122, p. 11730].

В исследование J.C Singh et al. с сентября 2013 по март 2015 были включены 66 пациентов РМЖ получивших неоадьювантную терапию. Патоморфологический ответ проанализирован у 57 пациентов. Пациенты с ранней стадией HER2-положительного рака молочной железы получали неоадьювантную терапию по схеме AC с последующей паклитакселом и двойной анти-HER2-терапией трастузумабом и пертузумабом. Частота общего pCR в исследовании составила 72% [119, p. 85-117].

В исследование Di Cosimo S. et al. включены пациенты с первичным тройным отрицательным раком молочной железы  $\geq 2$  см, которые получали неоадьювантную химиотерапию по схеме AT (доксорубин 60 мг/м<sup>2</sup> и паклитаксел 200 мг/м<sup>2</sup> 4 цикла), а затем мезилат эрибулина 1,4 мг/м<sup>2</sup>×4 цикла. Первичной конечной точкой была частота полного патоморфологического ответа pCR; вторичные и исследовательские конечные точки включали показатели клинической/метаболической реакции и безопасность, а также анализ биомаркеров соответственно. Используя двухэтапный дизайн Саймона, 43 пациента должны были быть включены при условии, что 4 из 13 пациентов достигли pCR на первом этапе исследования. На первом этапе исследования было зарегистрировано 13 женщин, средний возраст которых составил 43 года, у 9 из 13 (69%), размер опухоли составил 2-5 см, у 8 из 13(61%) отмечалось

метастатическое поражение регионарных лимфатических узлов. Общая эффективность (клинический полный + частичный ответ) изучаемого режима составила 85%, при этом частота pCR соответственно 23%. Иммуноокрашивание парных образцов опухолей до/после лечения показало снижение экспрессии  $\beta$ -катенина, CyclinD1, Zeb-1 и c-мус в отсутствие модуляции N-кадгерина [112, p. 73-79].

Показатели выживаемости при раке молочной железы в разных странах варьируются в широких пределах – от 80% и более в Северной Америке, Швеции и Японии до примерно 60% в странах со средним уровнем дохода и до менее 40% в странах с низким уровнем дохода. На показатели выживаемости влияет множество факторов: социально-экономические возможности страны проживания, степень распространенности опухолевого процесса, биологические особенности опухоли [130, p. 36-39].

Активные исследования молекулярно-генетических особенностей РМЖ и белковых структур, вовлеченных в обеспечение высокой жизнеспособности злокачественных клеток с целью определения перспектив использования подобных белков в качестве диагностических и прогностических биологических маркеров и молекулярных мишеней для создания лекарственных средств целенаправленного действия позволяют улучшить выживаемость пациентов [88, p.738-747; 89, p. 39-48].

Yang L.F et. al. опубликовали исследование, где определяли связь сверхэкспрессии Her2neu с прогнозом у 284 больных РМЖ. Было показано, что сверхэкспрессия Her2neu достоверно ухудшает прогноз больных РМЖ, понижая показатели безрецидивной и общей выживаемости ( $p=0,024$  и  $p=0,002$ , соответственно). Также было замечено, что сверхэкспрессия Her2neu ассоциирована с более высокой частотой выявления висцеральных метастазов [78, p. 346-352].

Magne N et. al. выполнили исследование прогностической значимости экспрессии рецепторов к эстрогену (ER). Было проанализировано 1940 больных РМЖ и выявлено, что положительная экспрессия ER является одним из наиболее сильных прогностических факторов, благоприятно влияющих на выживаемость ( $p<0.00001$ ) [85, p. 15-34].

В работе Kim M et. al. сравнивали показатели выживаемости при базальном фенотипе РМЖ, при сверхэкспрессии Her2neu и при экспрессии ER и/или PR. В исследование было включено 776 пациентов. Сверхэкспрессия Her2neu была ассоциирована с наибольшей частотой прогрессирования (33,8%), что указывает на Her2neu, как на самый сильный ИГХ фактор определяющий прогноз при РМЖ [86, p. 203-212].

Arpino G et. al. опубликовали результаты исследования, где проводился сравнительный анализ 31415 больных РМЖ с положительной экспрессией ER и PR, с 13404 больными РМЖ имевших положительную экспрессию только ER и отрицательную экспрессию PR. Сравнивалась общая и безрецидивная выживаемость, также учитывалась частота сверхэкспрессии Her2neu. У пациентов с ER+PR – фенотипом опухоли частота сверхэкспрессии Her2neu

была выше на 50%, а частота прогрессирования была в 2,6 раза выше ( $p=0,022$ ) [87, p. 122-133].

Нами было проведено изучение влияния экспрессии онкобелков H-Ras на показатели безрецидивной выживаемости пациентов РМЖ.

При изучении безрецидивной выживаемости в исследуемой группе пациентов РМЖ с положительной экспрессией H-Ras медиана безрецидивной выживаемости составила  $16,0 \pm 1,0$  месяцев.

Безрецидивная выживаемость в группе пациентов с положительной экспрессией H-Ras, получивших неоадьювантную терапию по схеме АС составила  $13,5 \pm 1,1$  месяцев; по схеме АС+Арглабин –  $16,4 \pm 1,2$  месяцев, монотерапию Арглабином соответственно –  $16,5 \pm 1,1$  месяцев.

Подгрупповой сравнительный анализ у пациентов с положительной экспрессией H-Ras показал, что в подгруппах пациентов, получавших Арглабин и АС+Арглабин отмечается статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение безрецидивной выживаемости по сравнению с подгруппой АС.

В контрольной группе медиана безрецидивной выживаемости составила  $33,0 \pm 1,1$  месяцев.

Показатель безрецидивной выживаемости в группе пациентов с отрицательной экспрессией H-Ras, получивших неоадьювантную терапию по схеме АС составил  $33,0 \pm 1,1$  месяцев; по схеме АС+Арглабин –  $34,00 \pm 1,1$  месяцев; монотерапию Арглабином –  $25,4 \pm 1,0$  месяцев.

Подгруппой сравнительный анализ у пациентов с отрицательной экспрессией H-Ras продемонстрировал статистически значимое достоверное ( $p < 0,05$ ) увеличение безрецидивной выживаемости в подгруппах, получивших неоадьювантную химиотерапию по схеме АС и АС+Арглабин, по сравнению с монотерапией Арглабином. Добавление Арглабина к стандартной схеме АС у пациентов с отрицательной экспрессией H-Ras не улучшало показатели безрецидивной выживаемости.

Анализ безрецидивной выживаемости и сопоставление полученных результатов с литературными данными позволяют предположить, что более низкие показатели выживаемости в группе сравнения зависят от положительной экспрессии H-Ras и Her2neu [113, p. 3104-3114].

Статистически значимое увеличение выживаемости у пациентов с положительной экспрессией H-Ras в подгруппах пациентов которые получили Арглабин и АС+Арглабин по сравнению с подгруппой АС ( $p < 0,05$ ) объясняется механизмом действия Арглабина. Поскольку для выполнения своей функции онкобелку H-Ras нужно приобрести соответствующую структуру и присоединиться к внутренней поверхности мембраны, с помощью фермента фарнезилтрансферазы. Без процесса фарнелизации RAS теряет способность фосфорилироваться, и передавать сигналы от рецептора к ядру клетки [13, p. 5984-5996; 14, p. 2225].

Учитывая, что препарат Арглабин блокирует фермент фарнезилтрансферазу, в результате чего белки H-Ras не могут передавать сигналы опухолевой клетке для пролиферации и прогрессирования, результаты

безрецидивной выживаемости пациентов с положительной экспрессией H-Ras после неoadьювантной терапии препаратом Арглабин в комбинации и в монорежиме статистически выше, чем при воздействии только стандартной терапии АС.

В рамках проведенного нами исследования построена модель прогнозирования безрецидивной выживаемости на основании обобщенной линейной модели GLM, которая не требует условий линейной взаимосвязи между параметрами.

Возраст, стадия, проведенная неoadьювантная терапия, объем опухолевой ткани до и после терапии, Ki 67, рецепторы эстрогена, прогестерона не вошли в прогностическую модель, поскольку имели среднюю корреляционную связь с периодом безрецидивной выживаемости.

Построение обобщенной линейной модели зависимости периода безрецидивной выживаемости параметров основывалось на информационном критерии Акаике (AIC), который применяется для выбора из нескольких статистических моделей.

В результате проведенного исследования была выбрана обобщенная линейная модель для прогнозирования периода безрецидивной выживаемости, которая состояла из двух параметров: экспрессия онкобелков H-Ras и Her2/neu. Коэффициент детерминации данной прогностической модели равен  $R^2=0,56$ , поэтому предсказательная способность данного метода при наличии у пациента 2 параметров (экспрессия онкобелков H-Ras и рецепторов Her2neu), является статистически обоснованной.

Построенная прогностическая модель периода безрецидивной выживаемости предсказала возникновение рецидива на 3-6 месяцев раньше реальных значений полученных в результате проведенного исследования. Полученные нами данные могут только усилить имеющиеся диагностические процедуры по контролю местно-распространенного рака молочной железы и быть дополнительным диагностическим методом по оценке безрецидивной выживаемости у пациентов с экспрессией H-Ras и Her2neu.

Результаты, полученные в исследовании позволяют сделать следующие **выводы:**

1 Экспрессия H-Ras выявленная до начала неoadьювантной лекарственной терапии у 45 (45 %) пациентов РМЖ чаще встречалась с Her2neu позитивным раком и высоким уровнем индекса пролиферативной активности Ki-67, что продемонстрировано наличием сильной статистически значимой связи при Her2neu ( $R_s=0,89$ ,  $p<0,05$ ), а при Ki-67 ( $R_s=0,70$ ,  $p=0,001$ ).

2 Экспрессия H-Ras влияла на непосредственную эффективность неoadьювантной лекарственной терапии. У пациентов с отрицательной экспрессией частота общего эффекта была статистически значимой на 24,1% ( $p<0,05$ ), прогрессирование заболевания на 22,2% ниже, чем у пациентов в исследуемой группе с положительной экспрессией H-Ras ( $p<0,05$ ).

3 Экспрессия H-Ras влияла на показатели безрецидивной выживаемости. В группе сравнения пациентов с отрицательной экспрессией H-Ras этот



показатель составил  $33,0 \pm 1,1$  месяцев, в исследуемой группе с положительной экспрессией соответственно  $-16,0 \pm 1,0$  месяцев. У пациентов с положительной экспрессией Н-Ras, в результате терапии препаратом Арглабин, отмечается статистически значимое увеличение безрецидивной выживаемости до  $16,5 \pm 1,1$  месяцев по сравнению со стандартным режимом АС ( $13,5 \pm 1,1$  месяцев) ( $p < 0,05$ ), добавление Арглабина к стандартному режиму АС также увеличивало этот показатель до  $16,4 \pm 1,2$  месяцев ( $p < 0,05$ ).

4 При положительном Her2neu и высоким уровнем Н-Ras (9-12 баллов) период безрецидивной выживаемости составил 16,98 месяцев, при умеренной степени выраженности Н-Ras (6-8 баллов) – 21,33 месяца, при низкой степени Н-Ras – 25,68 месяцев. Прогностический период безрецидивной выживаемости при отрицательной экспрессии Н-Ras онкобелков (0-3 балла) и положительных рецепторах Her2neu у пациентов с РМЖ составил 32,00 месяца. Отрицательная экспрессия в обоих случаях сопровождалась более коротким периодом безрецидивной выживаемости согласно прогностической модели, которая составила 30,00 месяцев.

## **СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ**

- 1 Нургазиев К.Ш., Толеутайулы К., Байпеисов Д.М., Оспанов Ш.Е. Развитие онкологической помощи в Республике Казахстан // Молодой ученый. – 2017. – №19. – С. 4-5.
- 2 Бермагамбетова Г.Н., Мукиева А.Б., Нугуманов Т.К., Шубина С.В. Здоровье населения Республики Казахстан и деятельность организаций здравоохранения в 2018 году: стат. отчет. – Астана, 2018. – 354 с.
- 3 Нургазиев Р.И., Сейтказина Г.Д., Байпеисов Д.М. и др. Показатели онкологической службы Республики Казахстан за 2018 год: стат. матер. – Алматы. – 2018. – 108 с.
- 4 Low S.K., Zembutsu H., Nakamura Y. Breast cancer: The translation of big genomic data to cancer precision medicine // Cancer Sci. – 2018. – Vol. 109. – P. 497-506.
- 5 Leong A.S., Zhuang Z. The changing role of pathology in breast cancer diagnosis and treatment // Pathobiology. – 2011. – Vol. 78(2). – P. 99-114.
- 6 Gloria M., Jorge A. Ras protein expression as a marker for breast cancer // Oncol Lett. – 2016. – Vol. 11. – P. 3637-3642.
- 7 Pardoll D.M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy // Nat. Rev. Cancer. – 2012. – Vol. 12. – P. 252-264.
- 8 Cree I.A. Progress and potential of RAS mutation detection for diagnostics and companion diagnostics // Expert Rev. Mol. Diagn. – 2016. – Vol. 16. – P. 1067-1072.
- 9 Pylayeva-Gupta Y. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web // Nat. Rev. Cancer. – 2011. – Vol. 11. – P. 761-774.
- 10 Bonnot P.E., Passot G. RAS mutation: site of disease and recurrence pattern in colorectal cancer // Chin. Clin. Oncol. – 2019. – №8. – P. 55.
- 11 Tong J.H., Lung R.W., Sin F.M. et al. Characterization of rare transforming KRAS mutations in sporadic colorectal cancer // Cancer Biol. Ther. – 2014. – Vol. 15. – P. 768-776.
- 12 Spandidos D.A., Karaiossifidi H., Malliri A. et al. Expression of ras Rb1 and p53 proteins in human breast cancer // Anticancer Res. – 1992. – Vol. 12, №1. – P. 81-89.
- 13 Kazi A., Xiang S., Yang H. et al. Dual Farnesyl and Geranylgeranyl Transferase Inhibitor Thwarts Mutant KRAS-Driven Patient-Derived Pancreatic Tumors // Clin. Cancer Res. – 2019. – Vol. 25. – P. 5984-5996.
- 14 Lee K.H., Koh M., Moon A. Farnesyl transferase inhibitor FTI-277 inhibits breast cell invasion and migration by blocking H-Ras activation // Oncol. Lett. – 2016. – Vol. 12, №3. – P. 2222-2226.
- 15 Cox A.D., Der C.J., Philips M.R. Targeting RAS membrane association: Back to the future for Anti-RAS drug discovery // Clin. Cancer Res. – 2015. – Vol. 21. – P. 1819-1827.
- 16 Koh M.S., Moon A. Activation of H-Ras and Rac1 correlates with epidermal growth factor-induced invasion in Hs578T and MDA-MB-231 breast carcinoma cells // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2011. – Vol. 406. – P. 25-29.

- 17 Arteaga C.L. et al. Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2012. – №9. – P. 16-32.
- 18 Ali R., Wendt M.K. The paradoxical functions of EGFR during breast cancer progression // *Signal. Transduct. Target. Ther.* – 2017. – №2. – P. 16042.
- 19 Haddad T.C., Goetz M.P. Landscape of neoadjuvant therapy for breast cancer // *Ann. Surg. Oncol.* – 2015. – Vol. 22. – P. 1408-1415.
- 20 King T.A., Morrow M. Surgical issues in patients with breast cancer receiving neoadjuvant chemotherapy // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2015. – Vol. 12. – P. 335-343.
- 21 Wright K.L. et al. Ras signaling is a key determinant for metastatic dissemination and poor survival of luminal breast cancer patients // *Cancer Res.* – 2015. – Vol. 75. – P. 4960-4972.
- 22 Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // *CA: a Cancer Journal for Clinicians.* – 2018. – Vol. 68. – P. 394-424.
- 23 WHO prequalifies first biosimilar medicine to increase worldwide access to life-saving breast cancer treatment // <https://www.who.int/ru>. 18.12.2019.
- 24 Кайдарова Д.Р., Ауэзова Э.Т., Чингисова Ж.К. и др. Показатели онкологической службы Республики Казахстан за 2015 год: стат. матер. – Алматы, 2018. – 97 с.
- 25 Zhumakaeva A.M., Rakhimov K.D., Omarova I.M. et al. Age peculiarities of breast cancer in Karaganda region // *Вестник АГИУВ.* – 2017. – №4. – С. 18-21.
- 26 Писарева Л.Ф., Бояркина А.Л., Одинцова И.Н. Заболеваемость гормонозависимыми опухолями женского населения Томской области // *Гормонозависимые опухоли: матер. 9-й всеросс. конф. онкологов.* – СПб., 2002. – С. 69-72.
- 27 Недельчева К.В., Харада Н., Кристенсен Т. и др. Генетический полиморфизм и вариабельность метаболизма стероидных гормонов: связь с риском развития рака молочной железы // *Вопр. онкологии.* – 2011. – Т. 47, №2. – С. 156-159.
- 28 Mavaddat N., Barrowdale D., Andrulis I.L. et al. Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA) // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2012. – Vol. 21. – P. 134-147.
- 29 White A.J., O'Brien K.M., Niehoff N.M., Carroll R., Sandler D.P. Metallic air pollutants and breast cancer risk in a nationwide cohort study // *Epidemiology.* – 2019. – Vol. 30. – P. 20-28.
- 30 Anderson K.N., Schwab R.B., Martinez M.E. Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: a review of the literature // *Breast. Cancer. Res. Treat.* – 2014. – Vol. 144. – P. 1-10.
- 31 Вайдерпасс Э., Перссон И.Р. Онкологические заболевания в менопаузе: причины и способы предотвращения // *Вопр. онкологии.* – 2001. – Т. 47, №2. – С. 139-147.

32 Copson E., Eccles B., Maishman T. et al. Prospective observational study of breast cancer treatment outcomes for UK women aged 18-40 years at diagnosis: the POSH study // *J Natl Cancer Inst.* – 2013. – Vol. 105. – P. 978-988.

33 Ercan C., Diest P.J. Mammary Development and Breast Cancer: The Role of Stem Cells // *Curr Mol Med.* – 2011. – Vol. 11. – P. 270-285.

34 Степина М.Б., Фролова М.А. Рак молочной железы: наиболее важные научные события и выводы последних лет // *Практическая онкология.* – 2011. – Т. 12, №1. – С. 6-11.

35 Жумакаева А.М., Рахимов К.Д, Омарова И.М. и др. Изменение метастатических лимфоузлов, как оценка эффективности терапии рака молочной железы // *Матер. конф. молодых ученых «Наука и здоровье» с междунар. участием, посв. 70-летию А.З. Дюсупова и Б.Б. Дюсуповой.* – Семей, 2018. – Т. 20, №5. – С. 37-38.

36 Cantwell-Dorris E.R., O'Leary J.J., Sheils O.M. BRAFV600E: Implications for carcinogenesis and molecular therapy // *Mol Cancer Ther.* – 2011. – №10. – P. 385-394.

37 Jiang B.H., Liu L.Z. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv // Cancer Res.* – 2009. – Vol. 102. – P. 49-65.

38 Chiang S.P., Cabrera R.M., Segall J. E. Tumor cell intravasation // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2016. – Vol. 311. – P. 1-14.

39 Meek D.W. Regulation of the p53 response and its relationship to cancer // *Biochem J.* – 2015. – Vol. 469. – P. 325–346.

40 Harding C., Pompei F., Burmistrov D. et al. Breast Cancer Screening, Incidence, and Mortality Across US Counties // *JAMA Intern Med.* – 2015. – Vol. 175. – P. 1483-1489.

41 Done S.J., Eskandarian S., Bull S. et al. p53 missense mutations in microdissected high-grade ductal carcinoma in situ of the breast // *J Natl Cancer Inst.* – 2001. – Vol. 93. – P. 700-704.

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

43 Cheang M.C., Chia S.K., Voduc D. et al. Ki 67 index, HER-2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer // *Journal of the National Cancer Institute.* – 2009. – Vol. 101. – P. 736-750.

44 Odle T.G. Precision Medicine in Breast Cancer // *Radiol Technol.* – 2017. – Vol. 88. – P. 401-421.

45 Perou C.M., Sorlie T., Eisen M.B., Rijn M., Jeffrey S.S. Molecular portraits of human breast tumors // *Nature.* – 2000. – Vol. 406. – P. 747-752.

46 Arteaga C.L. et al. Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives // *Nat Rev Clin Oncol.* – 2012. – №9. – P. 16-32.

47 Hashmi A.A., Edhi M.M., Naqvi H., Khurshid A., Faridi N. Molecular subtypes of breast cancer in South Asian population by immunohistochemical profile and Her2neu gene amplification by FISH technique: association with other clinicopathologic parameters // *Breast J.* – 2014. – Vol. 20, №6. – P. 578-585.

48 Masuda S. Breast cancer pathology: the impact of molecular taxonomy on morphological taxonomy // *Pathol Int.* – 2012. – Vol. 62, №5. – P. 295-302.

49 Blows F.M., Driver K.E., Schmidt M.K. et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies // *PLoS Med.* – 2010. – №7. – P. 279.

50 Goldhirsch A., Wood W.C., Coates A.S. et al. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011 // *Ann Oncol.* – 2011. – Vol. 22. – P. 1736-1747.

51 Bauer K., Parise C., Caggiano V. Use of ER/PR/Her2 subtypes in conjunction with the 2007 St Gallen consensus statement for early breast cancer // *BMC Cancer.* – 2010. – №10. – P. 228.

52 Vuong D., Simpson P.T., Green B., Cummings M.C., Lakhani S.R. Molecular classification of breast cancer // *Virchows Arch.* – 2014. – Vol. 465. – P. 1-14.

53 Иванцов А.О., Мацко Д.Е. Возможности иммуногистохимического исследования в диагностике опухолей // *Практическая онкология.* – 2011. – Т. 12, №4. – С. 185-193.

54 Амиросланов А.Т., Мурадов Х.К., Велиева А.Г. Влияние эндокринно-клеточного компонента на течение и прогноз гормонопродуцирующего рака молочной железы // *Российский биотерапевтический журнал.* – 2010. – Т. 9, №4. – С. 51-54.

55 Жумакаева А.М., Омарова И.М. Исследование лимфатических узлов в результате предоперационной лекарственной терапии рака молочной железы // *Матер. 4-й междунар. науч.-практ. конф. «Global science and innovations 2019: Central Asia».* – Астана, 2019. – С. 153.

56 Yoon E.C., Schwartz C., Brogi E. et al. Impact of biomarkers and genetic profiling on breast cancer prognostication: A comparative analysis of the 8th edition of breast cancer staging system // *Breast J.* – 2019. – Vol. 25. – P. 829-837.

57 Wolff A.C., Hammond M.E., Allison K.H. et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update // *J Clin Oncol.* – 2018. – Vol. 36. – P. 2105-2122.

58 Hanna W.M., Rüschoff J., Bilous M. et al. HER2 in situ hybridization in breast cancer: clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity // *Mod Pathol.* – 2014. – Vol. 27. – P. 4-18.

59 Rakha E.A., Pinder S.E., Bartlett J.M. et al. Updated UK Recommendations for HER2 assessment in breast cancer // *J Clin Pathol.* – 2015. – Vol. 68. – P. 93-99.

60 Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Тканевые маркеры как факторы прогноза при раке молочной железы // *Практическая онкология: избр. лекции.* – СПб.: Центр ТОММ, 2004. – С. 41-50.

61 Siewertsz van Reesema L.L. et al. RAS pathway biomarkers for breast cancer prognosis // *Cancer Res.* – 2016. – Vol. 40. – P. 18-23.

- 62 Кулигина Е.Ш. Эпидемиологические и молекулярные аспекты рака молочной железы // Практическая онкология. – 2010. – Vol. 11. – С. 203-216.
- 63 Nguyen T.H., Nguyen V.H., Nguyen T.L. et al. Evaluations of Biomarker Status Changes between Primary and Recurrent Tumor Tissue Samples in Breast Cancer Patients // BioMed Research International. – 2019. – Vol. 23. – P. 1-7.
- 64 Yan M., Parker B.A., Schwab R., Kurzrock R. Her2 aberration in cancer: Implications for therapy // Cancer treat Rev. – 2014. – Vol. 40. – P. 770-780.
- 65 Zeune L., van Dalsum G., Decraene C. et al. Quantifying HER-2 expression on circulating tumor cells by ACCEPT // PloS one. – 2017. – №12. – P. 1-12.
- 66 Riethdorf S., Muller V., Zhang L. et al. Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial // Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research. – 2010. – Vol. 16. – P. 2634-2645.
- 67 Page K., Hava N., Ward B., Brown J. et al. Detection of HER2 amplification in circulating free DNA in patients with breast cancer // British Journal of Cancer. – 2011. – Vol. 104. – P. 1342.
- 68 McGranahan N., Swanton C. Biological and therapeutic impact of intratumor heterogeneity in cancer evolution // Cancer Cell. – 2015. – Vol. 27(1). – P. 15-26.
- 68 Gabos Z., Sinha R., Hanson J. et al. Prognostic significance of human epidermal growth factor receptor positivity for the development of brain metastasis after newly diagnosed breast cancer // J. Clin. Oncol. – 2006. – Vol. 24. – P. 5658-5663.
- 69 Engels C.C., Kiderlen M., Bastiaannet E. et al. The clinical value of HER-2 overexpression and PIK3CA mutations in the older breast cancer population: a FOCUS study analysis // Breast Cancer Res Treat. – 2016. – Vol. 156. – P. 361-370.
- 70 Curtis C. et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumors reveals novel subgroups // Nature. – 2012. – Vol. 486. – P. 346-352.
- 71 Kono M., Fujii T., Lim B. et al. Androgen Receptor Function and Androgen Receptor-Targeted Therapies in Breast Cancer: A Review // JAMA Oncol. – 2017. – №3. – P. 1266-1273.
- 72 Pietri E., Conteduca V., Andreis D. et al. Androgen receptor signaling pathways as a target for breast cancer treatment // Endocr Relat Cancer. – 2016. – Vol. 23. – P. 485-498.
- 73 Niemeier L.A., Dabbs D.J., Beriwal S. et al. Androgen receptor in breast cancer: expression in estrogen receptor-positive tumors and in estrogen receptor-negative tumors with apocrine differentiation // Mod Pathol. – 2010. – Vol. 23. – P. 205-212.
- 74 Tsang J.Y., Ni Y.B., Chan S.K. et al. Androgen receptor expression shows distinctive significance in ER positive and negative breast cancers // Ann Surg Oncol. – 2014. – Vol. 21. – P. 2218-2228.
- 75 Bleach R., McIlroy M. The Divergent Function of Androgen Receptor in Breast Cancer; Analysis of Steroid Mediators and Tumor Intracrinology // Front Endocrinol (Lausanne). – 2018. – №9. – P. 594-607.

76 Zhang H., Sui X., Zhou S., Hu L., Huang X. Correlation of Conventional Ultrasound Characteristics of Breast Tumors With Axillary Lymph Node Metastasis and Ki-67 Expression in Patients With Breast Cancer // *J Ultrasound Med.* – 2019. – Vol. 38. – P. 183-1840.

77 Kim K.I., Lee K.H., Kim T.R. et al. Ki-67 as a predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients // *J Breast Cancer.* – 2014. – Vol. 17. – P. 40-46.

78 Curtis C. et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups // *Nature.* – 2012. – Vol. 46. – P. 346-352.

79 Poulakaki N., Makris G.M., Papanota A.M. et al. Ki-67 Expression as a Factor Predicting Recurrence of Ductal Carcinoma In Situ of the Breast: A Systematic Review and Meta-Analysis // *Clin Breast Cancer.* – 2018. – Vol. 18. – P. 157-167.

80 Sadashima E., Hattori S., Takahashi K. Meta-analysis of prognostic studies for a biomarker with a study-specific cutoff value // *Res Synth Methods.* – 2016. – №7. – P. 402-419.

81 Luporsi E., Andre F., Spyrtos F. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2012. – Vol. 132. – P. 895-915.

82 Chen X., He C., Han D. et al. The predictive value of Ki-67 before neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: a systematic review and meta-analysis // *Future Oncol.* – 2017. – Vol. 13. – P. 843-857.

83 Goldhirsch A., Ingle J.N., Gelber R.D. et al. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer // *Ann. Oncol.* – 2009. – Vol. 20. – P. 1319-1329.

84 Жумакаева А.М., Рахимов К.Д., Мадияров А.Е., Адекенов С.М. Динамика регресса регионарных лимфатических узлов при предоперационной терапии рака молочной железы // *Вестник АГИУВ.* – 2018. – №2. – С. 18-22.

85 Taneja P., Maglic D., Kai F. et al. Classical and novel prognostic markers for breast cancer and their clinical significance // *Clinical Medicine Insights Oncology.* – 2010. – №4. – P. 15-34.

86 Matsubara N., Mukai H., Fujii S., Wada N. Different prognostic significance of Ki-67 change between preand post-neoadjuvant chemotherapy in various subtypes of breast cancer // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2012. – Vol. 137. – P. 203-212.

87 Xu H., Eirew P., Mullaly S.C., Aparicio S. The omics of triplenegative breast cancers // *Clin Chem.* – 2014. – Vol. 60. – P. 122-133.

88 Fujita T., Mizukami T., Okawara T., Inoue K., Fujimori M. Identification of a novel inhibitor of triple-negative breast cancer cell growth by screening of a small-molecule library // *Breast Cancer.* – 2014. – Vol. 26. – P. 738-747.

89 Perou C.M. Molecular stratification of triple-negative breast cancers // *Oncologist.* – 2010. – Vol. 15. – P. 39-48.

90 Shah S.P., Roth A., Goya R. et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers // *Nature*. – 2012. – №9. – P. 395-399.

92 Curtis C., Shah S.P., Chin S.F. et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups // *Nature*. – 2012. – Vol. 48. – P. 346-352.

93 Lehmann B.D., Bauer J.A., Chen X. et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies // *J Clin Invest*. – 2011. – Vol. 12. – P. 2750-2767.

94 Paul A., Gunewardena S., Stecklein S.R. et al. PKC $\lambda$ /iota signaling promotes triplenegative breast cancer growth and metastasis // *Cell Death Differ*. – 2014. – Vol. 21. – P. 1469-1481.

95 Horgan X.J., Tatum H., Brannan E., Paull D.H., Rhodes L.V. Resveratrol analogues surprisingly effective against triple-negative breast cancer, independent of ER $\alpha$  // *Oncol Rep*. – 2019. – Vol. 416. – P. 3517-3526.

96 Nagini S. Breast Cancer: Current Molecular Therapeutic Targets and New Players // *Anticancer Agents Med Chem*. – 2017. – Vol. 17. – P. 152-163.

97 Herold C.I., Anders C.K. New targets for triple-negative breast cancer // *Oncology (Williston Park)*. – 2013. – Vol. 27. – P. 846-854.

98 Damaskos C., Garmpi A., Nikolettos K. et al. Triple-Negative Breast Cancer: The Progress of Targeted Therapies and Future Tendencies // *Anticancer Res*. – 2019. – Vol. 39. – P. 5285-5296.

99 Lehmann B.D., Bauer J.A., Chen X. et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies // *J Clin Invest*. – 2011. – Vol. 121. – P. 2750-2767.

100 Damaskos C., Garmpi A., Nikolettos K. et al. Triple-Negative Breast Cancer: The Progress of Targeted Therapies and Future Tendencies // *Anticancer Res*. – 2019. – Vol. 39, №10. – P. 5285-5296.

101 Karnoub A.E., Weinberg R.A. Ras oncogenes: split personalities // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2008. – №9. – P. 517-531.

102 Giltane J.M., Balko J.M. Rationale for targeting the Ras/MAPK pathway in triple-negative breast cancer // *Discov Med*. – 2014. – Vol. 17. – P. 275-283.

103 Watanabe S., Otani T., Iwasa T. et al. Case of Breast Adenomyoepithelioma With a Codon-61 Mutation of HRAS // *Clin Breast Cancer*. 2019. – Vol. 19. – P. 589-592.

104 Santos F.P., Getta B., Masarova L. et al. Prognostic impact of RAS-pathway mutations in patients with myelofibrosis // *Leukemia*. – 2019. – Vol. 18. – P. 231-244.

105 Sharma J., Bhardwaj V., Purohit R. Structural Perturbations due to Mutation (H1047R) in Phosphoinositide-3-kinase (PI3K $\alpha$ ) and Its Involvement in Oncogenesis: An in Silico Insight // *ACS Omega*. – 2019. – Vol. 14, №4. – P. 15815-15823.



- 106 Sang B., Sun J., Yang D., Xu Z., Wei Y. Ras-AKT signaling represses the phosphorylation of histone H1.5 at threonine 10 via GSK3 to promote the progression of glioma // *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* – 2019. – Vol. 47. – P. 2882-2890.
- 107 Costigan D.C., Dong F. The extended spectrum of RAS-MAPK pathway mutations in colorectal cancer // *Genes Chromosomes Cancer.* – 2019. – Vol. 7. – P. 228-233.
- 108 Afrasanie V.A., Marinca M.V., Alexa-Stratulat T. et al. KRAS, NRAS, BRAF, HER2 and microsatellite instability in metastatic colorectal cancer - practical implications for the clinician // *Radiol Oncol.* – 2019. – Vol. 53. – P. 265-274.
- 109 Jemal A., Siegel R., Xu J., Ward E. Cancer statistics, 2010 // *Cancer J Clin.* – 2010. – Vol. 60, №5. – P. 277-300.
- 110 Weyandt J.D., Lampson B.L., Tang S. et al. Wild Type Hras Suppresses the Earliest Stages of Tumorigenesis in a Genetically Engineered Mouse Model of Pancreatic Cancer // *PLoS One.* – 2015. – №10. – P. 253-262.
- 111 Mottini C., Tomihara H., Carrella D. et al. Predictive signatures inform the effective repurposing of Decitabine to treat K-RAS-dependent Pancreatic Ductal Adenocarcinoma // *Cancer Res.* – 2019. – Vol. 21. – P. 1-32.
- 112 Sadow P.M., Heinrich M.C., Corless C.L., Fletcher J.A., Nose V. Absence of braf nras kras hras mutations and ret ptc gene rearrangements distinguishes dominant nodules in hashimoto thyroiditis from papillary thyroid carcinomas // *Endocr. Pathol.* – 2010. – Vol. 21(2). – P. 73-79.
- 113 Jin L., Zhu C., Qin X. Expression profile of tRNA-derived fragments in pancreatic cancer // *Oncol Lett.* – 2019. – Vol. 18. – P. 3104-3114.
- 114 García-Foncillas J., Sunakawa Y., Aderka D. et al. Distinguishing Features of Cetuximab and Panitumumab in Colorectal Cancer and Other Solid Tumors // *Front Oncol.* – 2019. – №9. – P. 849.
- 115 Kwon Y., Kim M., Jung H.S., Kim Y., Jeoung D. Targeting Autophagy for Overcoming Resistance to Anti-EGFR Treatments // *Cancers (Basel).* – 2019. – Vol. 11. – P. 1-12.
- 116 Singh K., Pruski M.A., Polireddy K. et al. Mst1/2 kinases restrain transformation in a novel transgenic model of Ras driven non-small cell lung cancer // *Oncogene.* – 2019. – Vol. 30. – P. 433-446.
- 117 Low J.L., Walsh R.J., Ang Y., Chan G., Soo R.A. The evolving immunology landscape in advanced lung cancer: first-line treatment of non-small cell lung cancer // *Ther Adv Med Oncol.* – 2019. – №11. – P. 212-224.
- 118 Chapman A.M., Sun K.Y., Ruestow P., Cowan D.M., Madl A.K. Lung cancer mutation profile of EGFR, ALK, and KRAS: Meta-analysis and comparison of never and ever smokers // *Lung Cancer.* – 2016. – Vol. 102. – P. 122-134.
- 119 Hensing T., Chawla A., Batra R., Salgia R. A personalized treatment for lung cancer: molecular pathways, targeted therapies, and genomic characterization // *Adv Exp Med Biol.* – 2014. – Vol. 799. – P. 85-117.
- 120 Ogawa F., Walters M.S., Shafquat A. et al. Role of KRAS in regulating normal human airway basal cell differentiation. *Respir Res.* – 2019. – Vol. 20. – P. 181.

- 121 Masykura N., Zaini J., Syahrudin E. et al. Impact of smoking on frequency and spectrum of K-RAS and EGFR mutations in treatment naive Indonesian lung cancer patients // *Lung Cancer (Auckl)*. – 2019. – №10. – P. 57-66.
- 122 Vatansever S., Erman B., Gümüş Z.H. Oncogenic G12D mutation alters local conformations and dynamics of K-Ras // *Sci Rep*. – 2019. – №9(1). – P. 11730.
- 123 Nissan M.H., Pratilas C.A., Jones A.M. et al. Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence // *Cancer Res*. – 2014. – Vol. 74. – P. 2340-2350.
- 124 Scaranti M., Rodrigues D.N., Banerji U. Deep and sustained radiological response after MEK-RAF inhibition in HRAS mutant apocrine carcinoma of the scalp // *Eur J Cancer*. – 2019. – №122. – P. 9-11.
- 125 Kiessling M.K., Curioni-Fontecedro A., Samaras P. et al. Mutant HRAS as novel target for MEK and mTOR inhibitors // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 39. – P. 42183-42196.
- 126 Sugita S., Enokida H., Yoshino H. et al. HRAS as a potential therapeutic target of salirasib RAS inhibitor in bladder cancer // *Int J Oncol*. – 2018. – Vol. 53. – P. 725-736.
- 127 Kovalski J.R., Shanderson R.L., Khavari P.A. Ras functional proximity proteomics establishes mTORC2 as new direct ras effector // *Oncotarget*. – 2019. – Vol. 50. – P. 5126-5135.
- 128 Kiessling M.K., Rogler G. Targeting the RAS pathway by mitogen-activated protein kinase inhibitors // *Swiss Med Wkly*. – 2015. – №2. – P. 145.
- 126 Barklis E., Stephen A.G., Staubus A.O., Barklis R.L., Alfadhli A. Organization of Farnesylated, Carboxymethylated KRAS4B on Membranes // *J Mol Biol*. – 2019. – Vol. 431. – P. 3706-3717.
- 127 Murugan A.K., Grieco M., Tsuchida N. RAS mutations in human cancers: Roles in precision medicine // *Semin Cancer Biol*. – 2019. – Vol. 18. – P. 360-369.
- 128 Aoki Y., Niihori T., Kawame H. et al. Germline mutations in HRAS proto-oncogene cause Costello syndrome // *Nature Genet*. – 2005. – Vol. 37. – P. 1038-1040.
- 129 Efremidis A.P., Agnantis N.J., Patra F., Papadopoulou C., Spandidos D.A. Clinical significance of elevated p21 ras oncogene expression in breast cancer patients // *Cancer J*. – 1989. – №2. – P. 288-291.
- 130 Agnantis N.J., Parissi P., Anagnostakis D., Spandidos D.A. Comparative study of Harvey - ras oncogene expression with conventional clinicopathologic parameters of breast cancer // *Oncology*. – 1986. – Vol. 43. – P. 36-39.
- 131 Miglietta G., Gouda A.S., Cogoi S., Pedersen E.B., Xodo L.E. Nucleic Acid Targeted Therapy: G4 Oligonucleotides Downregulate HRAS in Bladder Cancer Cells through a Decoy Mechanism // *ACS Med Chem Lett*. – 2015. – №6. – P. 1179-1183.
- 132 Ruicci K.M., Pinto N., Khan M.I. et al. ERK-TSC2 signalling in constitutively-active HRAS mutant HNSCC cells promotes resistance to PI3K inhibition // *Oral. Oncol*. – 2018. – Vol. 84. – P. 95-103.

133 Spandidos D.A., Agnantis N.J. Human malignant tumours of the breast, as compared to their respective normal tissue, have elevated expression of the Harvey ras oncogene // *Anticancer Res.* – 1984. – №4. – P. 269-272.

134 Kasid A., Lippman M.E. Estrogen and oncogene mediated growth regulation of human breast cancer cells // *J Steroid Biochem.* – 1987. – Vol. 27. – P. 465-470.

135 Sommers C.L., Papageorge A., Wilding G., Gelmann E.P. Growth properties and tumorigenesis of MCF-7 cells transfected with isogenic mutants of ras // *Cancer Res.* – 1990. – Vol. 50. – P. 67-71.

136 Eckert L.B., Repasky G.A., Ulku A.S. et al. Involvement of Ras activation in human breast cancer cell signaling, invasion, and anoikis // *Cancer Res.* – 2004. – Vol. 64. – P. 4585-4592.

137 Baum J.E., Sung K.J., Tran H., Song W., Ginter P.S. Mammary Epithelial-Myoepithelial Carcinoma: Report of a Case With HRAS and PIK3CA Mutations by Next-Generation Sequencing // *Int J Surg Pathol.* – 2019. – Vol. 27. – P. 441-445.

138 Demetrios A., Spandidos D.A. et al. Human Malignant Tumors of the Breast, as Compared to their Respective Normal Tissue, Have Elevated of the Harvey ras Oncogene // *Anticancer Research.* – 1984. – №4. – P. 269-272.

139 Sharif S., Moran A., Huson S.M. et al. Women with neurofibromatosis 1 are at a moderately increased risk of developing breast cancer and should be considered for early screening // *J Med Genet.* – 2007. – Vol. 44. – P. 481-484.

140 von Lintig F.C., Dreilinger A.D., Varki N.M. et al. Ras activation in human breast cancer // *Breast Cancer Res Treat.* – 2000. – Vol. 62. – P. 51-62.

141 Kasid A., Lippman M.E., Papageorge A.G. et al. Transfection of vrasH DNA into MCF-7 human breast cancer cells bypasses dependence on estrogen for tumorigenicity // *Science.* – 1985. – Vol. 228. – P. 725-728.

142 Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy // *Nat. Rev. Cancer.* – 2003. – №2. – P. 11-22.

143 Guran S., Safali M. A case of neurofibromatosis and breast cancer: loss of heterozygosity of NF1 in breast cancer // *Cancer Genet Cytogenet.* – 2005. – Vol. 156. – P. 86-88.

144 Garg M., Prabhakar N., Singla V. et al. Breast cancer in a patient with neurofibromatosis type 1 // *Breast J.* – 2018. – Vol. 24. – P. 666-668.

145 Efremidis A.P., Agnantis N.J., Patra F. et al. Clinical significance of elevated p21 ras oncogene expression in breast cancer patients // *Cancer J.* – 1989. – №2. – P. 288-291.

146 Thammaiah C.K., Jayaram S. Role of let-7 family microRNA in breast cancer // *Noncoding RNA Res.* – 2016. – №1. – P. 77-82.

147 Gong C., Yu F., Yao H. et al. let-7 Regulates Self Renewal and Tumorigenicity of Breast Cancer Cells // *Cell.* – 2007. – Vol. 131. – P. 1109-1123.

148 Geyer F.C., Li A., Papanastasiou A.D. et al. Recurrent hotspot mutations in HRAS Q61 and PI3K-AKT pathway genes as drivers of breast adenomyoepitheliomas // *Nature Communication.* – 2018. – №9. – P. 1816-1824.

149 Tong L., Yang X.-X., Liu M.-F. et al. Mutational Analysis of Key EGFR Pathway Genes in Chinese Breast Cancer Patients // Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. – 2012. – Vol. 12. – P. 5599-5603.

150 Park S., Koo J.S., Kim M.S. et al. Characteristics and outcomes according to molecular subtypes of breast cancer as classified by a panel of four biomarkers using immunohistochemistry // Breast. – 2012. – Vol. 21. – P. 50-57.

151 Perou C.M., Sorlie T., Eisen M.B. et al. Molecular portraits of human breast tumours // Nature. – 2001. – Vol. 406. – P. 747-752.

152 de Oliveira Taveira M., Nabavi S., Wang Y. Genomic characteristics of trastuzumab-resistant Her2-positive metastatic breast cancer // Journal of cancer research and clinical oncology. – 2017. – Vol. 143. – P. 1255-1262.

153 Pareja F., Geyer F.C., Brown D.N. et al. Assessment of HMGA2 and PLAG1 rearrangements in breast adenomyoepitheliomas // NPJ Breast Cancer. – 2019. – Vol. 18. – P. 5-6.

154 Martin V., Botta F., Zanellato E. Molecular characterization of EGFR and EGFR-downstream pathways in triple negative breast carcinomas with basal like features // Histol Histopathol. – 2012. – Vol. 27. – P. 785-792.

155 Untch M., Jackisch C., Schneeweiss A. et al. NAB-Paclitaxel Improves Disease-Free Survival in Early Breast Cancer: GBG 69-GeparSepto // J Clin Oncol. – 2019. – Vol. 37. – P. 2226-2234.

156 А.с. 3930 Иммуногистохимические особенности H-Ras онкобелков при раке молочной железы после комбинированного лечения / А.М. Жумакаева, К.Д. Рахимов, Л.И. Арыстан; опубл. 11.05.19, Бюл. №3930. – 2 с.

157 Park Y.H., Jung H.H., Do I.G., Cho E.Y. A seven-gene signature can predict distant recurrence in patients with triple-negative breast cancers who receive adjuvant chemotherapy following surgery // International Journal of Cancer. – 2015. – Vol. 136. – P. 1976-1984.

158 Horn D., Hess J., Freier K., Hoffmann J., Freudlsperger C. Targeting EGFR-PI3K-AKT-mTOR signaling enhances radiosensitivity in head and neck squamous cell carcinoma // Expert Opin. Ther Targets. – 2015. – Vol. 19, №6. – P. 795-805.

159 Murugan A.K., Grieco M., Tsuchida N. RAS mutations in human cancers: Roles in precision medicine // Seminars in cancer biology. – 2019. – Vol. 23. – P. 1044.

160 Жумакаева А.М., Рахимов К.Д., Омарова И.М. Экспериментальное исследование HRAS онкобелков при раке молочной железы // Матер. 16-й всеросс. науч.-практ. конф. с междунар. участием памяти А.Ю. Барышникова «Новые отечественные противоопухолевые препараты и медицинские технологии: проблемы, достижения, перспективы». – Екатеринбург, 2019. – С. 313-314.

161 Zhumakayeva A.M., Rakhimov K.D., Omarova I.M. et al. Experimental, clinical and morphological analysis of H-Ras oncoproteins for locally advanced breast cancer // Open access macedonian journal of medical sciences. – 2019. – Vol. 7(19). – P. 3153-3157.

162 Karnoub A.E., Weinberg R.A. Ras oncogenes: split personalities // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2008. – №9. – P. 517-531.

163 Thor A., Ohuchi N., Hand P.H. Ras gene alterations and enhanced levels of ras p21 expression in a spectrum of benign and malignant human mammary tissues // *Lab Invest.* – 2006. – Vol. 55. – P. 603-615.

164 Gibbs J.B., Oliff A., Kohl N.E. Farnesyltransferase inhibitors: Ras research yields a potential cancer therapeutic // *Cell.* – 2004. – Vol.77. – P. 175-178.

165 Жумакаева А.М., Елешов Д.З., Рахимов К.Д., Адекенов С.М. Перспективы персонализированной фармакотерапии рака молочной железы ингибиторами фанезилпротеинтрансферазы // *Матер. 15-й всеросс. науч.-практ. конф. с междунар. участием памяти им. А.Ю. Барышникова «Отечественные противоопухолевые препараты».* – М., 2018. – С. 29.

166 Rowinsky E.K., Windle J.J., Von Hoff D.D. Ras protein farnesyltransferase: a strategic target for anticancer therapeutic development // *J Clin Oncol.* – 2009. – Vol. 17. – P. 3631-3652.

167 Omer C.A., Abrams M.T. Evaluation of farnesyhprotein transferase and geranylgeranylprotein transferase inhibitor combinations in preclinical models // *Cancer Res.* – 2001. – Vol. 61. – P. 8758-8768.

168 Fearon E.R. K-ras gene mutation as a pathogenetic and diagnostic marker in human cancer // *J Natl Cancer Inst.* – 2013. – Vol. 85. – P. 1978-1980.

169 Sebti S.M., Hamilton A.D. Farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I inhibitors and cancer therapy: lessons from mechanism and bench-to-bedside translational studies // *Oncogene.* – 2006. – Vol. 19. – P. 6584-6593.

170 Li T., Sparano J.A. Inhibiting Ras signaling in the therapy of breast cancer // *Clin Breast Cancer.* – 2003. – №3. – P. 405-416.

171 Жумакаева А.М., Рахимов К.Д., Омарова И.М., Арыстан Л.И. Значение экспрессии онкобелков Hras в терапии рака молочной железы // *Матер. 2-й рос. Зимней Школы молодых ученых и врачей по фармакогенетике, фармакогеномике и персонализированной терапии.* – М., 2018. – С. 20.

172 Sparano J.A., Moulder S., Kazi A. Targeted inhibition of farnesyltransferase in locally advanced breast cancer: a phase I // *J Clin Oncol.* – 2006. – Vol. 24. – P. 3013-3018.

173 De Azambuja E., Cardoso F., de Castro G. et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a metaanalysis of published studies involving 12,155 patients // *Brit. J. Cancer.* – 2007. – Vol. 96. – P. 1504-1513.

174 Jalava P., Kuopio T., Juntti-Patinen L. Ki67 immunohistochemistry: a valuable marker in prognostication but with a risk of misclassification: proliferation subgroups formed based on Ki67 immunoreactivity and standardized mitotic index // *Histopathology.* – 2006. – Vol. 48. – P. 674-682.

175 Kruger K., Stefansson I.M., Collett K. et al. Microvessel proliferation by co-expression of endothelial nestin and Ki-67 is associated with a basal-like phenotype and aggressive features in breast cancer // *Breast.* – 2013. – Vol. 22. – P. 282-288.

- 176 Li F.Y., Wu S.G., Zhou J. et al. Prognostic value of Ki-67 in breast cancer patients with positive axillary lymph nodes: a retrospective cohort study // PLoS One. – 2014. – Vol. 9. – P. 87264.
- 177 Stuart-Harris R., Caldas C., Pinder S.E., Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients // Breast. – 2008. – Vol. 17. – P. 323-334.
- 178 Yerushalmi R., Woods R., Ravdin P.M. et al. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential // The lancet oncology. – 2010. – Vol. 11. – P. 174-183.
- 179 Yoshioka T., Hosoda M., Yamamoto M. et al. Prognostic significance of pathologic complete response and Ki67 expression after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. Breast cancer // Breast Cancer. – 2013. – Vol. 22. – P. 185-191.
- 180 Wiesner F.G., Magener A., Fasching P.A. et al. Ki-67 as a prognostic molecular marker in routine clinical use in breast cancer patients // Breast. – 2009. – Vol. 18. – P. 135-141.
- 181 Xue C., Wang X., Peng R. et al. Distribution, clinicopathologic features and survival of breast cancer subtypes in Southern China // Cancer science. – 2012. – Vol. 103. – P. 1679-1687.
- 182 Matsubara N., Mukai H., Itoh K., Nagai S. Prognostic impact of Ki-67 overexpression in subgroups categorized according to St. Gallen with early stage breast cancer // Oncology. – 2011. – Vol. 81. – P. 345-352.
- 183 Johnston S., Semiglazov V., Manikhas G. et al. A randomised, blinded, phase II study of tipifarnib (Zarnestra) combined with letrozole in the treatment of advanced breast cancer after antiestrogen therapy // J Clin Oncol. – 2006. – Vol. 24. – P. 3013-3018.
- 184 Kerklaan B.M., Diéras V., Le Tourneau C. et al. Phase I study of lonafarnib (SCH66336) in combination with trastuzumab plus paclitaxel in Her2/neu overexpressing breast cancer: EORTC study 16023 // Cancer Chemother Pharmacol. – 2013. – Vol. 71. – P. 53-62.
- 185 Feldkamp M.M., Lau N., Roncari L., Guha A. Isotype-specific Ras. GTP-levels predict the efficacy of farnesyl transferase inhibitors against human astrocytomas regardless of Ras mutational status // Cancer Res. – 2001. – Vol.61. – P. 4425-4431.
- 186 Johnston S.R.D., Hickish T., Ellis P. et al. Phase II study of the efficacy and tolerability of two dosing regimens of the farnesyl transferase inhibitor, R115777, in advanced breast cancer // J Clin Oncol. – 2003. – Vol. 21. – P. 2492-2499.
- 187 Lebowitz P.F., Eng-Wong J., Widemann B.C. et al. A phase I trial and pharmacokinetic study of tipifarnib, a farnesyltransferase inhibitor, and tamoxifen in metastatic breast cancer // Clin Cancer Res. – 2005. – Vol. 11. – P. 1247-1252.
- 188 Sparano J.A., Moulder S., Kazi A. et al. Targeted inhibition of farnesyltransferase in locally advanced breast cancer: a phase I and II trial of tipifarnib plus dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide // J Clin Oncol. – 2006. – Vol. 24. – P. 3013-3018.

189 Sparano J.A., Moulder S., Kazi A. et al. Phase II trial of tipifarnib plus neoadjuvant doxorubicin-cyclophosphamide in patients with clinical stage IIB-III breast cancer // Clin Cancer Res. – 2009. – Vol. 15. – P. 2942-2948.

190 Andreopoulou E., Vigoda I.S., Valero V. et al. Phase I-II study of the farnesyl transferase inhibitor tipifarnib plus sequential weekly paclitaxel and doxorubicin-cyclophosphamide in HER2/neu-negative inflammatory carcinoma and non-inflammatory estrogen receptor-positive breast carcinoma // Breast Cancer Res Treat. – 2013. – Vol. 141. – P. 429-435.

191 Li T., Christos P.J., Sparano J.A. et al. Phase II trial of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib plus fulvestrant in hormone receptor-positive metastatic breast cancer: New York Cancer Consortium Trial P6205 // Ann Oncol. – 2009. – Vol. 20. – P. 642-647.

192 Johnston S.R.D, Semiglazov V.F., Manikhas G.M. et al. A phase II, randomized, blinded study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib combined with letrozole in the treatment of advanced breast cancer after antiestrogen therapy // Breast Cancer Res Treat. – 2008. – Vol. 110. – P. 327-335.

193 Liu G., Marrinan C.H., Taylor S.A. et al. Enhancement of the antitumor activity of tamoxifen and anastrozole by the farnesyltransferase inhibitor lonafarnib (SCH66336) // Anticancer Drugs. – 2007. – Vol. 18. – P. 923-931.

194 Marcus A.I., Zhou J., O'Brate A. et al. The synergistic combination of the farnesyl transferase inhibitor lonafarnib and paclitaxel enhances tubulin acetylation and requires a functional tubulin deacetylase // Cancer Res. – 2005. – Vol. 65. – P. 3883-3893.

195 Taylor J.S., Reid T.S., Terry K.L., Casey P.J., Beese L.S. Structure of mammalian protein geranylgeranyltransferase type-I // EMBO J. – 2003. – Vol. 22. – P. 5963-5974.

196 Kerklaan C., Sun J., Ohkanda J., Coppola D. et al. Geranylgeranyltransferase I inhibitor GGTI-2154 induces breast carcinoma apoptosis and tumor regression in H-Ras transgenic mice // Cancer Res. – 2003. – Vol. 63. – P. 8922-8929.

197 Шайкенов Т.Е., Бейкер Ф.Л., Вульфенбаргер Л., Адекенов С.М. Влияние арглабина на индукцию апоптоза опухолевых клеток и ингибирование фарнезилтрансферазы как возможный механизм действия // Росс. биотерапевт. журнал. – 2005. – №2. – С. 18-23.

198 Мусулманбеков К.Ж. Результаты клинических испытаний препарата «Арглабин» // Клинические аспекты применения противоопухолевого препарата «Арглабин» сб. науч. тр. – Караганда, 2002. – С. 46-51.

199 Сирота В.Б. Клиническая эффективность препарата «Арглабин» // Фармацевтический бюллетень РК. – 2012. – №1. – С. 22-28.

200 Shaikenov T.E., Adekenov S.M., Basset S., Trivedy M., Wolfenbarger L. Arglablin is a novel inhibitor of the farnesylation of *ras* proteins // Reports of Ministry of Science-Academy of sciences Republic of Kazakhstan. – 1998. – №5. – P. 64-75.

201 Жумакаева А.М., Сариев А.К., Сычев Д.А., Адекенов С.М. Экспериментальное исследование биотрансформации сесквитерпенового

лактона арглабина // Матер. 14-й всеросс. науч.-практ. конф. с междунар. участием памяти А.Ю. Барышникова «Отечественные противоопухолевые препараты». – М., 2017. – С. 36-37.

202 Жумакаева А.М., Омарова И.М., Рахимов К.Д. и др. Метаболизм гидрохлорида диметиламиноарглабина и перспективы персонализированной терапии рака молочной железы // Матер. 6-го съезда онкологов и радиологов Казахстана с междунар. участием. – Алматы, 2017. – С. 84.

203 Рахимов К.Д. Доклиническое изучение нового противоопухолевого препарата «Арглабин» // Клинические аспекты применения противоопухолевого препарата «Арглабин» сб. науч. тр. – Караганда, 2002. – С. 36-40.

204 Рахимов К.Д. Новые природные соединения в химиотерапии лекарственно резистентных опухолей: дис. ... док. мед. наук. – М., 1991. – 455 с.

205 Досаханов А.Х., Кострова Е.В., Сирота В.Б. и др. Радиомодификация фторпиримидинами при раке молочной железы // Клинич. медицина Казахстана. – 2006. – №2(6). – С. 148-151.

206 Омарова И.М. Клинико-фармакологическая характеристика препарата «Арглабин» // Российский биотерапевтический журнал. – 2002. – №2 – С. 96.

207 Жумакаева А.М., Сирота В.Б., Рахимов К.Д. и др. Эффективность нового режима неoadъювантной терапии рака молочной железы // Матер. междунар. симпоз. «Астана Биотех 2018». – Астана, 2018. – С. 61.

208 Жумакаева А.М., Елешов Д.З., Рахимов К.Д. и др. Изучение метаболических особенностей оригинального препарата гидрохлорида диметиламиноарлабина // Вестник АГИУВ. – 2017. – №3. – С. 86-90.

209 Сирота В.Б., Мусулманбеков К.Ж. Опыт применения арглабина в лечении местнораспространенного рака молочной железы // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – №2. – С. 75.

210 Fomenko Y., Sirota V., Omarova I., Kabildina N., Amanov A. Neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer // Georgian Medical News. – 2017. – Vol. 3 (264). – P. 11-16.

211 Zhumakayeva A.M., Sirota V.B., Rakhimov K.D. et al. Long-term results of combination therapy for locally advanced breast cancer // Georgian Medical News. – 2018. – Vol. 9(282). – P. 30-35.

212 Сирота В.Б., Мусулманбеков К.Ж., Досаханов А.Х., Нукубаева Г.Б. Радиомодифицирующее действие арглабина в комплексном лечении рака молочной железы // Современные аспекты онкологии и радиологии: сб. науч. тр. – Алматы, 2002. – С. 226-229.

213 Сирота В.Б., Нельдыбаев Е.М., Мусулманбеков К.Ж. и др. Радиосенсибилизирующее действие арглабина при внутривенном применении в комплексном лечении рака молочной железы // Онкология 2000: тез. 2-го съезда онкологов стран СНГ. – Киев, 2000. – С. 945.



214 Лавникова Г.А., Гош Т.Е., Талалаева А.В. Гистологический метод количественной оценки степени лучевого повреждения опухоли // Мед. радиол. – 1978. – №3. – С. 6-9.

215 Remmele W., Stegner H.E. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue // Pathologe. – 1987. – №8. – P. 138-140.

216 Корнеева И.А., Новикова Е.Г., Рубцова Н.А. и др. Современные подходы к оценке эффективности лечения опухолей репродуктивной системы с использованием критериев // Российский онкологический журнал. – 2012. – №3. – С. 54-56.

217 Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999. – 459 с.

218 Каас Р., Гувертс М., Дэнэ Ж., Денут М. Современная актуарная теория риска / пер. с англ. А.А. Новоселова; под ред. В.К. Малиновского. – М.: Янус-К, 2007. – 372 с.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

Свидетельство о государственной регистрации прав на объект авторского права

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ

РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

АВТОРЛЫҚ ҚҰҚЫҚПЕН ҚОРҒАЛАТЫН ОБЪЕКТІЛЕРГЕ ҚҰҚЫҚТАРДЫҢ  
МЕМЛЕКЕТТІК ТІЗІЛІМГЕ МӘЛІМЕТТЕРДІ ЕНГІЗУ ТУРАЛЫ  
КУӘЛІК


2019 жылғы «11» маусым № 3930

Автордың (лардың) жөні, аты, әкесінің аты (егер ол жеке басын куәландыратын құжатта көрсетілсе):  
ЖУМАКАЕВА АЙНУРА МАРАТОВНА, РАХИМОВ ҚАЙРОЛЛА ДЮСЕНБАЕВИЧ, АРЫСТАН ЛЕЙЛА  
ИБАТУЛЛАҚЫЗЫ

Авторлық құқық объектісі: ҒЫЛЫМИ ТУЫНДЫ

Объектінің атауы: Иммуногистохимические особенности H-Ras онкобелков при раке молочной железы  
после комбинированного лечения

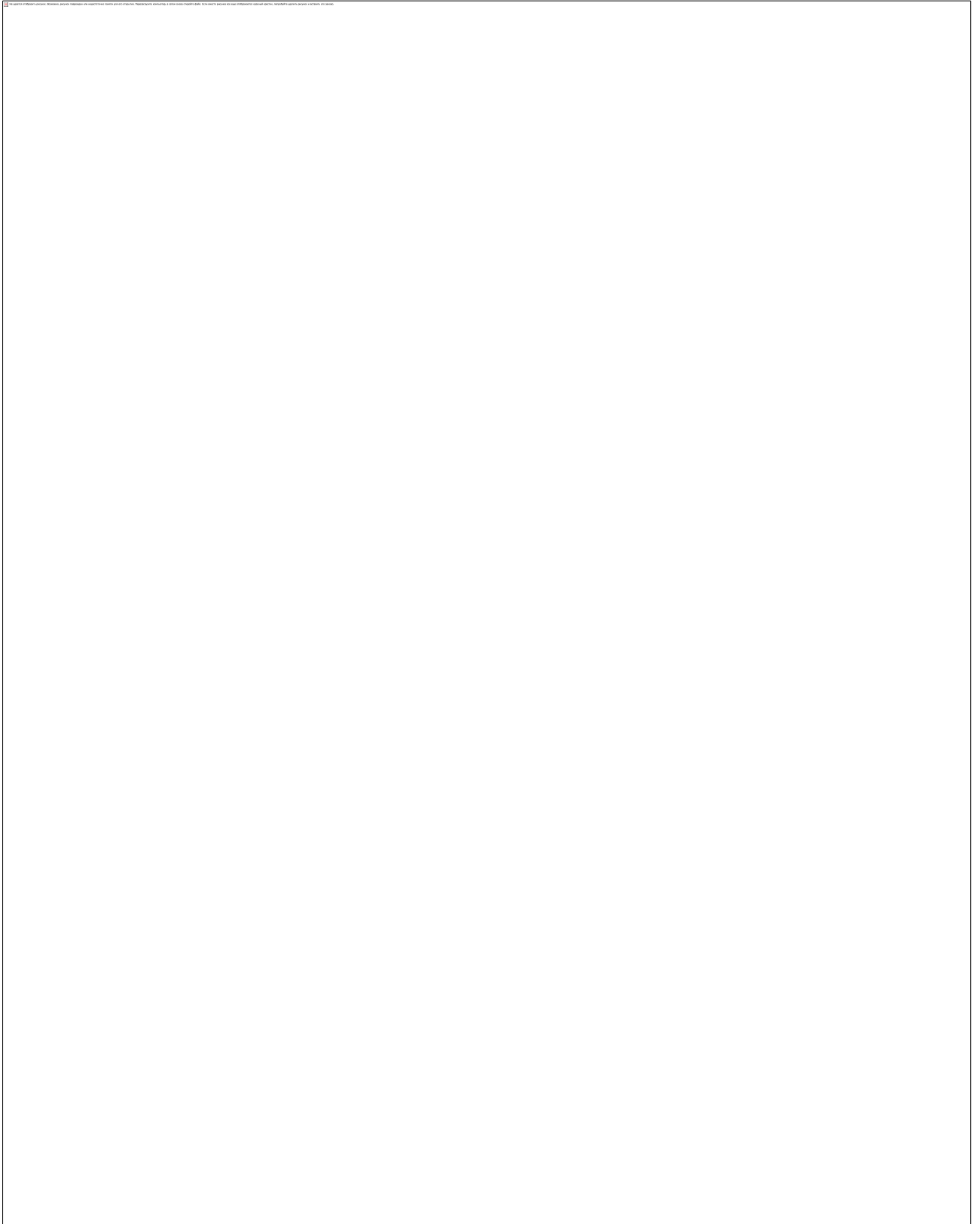
Объектіні жасаған күні: 07.06.2019

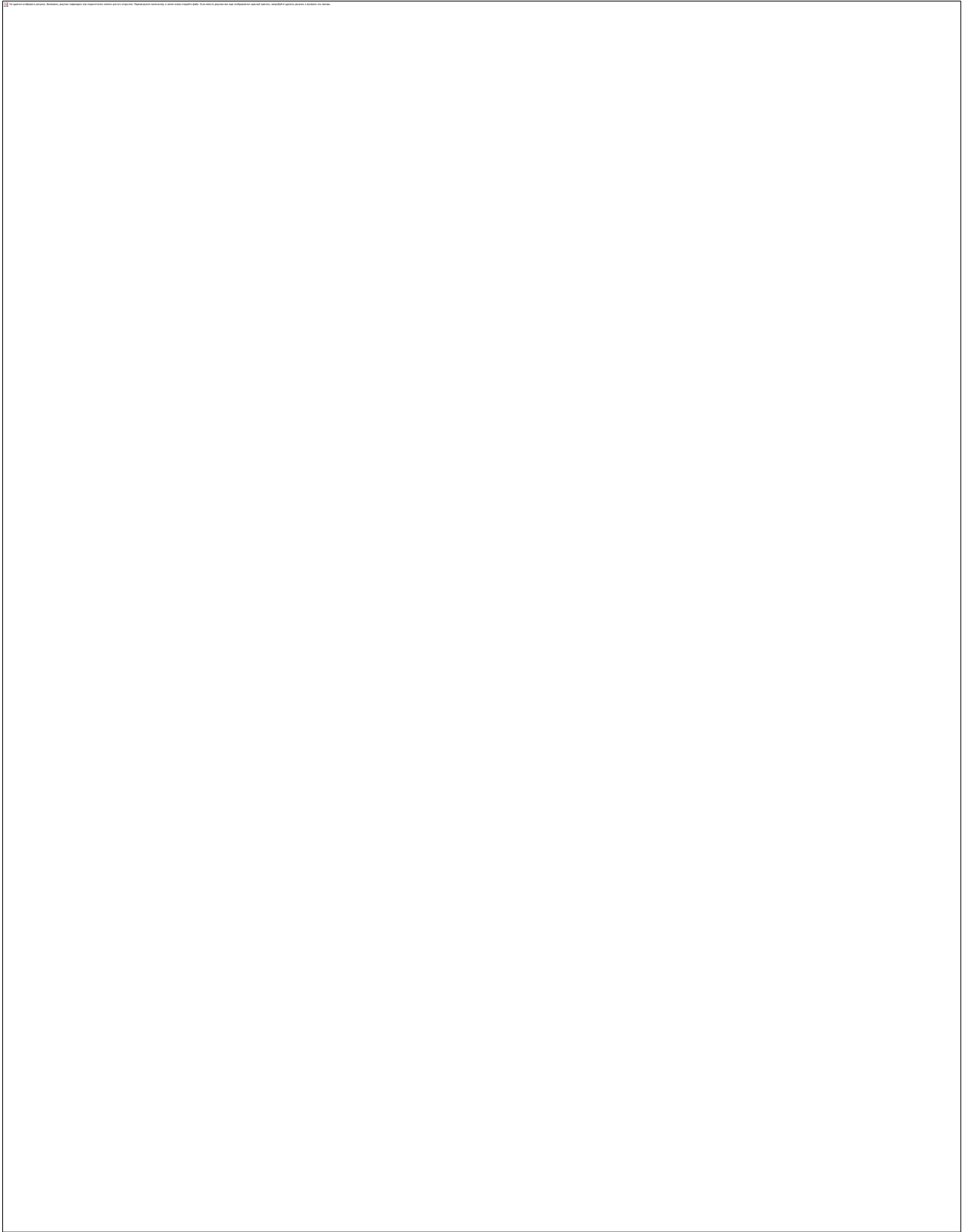


Құжат түпнұсқасының тіркеліміне қарапайым көрсеткішпен  
"Авторлық құқық" бөлімінде жетілдіріліп, болса да, тіркеліміне қарапайым қарайтын.  
Подлинность документа возможно проверить на сайте karpalint.kz

## **ПРИЛОЖЕНИЕ Б**

### **Акт внедрения алгоритма иммуногистохимической верификации H-Ras онкобелков при РМЖ**







## ПРИЛОЖЕНИЕ В

Грантовый проект Комитета науки МОН РК «Фармакогенетическое изучение терпеноидных молекул и молекулярно-генетические механизмы их действия»,  
№AP05130956

**5013 ТІРКЕУ КАРТАСЫ**

01

Кайда: 050096, Алматы, Бөгенбай батыр көшесі, 221 «Ұлттық мемлекеттік ғылым-техникалық сараптама орталығы» АҚ т. 3780519

5418 Шығыс №, күні  
10.05.2018 ж. 01-1/18-108

5436 Мемлекеттік тіркелу нөмірі  
0188PK-00008

5517 Өзгертілген мемлекеттік тіркелу нөмірі

Жұмысты орындау мерзімі  
7353 Басталуы 01.2018 ж. 7362 Аяқталуы 11.2020 ж.

7146 Жұмысты жүргізу үшін негіздеме	7137 Құнға бөліне жолдар бойынша қаражат көздері және көлемі (тенге)	Барлығы	1- жыл	2- жыл	3- жыл
07 Мемлекеттік бағдарлама	13 Мемлекеттік бюджеттің қаражаты	27753,65	10000,0	9064,66	8688,99
08 Республикалық ғылыми-техникалық бағдарлама (РҒТБ)	22 Тапсырыс берушінің қаражаты				
09 Салалық (секторальды) бағдарлама	04 Мемшілгі қаражат				
10 Іргелі зерттеулер бағдарламасы (ІЗБ)	14 Өзіндік гранттар				
11 Қолданбалы зерттеулер бағдарламасы	21 Ғылым қоры				
12 Инновациялық жоба	15 Халықаралық гранттар, жәрдеп				
13 Ғылым (технологиялық) жоба (ғылым қоры)	31 Басқалар				
25 Мемлекетаралық бағдарлама					
61 Өңірлік бағдарлама					
34 Министрліктің тапсырмасы					
52 Үйімімен шарт жасау					
43 Инталы					
17 Грант					

7191 Жұмыс түрі

19 Іргелі ғылыми-зерттеу жұмысы  
48 Қолданбалы ғылыми-зерттеу жұмысы  
37 Тәжірибелі-конструкторлық, жобалау-конструкторлық  
66 Жобалау-технологиялық

7020 Бағдарламаның шифры  
AP05130956

Негізгі ұйым туралы мәліметтер

2457 КҰӘЖК коды 2934 Телефоны 2394 Факсы 3033 Электрондық мекен-жайы 2754 Қала  
4076 ІБІР 8(7212)433127 8(7212)433127 phyo\_ric@mail.ru Құрағынлы к.

1332 Министрліктің (ведомствоның) қысқартылған атауы  
ҚР БҒМ ҒК

2151 Үйімінің толық атауы  
«ФитоХимия» ғылым-индустрия холдингі акционерлік қоғамы

2358 Үйімінің қысқартылған атауы  
«ФИТОХИМИЯ» ХТӨХ» АҚ

2655 Үйімінің мекен-жайы (индекс, республика, облыс, қала, көше, үй)  
100009, Қазақстан Республикасы, Қарағанды к., М. Газадиев көс. 4

2142 Қоса орындаушы ұйым

9126 Тапсырыс беруші  
Қазақстан Республикасы Білім және ғылым министрлігінің Ғылым комитеті

7021 Шенеберінде жұмыс орыдалатын бағдарлама тапсырмасының шифры

9027 Жұмыстың атауы

Терпенонд молекулаларын фармакогенетикалық зерттеу және олардың әсерінің молекулалық-генетикалық механизмдері.

9153 Күпілетін нәтижелер

Сүт безінің катерлі ісігіне шалдыққан науқастардың медициналық карталары, зерттеуге енгізу өлшемдеріне сәйкес келетін емделушілерді таңдап алу.

Ісік үдерісінің сатысы, жүргізілген емдеу, науқастар өмірінің ұзақтығы туралы деректер. Зертханалық және аспаптық зерттеу деректері. Ісіктің гистологиялық түрі туралы деректер. Гистологиялық блоктардан ДНҚ бөліп алудың іріктемелі әдістері.

Сүт безінің катерлі ісігіне шалдыққан науқастарда Вестерн-блоттинг әдісімен HRAS онкологиялық ақуыздар экспрессиясы деңгейінің мөлшерін бағалау нәтижелері.

Сүт безінің катерлі ісігі кезіндегі HRAS онкогендерінің экспрессиясы және ісіктің клиникалық-морфологиялық көрінісі арасындағы өзара байланыс нәтижелері және емделушілер өмірінің ұзақтығы арасындағы өзара байланыс нәтижелері.

HRAS онкологиялық ақуыздар мен гендерінің экспрессиялары және сүт безінің катерлі ісігі тінінің морфологиялық ерекшеліктері арасындағы, сондай-ақ «Арглабин» препаратының молекулалық әрекет ету механизмдері және HRAS гендерінің анықталған экспрессиясы арасындағы өзара байланысты анықтау.



	Тегі, аты-жөні	Ғылыми дәрежесі, ғылыми атағы	Қолы	Мөр орны
Ұйым жетекшісі	6111 Әдекенов С.М.	6210 ҚР ҰҒА академигі, Х.ғ.д., профессор		
Жұмыс жетекшісі	6120 Рахимов Қ.Д.	6228 ҚР ҰҒА академигі, М.ғ.д., профессор		

5634 ӘОК индекстері

615.017:616.079; 615.2/3

5274 Геологиялық код шифрі

7434 Күні

19.03.2019

5616 Тақырыптық айдарлардың кодтары

34.45.05			
----------	--	--	--

5643 Кілт сөздер

АҚУЫЗДАР ЭКСПРЕССИЯСЫ  
 HRAS ОНКОГЕНДЕРІ  
 СҮТ БЕЗІНІҢ ҚАТЕРЛІ ІСІГІ  
 ФАРМАКОГЕНЕТИКА  
 АРГЛАБИН

01

Құда: 050096, Алматы,  
 ұл. Бөгенбай батыра, 221  
 АО «Ғылыми-техникалық ақпараттық  
 қызметтердің қамтамасыз ету орталығы»  
 т. 3780319

5418 Исходный №, дата  
 М-1/13-168 от 16.03.2018

5436 Номер госрегистрации  
 0-118PK 00008

5517 Измененный номер госрегистрации	Сроки выполнения работы				
	7353 Начало 01.2018 г.	7362 Окончание 11.2020 г.			
7146 Основание для проведения работы	7137 Источники и объем финансирования по календарным годам (тыс. тенге)	Всего	1-ый год	2-ой год	3-ий год
07 Государственная программа	13 Средства госбюджета	27 713,63	10 000,0	9 004,66	8 608,97
08 Республиканская научно-техническая программа (РНТП)	22 Средства заказчика				
09 Отраслевая (секторальная) программа	04 Собственные средства				
10 Программа фундаментальных исследований (ПФИ)	14 Отчетные выплаты				
11 Программа прикладных исследований	21 Фонд науки				
12 Инновационный проект	15 Международные гранты, фонды				
13 Поискový (рисковый) проект (фонд науки)	31 Прочие				
25 Межгосударственная программа					

7191 Вид работы

39 Научно-исследовательская работа фундаментальная  
 48 Научно-исследовательская работа прикладная  
 57 Опытно-конструкторская, проектно-конструкторская  
 66 Проектно-технологическая

7020 Шифр программы  
 AP05130956

Сведения об основной организации

3457 Код ОКПО	2934 Телефон	2394 Факс	3033 Электронный адрес	2754 Город
40761819	8 (7212)433127	8(7212)433127	phyto_pio@mail.ru	Караганда

1332 Сокращенное наименование министерства (ведомства)  
 КН МОН РК

2151 Полное наименование организации  
 Акционерное общество «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия»

2358 Сокращенное наименование организации  
 АО «МНПХ «ФИТОХИМИЯ»

2655 Местонахождение организации (индекс, республика, область, город, улица, дом)  
 100009, Республика Казахстан, г. Караганда, ул. М. Газаиева, 4

2142 Организация-исполнитель

9126 Заказчик  
 Комитет науки Министерства образования и науки Республики Казахстан

7021 Шифр задания программы, в рамках которой выполняется работа



## 9027 Наименование работы

Фармакогенетическое изучение терпеноидных молекул и молекулярно-генетические механизмы их действия.

## 9153 Ожидаемые результаты

Медицинские карты больных с раком молочной железы, выбор пациентов, соответствующих критериям включения в исследование.

Данные по стадии опухолевого процесса, проведенном лечении, продолжительности жизни больных. Данные лабораторных и инструментальных обследований. Данные о гистологическом типе опухоли. Селективные методы выделения ДНК из гистологических блоков.

Результаты количественной оценки уровня экспрессии онкобелков HRAS методом Вестерн-блоттинга у больных с раком молочной железы.

Результаты взаимосвязи экспрессии онкогенов HRAS при раке молочной железы с клинко-морфологической картиной опухоли и с продолжительностью жизни пациентов.

Установление взаимосвязи экспрессии генов и онкобелков HRAS с морфологическими особенностями опухолевой ткани рака молочной железы и молекулярных механизмов действия препарата «Арглабин» с выявленной экспрессией HRAS генов.



	Фамилия, имя, отчество	Ученая степень, ученое звание	Подпись	Место печати
Руководитель организации	6111 Адекенов С.М.	6210 академик НАН РК, д.х.н., профессор		
Руководитель работы	6120 Рахимов К.Д.	6228 академик НАН РК, д.м.н., профессор		

## 5634 Индексы УДК

615.017:616.079; 615.2/3

## 5274 Шифр геофонда

17.13.2018

## 5616 Коды тематических рубрик

34.45.05

## 5643 Ключевые слова

ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКОВ

HRAS ОНКОГЕНЫ

РАК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

ФАРМАКОГЕНЕТИКА

АРГЛАБИН



## ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Заключение РГП на ПХВ «Национальный центр экспертизы лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники»





