

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
РАДИОЛОГИИ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Гузик Анастасия Андреевна

Влияние онтогенетических факторов на экспрессию NIS и опухолевую прогрессию при трижды негативном раке молочной железы

1.5.23. – Биология развития, эмбриология

3.1.6. – Онкология, лучевая терапия

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук

Демяшкин Григорий Александрович

кандидат медицинских наук

Шегай Петр Викторович

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1. Морфология и физиология молочной железы.....	16
1.2. Эпидемиология, клинико-морфологические и молекулярно-биологические особенности трижды негативного рака молочной железы	19
1.3. Структура и функция натрий-йод симпортера (NIS) в нормальной физиологии	23
1.4. Экспрессия NIS в опухолях молочной железы и ее клиническое значение	26
1.5. Влияние онтогенетических факторов на развитие и прогрессию рака молочной железы, а также на экспрессию NIS	28
1.6. Заключение по обзору литературы.....	32
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	35
2.1. Дизайн исследования	35
2.2. Методы исследования	38
2.2.1. Сбор клинико-anamнестических данных	38
2.2.2. Гистологическое исследование	41
2.2.3. Иммуногистохимическое исследование	42
2.2.4. Мультиплексное иммуногистохимическое исследование	45
2.2.5. Морфометрические методы.....	48
2.2.6. Анализ остаточной опухолевой нагрузки по системе RCB и критериев оценки ответа солидных опухолей по системе RECIST 1.1	50
2.2.7. Статистические методы	53
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	54
3.1. Клинико-anamнестические данные когорты	54
3.2. Гистологическое исследование	56
3.3. Иммуногистохимическое исследование	58
3.4. Характеристика NIS	60

3.4.1. Иммуногистохимическая характеристика экспрессии NIS в трижды негативном раке молочной железы в зависимости от количества беременностей, завершившихся родами.....	60
3.4.2. Сравнительный анализ между уровнем экспрессии NIS, GATA-3 и маммаглобин.	65
3.4.3. Корреляция между возрастом и уровнем экспрессии NIS.....	67
3.5. Мультиплексное иммуногистохимическое исследование	68
3.5.1. Ко-локализация NIS, TGF- β , p53 в трижды негативном раке молочной железы.....	68
3.5.2. Оценка Т-клеточного компонента микроокружения опухоли в зависимости от количества беременностей, завершившихся родами.....	72
3.5.3. Оценка сосудистого и макрофагального компонентов микроокружения опухоли в зависимости от количества беременностей, завершившихся родами. ..	75
3.5.4. Оценка ко-локализации компонентов секрета тучных клеток при трижды негативном раке молочной железы в зависимости от количества беременностей, завершившихся родами.....	79
3.6 Корреляция между уровнем экспрессии NIS в атипичных клетках трижды негативного рака молочной железы и остаточной опухолевой нагрузки по системе RCB и критериям оценки ответа солидных опухолей по системе RECIST 1.1	83
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	88
4.1. Анализ экспрессии NIS в трижды негативном раке молочной железы в зависимости от количества беременностей.....	88
4.2. Сравнительный анализ степени экспрессии NIS в клетках трижды негативного рака молочной железы с экспрессией маммаглобина и GATA-3.....	91
4.3. Анализ влияния возраста на экспрессию NIS в атипичных клетках трижды негативного рака молочной железы.....	94
4.4. Оценка ко-локализации TGF- β , p53 в NIS-позитивных клетках при трижды негативном раке молочной железы.....	96

4.5. Количественная оценка иммунофенотипических изменений Т-лимфоцитарного звена в трижды негативном раке молочной железы в зависимости от числа перенесенных беременностей.....	98
4.6. Количественная оценка сосудистого и макрофагального звена (CD31, CD68, CD163) микроокружения трижды негативного рака молочной железы в зависимости от количества беременностей, завершившихся родами.....	101
4.7. Количественная оценка секретома тучных клеток (триптазы, химазы и карбоксипептидазы А3) в трижды негативном раке молочной железы в зависимости от количества беременностей, завершившихся родами.....	103
4.8. Анализ степени корреляции между уровнем экспрессии NIS в клетках трижды негативного рака молочной железы и ответом на неoadьювантную химиотерапию по индексам остаточной опухолевой нагрузки по системе RCB и критериям оценки ответа солидных опухолей по системе RECIST 1.1	105
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	112
ВЫВОДЫ	116
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	116
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	119
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	122

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Рак молочной железы (РМЖ) остается одним из наиболее распространенных злокачественных новообразований (ЗНО) у женщин. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в 2020 году было зарегистрировано более 2,3 миллиона новых случаев РМЖ из них – 83,4 тысячи в Российской Федерации, а смертность от этого заболевания превысила 670 тысяч человек [8, 10, 85]. Трижды негативный рак молочной железы (ТНРМЖ) характеризуется отсутствием экспрессии рецепторов эстрогена (ER), прогестерона (PR) и белка HER2/neu. Он обладает высокой агрессивностью, склонен к раннему метастазированию и отличается низкой 5-летней выживаемостью пациентов [53, 54, 58].

Высокая частота возникновения неопластических процессов в молочной железе является проявлением циклических гормон-зависимых изменений, берущих начало с 4-й недели эмбриогенеза – как закладка млечных гребней, достигая наиболее значительных структурных преобразований после полового созревания, в периоды беременности и лактации, заканчивая свою дифференцировку в период менопаузы у женщины. Однако, особенности пролиферации, дифференцировки и апоптоза эпителия дольковых единиц концевых протоков молочной железы, связанные с беременностью, приводят к физиологическим изменениям эпигенетических свойств glanduloцитов, которые способны влиять на некоторые факторы канцерогенеза [94].

Одним из ключевых проявлений дифференцировки клеток люминального эпителия молочной железы в ходе беременности, является экспрессия натрий-йод симпортера (NIS). NIS – это трансмембранный белок, обеспечивающий активный транспорт йод-аниона в клетку [141]. Наибольшая степень экспрессии NIS наблюдается в фолликулярных клетках щитовидной железы, где йод необходим для биосинтеза тиреоидных гормонов [42]. Помимо того, NIS экспрессируется в

структурах плаценты, эпителии поднижнечелюстных и околоушных слюнных желез [48]. Следует отметить, что в физиологических условиях, вне периодов беременности и лактации, экспрессия NIS в эпителии млечного протока молочной железы практически отсутствует, так как основной его функцией является насыщение молока йодид-ионами, необходимым для адекватной работы щитовидной железы новорожденного.

Парадоксальным феноменом, связанным с экспрессией NIS, является его гиперэкспрессия в опухолях, связанная с мутационной aberrантной активацией сигнальных путей и транскрипционных механизмов, заложенных еще в эмбриогенезе. Обращает на себя внимание тот факт, что его экспрессия не угасает по мере дедифференцировки атипичных клеток. Это свойство можно использовать при иммуногистохимической верификации низкодифференцированного ТНРМЖ, поэтому NIS и его практическое применение являются предметом активного изучения в онкологии, а прямое влияние беременности и гормонального фона на его экспрессию, вероятно, может быть связующим звеном между особенностями развития женского организма и биологией опухолевых клеток ТНРМЖ [146, 149].

Влияние беременности – как одного из ключевых онтогенетических факторов, на риск развития РМЖ представляет собой сложный феномен с двойственным эффектом, зависящим от возраста женщины на момент первой беременности и временного интервала после родов. Данные из единичных работ указывают на кратковременное повышение риска РМЖ в период 5–10 лет после беременности, однако при первой беременности до 30 лет риск снижается на 50% по сравнению с пациентками без беременностей в анамнезе, а каждая последующая уменьшает его дополнительно в среднем на 10% [143]. Однако, в специализированной литературе отсутствуют данные о взаимосвязи между онтогенетическими факторами, такими как количество перенесенных беременностей в анамнезе, возрастом и морфологическими характеристиками ТНРМЖ, иммунного ландшафта опухоли, степени экспрессии NIS, что в свою очередь может иметь фундаментальное, клиническое или прогностическое значение.

Степень разработанности темы исследования

Исследования NIS в молочной железе ведутся уже около двух десятилетий. В то же время, работы, посвященные влиянию онтогенетических факторов на течение ТНРМЖ и значению в этом процессе, продукции NIS, отсутствуют или недостаточно детализированы. ТНРМЖ является наиболее гетерогенным подтипом РМЖ, и исследования чаще фокусируются на виротерапии, иммунных мишенях, ДНК-репарации и метаболических уязвимостях [147], а не на транспортерных белках, а связь между стадиями развития молочной железы (эмбриогенез→ пубертат→ беременность→ лактация→ инволюция) и экспрессией/регуляцией NIS редко подвергается комплексному анализу [130, 171].

Кроме того, дискуссионным остается вопрос о биологической роли экспрессии NIS в раковых клетках ТНРМЖ. Так на данный момент существует лишь одна экспериментальная работа, проведенная Lacoste с соавт., на культуре опухолевых клеток РМЖ, в которой доказана потенциальная проонкогенная роль NIS, за счет его способности усиливать подвижность этих клеток, тем самым способствуя их инвазии и метастазированию [40, 92]. Также существуют единичные работы о влиянии белков p53 и TGF- β на экспрессию NIS в структурах молочной железы в материале клеточных культур или открытых базах данных, таких как TCGA и METABRIC [71, 83].

Практически не разработанной темой для исследования является изучение влияния количества перенесенных беременностей на элементы микроокружения трижды негативного рака молочной железы. Анализ научных работ указывает на отсутствие данных о влиянии количества беременностей, завершившихся родами, на количество лимфоцитов, макрофагов, тучных клеток, микрососудистую плотность ТНРМЖ.

Резюмируя вышесказанное, онтогенетические изменения эпителия дольковой единицы молочной железы – последовательные этапы пролиферации, дифференцировки, секреции и инволюции – формируют не только структуру органа, но и определяют ее биологическую уязвимость к опухолевой

трансформации. Данная проблема носит многогранный характер, а ее решение находится на стыке нескольких фундаментальных дисциплин. Однако, учитывая, что раскрытие механизмов регуляции жизненного цикла, реализации клеточной пластичности и регенерации, напрямую зависит от изучения фундаментальных закономерностей онтогенетических процессов в женском организме, в этой связи приоритетным является понимание особенностей биологии развития раковых клеток и элементов микроокружения, в совокупности с экспрессией NIS в трижды негативном раке молочной железы.

Цель и задачи исследования

Цель исследования: выявление влияния возраста, количества беременностей, пролиферации эпителия на экспрессию натрий-йодного симпортера и опухолевую прогрессию при трижды негативном раке молочной железы.

Задачи исследования:

1. Проанализировать экспрессию NIS в атипичных клетках трижды негативного рака молочной железы, сопоставить с количеством беременностей, завершившихся родами; сопоставить степени экспрессии NIS, GATA-3 и маммаглобина.
2. Оценить экспрессию NIS в атипичных клетках трижды негативного рака молочной железы в зависимости от возраста женщин и пролиферации эпителия.
3. Оценить ко-локализацию TGF- β , p53 и NIS-позитивных атипичных клеток трижды негативного рака молочной железы в зависимости от количества беременностей, завершившихся родами.
4. Провести количественную оценку лимфоцитов (CD4, CD8, FOXP3), макрофагов (CD68, CD163) и эндотелиоцитов кровеносных сосудов (CD31), тучных клеток (триптаза, химаза, карбоксипептидаза A3), и NIS-позитивных

атипичных клеток трижды негативного рака молочной железы в зависимости от количества беременностей, завершившихся родами.

5. Определить степень корреляции между уровнем экспрессии NIS в атипичных клетках трижды негативного рака молочной железы и ответом на неоадьювантную химиотерапию согласно индексу остаточной опухолевой нагрузки по системе RCB и критериям оценки ответа солидных опухолей по системе RECIST1.1.

Научная новизна

Научная новизна исследования заключается в выявлении влияния онтогенетических факторов (беременности, возраст) на экспрессию натрий-йодного симпортера в атипичных клетках трижды негативного рака молочной железы, количественные изменения ключевых элементов иммунного микроокружения и опухолевую прогрессию.

Впервые обнаружена корреляция между количеством беременностей и экспрессией NIS: с увеличением количества беременностей, завершившихся родами, уменьшается экспрессия NIS в раковых клетках ТНРМЖ, что свидетельствует о подавлении проонкогенных свойств NIS за счет терминальной дифференцировки эпителия молочной железы ($t = -0,369$, $p < 0,05$). Установлена корреляция между частотой экспрессии NIS в ТНРМЖ и возрастом пациенток: доля NIS-позитивных клеток при ТНРМЖ выше в группе более возрастных пациенток и наоборот – в группе у молодых женщин уменьшается экспрессия NIS ($p < 0,05$). Определяется ко-экспрессия NIS и TGF- β при отсутствии экспрессии p53. Установлена зависимость количественного и субпопуляционного состава иммунных клеток опухолевого микроокружения и NIS-позитивных атипичных клеток при ТНРМЖ от количества беременностей, завершившихся родами: отмечается увеличение численности CD8⁺-лимфоцитов, при одновременном уменьшении доли регуляторных Т-лимфоцитов, уменьшении количества CD68⁺-опухоль-ассоциированных макрофагов. Количество тучных клеток коррелирует с

гравидарным статусом пациенток – при менее чем 3-х беременностях в анамнезе – преобладают триптаза⁺-клетки, а при 4 и более – карбоксипептидаза A3⁺-клетки.

Согласно индексу остаточной опухолевой нагрузки по системе RCB и критериям оценки ответа солидных опухолей по системе RECIST1.1 обнаружили, что высокая экспрессия NIS коррелирует с химиорезистентностью ($t = 0,481$, $p < 0,01$): чем выше уровень экспрессии NIS в клетках ТНPMЖ, тем ниже ответ на неoadьювантную химиотерапию.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость научной работы основана на дополнении существующих данных о морфологических и молекулярно-биологических изменениях в раковых клетках трижды негативного рака молочной железы под влиянием некоторых онтогенетических факторов (возраст, беременность, пролиферация). Результатами проведенного исследования подтверждены проонкогенные свойства NIS, а именно – его роль в пролиферации раковых клеток, особенности химиорезистентности, а также снижение рисков опухолевой прогрессии за счет терминальной дифференцировки эпителия молочной железы при беременности. Ключевые онтогенетические факторы способны модулировать экспрессию NIS, влияя на регуляцию пролиферации (Ki-67) и дифференцировки (GATA-3, Маммаглобин). NIS способен ингибировать пути опухолевой прогрессии, связанные с возрастом и количеством беременностей, ответственных за сохранение агрессивности опухоли и регуляцию жизненного цикла раковых клеток, а также активатор химиорезистентности – путь FOXA1.

Беременность в отдаленные сроки приводит к снижению экспрессии NIS, что предотвращает развитие проонкогенных свойств. В то же время, максимальную активность NIS проявляет у молодых пациенток, что ассоциировано с повышенной пролиферативной активностью и химиорезистентностью, увеличивающих агрессивность опухоли.

Практическая значимость работы заключается в том, что полученные результаты о степени экспрессии NIS в раковых клетках ТНРМЖ, учитывая возраст и количество беременностей, не исключают использования NIS как маркера прогнозирования химиорезистентности, что можно учитывать при проведении химиотерапии и радиойодтерапии ТНРМЖ. Кроме того, морфологическая оценка состояния экспрессии NIS в опухолевых клетках, в том числе – в отдаленные сроки после терапии, может быть использована в работе врача-патологоанатома.

В результате проведенного исследования **решена актуальная научная задача** – выявлено влияние возраста, количества беременностей, пролиферации эпителия на экспрессию NIS и элементы микроокружения, и опухолевую прогрессию при трижды негативном раке молочной железы.

Методология и методы исследования

В ходе данной ретроспективной работы использовали клиничко-анамнестический, гистологический, морфометрический, иммуногистохимический, молекулярно-генетический и статистические методы анализа. Пациенты – женщины с впервые установленным диагнозом трижды негативного рака молочной железы (n=161), которым проводили неoadъювантную химиотерапию с последующей мастэктомией.

Все манипуляции выполняли в строгом соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki, 1964, ред. 2013) и одобрены Независимым советом по этике при МНИОИ им. П. А. Герцена – ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России (протокол № 125 от 30 мая 2025 г.).

Личный вклад автора

Все основные результаты, представленные в диссертации, получены автором лично. Автором самостоятельно выполнены анализ литературы, разработка дизайна исследования, сбор и анализ медицинской документации; проведение гистологического и иммуногистохимического исследований (NIS, TGF- β , p53, CD4, CD8, FOXP3, CD68, CD163, CD31, триптаза, химаза, карбоксипептидаза А3); статистическая обработка данных, формулировка выводов и практических рекомендаций.

Положения, выносимые на защиту

1. В трижды негативном раке молочной железы натрий-йодный симпортер (NIS) является высокочувствительным маркером, сопоставимым с GATA-3 и превосходящим Маммаглобин. Уровень экспрессии NIS отрицательно коррелирует с количеством беременностей у пациенток (коэффициент τ -Кендалла -0,369, $p < 0,05$) и более молодым возрастом, что оказывает влияние на молекулярный профиль этой опухоли.

2. В трижды негативном раке молочной железы репродуктивный анамнез пациенток оказывает многонаправленное комплексное влияние на различные биологические аспекты опухоли. Выраженность ко-экспрессии NIS и TGF- β позволяет рассматривать TGF- β как позитивного межклеточного регулятора экспрессии NIS в раковых клетках. Беременность модулирует элементы иммунного микроокружения: увеличивая количество CD8 клеток; соотношение CD68 и CD163 макрофагов было наименьшим у женщин с 1–3 беременностями, в группах без беременностей и с множественными беременностями было сопоставимым. В то же время, выявлены качественные изменения секрета тучных клеток: с триптаза-позитивного (1–3 беременности в анамнезе или их отсутствие) на карбоксипептидаза А3-позитивный (при 4 и более беременностей). Это раскрывает комплексный механизм формирования биологической гетерогенности ТНРМЖ,

где наблюдается сочетанное действие как внутренних автономных сигналов, так и внешних – гравидарного статуса.

3. Повышение экспрессии NIS в раковых клетках трижды негативного рака молочной железы является биомаркером биологической агрессивности опухоли, что подтверждается ее прямой корреляцией с неблагоприятными объективными критериями ответа на терапию и резидуальной опухолевой нагрузкой, оцениваемыми по индексу остаточной опухолевой нагрузки по системе RCB и критериям оценки ответа солидных опухолей по системе RECIST1.1 (коэффициент Kendall-tau 0,481, $p < 0,01$), что служит предиктором химиорезистентности.

Соответствие диссертации паспорту научных специальностей

Диссертация на тему «Влияние онтогенетических факторов на экспрессию NIS и опухолевую прогрессию при трижды негативном раке молочной железы» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук соответствует шифру специальностей 1.5.23. Биология развития, эмбриология и 3.1.6. Онкология, лучевая терапия. Области исследования диссертационной работы соответствуют пунктам: 2, 3 паспорта научной специальности 1.5.23. Биология развития, эмбриология. Область исследования диссертационной работы соответствуют пункту: 2 паспорта научной специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия.

Внедрение результатов диссертации в практику

Результаты диссертационного исследования внедрены в лечебную работу ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России и в учебный процесс НОРЦ «Инновационные технологии иммунофенотипирования, цифрового пространственного профилирования и ультраструктурного анализа» (Молекулярная морфология) ФГАОУ ВО РУДН им. П. Лумумбы.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов диссертационного исследования обеспечивается использованием современных методов исследования, достаточным объемом клинического материала (n=161), а также статистической обработкой полученных данных с использованием современных программных продуктов (Statistica 13.5.0.17 software, TIBCO Software Inc.). Исследование проводилось в соответствии с принципами доказательной медицины, с ретроспективным анализом биопсийных образцов, иммуногистохимическим окрашиванием на Ventana Benchmark XT и молекулярно-генетическим тестированием. Корреляционные связи оценивались с применением коэффициента Кенделла-тау при уровне значимости $p \leq 0,05$, что подтверждает надежность выявленных зависимостей между экспрессией NIS, онтогенетическими факторами и опухолевой прогрессией.

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования автором опубликовано 5 работ, в том числе 1 научная статья в издании из базы данных RSCI, 1 статья в журнале, включенном в Перечень рецензируемых научных изданий Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 2 статьи в издании, индексируемом в международной базе (Scopus), 1 публикация в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа представляет собой рукопись на русском языке объемом 146 страниц машинописного текста; состоит из введения, обзора литературы, главы описания материала и методов, главы, посвященной

результатам собственного исследования, обсуждения результатов исследования и заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа иллюстрирована 14 таблицами и 33 рисунками. Список цитируемой литературы включает 182 источника, из которых 22 отечественных, 160 – зарубежных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Морфология и физиология молочной железы

Молочная железа представляет собой экзокринный орган, расположенный на передней поверхности большой грудной мышцы, основная функция которого заключается в синтезе молозива и молока для последующего кормления новорожденного. С эволюционной точки зрения она рассматривается как модифицированная апокриновая железа [138]. Молочная железа является сложной альвеолярной, содержит от 15 до 20 долек, которые разделены септами рыхлой волокнистой соединительной ткани и прослойками жировой ткани. Выводные протоки, открывающиеся на вершине соска, переходят в расширенные млечные синусы, в которые впадают множество ветвящихся млечных протоков, заканчивающиеся альвеолярными ходами. В период лактации молоко вырабатывается в молочных экзокриноцитах (галактоцитах), которые вместе с миоэпителиоцитами образуют два слоя стенки альвеолы – наружный (люминальный) и внутренний (миоэпителиальный) [105, 138] (Рис. 1.1). В состоянии покоя галактоциты кубической или призматической формы, в то время как миоэпителиальные клетки характеризуются тонким ободком цитоплазмы и уплощенной формой ядер, формируют корзинообразную сеть вокруг люминального слоя. Примечательно, что при инвазивном характере роста злокачественной опухоли происходит утрата базального слоя эпителия, что является одним из ключевых морфологических критериев для дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных новообразований [45, 78].

Строма молочной железы неоднородна и играет существенную роль в поддержании ее структуры и обеспечении физиологических функций. Междольковая строма содержит мало клеток, она с высокой концентрацией коллагеновых волокон, гладкомышечных клеток и жировой ткани, включая поддерживающие связки Купера. Внутريدольковая строма представлена рыхлой

волокнистой соединительной тканью, богата кровеносными сосудами, множество иммунных клеток – лимфоцитов, плазмоцитов, макрофагов и тучных клеток – а также характеризуется высоким содержанием кислых гликозаминогликанов (мукополисахаридов), в связи с чем она окрашивается в бледно-синий / голубой цвет при реакции альциановым синим [140].

Сосково-ареолярный комплекс покрыт многослойным плоским ороговевающим эпителием, содержащим пигментные клетки, а также сальные, потовые и модифицированные апокриновые железы – железы Монгмери, предотвращающие повреждение кожи соска во время кормления за счет выработки барьерного секрета. Под ареолой располагаются млечные синусы, предназначенные для накопления молока в промежутках между кормлением [41].

Морфологические изменения молочной железы тесно связаны с возрастом и гормональным статусом, отражая динамику репродуктивного цикла. В период пубертата под воздействием эстрогена и прогестерона наблюдается пролиферация эпителия и стромы, формирующая основу для дальнейшего развития органа. В течение менструального цикла фолликулярная фаза характеризуется пролиферацией протоков, в то время как лютеиновая фаза сопровождается ростом альвеол и отеком стромы; менструация же проявляется инволюцией и апоптозом тканей. Во время беременности молочная железа достигает зрелости: первый триместр характеризуется удлинением протоков, второй – дифференцировкой альвеол, а третий – их созреванием. После родов пролактин и окситоцин стимулируют секрецию молозива и молока посредством мерокринового (для белков) и апокринового (для липидов) механизмов секреции. В период регрессии и менопаузы паренхима постепенно замещается фиброзной и жировой тканью [138].

Кровоснабжение молочной железы осуществляется посредством ветвей подмышечной, внутренней грудной и межреберных артерий, при этом венозный отток происходит по зеркальным венам; лимфоотток направлен в подмышечные, подключичные и парастернальные лимфатические узлы, а иннервация обеспечивается межреберными нервами [74].

Иммунофенотип молочной железы характеризуется разнообразием маркеров, отражающих клеточную специализацию: низкомолекулярные цитокератины (СК7, 8, 18, 19) экспрессируются в люминальных клетках; высокомолекулярные цитокератины (СК5/6, 14, 17) – в миоэпителиальных; Е-кадгерин обеспечивает межклеточные контакты; миоэпителиальные маркеры включают α -SMA, calponin-1, SMMHC, p40/p63 и CD10; люминальные клетки демонстрируют экспрессию рецепторов эстрогена и прогестерона с минимальной экспрессией HER2/neu; Ki-67 используется для оценки пролиферативной активности; CD45/CD68 идентифицируют иммунные клетки; коллаген IV – маркер базальной мембраны, а D2-40 – лимфатических сосудов [78, 158].

Стволовые клетки молочной железы подразделяются на мультипотентные (эпителиальные предшественники) и унипотентные (люминальные/миоэпителиальные), функционирование которых регулируется эстрогеном и прогестероном посредством паракринных факторов, таких как амфирегулин, эпидермальный фактор роста (EGF), трансформирующий фактор альфа (TGF- α), херегулин и лиганд RANKL [30, 145].

Иммунная система молочной железы представлена широким спектром клеток, обеспечивающих локальный иммунный ответ. Макрофаги подразделяются на протоковые (CD11c⁺/CX3CR1⁺/MHC-II⁺) и стромальные (CD11b⁺/LYVE-1⁺/MHC-II^{+/-} и CD11b⁺/MHC-II⁺), выполняющие функции фагоцитоза и презентации антигенов. Гранулоциты, включая эозинофилы, способствуют ветвлению протоков и ремоделированию ткани. Лимфоциты (Т- и В-клетки, плазмоциты) обеспечивают адаптивный иммунитет, в том числе секрецию IgA для защиты от инфекций [36, 57]. Эти клетки также участвуют в регуляции формирования и инволюции дольковых единиц, элиминации апоптотических тел и поддержании противоопухолевого надзора [159, 181].

Двухъядерные клетки, составляющие до 30% от общей клеточной популяции в период лактации, представляют собой адаптивный механизм галактоцитов к интенсивному синтезу молока [28, 73]. Они возникают вследствие неполного цитокинеза люминальных эпителиоцитов. Функциональное значение

двухъядерности заключается в увеличении объема генетического материала, что позволяет более эффективно осуществлять синтез компонентов молока [115, 144].

Коронеподобные адипоциты – это некротизированные жировые клетки, окруженные макрофагами [29, 111]. Данные структуры формируются вследствие липодистрофии и макрофагальной инфильтрации [11], способствуют локальному воспалению и служат отражением повышенной ароматазной и гормональной активности [37], что делает их маркером ожирения, хронического воспаления и повышенного риска малигнизации [116, 161].

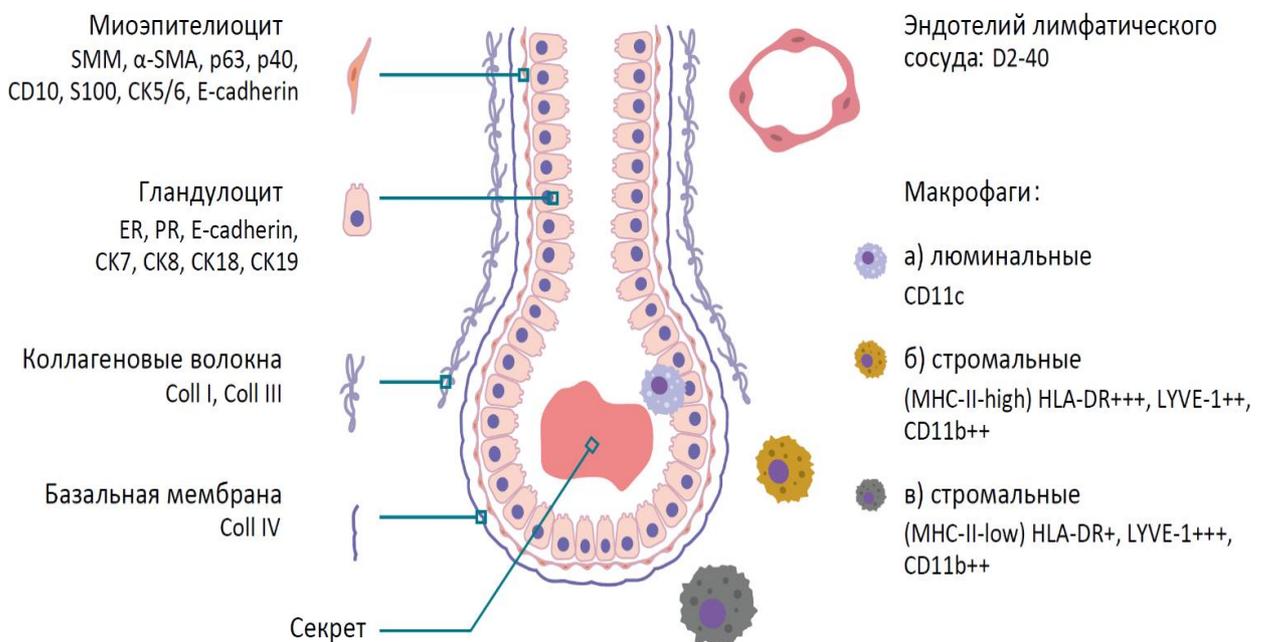


Рисунок 1.1 – Клеточный состав дольки молочной железы, иммуногистохимическая характеристика

1.2. Эпидемиология, клиничко-морфологические и молекулярно-биологические особенности трижды негативного рака молочной железы

Рак молочной железы остается одной из наиболее распространенных онкологических патологий среди женского населения в глобальном масштабе, составляя до 23% от общего числа злокачественных новообразований (ЗНО) всех локализаций. Несмотря на внедрение программ раннего выявления и

комбинированных методов лечения, в развивающихся странах отмечается тенденция к росту заболеваемости РМЖ. В Российской Федерации РМЖ занимает первое место в структуре онкологической заболеваемости у женщин, составляя приблизительно 22,5% случаев (Рис. 1.2). ТНРМЖ представляет собой специфический молекулярно-генетический подтип РМЖ, на долю которого приходится около 15% впервые выявленных случаев РМЖ во всем мире, что соответствует примерно 200 тысячам заболевших ежегодно [10, 85].



Рисунок 1.2 – Структура женской онкологической заболеваемости в Российской Федерации. В скобках указаны (%) значения

ТНРМЖ характеризуется отсутствием экспрессии рецепторов ER и PR, а также отсутствием гиперэкспрессии или амплификации HER2/neu. Значительная часть случаев РМЖ, ассоциированных с мутацией в гене BRCA1, относится к ТНРМЖ [58]. Ввиду отсутствия доступных молекулярных мишеней для гормональной и таргетной терапии, лечение пациенток с ТНРМЖ ограничено преимущественно химиотерапией, что обуславливает крайне неблагоприятный прогноз даже при радикальном подходе [53]. Клинически ТНРМЖ проявляется агрессивным течением, высокой частотой метастазирования и рецидивов, с

пятилетней выживаемостью, варьирующей в зависимости от стадии заболевания, но в целом ниже, чем у других подтипов РМЖ [19, 54].

Морфологически ТНРМЖ чаще всего представлен инвазивной карциномой неспецифического типа (*invasive breast carcinoma of no special type*), характеризующейся низкой степенью дифференцировки (G3 по Nottingham score), наличием центрального некроза, лимфоидной инфильтрацией стромы и высокой пролиферативной активностью, оцениваемой по индексу Ki-67 (обычно >20-30%) [156]. Опухолевые клетки демонстрируют базалоидный фенотип, с экспрессией высокомолекулярных цитокератинов (CK5/6, CK14), EGFR и p53, однако в некоторых случаях отсутствует E-кадгерин, что свидетельствует о эпителиально-мезенхимальном переходе и повышенном метастатическом потенциале [32]. Строма опухоли часто характеризуется фиброзной структурой с выраженным десмопластическим компонентом и инфильтрацией иммунокомпетентными клетками, включая TILs (*tumor-infiltrating lymphocytes*), что может оказывать влияние на эффективность иммунотерапевтического подхода [13, 16]. Молекулярно-биологически ТНРМЖ является гетерогенной группой, объединяемой под "зонтичным" термином, и включает несколько подтипов по классификации Lehmann et al. (базально-подобные 1 и 2, мезенхимальный, мезенхимальный стволово-клеточный, иммуномодуляторный, люминальный с экспрессией андрогеновых рецепторов) [134]. Базальноподобный подтип (70–80% ТНРМЖ) ассоциирован с мутациями BRCA1/2, потерей p53 и высокой экспрессией генов пролиферации; *mesenchymal* подтип характеризуется активацией путей эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) и стромальными сигналами; иммуномодуляторный - обогащен генами иммунного ответа [1, 4, 6]. Генетический профиль включает мутации в TP53 (80%), PIK3CA (10-20%), PTEN и RB1, с гиперметилированием промоторов и нарушениями ДНК-репарации [14, 49]. Эти особенности объясняют химиорезистентность и склонность к раннему метастазированию, особенно в мозг и легкие [21, 53].

Эпидемиологические исследования выявляют повышенную распространенность ТНРМЖ среди молодых женщин в возрасте до 40 лет, а также

среди лиц афро- и латиноамериканского происхождения (составляющих до 30–40% случаев РМЖ), при этом заболеваемость наблюдается чаще в регионах с неблагоприятными социально-экономическими условиями. В Российской Федерации распространенность РМЖ соответствует общемировым тенденциям, характеризуясь более высокой частотой выявления в урбанизированных районах. К установленным факторам риска РМЖ относятся отсутствие беременности, поздние первые роды, ожирение и наличие семейного анамнеза мутаций генов BRCA. Другие закономерности наблюдаются при анализе факторов риска ТНРМЖ. Так, обнаружено что большее число беременностей хоть и снижает риск развития гормон-позитивного РМЖ, ассоциировано с повышением риска развития ТНРМЖ. Однако, данный негативный эффект компенсируется или полностью нивелируется в случае продолжительного (6+ месяцев) грудного кормления [39, 89, 125]. Несмотря на склонность ТНРМЖ к агрессивному течению, существуют подгруппы опухолей с высокой инфильтрацией лимфоцитами (TILs), среди которых, например, так называемый медулярный рак молочной железы, демонстрирующий более выраженный ответ на иммунотерапию, например, при применении ингибиторов PD-1/PD-L1, что создает возможности для разработки персонализированных стратегий лечения [9, 18, 20, 97].

Иммунное микроокружение ТНРМЖ характеризуется наиболее высокой инфильтрацией иммунными клетками по сравнению с люминальными подтипами, с преобладанием Т-лимфоцитов (особенно цитотоксических CD8⁺ и регуляторных FOXP3⁺ клеток). Несмотря на высокое абсолютное число CD8⁺ клеток, их пролиферативная активность часто снижена, однако именно высокая плотность CD8⁺ лимфоцитов, а также наличие CD163⁺ PD-L1⁺ макрофагов, ассоциируются с лучшим прогнозом и снижением риска рецидива. В отличие от других подтипов, для ТНРМЖ характерно низкое содержание тучных клеток [121, 126].

Сосудистое микроокружение ТНРМЖ отличается агрессивным ангиогенезом: опухоли демонстрируют достоверно более высокую плотность микрососудов и экспрессию проангиогенных маркеров (например, PDGFR- α) по сравнению с не-трижды негативными формами, что также может быть обусловлено

активностью тучных клеток, известных своим колоссальным влиянием на регуляцию регенеративных, репаративных процессов, неоваскуляризации и неоангиогенеза [27, 103]. Сосудистая инвазия (преимущественно лимфатическая) выявляется у 26% пациенток и является критическим прогностическим фактором, снижая 20-летнюю выживаемость с 79% до 46% [82, 177]. Таким образом, сосудистый, макрофагальный, мастоцитарный, лимфоцитарный компоненты иммунного микроокружения обладают важным значением в биологии опухолевых клеток и значительно влияют на прогрессировании опухоли.

1.3. Структура и функция натрий-йод симпортера (NIS) в нормальной физиологии

Натрий-йод симпортер (NIS) представляет собой трансмембранный гликопротеин, состоящий из 643 аминокислотных остатков и кодируемый геном SLC5A5, расположенным на коротком плече хромосомы 19 (локус 19p13.2-p12). Данный белок относится к семейству переносчиков растворимых соединений (SLC) и осуществляет активный котранспорт одного йод-аниона (I^-) с двумя ионами натрия (Na^+), используя энергию электрохимического градиента Na^+ , поддерживаемого работой Na^+/K^+ -АТФазы. NIS, являясь мембранным гликопротеином, выполняет функцию захвата и транспорта йода в клетки. Механизм его действия предполагает последовательное связывание двух молекул натрия (Na^+), что сопровождается конформационными изменениями, многократно увеличивающими сродство белка к йод-аниону (I^-). После связывания с I^- , NIS использует энергию электрохимического градиента Na^+ , создаваемую посредством активности Na^+/K^+ -АТФазы, для транспорта одной молекулы йод-аниона против его собственного электрохимического градиента. В результате формируется внутриклеточная концентрация йода, превышающая плазменную в 40 раз [146, 148]. В щитовидной железе NIS играет критическую роль в захвате йода, необходимого для биосинтеза тиреоидных гормонов (тироксина и

трийодтиронины), что обуславливает эффективность радиойодтерапии при злокачественных новообразованиях щитовидной железы за счет накопления радиоактивного йода в тиреоцитах. Экспрессия NIS в щитовидной железе регулируется тиреотропным гормоном (ТТГ) посредством цАМФ-зависимых сигнальных путей, при участии промоторной области гена, содержащей ТТГ-регулируемые элементы [91, 120].

Помимо щитовидной железы, NIS экспрессируется в экстратиреоидных тканях, например, слюнных и слезных железах, желудке, поджелудочной железе, почках, плаценте, яичнике, яичке и лактирующей молочной железе [50]. В молочной железе NIS обеспечивает активный захват йода, который посредством действия лактопероксидазы окисляется и связывается с казеином для последующей секреции в молоко, тем самым способствуя насыщению организма новорожденного йодом и обеспечивая нормальное развитие его собственной щитовидной железы и препятствуя развитию кретинизма [12, 117]. В слюнных железах NIS участвует в захвате йода из кровотока и его дальнейшей секреции со слюной, потенциально поддерживая санацию полости рта и защищая слизистую оболочку за счет выработки бактерицидных свободных радикалов [109]. В желудочно-кишечном тракте NIS экспрессируется в слизистой оболочке, где опосредует активный захват йода, способствуя абсорбции диетарного I- и обеспечивая защиту слизистой желудка; примечательно, что его экспрессия значительно снижается или отсутствует при раке желудка и метапластической слизистой пищевода Барретта [65]. Данное распределение экспрессии обуславливает максимальное усвоение йода и его рециркуляцию в организм: после поступления с пищей, йод абсорбируется в тонком кишечнике и распределяется посредством кровотока по всему организму. В первую очередь он захватывается щитовидной железой для синтеза тиреоидных гормонов. Не усвоенная щитовидной железой фракция йода, транспортируясь с током крови, достигает слюнных желез, где протоковые эпителиоциты секретируют йод со слюной, которая затем поступает в желудок. Муцин-секретирующие и обкладочные клетки желудка также выделяют захваченный из кровотока йод. Обогащенные йодом пищеварительные

соки вновь попадают в тонкий кишечник, замыкая цикл рециркуляции йода. Часть этой рециркулирующей фракции йода выводится почками [141]. Интересно также и то, что часть рециркулирующего йода захватывается также и слезными железами, где он также необходим для локального антибактериального гомеостаза, и именно экспрессия NIS в данных тканях обуславливает побочные эффекты радиодтерапии, такие как «радиоактивные слезы», ксерофтальмия, наряду с поражением и слюнных желез – сиалоаденит, ксеростомия [46, 47, 80].

В женском репродуктивном тракте NIS экспрессируется в тканях плаценты на различных этапах гестации, амниотической мембране, эндометрии и яичниках, обеспечивая захват йода для обеспечения плода тиреоидными гормонами и осуществления транспорта I- от матери к плоду [64]. В эндометрии экспрессия NIS варьирует в зависимости от фазы менструального цикла и наступления менопаузы, в яичнике и маточных трубах он также, вероятно, необходим для транспорта йода и поддержания стерильности внутренней среды.

С биохимической точки зрения, NIS является полипептидным трансмембранным белком, состоящим из 13 доменов, его N-конец ориентирован внеклеточно, а С-конец внутриклеточно. Как и прочие члены семейства солют-транспортеров, он существует в виде мультимерного комплекса, т. е. димера, его олигомерная форма малофункциональна и существует только на этапе прохождения контроля в эндоплазматическом ретикулуме. В клетке есть множество механизмов регуляции транспорта и функциональной активности NIS. Например, одним из ключевых механизмов контроля является фосфорилирование С-концевого фрагмента, считается, что именно он необходим для правильной стабилизации его белковой структуры. Обе субъединицы NIS – N-концевой (аминокислоты 1–512) и С-концевой фрагменты (аминокислоты 512–643), способны самостоятельно захватывать йод, однако их эффективность поодиночке многократно ниже [134, 179]. Другим важным механизмом регуляции NIS является гликозилирование, именно его гипергликозилированная форма встраивается в плазмолемму [61]. Интересно то, что в опухолях встречаются преимущественно частично-гликозилированные формы белка, что объясняет их цитоплазматическую

локализацию [122]. Однако, даже гипогликозилированные формы белка способны захватывать йод [34, 69].

Регуляция NIS включает посттранскрипционные механизмы: в нормальных клетках NIS локализуется на базолатеральной мембране, но в опухолевых клетках часто наблюдается внутриклеточное накопление из-за нарушений внутриклеточного транспорта белка. Гормональная стимуляция (например, пролактином) усиливает экспрессию NIS в эпителии молочной железы, обеспечивая физиологический захват йода, который во время беременности может быть даже более эффективным, чем в норме в щитовидной железе. Дефицит йода нарушает структуру молочной железы, вызывая протоковую гиперплазию и фиброз, которые устраняются терапией I₂, подчеркивая роль NIS в поддержании целостности ткани. Клинико-практическое значение экстратиреоидной экспрессии NIS открывает возможности для радиойодтерапии злокачественных опухолей (например, молочной железы, яичников, простаты, головного мозга) через генную терапию с использованием вирусных векторов или мезенхимальных стволовых клеток для визуализации, диагностики и лечения [88]; NIS служит сигнальным белком для онколитической виротерапии, позволяя точно отслеживать пропацию вируса с помощью сцинтиграфии. Дефекты транспорта йода, вызванные мутантными формами NIS, зачастую приводят к врожденному гипотиреозу, но могут иметь и экстратиреоидные осложнения [173].

1.4. Экспрессия NIS в опухолях молочной железы и ее клиническое значение

Экспрессия NIS представляет собой область значительного интереса при изучении патогенеза РМЖ и разработке инновационных стратегий диагностики и терапии. Научная литература демонстрирует экспрессию NIS в атипичных клетках как доброкачественных, так и злокачественных новообразований МЖ [87]. В более широком контексте распространенность экспрессии NIS варьирует от 65% до 87% среди как доброкачественных, так и злокачественных опухолей молочной железы

[165]. При этом наблюдается отсутствие прямой корреляции между уровнем экспрессии NIS и интенсивностью захвата радиойода, что обусловлено потенциальными нарушениями внутриклеточного транспорта белка. В физиологических условиях NIS преимущественно локализуется на базолатеральной поверхности плазматической мембраны, обеспечивая активный транспорт йодид-анионов. Однако в опухолевых клетках часто отмечается цитоплазматическая локализация NIS вместо мембранной, что приводит к снижению эффективности захвата радиойода. Данные отклонения могут быть связаны с особенностями гликозилирования NIS, поскольку маннозное гликозилирование играет критическую роль в обеспечении правильной локализации и функциональности этого белка в клетках рака молочной железы [133].

Как отмечалось ранее, потенциал NIS в качестве мишени для радиойодтерапии вызывает значительный интерес. В контексте опухолей молочной железы, характеризующихся высокой, но преимущественно нефункциональной частотой экспрессии NIS, трансдукция клеток с помощью вирусных векторов, несущих ген NIS, может обеспечить визуализацию и целенаправленную абляцию злокачественных клеток посредством использования радиоактивного йода-131 (^{131}I) [147]. В частности, NIS позволяет проводить маркировку вирусно-трансдуцированных клеток с использованием сцинтиграфии и последующего захвата ими радиойода и технеция [114]. Это подчеркивает перспективность NIS в качестве терапевтической мишени, особенно в ситуациях, когда эффективность традиционных методов лечения ограничена.

Отдельное внимание обращает на себя то, что при ТНПМЖ, экспрессия NIS выявляется приблизительно в 65% случаев, при этом лишь половина из них характеризуется выраженной мембранной локализацией, что также влияет на интенсивность захвата радиойода – только 25% опухолей активно захватывают радиойод [129, 136]. Крайне многообещающим методом представлялось применение ретиноевых кислот, способных усиливать экспрессию NIS за счет связывания с ядерными ретиноевыми рецепторами и, в том числе, усиления

экспрессии FOXA-1 [174]. Однако, клинические испытания не продемонстрировали терапевтически значимого эффекта [157].

Дефектные цитоплазматические формы NIS могут проявлять проонкогенные свойства, способствуя миграции и метастазированию клеток посредством взаимодействия с гуаниннуклеотидным обменным фактором Rho (LARG) [92]. В контексте ТНРМЖ экспрессия NIS может служить потенциальным прогностическим биомаркером, поскольку она ассоциирована с активностью транскрипционных факторов, таких как FOXA1, что потенциально влияет на клеточные процессы, включая миграцию, метастазирование и химиорезистентность [132]. Таким образом, NIS может выступать в роли косвенного биомаркера, отражающего специфические биологические характеристики опухоли. Тем не менее, вышеупомянутые утверждения требуют дальнейшего подтверждения посредством проспективных исследований, а также экспериментальных работ, сфокусированных на механизмах экспрессии и внутриклеточного транспорта NIS, а также на стратегиях их регуляции в атипичных клетках.

1.5. Влияние онтогенетических факторов на развитие и прогрессию рака молочной железы, а также на экспрессию NIS

Онтогенетические факторы, такие как возраст манифестации заболевания и репродуктивная история (количество беременностей, завершившихся родами), играют определяющую роль в этиологии, развитии и прогрессировании РМЖ. Эти факторы формируют морфофункциональное состояние эпителия молочной железы (МЖ), влияя на его восприимчивость к канцерогенным воздействиям, эпигенетические модификации и молекулярные профили. Возраст представляет собой один из основных факторов риска развития РМЖ, поскольку заболеваемость увеличивается с возрастом, достигая пика в постменопаузальном периоде (после 50–60 лет), когда происходят значительные гормональные изменения,

накапливаются соматические мутации и снижается эффективность механизмов репарации ДНК [133]. В этом контексте преобладают гормонозависимые подтипы РМЖ, такие как люминальный А и В. ТНРМЖ, составляющий 10–15% всех случаев РМЖ, чаще диагностируется у молодых женщин (моложе 40 лет) и ассоциирован с агрессивным течением, высокой пролиферативной активностью (индекс Ki-67 >50%) и неблагоприятным прогнозом. У пожилых пациенток (старше 65 лет) ТНРМЖ встречается реже, но характеризуется сниженной 5-летней выживаемостью, что может быть связано с сопутствующими заболеваниями, сниженной переносимостью терапии и менее интенсивными подходами к лечению [44, 151]. Возрастные изменения влияют на молекулярные характеристики опухоли, приводя к модификациям в сигнальных путях, таких как PI3K/AKT, Wnt и p53, которые могут модулировать экспрессию NIS [38, 109]. В нормальной МЖ NIS не экспрессируется у женщин, не находящихся в состоянии лактации, однако его индукция зависит от гормонального фона, который изменяется с возрастом [118]. Тем не менее, данных о прямой корреляции между возрастом и экспрессией NIS в РМЖ нет.

Репродуктивный анамнез оказывает существенное влияние на риск развития рака молочной железы. Эффект беременности характеризуется двойственной природой: кратковременное повышение риска сразу после родов сменяется долгосрочной защитой. Эпидемиологические данные свидетельствуют о том, что в краткосрочной перспективе (в течение 5–10 лет после родов) риск РМЖ временно возрастает вследствие интенсивной пролиферации эпителия, однако в долгосрочной перспективе первая беременность в молодом возрасте (до 20–25 лет) снижает пожизненный риск РМЖ на 50% по сравнению с нерожавшими женщинами, а каждая последующая беременность уменьшает этот риск приблизительно на 10% [107]. Данная защитная функция объясняется терминальной дифференцировкой эпителия молочной железы во время беременности, что снижает пролиферативный потенциал клеток и их чувствительность к канцерогенным воздействиям [25]. Детальный анализ молекулярных механизмов, лежащих в основе защитного эффекта беременности,

подтверждает, что физиологические стимулы, связанные с беременностью, вызывают значительную реорганизацию железы, включая экспансию эпителиоцитов и протоков, накопление молока и последующую инволюцию. У млекопитающих беременность приводит к ремоделированию тканей, в том числе к лактогенезу, синхронизированному с выделением молока посредством транскрипционных и механических взаимодействий между люминальными и миоэпителиальными клетками [72, 101]. После периода лактации молочная железа возвращается в несекреторное состояние, однако постгестационные эпителиоциты молочной железы (ПГ-МЭК) отличаются от прегестационных: их транскрипционная сеть характеризуется иными регуляторными механизмами. Полногеномное бисульфитное секвенирование выявило стабильные изменения в метилировании ДНК в ПГ-МЭК, включая деметилирование, что формирует "эпигенетическую память" о беременности. Эта эпигенетическая память обеспечивает ускоренную реактивацию генов при последующих беременностях и коррелирует с защитой от канцерогенеза. В экспериментах, проведенных на моделях мышей для оценки влияния беременности на эпигеном маммарных эпителиальных клеток (МЭК), анализ профиля активных энхансеров методом ChIP-seq с использованием антитела к H3K27ac выявил стабильные эпигенетические изменения, возникающие в ответ на сигналы беременности. Для оценки онкогенного потенциала использовались трансгенные мыши (CAGMYC), характеризующиеся доксицилин-индуцированной гиперэкспрессией онкогена сMYC. В МЭК, развившихся после гестации (ПГ-МЭК), гиперэкспрессия сMYC не вызывала злокачественную трансформацию ни *in vitro*, ни *in vivo*, в отличие от МЭК, сформировавшихся до беременности (прегестационные МЭК), где наблюдался аномальный рост. Транскриптомный и эпигенетический анализ показал, что в ПГ-МЭК сMYC индуцирует состояние, сходное с клеточным старением, препятствующее прогрессии опухоли. Данное состояние характеризуется повышением уровня белка p53, снижением концентрации STAT3 и p300, а также активацией онкосупрессивных генов, таких как Esg4. Гиперэкспрессия сMYC, наблюдаемая в 50% случаев РМЖ, соотносится с другими

онкогенными путями, такими как потеря функции BRCA1, активация сигнального каскада MAPK-Ras и PI3K-AKT. Однако в ПГ-МЭЖ эти пути подвергаются эпигенетической регуляции [60]. Дополнительные механизмы защиты включают изменения во внеклеточном матриксе (ВКМ), где противоопухолевый эффект, обусловленный постгестационным ВКМ, определяется не плотностью коллагена, а его структурной организацией: повышенная экспрессия E-кадгерина и снижение активности ERK1/2 препятствуют пролиферации опухолевых клеток. В *in vitro* моделях повышенная плотность коллагена I способствует формированию неполяризованных клеточных структур посредством сигнального пути $\beta 1$ -интегрин-ERK1/2, однако в постгестационном контексте этот путь ингибируется. Влияние беременности на состав ВКМ и иммунный компонент (например, системные иммунные изменения) усиливает защитный эффект [55].

На данный момент не было проведено исследований по изучению влияния возраста на экспрессию NIS в ТНРМЖ, однако мы можем предположить, что возможно влияние различий в мутационном профиле ТНРМЖ у молодых и пожилых пациенток. У женщин молодого возраста чаще встречаются опухоли с высокой пролиферативной активностью, выраженной иммунной инфильтрацией и активацией стресс-индуцированных путей, которые могут повышать или изменять субклеточную локализацию NIS. У пациенток старшего возраста, напротив, стромальный компонент выражен сильнее, а интенсивность воспалительных сигналов ниже, что также может приводить к различиям в уровне и функциональном статусе NIS [23]

Особое влияние могут иметь и тиреоидные гормоны, отвечающие за процессы пролиферации и дифференцировки на уровне всего организма, а потому мы не можем исключать их воздействие в том числе и на экспрессию NIS, учитывая что по имеющимся данным для карцином щитовидной железы, экспрессия NIS зависима от сигнальных путей тиреотропного гормона, PAX8 и ц-АМФ-зависимых сигнальных путей [62].

В целом, онтогенетические факторы оказывают существенное влияние на риск развития РМЖ и определяют ее молекулярный профиль, включая экспрессию

NIS, что открывает перспективные направления для разработки профилактических стратегий. Для детального понимания этих процессов необходимы дальнейшие исследования, направленные на уточнение лежащих в основе патогенетических и молекулярно-биологических механизмов.

1.6. Заключение по обзору литературы

Онтогенетические факторы, такие как возраст и репродуктивная история (количество беременностей, завершившихся родами), могут оказывать существенное влияние на экспрессию NIS в опухолях молочной железы, тем самым определяя молекулярные механизмы прогрессирования рака молочной железы. Однако, в силу отсутствия прямых данных, подтверждающих взаимосвязь между особенностями онтогенеза и экспрессией NIS, наше исследование основывается на косвенных данных и общих патогенетических закономерностях.

Возраст демонстрирует корреляцию с риском развития РМЖ: в постменопаузе риск возрастает вследствие гормональных изменений и накопления мутаций, в то время как наиболее агрессивный вариант – трижды негативный рак молочной железы – чаще встречается у молодых женщин и характеризуется повышенной пролиферативной активностью.

Помимо возраста, важным фактором, влияющим на риск малигнизации эпителия молочной железы, является беременность. Несмотря на то, что период беременности и последующий послеродовой период сопровождаются значительным повышением пролиферативной активности эпителия молочной железы, обусловленным существенными изменениями гормонального фона, и это потенциально может способствовать опухолевой прогрессии при наличии атипичных клеток в момент беременности, статистически подтверждается снижение риска малигнизации на 10–15%, если первая беременность произошла в молодом возрасте. Чем более поздний возраст первой беременности, тем менее

выражен этот защитный эффект, и он может даже смениться обратным эффектом при наступлении первой беременности после 35 лет.

Возможным биологическим механизмом, объясняющим данный феномен, является терминальная дифференцировка эпителиоцитов. Перенесенная беременность снижает общую метилированность генома, увеличивая количество активных регуляторных элементов с 5000 до 60000, что препятствует малигнизации клеток. Одним из ключевых регуляторов в данном процессе является ген TP53, уровень экспрессии которого в клетках люминального эпителия после беременности возрастает. Аналогичный эффект оказывает белок p300. Кроме того, беременность изменяет структуру внеклеточного матрикса молочной железы таким образом, что усиливается контакт клеток эпителия с ним, что приводит к повышению экспрессии белков межклеточных контактов и адгезии клеток, препятствуя инвазивному или метастатическому росту опухоли.

Рядом авторов принято считать, что возраст пациентки может влиять на пролиферативную активность опухоли. Известно, что у молодых пациенток чаще встречаются мутации TP53, а также отмечается более высокий уровень тиреоидных гормонов по сравнению с пожилыми женщинами. В данном исследовании влияние половых гормонов, вероятно, можно исключить, поскольку ТНРМЖ нечувствителен к ним по определению.

Кроме того, мы предполагаем, что терминальная дифференцировка клеток люминального эпителия молочной железы, опосредованная усилением экспрессии p53, может влиять на уровень экспрессии NIS, поскольку p53 является мощным супрессором гена SLC5A5, кодирующего NIS. Мы также считаем, что, учитывая имеющиеся данные о проонкогенных свойствах интрацитоплазматического NIS и его способности стимулировать миграцию опухолевых клеток посредством взаимодействия с белком LARG, различные уровни экспрессии NIS могут оказывать влияние на клинико-прогностические показатели, такие как прогноз заболевания и ответ на противоопухолевую терапию. Таким образом, целью данного исследования является прояснение влияния количества перенесенных

беременностей на факторы риска прогрессии опухоли, экспрессию NIS и практическую значимость этой взаимосвязи.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Диссертационное исследование выполнено в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

2.1. Дизайн исследования

В исследование включены архивные данные медицинской документации и парафиновые блоки пациенток ($n=2719$), находившихся на лечении в отделении онкологии и реконструктивно-пластической хирургии молочной железы и кожи Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России (г. Москва) с верифицированным диагнозом трижды негативного рака молочной железы в период с 2020 по 2023 гг.

Отбор пациенток проводился с использованием стратифицированной рандомизации для максимального обеспечения репрезентативности выборки с учетом специфики исследуемых параметров (Рис. 2.1). В зависимости от количества перенесенных беременностей, завершившихся родами, были сформированы следующие группы пациенток ($n=161$):

- Группа I ($n=9$, 5%) – отсутствие беременностей в анамнезе;
- Группа II ($n=88$, 55%) – 1–3 беременности в анамнезе;
- Группа III ($n=64$, 40%) – 4 и более беременностей в анамнезе.

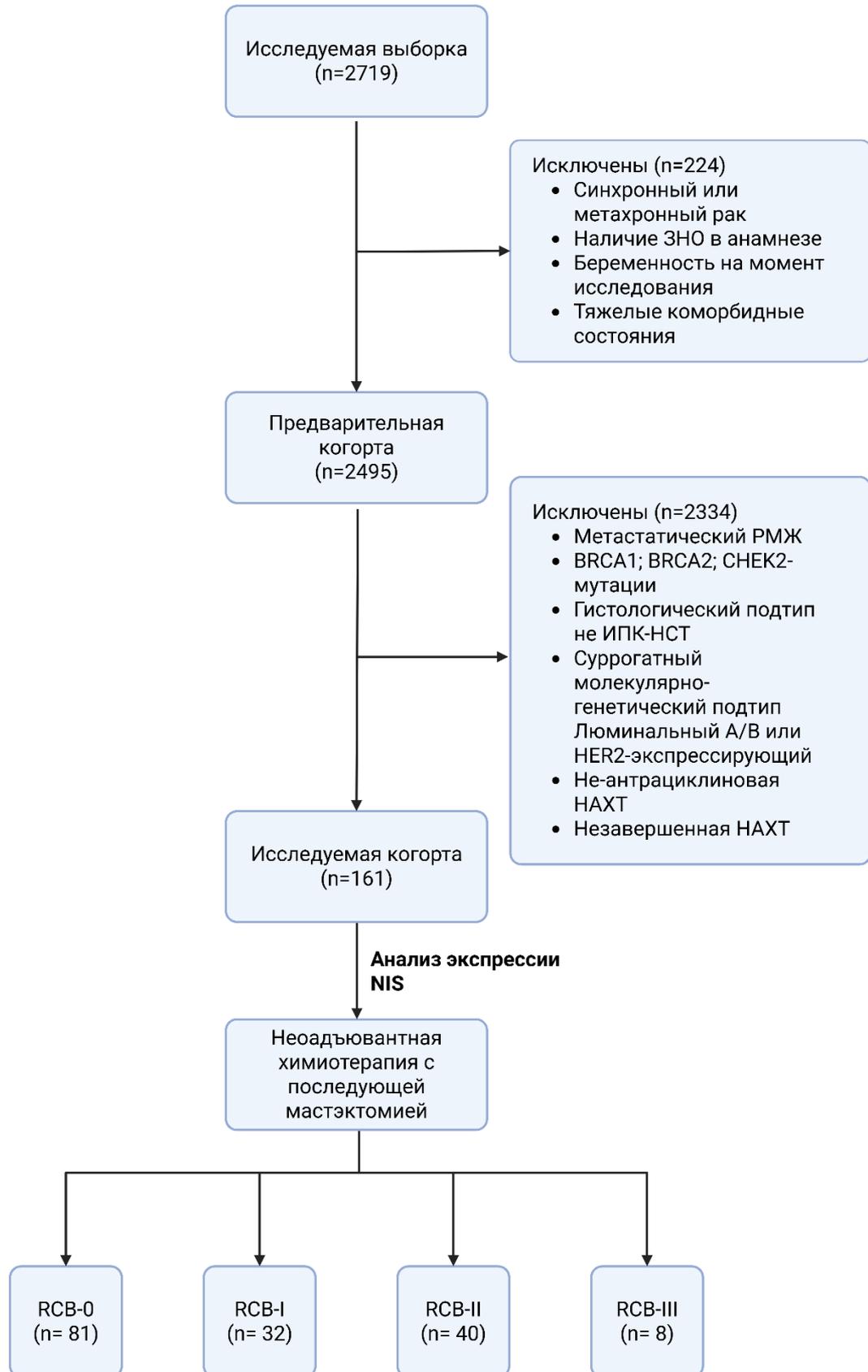


Рисунок 2.1. – Дизайн исследования. Аббревиатуры: ИПК-НСТ – инвазивная протоковая карцинома неспецифического типа; НАХТ – неoadъювантная химиотерапия

Объектом настоящего исследования является первично операбельный или местно-распространенный трижды негативный рак молочной железы.

Критерии включения:

- Первично операбельный или местно-распространенный первично неоперабельный РМЖ: сT1-4, сN0-3 без отдаленных метастазов (M0) по TNM-стадированию 8-й редакции;
- Гистологически верифицированный диагноз: первичная опухоль – core-биопсия, тонкоигольная биопсия лимфатических узлов;
- Подтвержденный трижды негативный подтип РМЖ гистологическим и иммуногистохимическими методами (ER 0, PR 0, HER2/neu 0-1+) с FISH-реакцией к гену HER2 в биопсийном материале;
- Проведенное молекулярно-генетическое исследование мутаций генов *BRCA1/2*, *CHEK2*;
- Отсутствие предшествующей лекарственной и/или лучевой терапии;
- Женщины в возрасте от 18 до 70 лет;
- Функциональный статус по шкале ECOG 0-1.

Критерии исключения:

- Проведенная ранее лекарственная и/или лучевая терапия;
- Наличие отдаленных метастазов или рецидив заболевания;
- Первично-множественный рак (синхронный или метакронный);
- Контралатеральный гормон-позитивный РМЖ;
- Наличие мутаций генов *BRCA1/2*, *CHEK2*;
- Декомпенсированная ишемическая болезнь сердца, кардиомиопатия или сердечная недостаточность III – IV стадии по NYHA;
- Тяжелое нехирургическое сопутствующее заболевание или острая инфекция (неконтролируемая артериальная гипертензия, неконтролируемый сахарный диабет, острое нарушение мозгового кровообращения или инфаркт миокарда давностью менее 6 месяцев, психические расстройства и др.);
- Беременность или период лактации;
- Гепатит В или С или ВИЧ.

Медиана возраста пациенток составила 53,9 года (95% доверительный интервал: 50,0–57,8). В выборке преобладали пациентки зрелого возраста – 75,8% были старше 45 лет, в то время как 24,2% были младше. Всем участницам исследования была проведена неoadъювантная химиотерапия согласно стандартным протоколам, включающим препараты на основе антрациклинов и таксанов, с последующей мастэктомией. Размер выборки был определен исходя из статистической мощности, достаточной для выявления корреляций (мощность 80% при уровне значимости $\alpha=0,05$ для коэффициента корреляции Kendall tau $\geq 0,3$).

Обработка данных осуществлялась в анонимной форме с соблюдением этических принципов Хельсинкской декларации (редакция 2013 года). Протокол исследования был одобрен Независимым советом по этике при МНИОИ им. П. А. Герцена – ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России (протокол № 125 от 30 мая 2025 г.).

2.2. Методы исследования

2.2.1. Сбор клинико-anamнестических данных

Ретроспективный сбор данных осуществлялся посредством анализа медицинской документации, включающей информацию о возрасте пациентки на момент постановки диагноза, количестве беременностей и родов, семейном анамнезе, а также результатах физикального осмотра, инструментальных, лабораторных и молекулярно-генетических исследований. Оцениваемые исходы были разделены на первичные и вторичные: к первичным отнесен уровень экспрессии NIS и его корреляция с онтогенетическими факторами; ко вторичным – ответ на химиотерапию (оцениваемый по индексу остаточной опухолевой нагрузки по системе RCB и критериям оценки ответа солидных опухолей по системе RECIST 1.1).

Согласно решению онкологического консилиума, все участницы когорты получали неоадьювантную химиотерапию на основе антрациклинов в соответствии с утвержденными протоколами, с последующей мастэктомией.

Режимы неоадьювантной химиотерапии включали доксорубин (А), циклофосфамид (С), докетаксел (Т), паклитаксел (Р), карбоплатин (Carbo) и dose-dense (dd) режимы:

- 4АС+4Т/12Р (Доксорубин 60 мг/м² внутривенно в 1-й день + циклофосфамид 600 мг/м² внутривенно в 1-й день каждые 3 недели в течение 4 циклов + докетаксел 75 мг/м² внутривенно в 1-й день каждые 3 недели в течение 4 циклов ИЛИ паклитаксел 80 мг/м² внутривенно еженедельно в течение 12 недель);
- 4ddАС+12Р (dose-dense режим: Доксорубин 60 мг/м² внутривенно в 1-й день + Циклофосфамид 600 мг/м² внутривенно в 1-й день; цикл каждые 14 дней в течение четырех циклов, за которым следует паклитаксел 80 мг/м² внутривенно еженедельно в течение 12 недель);
- 4ddАС+4ddР (dose-dense режим: Доксорубин 60 мг/м² внутривенно в 1-й день + Циклофосфамид 600 мг/м² внутривенно в 1-й день; цикл каждые 14 дней в течение четырех циклов, за которым следует Паклитаксел 175 мг/м² внутривенно в 1-й день с циклом каждые 14 дней в течение четырех циклов);
- 4ddАС+Р+Carbo (dose-dense режим: Доксорубин 60 мг/м² внутривенно в 1-й день + Циклофосфамид 600 мг/м² внутривенно в 1-й день; цикл каждые 14 дней в течение четырех циклов, за которым следует паклитаксел 80 мг/м² внутривенно еженедельно в течение 12 недель с карбоплатином АУС 6 внутривенно в 1-й день)

Окончательное количество курсов неоадьювантной химиотерапии определялось индивидуально, в соответствии с запланированным протоколом и оценкой эффективности на основании результатов компьютерной томографии. После завершения химиотерапевтического курса пациентки были направлены на хирургическое вмешательство, включавшее радикальную резекцию опухоли, подкожную мастэктомию с одновременной реконструкцией большой грудной

мышцей в комбинации с силиконовым протезом, либо тотальную мастэктомию с лимфодиссекцией подмышечной области – в зависимости от распространенности процесса и на основании данных срочных гистологических исследований. На момент начала исследования все участницы когорты были живы.

Молекулярно-генетическое исследование

Молекулярно-генетическое исследование проводилось на образцах венозной крови, полученной от всех пациенток на момент поступления, для выявления герминальных мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2* и *CHEK2* с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР в реальном времени) на приборе DTPPrime4 (ДНК-технология). Исследовались следующие мутации в гене *BRCA1*: 5382insC (вставка C в позиции 5382); 4153delA (делеция A в позиции 4153); 300T>G (замена T на G в позиции 300); 3819delGTAAA (делеция GTAAA в позиции 3819); 2080delA (делеция A в позиции 2080); 185delAG (делеция AG в позиции 185); 3875delGTCT (делеция GTCT в позиции 3875). В гене *BRCA2*: 6174delT (делеция T в позиции 6174). Для гена *CHEK2*, ассоциированного с раком молочной железы и яичников, анализировались мутации: 1100delC (делеция C в позиции 1100); IVS2+1G>A (замена G на A в позиции +1 сайта сплайсинга интрона 2); 470T>C (замена T на C в позиции 470) [15].

Исключение *BRCA1*, *BRCA2* и *CHEK-2*-мутантных форм ТНPMЖ обусловлено необходимостью нивелирования влияния HRD-статуса (дефицита гомологичной рекомбинации) на параметры иммунного микроокружения и чувствительность к платиносодержащей неоадьювантной химиотерапии, поскольку наследственные опухоли характеризуются исходно более высоким уровнем иммуногенности и отличным профилем ответа на лечение, например, повышенной чувствительностью опухоли к препаратам платины [104, 172].

В связи с чем, в диссертационное исследование были включены только пациентки (n=161) с ТНPMЖ, не ассоциированные с *BRCA1*-, *BRCA2*-, *CHEK-2*-мутациями.

2.2.2. Гистологическое исследование

Гистологическое исследование проводили на биопсийном материале – трепан-биопсия опухоли молочной железы (архивные парафиновые блоки), окрашенных гематоксилином и эозином. Степень злокачественности опухоли оценивали по Nottingham Grading System (Таблица 2.1) [37].

Таблица 2.1. Ноттингемская система оценки злокачественности карцином молочной железы

Показатель	Балл		
	1	2	3
Тубулярные структуры	>75%	10 –75%	<10%
Ядерный полиморфизм	Слабый	Умеренный	Выраженный
Митотическая активность*	≤12	13 – 24	>25
Итоговый балл	3 – 5	6 – 7	8 – 9
	Grade 1	Grade 2	Grade 3

Примечание: * – определяется по горячим точкам на 10 полей зрения при большом увеличении с поправкой на площадь поля зрения (данные указаны для диаметра 0.65 мм)

2.2.3. Иммуногистохимическое исследование

Иммуногистохимическое исследование (ИГХ) выполнялось на автоматизированной платформе Ventana Benchmark XT (Roche Diagnostics) с использованием набора ultraView Universal DAB Detection Kit. Оценивались следующие маркеры:

- Рецепторы к эстрогену (ER) и прогестерону (PR) – антитела ER clone SP1 Ventana; PgR, clone 1E2 Ventana, HER2/neu – антитела (clone 4B5 Ventana);

- Маркер пролиферативной активности Ki-67 – антитела Mouse monoclonal (Ventana); оценка по шкале St. Gallen Consensus (2009): низкий (<14%), промежуточный (14–20%), высокий (>20%) [56]. Суррогатный молекулярно-генетический профиль и степень пролиферативной активности определялись согласно рекомендациям ВОЗ и College of American Pathologist с применением системы Allred (Таблица 2.2). Трижды негативным фенотипом считалось 2 и менее баллов по Allred для ER и PR, а также отсутствие экспрессии HER2/neu (Таблица 2.3; 2.4). При оценке пролиферативной активности анализу подвергалось как минимум 1000 опухолевых клеток, подсчет велся по всему опухолевому материалу с учетом «горячих точек» [22, 75].

Таблица 2.2 – Оценка экспрессии рецепторов к эстрогену и прогестерону по системе Allred

Доля экспрессии	Позитивные клетки, %	Интенсивность /баллы
0	0	Нет окрашивания / 0
1	<1	Слабая /1
2	1 – 10	Умеренная /2
3	11 – 33	Высокая / 3
4	34 – 66	
5	≥67	

Примечание: Итоговый балл (Total score) = доля экспрессии + степень интенсивности (балл). 0–2 – негативный результат, 3–8 – позитивный результат

Таблица 2.3 – Оценка степени экспрессии HER/neu

HER2/статус	Критерии
Негативный (0)	Отсутствие окрашивания, либо мембранное окрашивание, которое является неполным и слабым; в $\leq 10\%$ опухолевых клеток
Негативный (1+)	Неполное мембранное окрашивание, которое является слабым; в $\geq 10\%$ опухолевых клеток
Сомнительный (2+)	Слабое или умеренное полное мембранное окрашивание в $\geq 10\%$ опухолевых клеток или полное интенсивное мембранное окрашивание, но в $\leq 10\%$ опухолевых клеток
Позитивный (3+)	Полное интенсивное мембранное окрашивание в $>10\%$ опухолевых клеток

Таблица 2.4 – Суррогатные молекулярно-генетические подтипы рака молочной железы

Суррогатный молекулярно-генетический подтип	Характеристика
Люминальный А	ER-позитивный; PR-позитивный HER2-негативный Ki-67 $\leq 20\%$ *
Люминальный В. HER2-негативный	ER-позитивный HER2-негативный И как минимум 1 из следующего: <ul style="list-style-type: none"> • Ki-67 $\geq 30\%$ • PR $< 20\%$ (процент экспрессирующих клеток)
Люминальный В. HER2-позитивный	ER-позитивный; PR любой HER2-позитивный Ki-67 любой
HER2-гиперэкспрессирующий	ER-негативный; PR-негативный HER2-позитивный
Трижды негативный	ER-негативный; PR-негативный HER2-негативный

Примечание – * – пороговые значения Ki-67 могут быть индивидуальны для каждого отделения. ER – рецептор к эстрогену; PR – рецептор к прогестерону

- Натрий-йод симпортер (NIS) – антитела Rabbit polyclonal (Affinity Biosciences Cat# DF2242, RRID: AB_2839473, 1:2500); оценка проводилась полуколичественно по модифицированной шкале Gainor: 0 баллов – окраска отсутствует; 1 балл – бледная цитоплазматическая окраска, позволяющая отличить положительные клетки от фона, присутствуют мелкие гранулы; 2 балла – отчетливая цитоплазматическая окраска с грубым гранулярным паттерном окрашивания; 3 балла – выраженная мембранно-цитоплазматическая окраска, грубая гранулярная окраска, отдельные гранулы часто неразличимы [66]. Кроме того, подсчитывался процент положительных опухолевых клеток: от 0 до 100% (Рисунок 2.2).

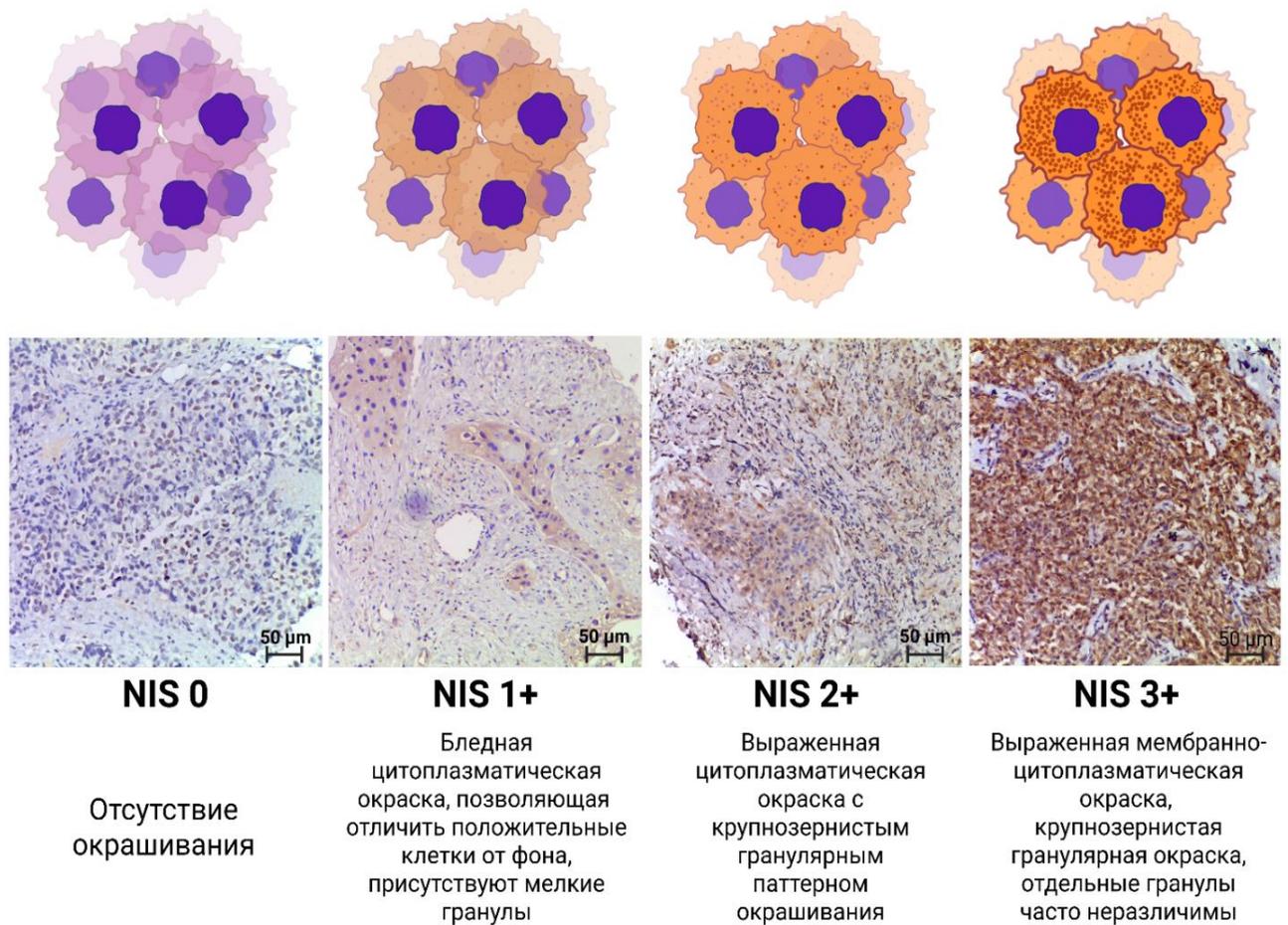


Рисунок 2.2 – Оценка степени экспрессии NIS по модифицированной шкале Gainor

- Дополнительно: GATA-3 (clone L50-823 CellMarque) и маммаглобин (clone 31A5 CellMarque) для сравнительной оценки чувствительности маркеров.

- Фрагменты щитовидной железы с болезнью Грейвса (окрашивание фолликулярных клеток) [43, 166] использовались в качестве внешнего контроля для иммуногистохимического исследования с антителами к NIS, фрагменты кожи

(окрашивание потовых желез) [70] – для реакции с антителами к маммаглобину, а фрагменты шейки матки (окрашивание базальных и парабазальных клеток экзоцервикального эпителия) [131] – для реакции с антителами к GATA-3.

2.2.4. Мультиплексное иммуногистохимическое исследование

Мультиплексное иммуногистохимическое исследование проводили в Научно-образовательном ресурсном центре «Инновационные технологии иммунофенотипирования, цифрового пространственного профилирования и ультраструктурного анализа» (Молекулярная морфология) РУДН (выражаем благодарность директору НОРЦ «Молекулярная морфология» – д.м.н., Д.А. Атякшину за помощь в проведении исследования).

Мультиплексное иммунофлуоресцентное окрашивание было выполнено с помощью 7-цветного набора Opal (Akoya Biosciences, Marlborough, MA) в соответствии с протоколом производителя. После стандартной депарафинизации и регидратации проводили демаскировку (извлечение) антигена в растворе R-UNIVERSAL путем нагревания в микроволновой печи при 95 °C в течение 20 минут. Затем выполняли блокирование активности эндогенной пероксидазы.

Исследование маркеров внутриклеточной и межклеточной регуляции

Первый цикл окрашивания. Срезы инкубировали в течение 60 минут с первичными антителами к p53 (Clone: DO7, mouse; 1:500), затем наносили полимер Opal Anti-Ms + Rb HRP на 30 минут, после чего инкубацию проводили с флуорохромом Opal 480 в течение 10 минут. Затем связанные первичные и вторичные антитела были удалены с помощью повторного нагревания в микроволновой печи в растворе R-UNIVERSAL (согласно описанию выше).

Второй и третий циклы окрашивания. Повторение процедуры проводили с антителами к NIS (Affinity Biosciences Cat# DF2242, RRID: AB_2839473; 1:2500), инкубацией с полимером Opal Anti-Ms + Rb HRP (30 минут) и последующей

визуализацией флуорохромом Opal 540 (10 минут). Следующий цикл включал инкубацию с антителами к TGF-beta 1 (Abcam; clone ab315254, 1:50), полимером Opal Anti-Ms + Rb HRP (30 минут) и флуорохромом Opal 647 (10 минут).

В завершение образцы ткани были окрашены DAPI в течение 5 минут и заключены в монтирующую среду ProLong Diamond Antifade Mountant (ThermoFisher Scientific).

Исследование маркеров тучных клеток

Первый цикл окрашивания. Срезы инкубировали в течение 60 минут с антителами к Tryptase (Abcam clone ab2378; 1:2500), затем наносили полимер Opal Anti-Ms + Rb HRP на 30 минут, после чего инкубацию проводили с флуорохромом Opal 488 в течение 10 минут. Затем связанные первичные и вторичные антитела были удалены с помощью повторного нагревания в микроволновой печи в растворе R-UNIVERSAL.

Второй цикл окрашивания. Повторение перечисленных манипуляций проводили с антителами к CPA-3 (Abcam clone ab251696; 1:2500), инкубацией с полимером Opal Anti-Ms + Rb HRP (30 минут) и последующей визуализацией флуорохромом Opal 555 (10 минут). После этого проводили удаление антител нагреванием.

Третий и четвертый циклы окрашивания. Срезы инкубировали в течение 60 минут с антителами к Chymase (Abcam clone ab186417; 1:500), затем наносили полимер Opal Anti-Ms + Rb HRP (30 минут) с последующей инкубацией с флуорохромом Opal 647 (10 минут). После удаления антител повторяли манипуляции с антителами к NIS (Affinity Biosciences Cat# DF2242, RRID: AB_2839473; 1:2500), полимером Opal Anti-Ms + Rb HRP (30 минут) и флуорохромом Opal 780 (10 минут).

В завершение образцы ткани были окрашены DAPI в течение 5 минут и заключены в монтирующую среду ProLong Diamond Antifade Mountant (ThermoFisher Scientific).

Исследование маркеров сосудистого и макрофагального микроокружения опухоли

Первый цикл окрашивания. Срезы инкубировали в течение 60 минут с антителами к CD31 (Ventana; Clone: JC70A, mouse; RTU), затем наносили полимер Opal Anti-Ms + Rb HRP на 30 минут, после чего инкубацию проводили с флуорохромом Opal 480 в течение 10 минут. Затем связанные первичные и вторичные антитела были удалены с помощью повторного нагревания в микроволновой печи в растворе R-UNIVERSAL.

Второй, третий и четвертый циклы окрашивания. Повторение перечисленных манипуляций проводили с антителами к CD68 (Ventana; Clone: KP-1, mouse; RTU), инкубацией с полимером Opal Anti-Ms + Rb HRP (30 минут) и последующей визуализацией флуорохромом Opal 520 (10 минут). Затем следовало повторение манипуляций с антителами к CD163 (Ventana; Clone: MRQ-26, mouse; RTU), инкубацией с полимером Opal Anti-Ms + Rb HRP (30 минут) и визуализацией флуорохромом Opal 570 (10 минут). Завершающий цикл включал инкубацию с антителами к NIS (Affinity Biosciences Cat# DF2242; 1:2500), использование полимера Opal Anti-Ms + Rb HRP и визуализацию флуорохромом Opal 690 (10 минут).

После всех циклов окрашивания образцы ткани были контрастированы DAPI в течение 5 минут и заключены в монтирующую среду ProLong Diamond Antifade Mountant (ThermoFisher Scientific).

Исследование маркеров Т-клеточного компонента опухоли

Первый цикл окрашивания. Срезы инкубировали в течение 60 минут с антителами к CD8 (Ventana; Clone: SP57, rabbit; RTU), затем наносили полимер Opal Anti-Ms + Rb HRP на 30 минут, после чего инкубацию проводили с флуорохромом Opal 480 в течение 10 минут. Затем связанные первичные и вторичные антитела были удалены с помощью повторного нагревания в микроволновой печи в растворе R-UNIVERSAL.

Второй, третий и четвертый циклы окрашивания. Повторение перечисленных манипуляций проводили с антителами к CD4 (Ventana; Clone: SP35, rabbit; RTU), инкубацией с полимером Opal Anti-Ms + Rb HRP (30 минут) и последующей визуализацией флуорохромом Opal 520 (10 минут). Затем следовало повторение манипуляций с антителами к FOXP3 (Ventana; Clone: SP354, rabbit; RTU), инкубацией с полимером Opal Anti-Ms + Rb HRP (30 минут) и визуализацией флуорохромом Opal 570 (10 минут). Завершающий цикл включал инкубацию с антителами к NIS (Affinity Biosciences Cat# DF2242; 1:2500), использование полимера Opal Anti-Ms + Rb HRP и визуализацию флуорохромом Opal 690 (10 минут).

После всех циклов окрашивания образцы ткани были контрастированы DAPI в течение 5 минут и заключены в монтирующую среду ProLong Diamond Antifade Mountant (ThermoFisher Scientific).

2.2.5. Морфометрические методы

Микроскопическое исследование и получение изображений проводили с использованием исследовательского микроскопа Zeiss Axio Imager.Z2 (Carl Zeiss Vision, Jena, Germany). Для детального анализа структур использовали иммерсионные объективы Zeiss alpha Plan-Apochromat 100×/1.46 Oil DIC M27 и Zeiss Plan-Apochromat 150×/1.35 Glyc DIC Corr M27. Регистрацию изображений осуществляли с помощью цифровых камер Zeiss AxioCam 712 color и Zeiss AxioCam 712 mono (Carl Zeiss Vision, Jena, Germany).

Для получения обзорных изображений гистологических срезов выполняли полноформатное цифровое сканирование стекол (Whole Slide Imaging) на сканере KF-PRO-005 (Ningbo, ZheJiang, China). Полученные цифровые сканы использовали для навигации, выбора репрезентативных зон (Regions of Interest, ROI) и сопоставления с результатами высокоразрешающей флуоресцентной микроскопии.

Количественный анализ изображений

Морфометрический анализ и количественную оценку экспрессии маркеров выполняли в программной среде QuPath (версия 0.6.0). Для обеспечения воспроизводимости результатов и унификации параметров обработки всего массива изображений применяли автоматизированный анализ с использованием оригинальных скриптов на языке Groovy.

Анализ интенсивности и ко-экспрессии (Суперпиксельная сегментация)

Количественную оценку взаимосвязи интенсивности экспрессии маркеров проводили методом суперпиксельной сегментации SLIC (Simple Linear Iterative Clustering). Использовали следующие параметры алгоритма: размер суперпикселя (σ) — 5,0 мкм, расстояние между центрами суперпикселей — 50,0 мкм, количество итераций — 10, коэффициент регуляризации — 0,25. Для каждого суперпикселя рассчитывали среднюю интенсивность флуоресценции в соответствующих цветовых каналах (Рисунок 2.3).

Корреляционный анализ интенсивности сигнала между каналами выполняли с использованием коэффициентов корреляции Пирсона (r) и Спирмена (ρ). Статистическую значимость корреляции оценивали по t-критерию Стьюдента, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

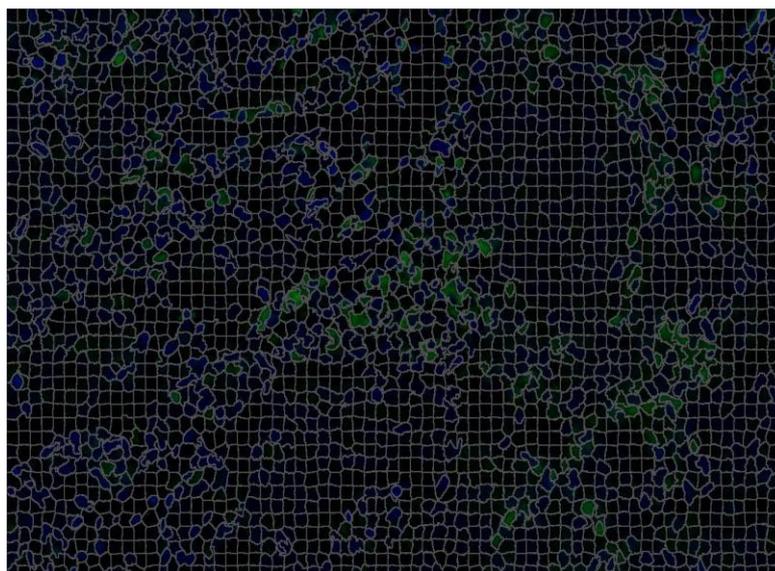


Рисунок 2.3 – Анализ изображения методом суперпикселизации с помощью программного обеспечения QuPath. Изображение сегментируется на отдельные элементы на основании цветовых характеристик и в каждом отдельном элементе высчитывается интенсивность окрашивания маркера

Анализ плотности распределения клеток

Количественная оценка популяций клеток проводилась на мультиканальных изображениях. Детекцию клеток осуществляли на основе ядерного окрашивания (DAPI) с использованием встроенного алгоритма «Cell Detection» в QuPath и его модификаций с применением специализированных скриптов. Классификацию клеток на позитивные и негативные для каждого маркера проводили путем установки пороговых значений (thresholding) средней интенсивности флуоресценции в цитоплазме или ядре (в зависимости от локализации маркера). Результаты представлены в виде плотности клеток (количество позитивных клеток на 1 мм² площади опухолевой ткани).

2.2.6. Анализ остаточной опухолевой нагрузки по системе RCB и критериев оценки ответа солидных опухолей по системе RECIST 1.1

Оценка степени патоморфологического ответа на проведенную неоадьювантную полихимиотерапию проводилась на операционном материале, полученном после радикального хирургического лечения (мастэктомии или органосохраняющей резекции с аксиллярной лимфодиссекцией). Для определения индекса остаточной опухолевой нагрузки (Residual Cancer Burden, RCB) выполняли макроскопическое и гистологическое исследование ложа опухоли и удаленных регионарных лимфатических узлов. В ходе анализа учитывали первичные размеры ложа опухоли в двух измерениях, средний процент клеточности инвазивного компонента карциномы, количество пораженных лимфатических узлов и размер наибольшего метастаза. Расчет индекса выполнялся с использованием валидированного онлайн-калькулятора MD Anderson Cancer Center. На основании полученных числовых значений индекса пациенты были стратифицированы на четыре прогностические группы в зависимости от степени ответа: RCB-0 (индекс RCB = 0, эквивалентно полному ответу), RCB-1 (индекс RCB $\geq 0-1,36$), RCB-2 (индекс RCB 1,37–3,28) и RCB-3 (индекс RCB $> 3,28$). Расчет

выполнялся с использованием онлайн-калькулятора RCB (www.mdanderson.org/breastcancer_RCB) [96].

Оценка объективного клинического ответа опухоли на терапию осуществлялась на основании данных инструментальных методов визуализации (КТ, МРТ, маммография) в соответствии с международными критериями оценки ответа солидных опухолей по системе RECIST версии 1.1 (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors). Для количественного анализа выделяли до пяти таргетных очагов (максимум два на орган), измерение которых проводили с учетом морфологического типа ткани: для экстранодальных солидных очагов фиксировали наибольший линейный диаметр, тогда как для лимфатических узлов измеряли короткую ось, перпендикулярную наибольшему диаметру (Рис. 2.4).

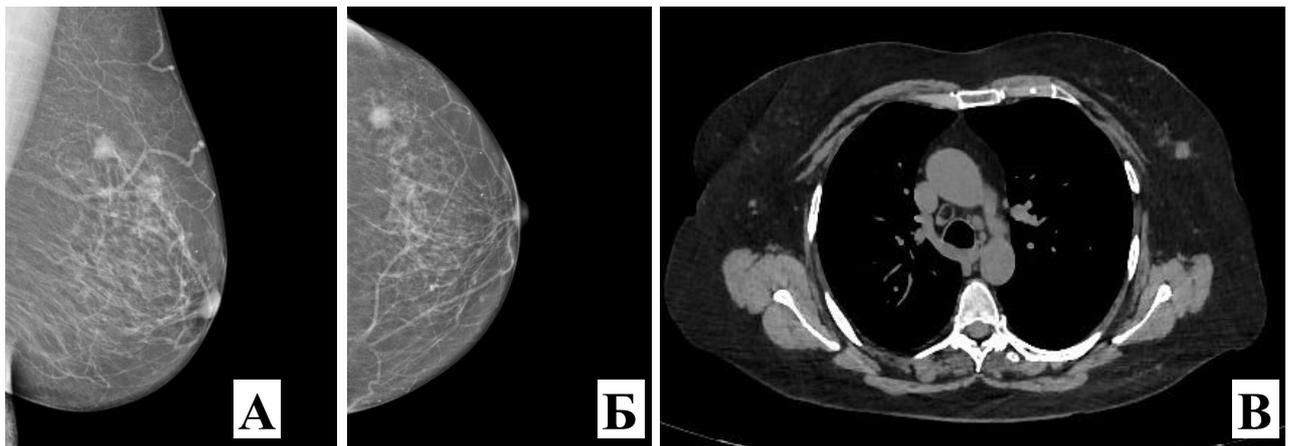


Рисунок 2.4 – Маммография и компьютерная томография молочной железы. А) Маммография, прямая проекция; Б) Маммография, косая проекция; В) Компьютерная томография органов грудной клетки. В верхненаружном квадранте правой молочной железы определяется узловое уплотнение ~1 см в диаметре

Динамику заболевания оценивали путем сравнения суммы диаметров всех таргетных очагов с исходными показателями (для оценки частичного ответа) или с наименьшим зарегистрированным значением (надиром) для оценки прогрессирования. Определение категорий ответа (полный ответ, частичный ответ, стабилизация, прогрессирование) проводили на основании пороговых значений изменения суммы диаметров и появления новых очагов, подробно описанных в Таблице 2.5.

Таблица 2.5 – Критерии оценки ответа для таргетных и нетаргетных очагов согласно RECIST 1.1

Категория ответа	Критерии для таргетных (измеряемых) очагов	Критерии для нетаргетных (неизмеряемых) очагов
Полный ответ (CR — Complete Response)	Исчезновение всех таргетных очагов. Любые патологические лимфоузлы (как таргетные, так и нетаргетные) должны иметь короткую ось <10 мм.	Исчезновение всех нетаргетных очагов и нормализация уровня онкомаркеров. Все лимфоузлы должны быть непатологических размеров (<10 мм по короткой оси).
Частичный ответ (PR — Partial Response)	Уменьшение суммы диаметров таргетных очагов не менее чем на 30% по сравнению с исходной суммой (baseline).	Не применимо (для нетаргетных очагов частичный ответ количественно не оценивается, используется категория «Non-CR/Non-PD»).
Прогрессирование заболевания (PD — Progressive Disease)	Увеличение суммы диаметров таргетных очагов не менее чем на 20% по сравнению с наименьшей суммой (надиром), зарегистрированной за время наблюдения. Абсолютное увеличение суммы должно составлять не менее 5 мм. ИЛИ Появление одного или нескольких новых очагов.	Однозначное прогрессирование (существенный рост) существующих нетаргетных очагов. Примечание: скромное увеличение размеров нетаргетных очагов не является достаточным для установления PD. ИЛИ Появление одного или нескольких новых очагов.
Стабилизация заболевания (SD — Stable Disease)	Недостаточное уменьшение для квалификации как PR и недостаточное увеличение для квалификации как PD (по сравнению с надиром).	Сохранение одного или более нетаргетных очагов и/или уровень онкомаркеров выше нормы (категория «Non-CR/Non-PD»).

2.2.7. Статистические методы

Статистический анализ выборки проводился с использованием программного обеспечения Statistica 13.5.0.17 (TIBCO Software Inc.). Описание количественных данных включало определение медианы и межквартильного размаха (IQR; 25–75-й перцентили) или среднего значения и стандартного отклонения (SD) в зависимости от нормальности распределения (тест Лиллиефорса: $p > 0,20$), значение $p \leq 0,05$ считалось статистически значимым. Степень корреляции между переменными оценивалась с использованием коэффициента ранговой корреляции Kendall-tau. Коэффициенты корреляции Kendall-tau (τ) интерпретировались на основе стандартных рекомендаций: $\tau < 0,2$ – слабая, $0,2–0,4$ – слабая/умеренная, $0,4–0,6$ – умеренная, $0,6–0,8$ – сильная и $>0,8$ – очень сильная [24].

При нормальном распределении данных и равенстве дисперсий для сравнения двух и более независимых групп применяли однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA). При обнаружении статистически значимых различий между группами проводили апостериорные (post-hoc) попарные сравнения с использованием критерия Тьюки (Tukey's Honest Significant Difference, HSD), обеспечивающего контроль ошибки первого рода при множественных сравнениях. При нарушении условий применимости параметрических методов использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса (Kruskal–Wallis H-test) с последующим попарным сравнением групп с помощью критерия Данна (Dunn's test) с поправкой Бонферрони.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной главе представлены клинико-анамнестические данные и результаты морфологического исследования пациенток (n=161) с ТНРМЖ. Анализ проводился в соответствии с поставленными задачами и включал оценку основных клинико-морфологических характеристик опухолей, таких как гистологический тип, степень злокачественности, наличие лимфоваскулярной инвазии и состояние регионарных лимфоузлов. Особое внимание уделено результатам иммуногистохимического фенотипирования, что позволило изучить иммунный ландшафт и молекулярно-биологические особенности этого злокачественного новообразования, а также статистическому анализу взаимосвязи выявленных морфологических параметров с онтогенетическими факторами, прежде всего – количество перенесенных беременностей и возраст пациенток.

3.1. Клинико-анамнестические данные когорты

Исследуемая когорта включала 161 пациента. Медицинские карты были подвергнуты анализу. Средний возраст пациенток составил 51,6 лет (стандартное отклонение: $\pm 12,56$). В выборке преобладали пациентки старше 45 лет – 75,8% (n=122), тогда как доля пациенток моложе 45 лет составила 24,2% (n=39). На момент поступления большинство пациенток имели стадию IIА (53,09%) по TNM (Таблица 3.1) [38]. Анализ возрастного состава групп продемонстрировал существенные различия в демографическом профиле пациенток. Первая группа была представлена исключительно пациентками молодого возраста (до 45 лет), тогда как во второй группе подавляющее большинство составили женщины старшей возрастной категории (45 лет и старше). Третья группа занимала промежуточное положение: несмотря на доминирование пациенток старшего

возраста, доля молодых женщин в ней была заметно выше по сравнению со второй группой.

При оценке распространенности первичной опухоли (категория cT) во всех исследуемых когортах наиболее часто встречалась стадия T2. Статус регионарных лимфатических узлов (категория cN) выявил различия между группами, коррелирующими с показателями лимфоваскулярной инвазии (Таблица 3.2).

Таблица 3.1 – Характеристики когорты. Распределение по стадиям TMN (UJCC 2025)

Стадия TNM	Количество пациенток (%)
Стадия I A	8 (4,97%)
Стадия I B	1 (0,62%)
Стадия II A	88 (54,66%)
Стадия II B	16 (9,94%)
Стадия III A	8 (4,97%)
Стадия III B	16 (9,94%)
Стадия III C	24 (14,9%)
Итого	161 (100%)

Таблица 3.2 – Клинико-морфологические характеристики когорты

Характеристики	Общая когорта пациенток (n=161)		
	Группа		
	I	II	III
Возраст (годы) (n, %)			
<45 лет	9 (5.59%)	8 (4.97%)	22 (13.66%)
≥45 лет	0 (0.00%)	80 (49.69%)	42 (26.09%)

Продолжение Таблицы 3.2			
Характеристики	Группа		
	I	II	III
сТ стадия (n, %)			
T1	0 (0.00%)	8 (4.97%)	0 (0.00%)
T2	9 (5.59%)	64 (39.75%)	56 (34.78%)
T3	0 (0.00%)	0 (0.00%)	8 (4.97%)
T4	0 (0.00%)	16 (9.94%)	0 (0.00%)
сN стадия (n, %)			
N0	0 (0.00%)	72 (44.72%)	40 (24.84%)
N1	0 (0.00%)	8 (4.97%)	8 (4.97%)
N2	0 (0.00%)	0 (0.00%)	8 (4.97%)
N3	9 (5.59%)	8 (4.97%)	8 (4.97%)
Лимфоваскулярная инвазия (n, %)			
Не обнаружена	0 (0.00%)	72 (44.72%)	40 (24.84%)
Обнаружена	9 (5.59%)	16 (9.94%)	24 (14.91%)

3.2. Гистологическое исследование

Гистологическое исследование образцов трепан-биопсии молочной железы (n=161) выявило типичную морфологическую картину инвазивной карциномы неспецифического типа, классифицируемую как степень 3 по системе Nottingham

Grading Score. Микроскопическое исследование образцов продемонстрировало наличие патологически измененной ткани молочной железы, характеризующейся скоплением плеоморфных атипичных клеток, формирующих солидные структуры. Цитоплазма этих клеток представлена тонким ободком, ядра имеют признаки полиморфизма, эксцентрично расположены и обладают округлой формой с «разъединенной» кариолеммой. Стромальный компонент характеризуется слабой десмопластической реакцией (Рисунок 3.1).

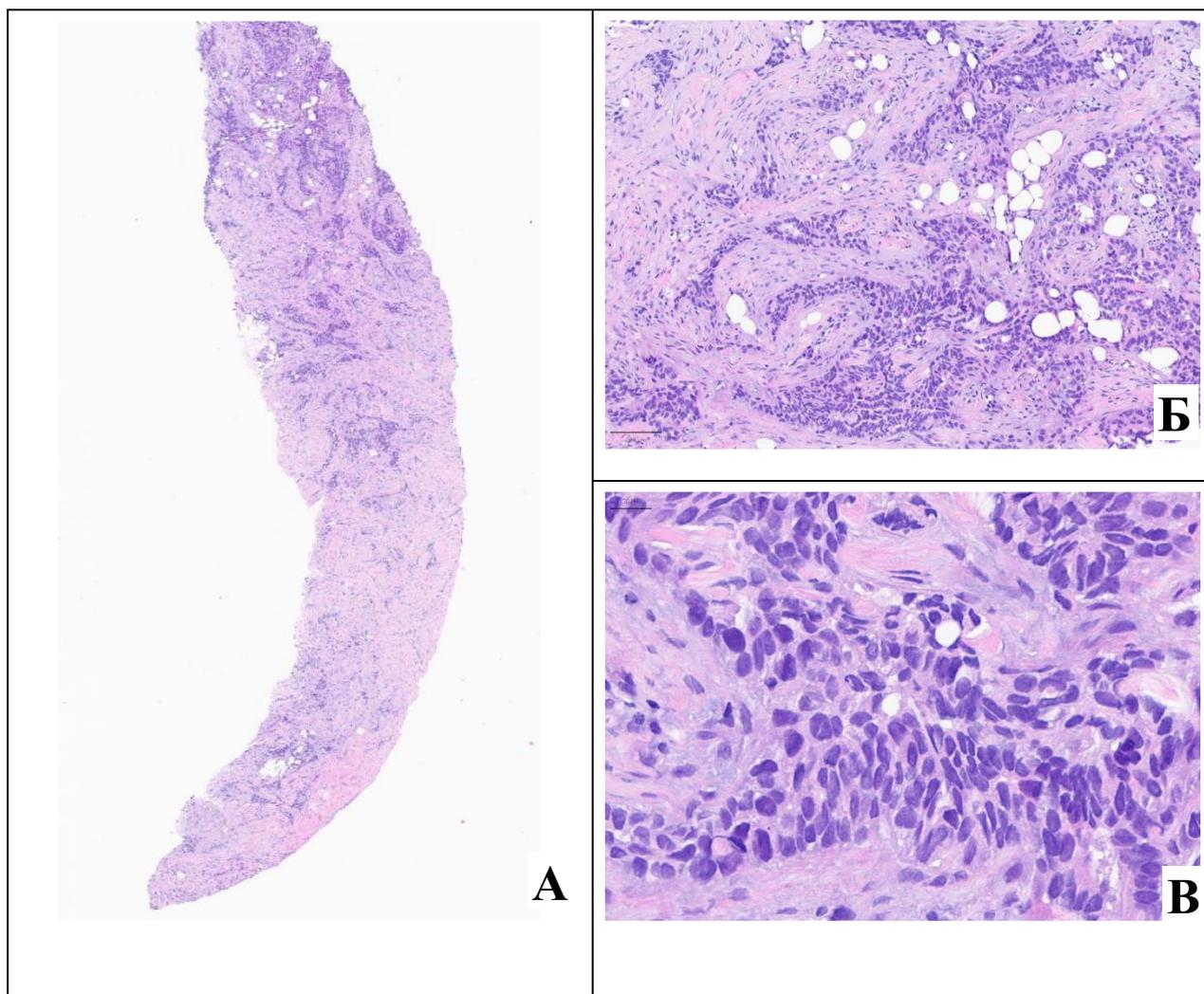
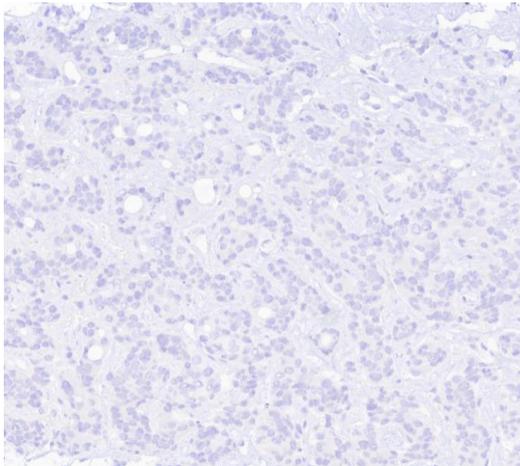


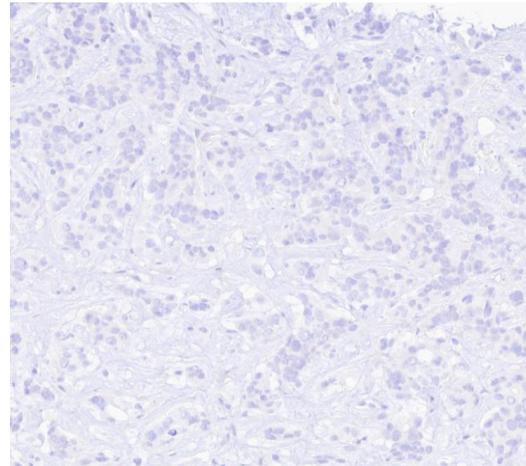
Рисунок 3.1 – Пациентка Р., 56 л. Инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа, трижды негативный рак. Окрашивание – гематоксилином и эозином; увеличения: А – гистоскан микропрепарата, Б – увеличение $\times 200$ (окуляр $\times 10$, объектив $\times 20$), В – увеличение $\times 400$ (окуляр $\times 10$, объектив $\times 40$)

3.3. Иммуногистохимическое исследование

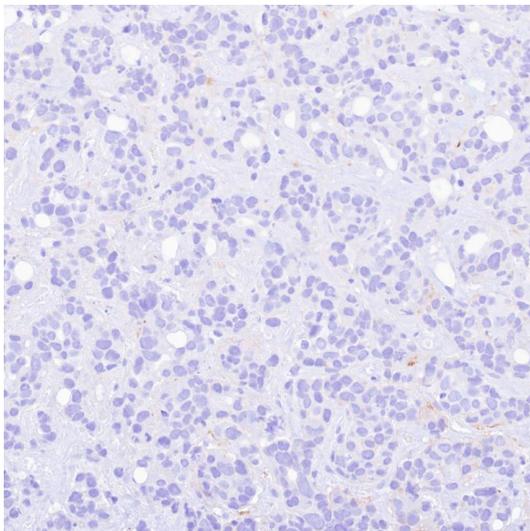
По результатам иммуногистохимического исследования материала биопсии молочной железы (n=161) не было выявлено экспрессии рецептора эстрогена (Allred=0), рецептора прогестерона (Allred=0) и HER2/neu (-/0), что соответствует диагнозу трижды негативного рака молочной железы (Рисунок 3.2).



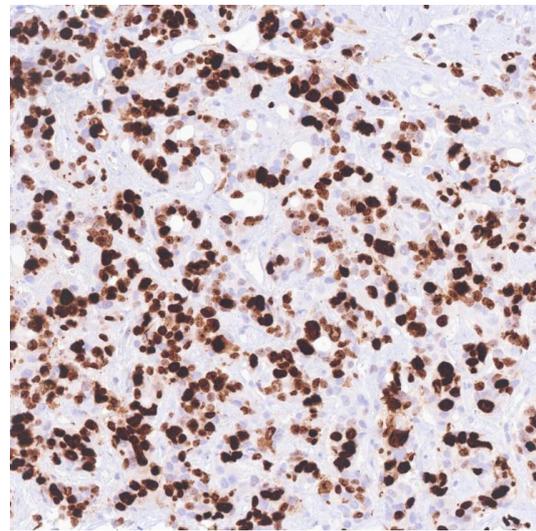
Рецепторы эстрогена



Рецептора прогестерона



HER2/neu



Ki-67

Рисунок 3.2 – Трижды негативный рак молочной железы. Иммуногистохимическое исследование; докрасивание ядер – гематоксилином, увеличение $\times 250$ (окуляр $\times 10$, объектив $\times 25$)

Оценка пролиферативной активности раковых клеток на основе экспрессии Ki-67 (%) демонстрировала вариабельность в зависимости от возраста пациенток. Результаты статистического анализа не выявили статистически значимой корреляции между уровнем экспрессии NIS и количеством пораженных лимфатических узлов, митотической активностью, уровнем Ki-67 ($p > 0,05$). В то же время, была обнаружена статистически значимая отрицательная корреляция между возрастом пациента и уровнем пролиферативной активности Ki-67 (%) – коэффициент Кендалла-тау составил $-0,416$ ($p < 0,05$), что указывает на слабую-умеренную корреляционную взаимосвязь (Рис. 3.3 – 3.4)

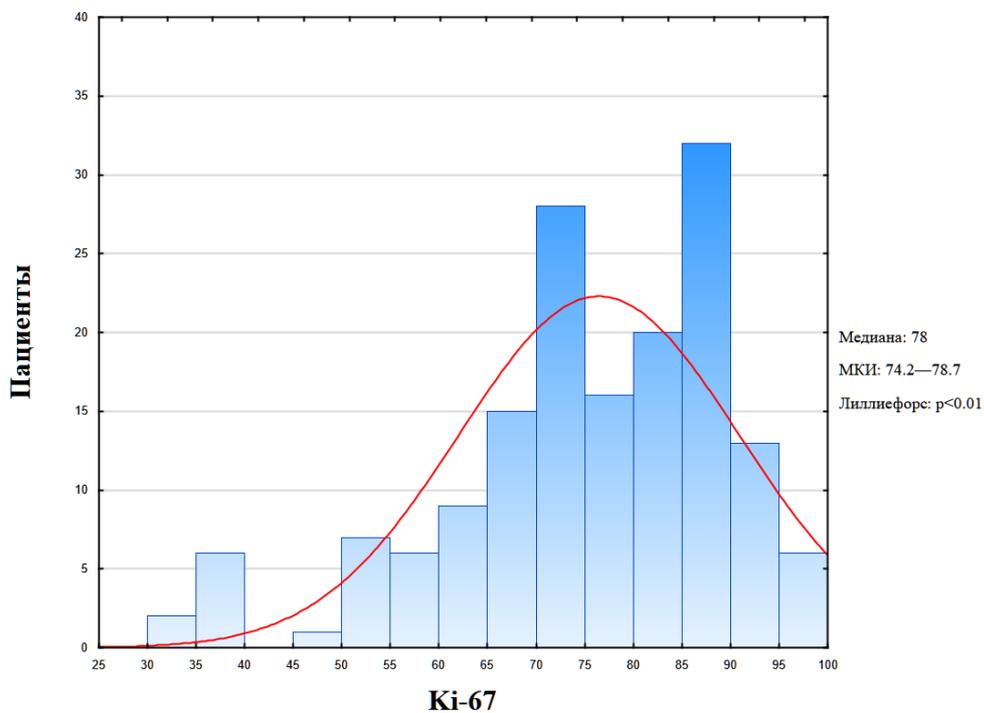


Рисунок 3.3 – Распределение степени экспрессии Ki-67 в исследуемой когорте пациенток. Столбцы представляют количество пациенток для уровня Ki-67(ось X: уровень Ki-67; ось Y: количество пациенток). Красная линия – кривая ожидаемого нормального распределения

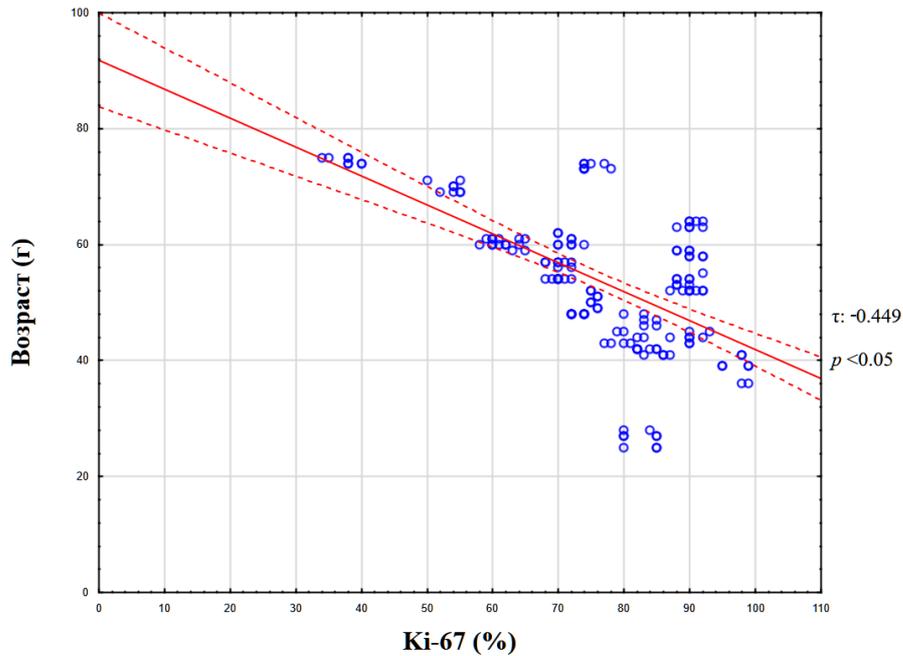
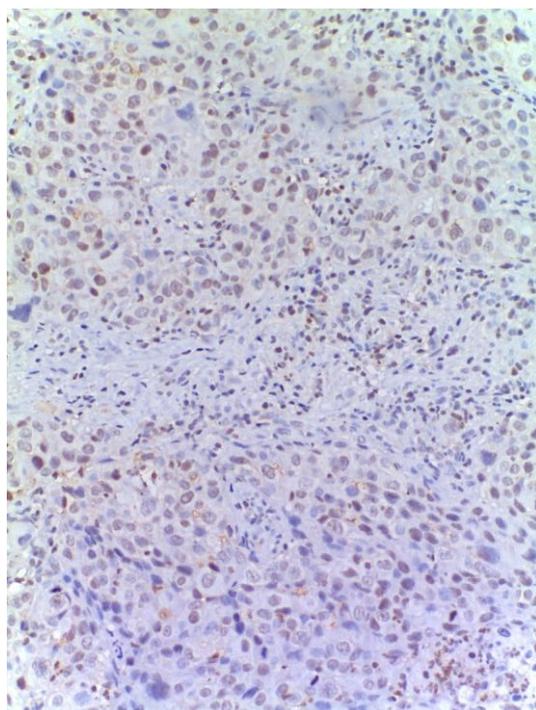


Рисунок 3.4 – График корреляции между экспрессией Ki-67 и количеством беременностей. Синие круги представляют отдельные точки данных для каждого пациента (ось X: уровень Ki-67, %; ось Y: возраст пациента). Сплошная красная линия указывает на линию регрессии. Пунктирные красные линии обозначают 95% доверительный интервал вокруг линии регрессии

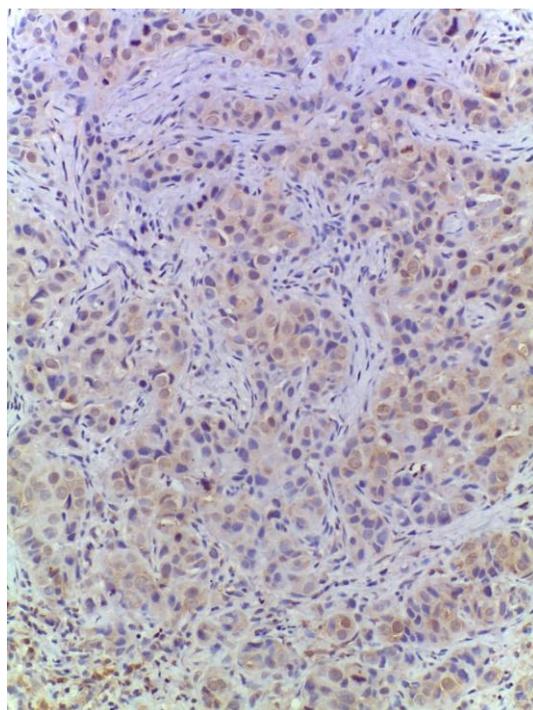
3.4. Характеристика NIS

3.4.1. Иммуногистохимическая характеристика экспрессии NIS в трижды негативном раке молочной железы в зависимости от количества беременностей, завершившихся родами

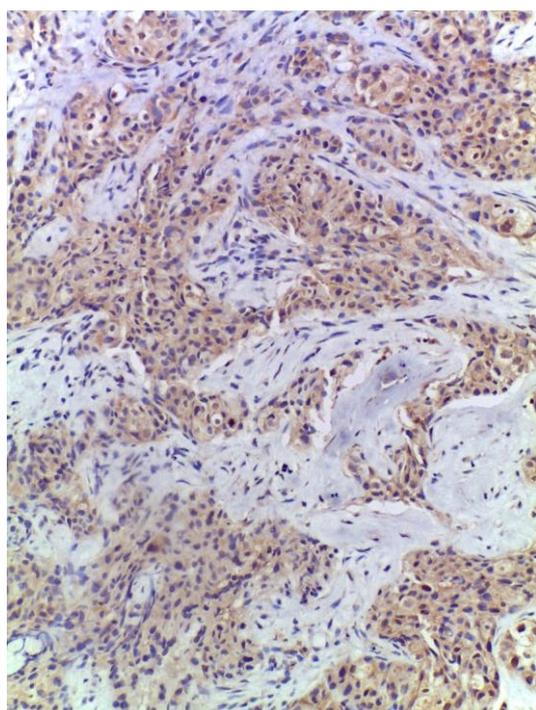
При иммуногистохимическом исследовании с антителами к NIS наблюдалась значительная вариабельность по интенсивности окрашивания. Распределение среди NIS-позитивных опухолей было следующим: NIS 1+ наблюдался в 40 (35,7%) случаях, NIS 2+ в 24 (21,4%), NIS 3+ в 48 (42,8%) (Рис. 3.5). NIS-негативными были 49 случаев (30,4%). Медианный показатель интенсивности окрашивания составлял 1 (МКИ: 1–3) (Рис. 3.6).



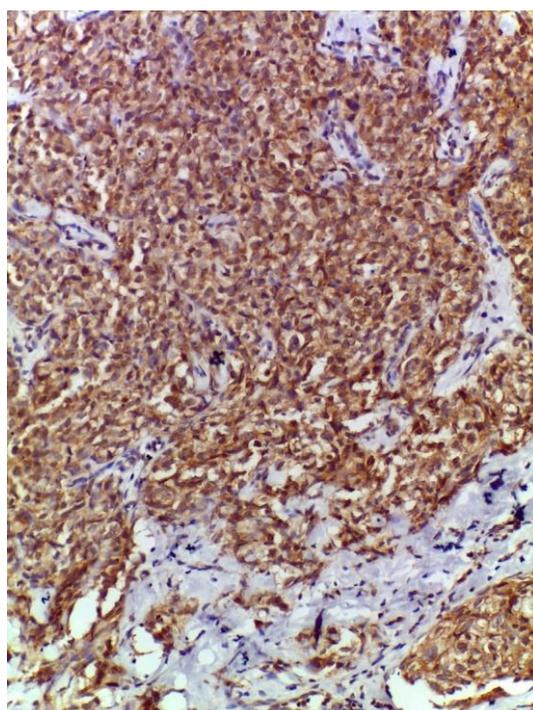
NIS 0



NIS 1+



NIS 2+



NIS 3+

Рисунок 3.5 – Вариабельность экспрессии NIS в ТНРМЖ. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к NIS, увеличение $\times 250$ (окуляр $\times 10$, объектив $\times 25$)

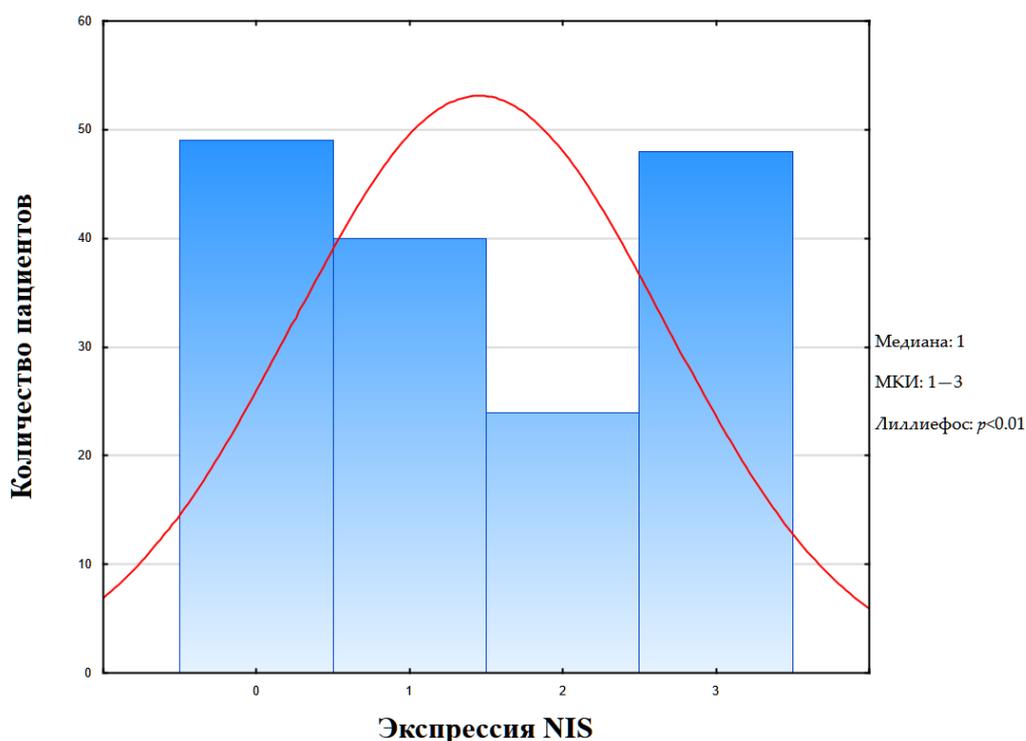


Рисунок 3.6. – Распределение интенсивности окрашивания NIS в исследуемой когорте пациенток. Столбцы представляют количество пациенток для каждого уровня экспрессии NIS (ось X: степень экспрессии NIS; ось Y: количество пациенток). Красная линия – кривая ожидаемого нормального распределения

В исследуемой выборке распределение пациенток по количеству беременностей было следующим: пациентки I группы (нет беременностей в анамнезе, дошедших до 3-го триместра) составили 5,5% ($n=9$); группа II пациенток с количеством беременностей от 1 до 3 – 54,66% ($n=88$); и группа III пациенток с четырьмя и более беременностями – 39,75% ($n=64$) (Таблица 3.3). Медиана количества беременностей составила 3 (межквартильный размах: 1–4) (Рисунок 3.7).

Статистический анализ продемонстрировал следующую картину: наблюдается отрицательная взаимосвязь слабой-умеренной силы между количеством перенесенных беременностей и степенью экспрессии NIS в клетках трижды негативного рака молочной железы ($\tau = -0,369$, $p < 0,05$). (Рисунок 3.8).

Таблица 3.3 – Распределение пациенток по количеству беременностей в анамнезе, завершится родами и степени экспрессии NIS в клетках ТНРМЖ

Характеристики	Образцы ТНРМЖ (Общее количество n=161)				
	Экспрессия NIS				
	NIS 0	NIS 1+	NIS 2+	NIS 3+	p-value
Количество беременностей (n, %)					
0	9 (5.5%)	0	0	0	<0,05
1 –3	8 (4.97%)	16 (9.94%)	24 (14.9%)	40 (24.8%)	
4+	32 (19.87%)	24 (14.9%)	0	8 (4.97%)	

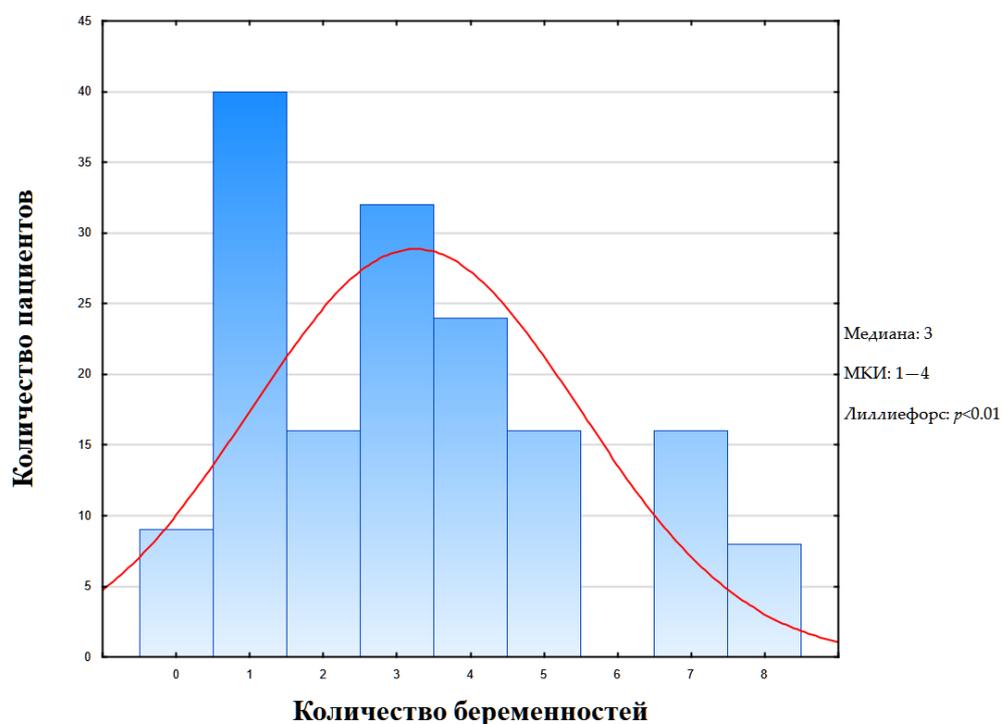


Рисунок 3.7 – Распределение количества беременностей в исследуемой когорте пациенток. Столбцы представляют количество пациенток для каждого количества беременностей (ось X: количество беременностей; ось Y: количество пациенток). Красная линия – кривая ожидаемого нормального распределения

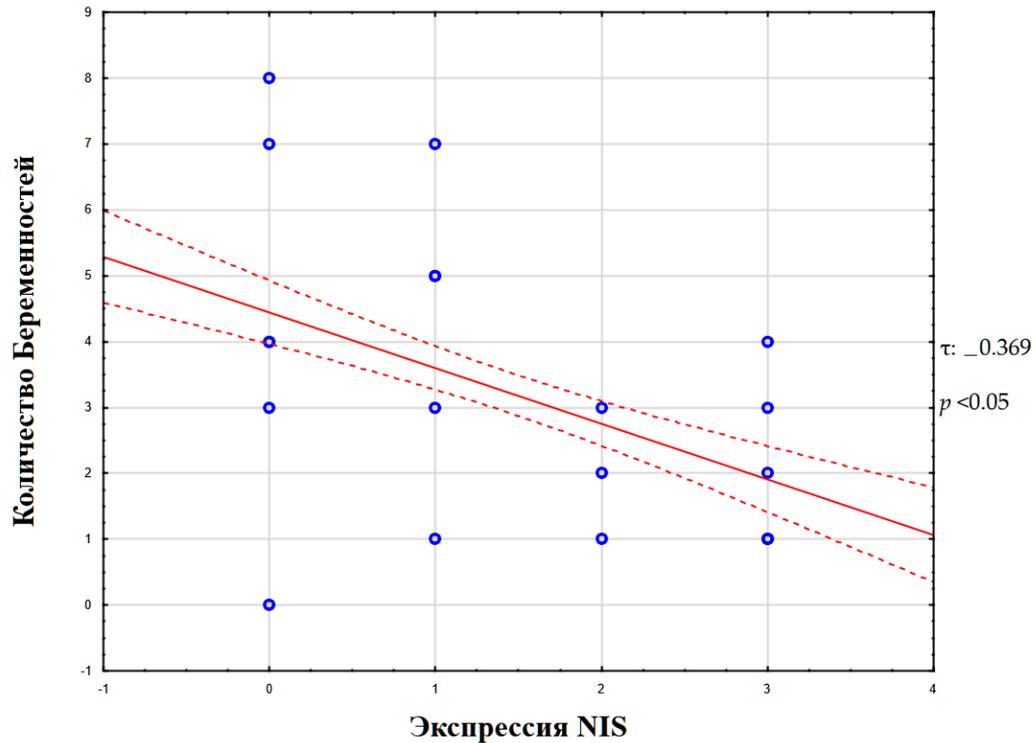


Рисунок 3.8 – График корреляции между экспрессией NIS и количеством беременностей. Синие круги обозначают отдельные точки данных для каждого пациента (ось X: оценка экспрессии NIS от 0 до 3+; ось Y: количество беременностей). Сплошная красная линия указывает на линию регрессии, а штриховые красные линии отображают 95% доверительный интервал вокруг этой линии

Резюме:

Количество беременностей оказывают влияние на биологию клеток млечного эпителия дольковых единиц концевых протоков молочной железы и данные изменения могут сохраняться даже после малигнизации эпителиоцитов при трижды негативном раке. Потому экспрессия NIS находится в корреляционной взаимосвязи с количеством беременностей, закончившихся родами. Этот факт имеет как фундаментальное – биологическое, так и клиническое значение, поскольку отражает влияние репродуктивного анамнеза на программы дедифференцировки эпителия и формирование уникального молекулярно-биологического профиля опухоли.

3.4.2. Сравнительный анализ между уровнем экспрессии NIS, GATA-3 и маммаглобина

Иммуногистохимическое исследование с применением антител к маммаглобину и GATA-3 в большинстве наблюдений выявило положительную реакцию практически во всех образцах, однако в ряде случаев экспрессия обоих маркеров отсутствовала. Анализ распределения иммунопозитивных реакций в атипичных клетках трижды негативного рака молочной железы (ТНРМЖ) показал, что экспрессия NIS различной степени интенсивности была зарегистрирована у 112 пациенток, что составило 69,5%. Экспрессия маммаглобина выявлялась у 50 женщин (31,0%), тогда как положительная реакция на GATA-3 отмечалась у 102 пациенток (63,3%) (Рисунок 3.9).

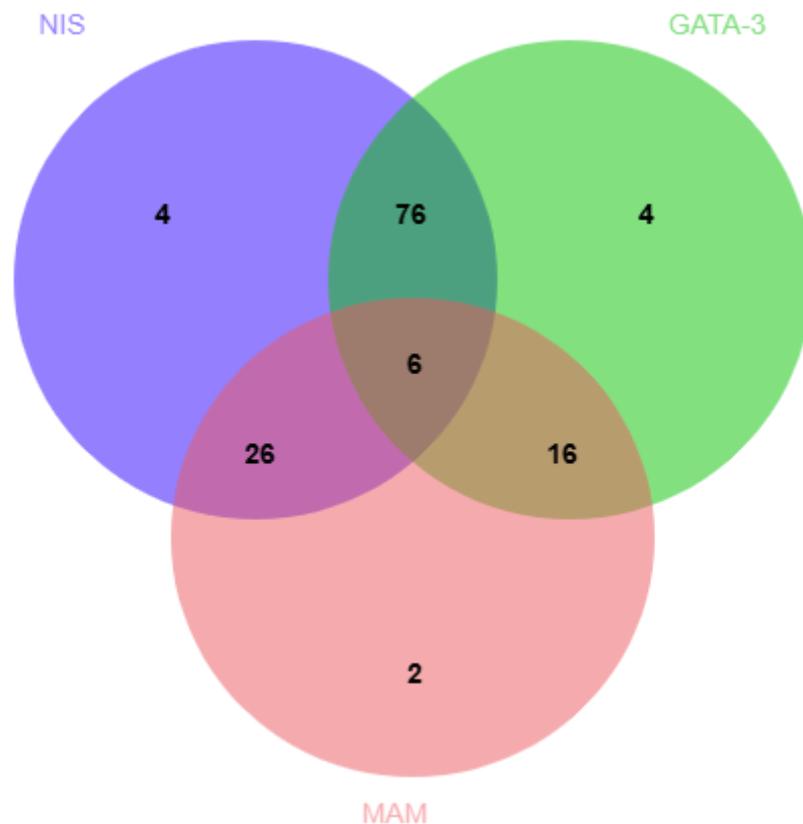
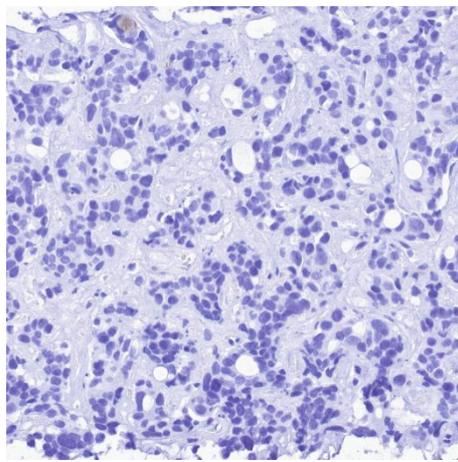
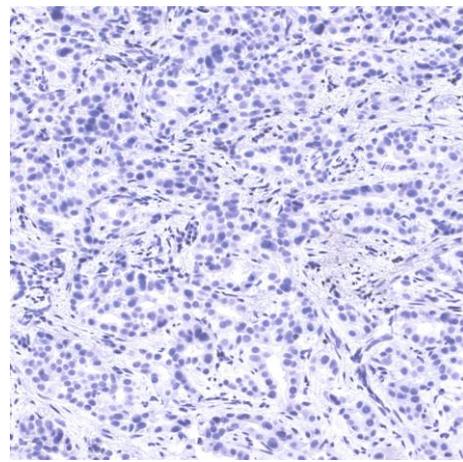


Рисунок 3.9 – Результаты иммуногистохимического исследования, представленные в виде диаграммы Венна. Тотально негативные (NIS-/GATA3-/MAM-; n=27) не указаны

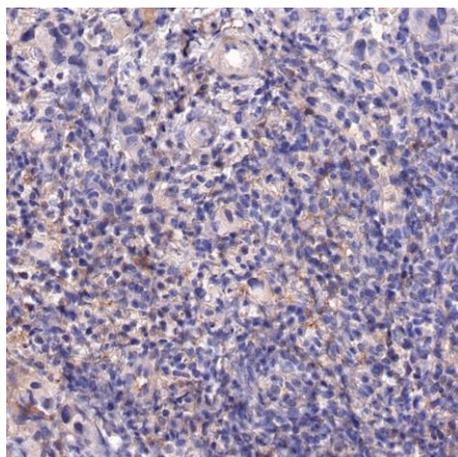
В большинстве случаев (83,7%) наблюдалось позитивное иммуногистохимическое окрашивание с использованием двух и более антител. Изолированная экспрессия только одного маркера была обнаружена у 10 пациенток: у 4 из них отмечалась положительная реакция исключительно на NIS, у 4 – только на GATA-3, и у 2 – только на маммаглобин. У 27 пациенток (16,7%) иммунопозитивная реакция не выявлялась ни с одним из антител (рис. 3.10). При этом отсутствие экспрессии NIS было установлено у 49 женщин, что составило 30,4% наблюдений.



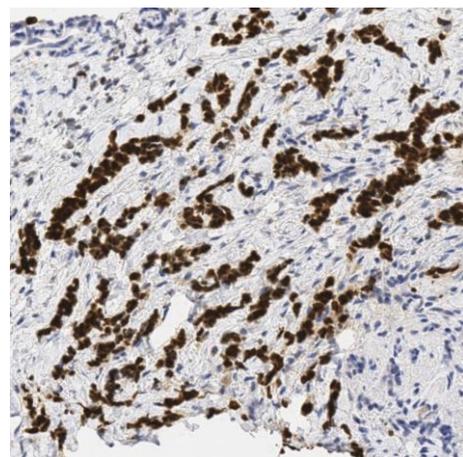
Маммаглобин



GATA-3



Маммаглобин



GATA-3

Рисунок 3.10. – ТНРМЖ. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к Маммаглобину и GATA-3. Верхний ряд – отсутствие экспрессии маммаглобина и GATA-3; Нижний ряд – цитоплазматическая экспрессия маммаглобина, ядерная экспрессия GATA-3, увеличение $\times 200$ (окуляр $\times 10$, объектив $\times 20$)

3.4.3. Корреляция между возрастом и уровнем экспрессии NIS

Основная когорта

Результаты статистического анализа не выявили статистически значимой корреляции между уровнем экспрессии NIS и количеством пораженных лимфатических узлов, митотической активностью, уровнем Ki-67 и возрастом ($p > 0,05$). В то же время, были обнаружены статистически значимые различия в частоте встречаемости NIS-позитивных опухолей в различных возрастных группах. Так, среди пациенток чей возраст 45 лет и старше, наблюдалось статистически значимое повышение количества NIS-позитивных ТНРМЖ ($p < 0,05$) (Рисунок 3.11–3.12).

Резюмируя вышесказанное, доля NIS позитивных опухолей ТНРМЖ выше у более возрастных пациенток, и наоборот – ниже у более молодых.

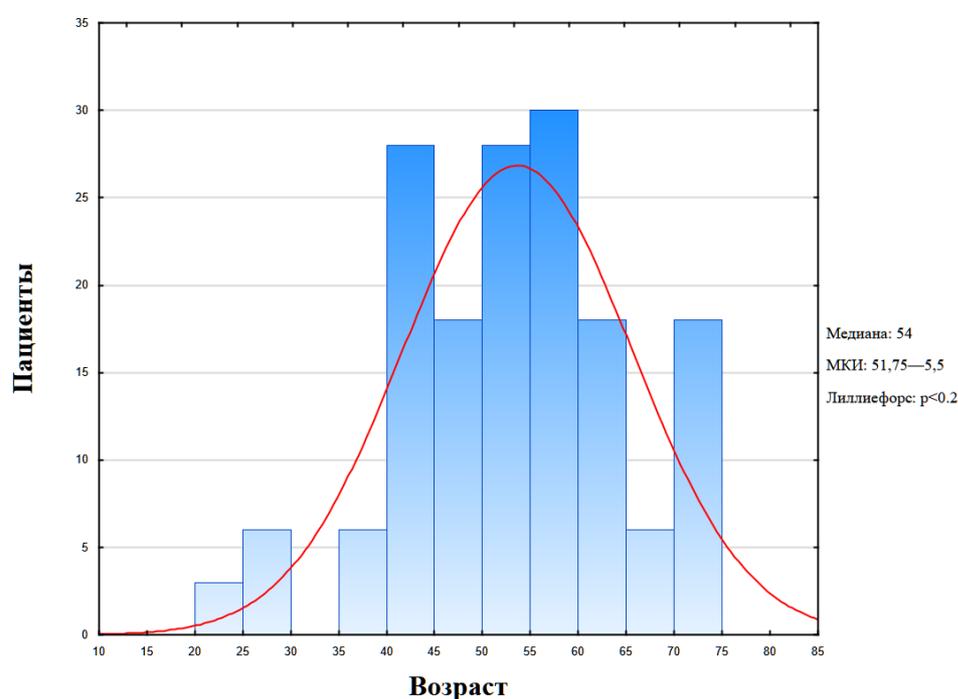


Рисунок 3.11. – Возрастные характеристики в исследуемой когорте пациенток. Синие столбцы – количество пациенток в возрастной группе (ось X: возраст; ось Y: количество пациенток). Красная кривая – показатель ожидаемого нормального распределения

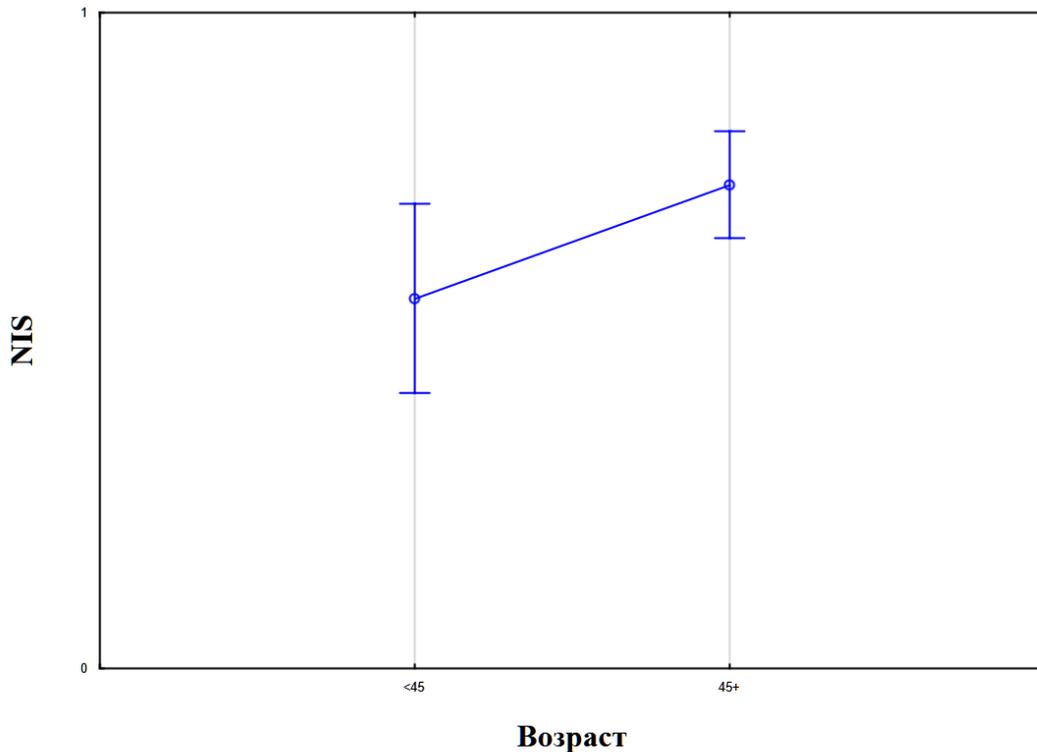


Рисунок 3.12 – Сравнительный график частоты экспрессии NIS в разных возрастных группах пациенток. Синие круги представляют долю NIS-позитивных образцов (ось X: возрастная группа, годы; ось Y: экспрессия NIS)

3.5. Мультиплексное иммуногистохимическое исследование

3.5.1. Ко-локализация NIS, TGF- β , p53 в трижды негативном раке молочной железы

Регуляция экспрессии NIS происходит как на уровне ядерных механизмов – факторов транскрипции, энхансеров и сайленсеров, так и на межклеточном уровне за счет воздействия сигнальных молекул. Учитывая влияния внутриклеточного сигналинга p53 и TGF- β , было проведено мультиплексное иммуногистохимическое исследование этих маркеров в NIS-позитивных и NIS-негативных раковых клетках трижды негативного рака молочной железы.

В NIS-позитивных образцах более 95% клеток обладали выраженным цитоплазматическим или мембранно-цитоплазматическим паттерном

окрашивания. Обращало на себя внимание значительная гетерогенность интенсивности окрашивания в пределах исследуемого материала.

При мультиплексном иммуногистохимическом исследовании образцов трижды негативного рака молочной железы (n=161) наблюдали экспрессию на TGF- β различной степени выраженности практически во всех атипичных клетках и некоторых иммунных клетках. Кроме того, обращало на себя внимание значительная степень ко-локализации экспрессии NIS и TGF- β (Рис. 3.13).

При морфометрической обработке изображений с оценкой интенсивности ко-локализации NIS- и TGF- β -позитивных клеток выявили корреляционную взаимосвязь степени окрашивания в анализируемых микропрепаратах во всех группах, т. е. независимо от количества беременностей. Это говорит о наличии прямой корреляции между экспрессией NIS и TGF- β при трижды негативном раке молочной железы (Pearson $r = +0,34$; Spearman $\rho = +0,41$) (Таблица 3.4).

При оценке экспрессии p53 в практически всех образцах (n=155) наблюдался мутантный «null»-паттерн окрашивания. В остальных образцах (n=6) отмечалось aberrантное цитоплазматическое окрашивание опухолевых клеток.

Таблица 3.4 – Морфометрические параметры оценки интенсивности окрашивания маркеров NIS и TGF- β в исследуемых образцах. Значения интенсивности указаны в условных единицах, соответствующих кодировке RGB

Интенсивность	NIS	TGF-β
Среднее значение \pm С.О.	29,295 \pm 21,968	19,217 \pm 12,975
Коэффициент Корреляции Пирсона	0,335742	
Коэффициент Корреляции Спирмена	0,411451	

Резюме

Выявлено, что экспрессия TGF- β в трижды негативном раке молочной железы ассоциирована с более высоким уровнем экспрессии NIS ($p < 0,05$). Внутригрупповой и межгрупповой сравнительный анализ не обнаружил

статистически значимых различий в корреляции между экспрессией NIS и TGF- β во всех исследуемых группах, а также не было обнаружено статистически значимой взаимосвязи высчитываемого коэффициента корреляции для суперпикселей в каждом отдельном образце с клинико-морфологическими данными пациента ($p > 0,05$). Также обращает на себя внимание значительное преобладание p53-мутантных форм рака среди ТНРМЖ с null-паттерном окрашивания, связанным со значительными мутационными изменениями структуры белка p53 и нарушением связывания специфических антител в ходе иммуногистохимического исследования (Рис. 3.13).

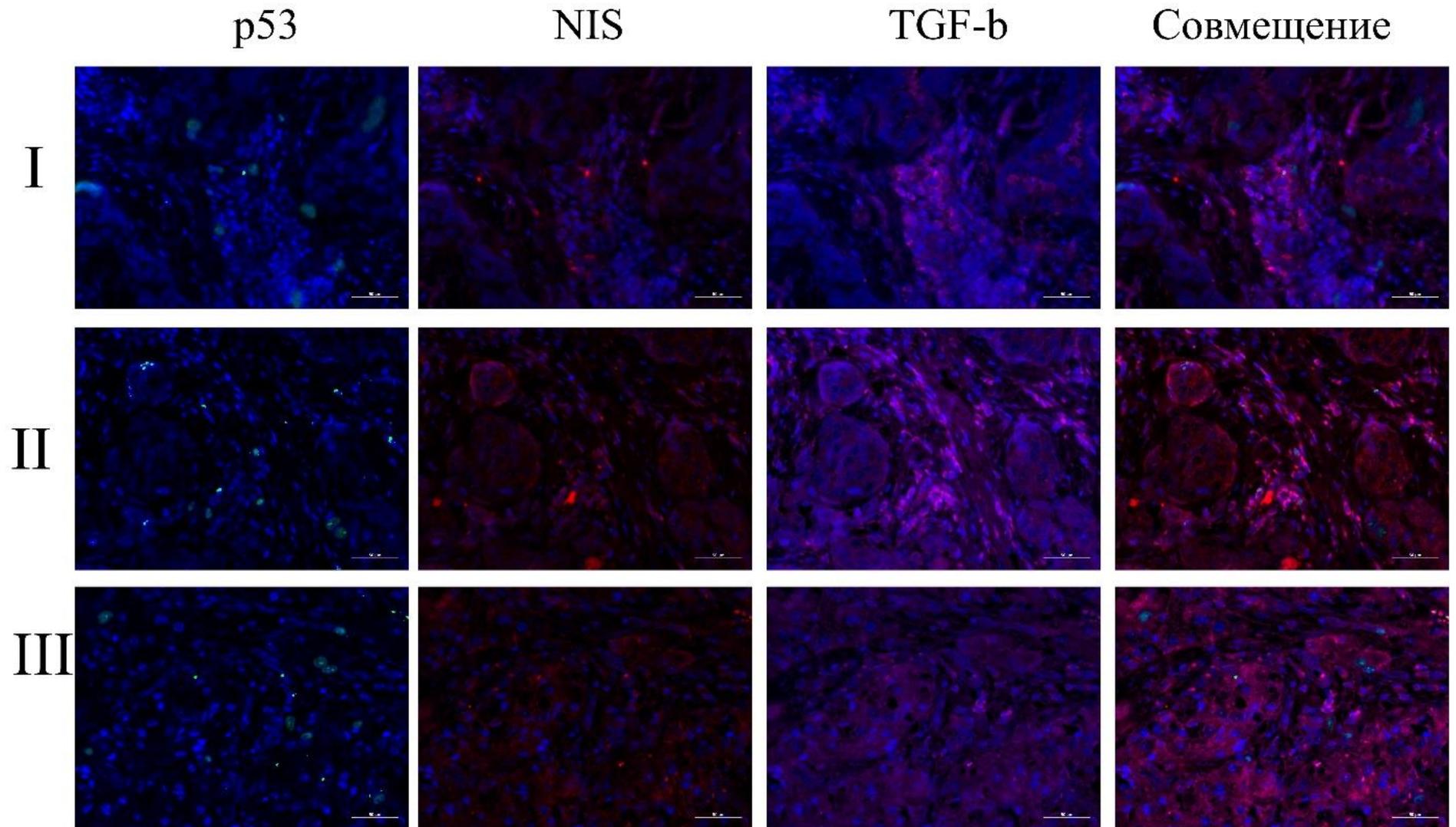


Рисунок 3.13 – ТНРМЖ. Иммуногистохимическое мультиплексное исследование с антителами к p53 (зеленый цвет), NIS (красный цвет), TGF- β (фиолетовый цвет), а также совмещенное изображение иммуномечения p53+NIS+TGF- β . DAPI – синий цвет. Флуоресцентная микроскопия. Масштабная линейка = 25 мкм

3.5.2. Оценка Т-клеточного компонента микроокружения опухоли в зависимости от количества беременностей, завершившихся родами

Анализ субпопуляций Т-лимфоцитов выявил значимые различия в структуре иммунного инфильтрата в зависимости от количества беременностей, завершившихся родами. Изменения носили разнонаправленный характер для хелперного и цитотоксического звеньев (Рис. 3.14).

Наиболее выраженные изменения коснулись популяции Т-хелперов (CD4⁺). У пациенток, не имевших беременностей, плотность инфильтрации данными клетками была максимальной. В группе женщин с 1–3 беременностями отмечено резкое снижение показателей: количество CD4-положительных лимфоцитов уменьшилось более чем в 7,5 раз по сравнению с группой контроля. У пациенток с 4 и более беременностями наблюдалось некоторое повышение уровня Т-хелперов — он был в 2 раза выше, чем во II-ой группе, однако оставался в 3,5 раза ниже значений, характерных для пациенток с отсутствием беременностей в анамнезе.

Обратная динамика наблюдалась в отношении цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8⁺). I группа пациенток отличалась минимальной инфильтрацией данными клетками. Наличие беременностей в анамнезе сопровождалось последовательным увеличением плотности данной популяции. В группе с 1–3 беременностями количество CD8-положительных клеток возросло более чем в 2,5 раза. Максимальные значения были достигнуты в III-ей группе пациенток, где уровень цитотоксических лимфоцитов превысил показатели пациенток I-ой группы почти в 4 раза.

Анализ экспрессии FOXP3⁺ также показал снижение плотности регуляторных клеток у пациенток II-ой и III-ей группы. Общее количество FOXP3-положительных клеток было максимальным в I-ой группе, снижаясь более чем в 2 раза в группах пациенток с наличием беременностей в анамнезе.

Схожая тенденция прослеживалась при анализе специфической популяции клеток с фенотипом CD4⁺FOXP3⁺. Здесь наблюдалось постепенное снижение

плотности инфильтрации. Максимальные значения регистрировались у пациенток с отсутствием беременностей в анамнезе. В группе с 1–3 беременностями количество данных клеток снизилось в 1,5 раза, а в группе пациенток с 4 и более беременностями в анамнезе — почти в 2 раза относительно исходного уровня (Таблица 3.5).

Таблица 3.5 – Морфометрические параметры экспрессии маркеров CD4⁺, CD8⁺ и FOXP3⁺ в исследуемых образцах. Значения указаны как количество клеток на мм²

Маркеры	Группа I	Группа II	Группа III	p-value
CD4 ⁺	113,19*, ** (59,88—187,75)	14,95*, *** (10,61—20,54)	33,51**, *** (26,59—47,62)	*<0,00001 **0,0031 ***0,0012
CD8 ⁺	7,26*, ** (3,78—8,65)	19* (14,55—27,91)	27,06** (8,59—76,02)	*<0,00001 **<0,00001
FOXP3 ⁺	126,17 (49,85—254,69)	58,39 (48,1—70,56)	70,5 (14,09—145,6)	0,03
CD4 ⁺ FOXP3 ⁺	21,1*, ** (15,16—30,64)	13,45* (8,09—16,42)	11,73*, ** (9,59—15,54)	*0,0002 **0,0002

Резюме

Таким образом, репродуктивный анамнез оказывает существенное влияние на клеточный состав микроокружения опухоли. У пациенток I-ой группы преобладает профиль с высоким содержанием CD4⁺-клеток и дефицитом цитотоксического звена. Напротив, наличие беременностей смещает соотношение в сторону увеличения числа CD8⁺-лимфоцитов на фоне выраженного снижения численности Т-хелперов и регуляторных клеток.

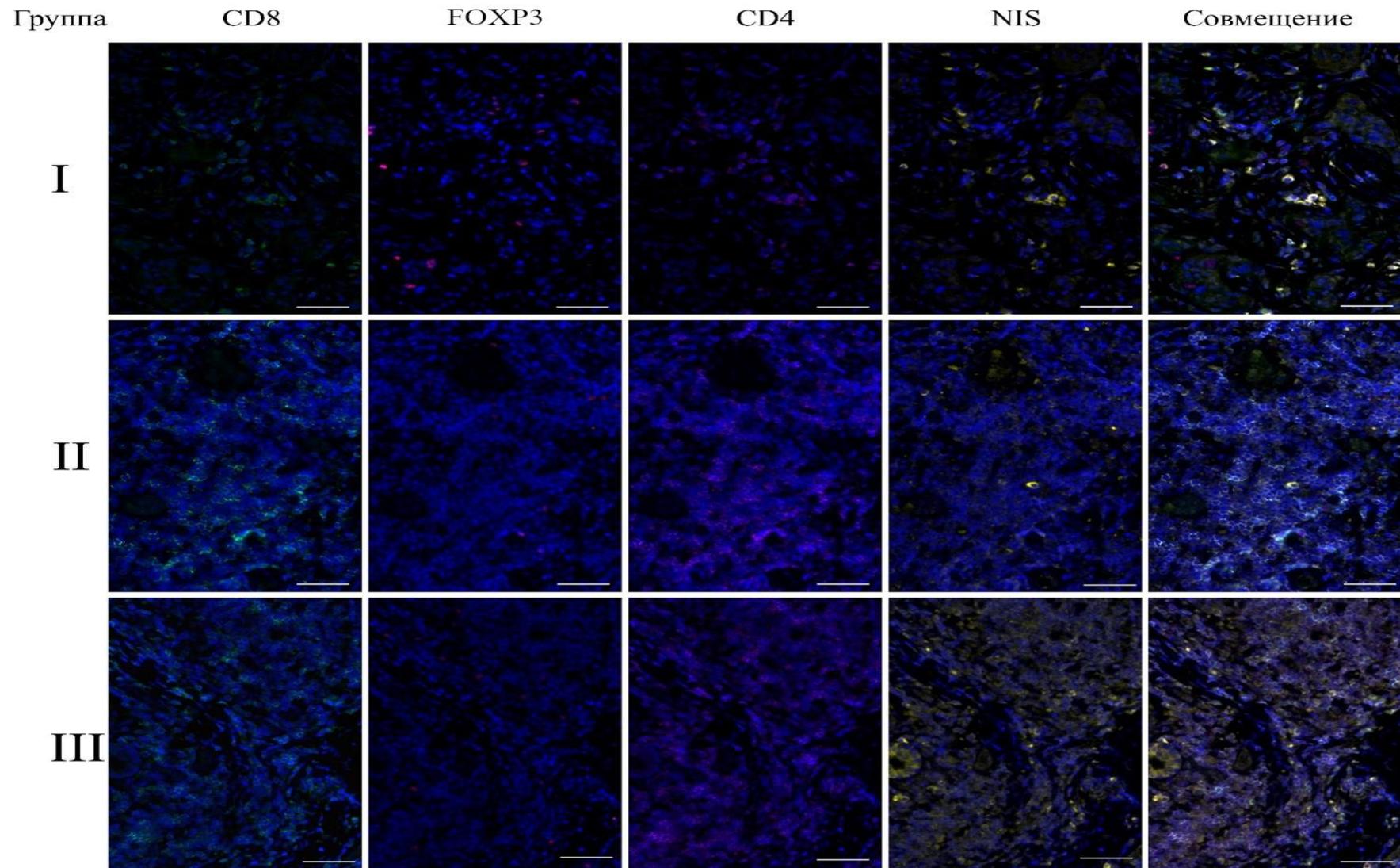


Рисунок 3.14 – ТНРМЖ. Иммуногистохимическое мультиплексное исследование с антителами к CD8 (зеленый цвет), FOXP3 (красный цвет), CD4 (фиолетовый цвет свечение), NIS (желтый цвет), а также совмещенное изображение визуализации CD8 + FOXP3 + CD4 + NIS. DAPI – синее свечение. Флуоресцентная микроскопия. Масштабная линейка = 25 мкм

3.5.3. Оценка сосудистого и макрофагального компонентов микроокружения опухолей в зависимости от количества беременностей, завершившихся родами

При мультиплексном иммуногистохимическом исследовании образцов ТНРМЖ (n=161) выявили экспрессию CD31⁺, CD68⁺ и CD163⁺ макрофагов различной степени выраженности (Рис. 3.15 – 3.17).

Анализ экспрессии маркеров эндотелия и макрофагов выявил сложную, нелинейную зависимость состава микроокружения от количества беременностей, завершившихся родами, а динамика макрофагального компонента носила изменчивый характер.

Плотность сосудистой сети (маркер CD31⁺) была максимальной в группе пациенток, не имевших беременностей. У пациенток с 1–3 беременностями в анамнезе отмечалось статистически значимое снижение васкуляризации: количество CD31-позитивных структур оказалось почти в 3 раза меньше по сравнению с I-ой группой. В группе пациенток с 4 и более беременностями в анамнезе наблюдалось восстановление показателей васкуляризации: их уровень превышал значения II-ой группы более чем в 2 раза, практически приближаясь к показателям пациенток с отсутствием беременностей в анамнезе.

Наиболее выраженные колебания были характерны для общей популяции макрофагов (CD68⁺). У пациенток I-ой группы наблюдалась крайне высокая плотность инфильтрации данной популяцией. В группе с 1–3 беременностями происходил резкий спад: количество CD68-позитивных клеток снижалось более чем в 7 раз по сравнению с группой контроля. У пациенток III-ей группы инфильтрация частично восстанавливалась, превышая минимум (группу 1–3 беременности) почти в 3 раза, однако все равно оставалась в 2,5 раза ниже, чем у пациенток с отсутствием беременностей в анамнезе.

Примечательно, что экспрессия маркера CD163⁺ (ассоциированного с M2-фенотипом) при изолированной оценке не продемонстрировала статистически

значимых различий между группами. Также не было выявлено значимой динамики для популяции клеток с фенотипом CD31⁺CD163⁺.

Однако анализ со-экспрессии CD68⁺CD163⁺, который более точно отражает популяцию поляризованных макрофагов, показал картину, обратную динамике общего пула CD68⁺. Если общее число макрофагов в группе с 1–3 беременностями падало, то плотность специфических CD68⁺CD163⁺ клеток, напротив, достигала пика, превышая показатели пациенток I группы более чем в 3,5 раза, а показатели пациенток с 4 и более беременностями в анамнезе – почти в 3 раза.

В то же время популяция CD31⁺CD68⁺ повторяла тренд общей макрофагальной инфильтрации: максимальные значения у пациенток I-ой группы и снижение в 4,5 раза в группе с 1–3 беременностями.

Резюме

У пациенток I-ой группы выявлена максимальная плотность сосудистой сети (CD31⁺) и наибольшим общим количеством макрофагов (CD68⁺) в микроокружении опухоли. Во II-ой группе (1–3 беременности) происходит значительное снижение васкуляризации и общего числа макрофагов, однако именно в этой когорте наблюдается пиковая концентрация специфических субпопуляций клеток с фенотипом CD68⁺CD163⁺. У пациенток с 4 и более беременностями показатели плотности сосудов и общей макрофагальной инфильтрации частично восстанавливаются, приближаясь к уровню I-ой группы, тогда как количество специфических ко-экспрессирующих клеток снижается относительно пиковых значений II-ой группы (Таблица 3.6).

Таблица 3.6. Морфометрические параметры экспрессии маркеров CD31⁺, CD68⁺ и CD163⁺ в исследуемых образцах. Значения указаны как количество клеток на мм²

Маркеры	Группа I	Группа II	Группа III	p-value
CD31 ⁺	38,15* (16,72—134,14)	13,41* (3,1—39,43)	31,45 (26,18—39,38)	*0,01235

<i>Продолжение таблицы 3.6</i>				
Маркеры	Группа I	Группа II	Группа III	p-value
CD68 ⁺	437,41* (75,92— 1255,07)	60,42*** (48,54—73,78)	171,45** (142,24— 187,26)	*<0,00001 **<0,00001
CD163 ⁺	172,8 (148,2—353,28)	194,24 (163,29—374,6)	196,71 (83,66—424,51)	0,2630
CD31 ⁺ + CD163 ⁺	10,35 (8,81—197,23)	87,36 (13,57—217,6)	46,15 (27,48—77,87)	0,0965
CD68 ⁺ + CD163 ⁺	77,28* (40,38—168,27)	273,64*** (172,05—583,05)	93,71** (60,71—201,63)	*<0,00001 **0,0007
CD31 ⁺ + CD68 ⁺	37,58*** (31,56—42,29)	8,32* (6,35—10,92)	15,87** (1,41—44,79)	*0,00003 **0,0118

Примечание: статистически значимые различия между группами указывались попарно как *, ** или ***

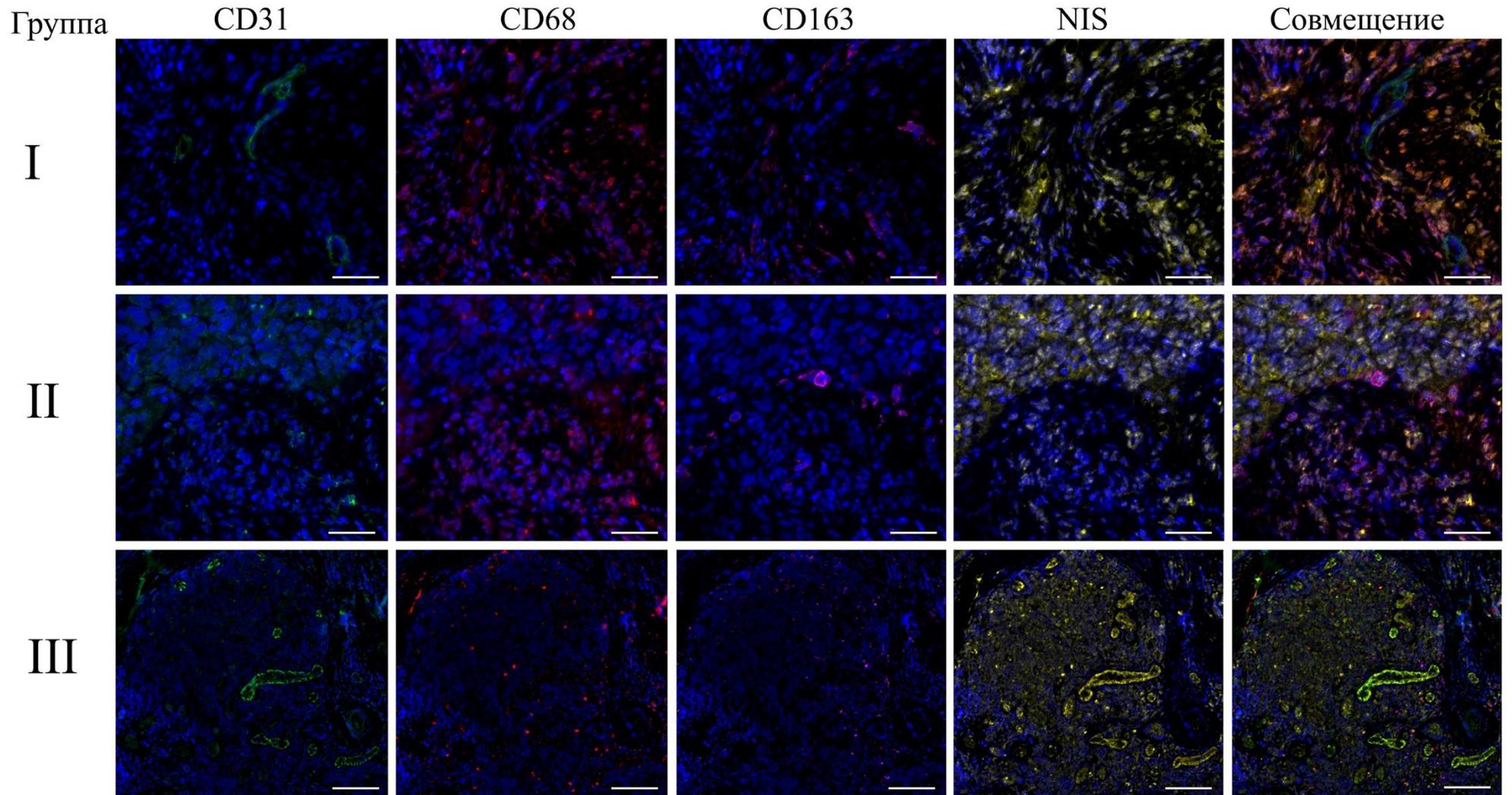


Рисунок 3.15 – ТНРМЖ. Иммуногистохимическое мультиплексное исследование с антителами к CD31 (зеленый цвет), CD68 (красный цвет), CD163 (фиолетовый цвет), NIS (желтый цвет) а также совмещенное изображение иммуномечения CD31 + CD68 + CD163+NIS. Ядра докрашены DAPI (синий цвет). Флуоресцентная микроскопия. Масштабная линейка = 25 мкм

3.5.4. Оценка ко-локализации компонентов секретома тучных клеток при трижды негативном раке молочной железы в зависимости от количества беременностей, завершившихся родами

В ходе исследования была проведена оценка степени ко-локализации компонентов секретома тучных клеток в ТНРМЖ в зависимости от числа беременностей, завершившихся родами. Анализ позволил выявить качественные и количественные особенности распределения протеинов секретома тучных клеток (триптаза, Try; химаза, Chu; карбоксипептидаза А3, СРА3) в опухолевой микросреде, отражающие влияние репродуктивного анамнеза на иммунный ландшафт ТНРМЖ (Рис. 3.16 – 3.18).

Наиболее значимые изменения были отмечены для популяции триптаза-положительных (Try⁺) клеток. Максимальная плотность данной популяции клеток на мм² наблюдалась у пациенток, не имевших беременностей. По мере увеличения числа беременностей происходило последовательное снижение инфильтрации. В группе пациенток с 1–3 беременностями плотность клеток была почти в 1,5 раза ниже по сравнению с I-ой группой. Наиболее выраженное снижение показателей зафиксировано у пациенток III-ей группы (4 и более беременностей в анамнезе): количество триптаза-положительных клеток оказалось более чем в 12 раз меньше относительно пациенток с отсутствием беременностей в анамнезе и в 8 раз меньше по сравнению со II-ой группой (1–3 беременности в анамнезе).

Экспрессия химазы (Chu) демонстрировала схожую тенденцию к обратной корреляции с числом беременностей. У пациенток I-ой группы плотность химаза-положительных клеток была максимальной, превышая аналогичные показатели в группе с 1–3 беременностями почти в 1,7 раза. В группе пациенток с 4 и более беременностями в анамнезе отмечалось дальнейшее обеднение стромы данными клетками: их плотность была почти в 3 раза ниже, чем в группе пациенток с отсутствием беременностей) и более чем в 1,5 раза ниже, чем во II-ой группе.

Принципиально иную динамику выявил маркер карбоксипептидаза А3 (СРА3). В отличие от триптазы и химазы, минимальные значения плотности СРА3⁺

клеток были зарегистрированы именно у пациенток с отсутствием беременностей в анамнезе. Наличие беременностей в анамнезе сопровождалось ростом экспрессии данного маркера. В частности, в группе с 1–3 беременностями зафиксирован пик инфильтрации: плотность CPA3^+ клеток возросла более чем в 2,3 раза по сравнению с группой контроля. У пациенток III-ей группы показатели несколько снизились относительно пиковых значений, однако оставались в 1,5 раза выше, чем у пациенток без беременностей в анамнезе (Таблица 3.7).

Таблица 3.7. Морфометрические параметры экспрессии триптазы (Tryptase), химазы (Chymase) и карбоксипептидазы А3 (CPA3) тучных клеток в ТНРМЖ. Значения указаны как количество клеток на мм^2 . Между группами определены статистически значимые различия ($p < 0,05$)

Группа	Маркер	Среднее значение \pm С.О. (на мм^2)
I	Tryptase	177,4 \pm 64,37
	Chymase	136,07 \pm 40,65
	CPA3	39,27 \pm 32,2
II	Tryptase	122,3 \pm 89,82
	Chymase	77,82 \pm 51,22
	CPA3	92,24 \pm 53,17
III	Tryptase	14,72 \pm 12,24
	Chymase	47,51 \pm 53,29
	CPA3	60,55 \pm 74,45

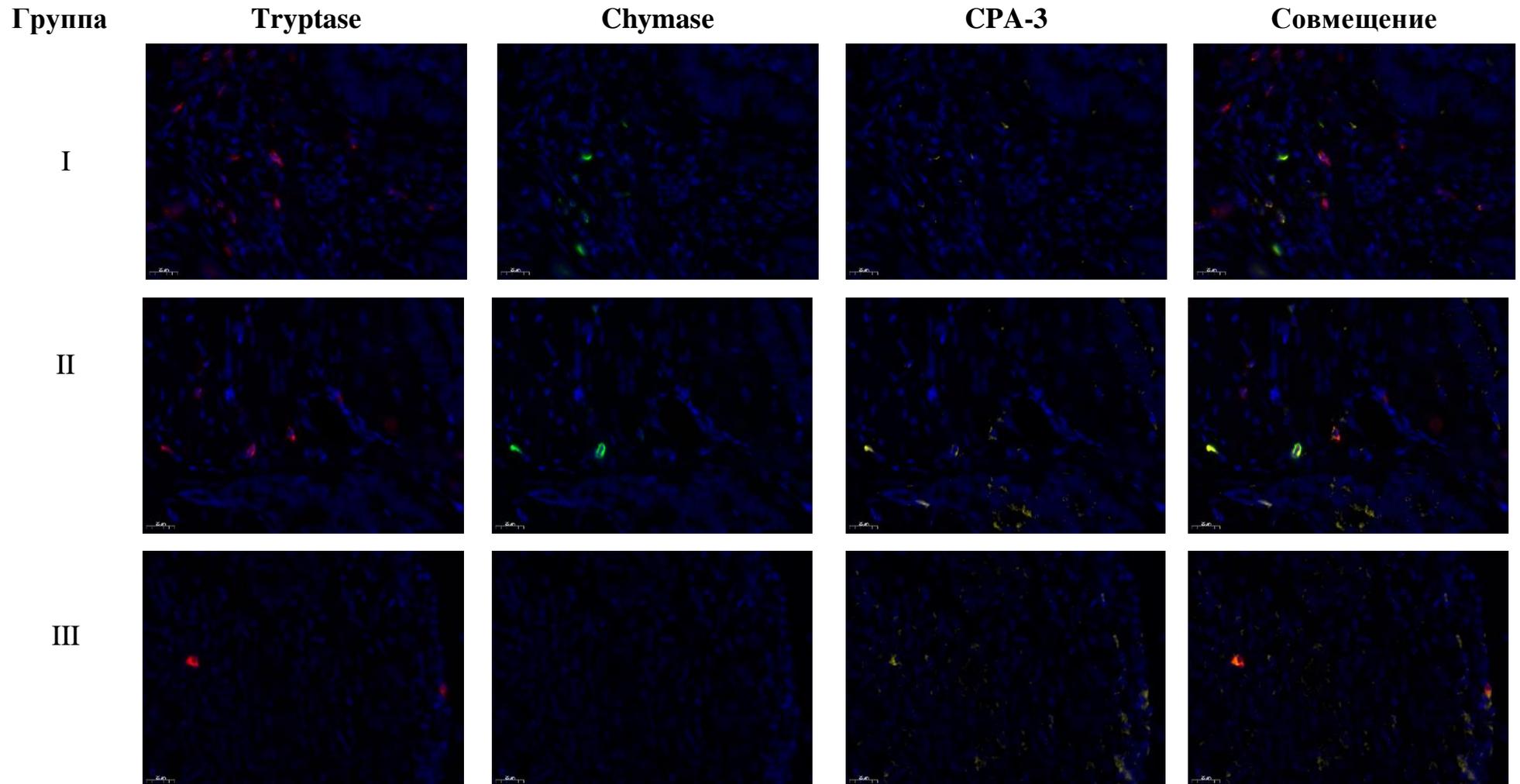


Рисунок 3.16 – ТНРМЖ. Иммуногистохимическое мультиплексное исследование с антителами к Тryptase (красное свечение), Chymase (зеленое свечение), CPA-3 (розовое свечение) а также совмещенное изображение иммуномечения Тryptase + Chymase + CPA-3. DAPI – синее свечение. Флуоресцентная микроскопия. Масштабная линейка = 25 мкм

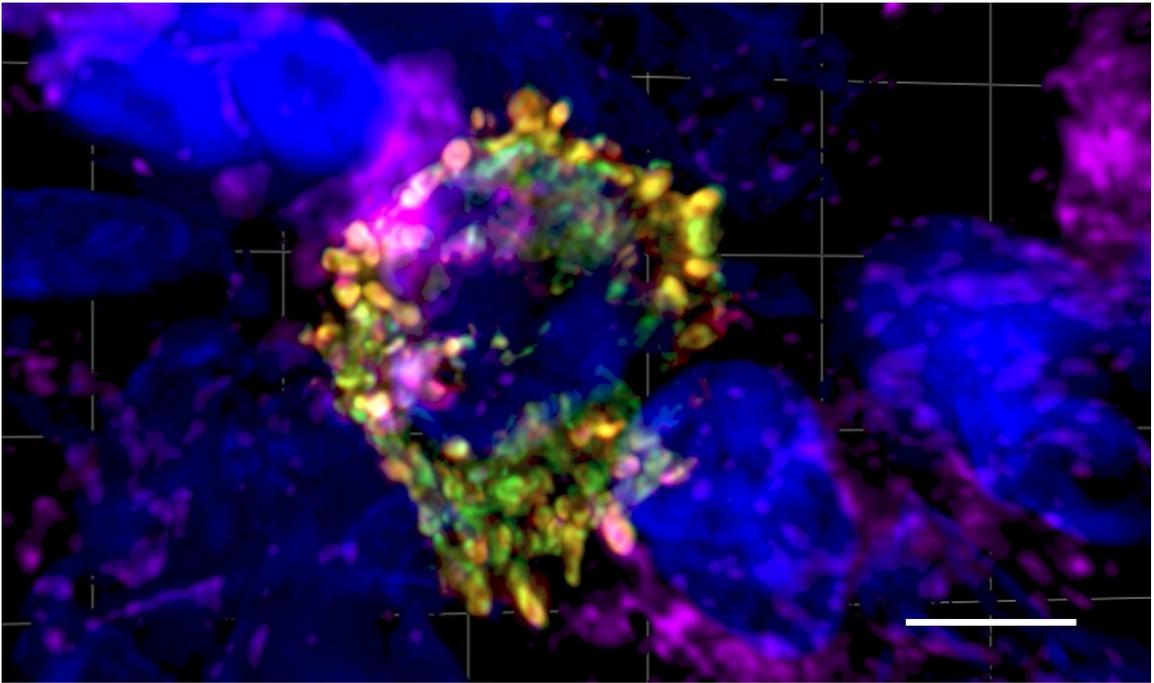


Рисунок 3.17 – ТНРМЖ. Мультиплексное иммуногистохимическое исследование тучных клеток. Совмещенное изображение иммуномечения триптазы (зеленый цвет), карбоксипептидазы А3 (красный цвет) и NIS (фиолетовый цвет). Ядра контрастированы DAPI (синий цвет). Флуоресцентная микроскопия. Масштабная шкала – 5 мкм.

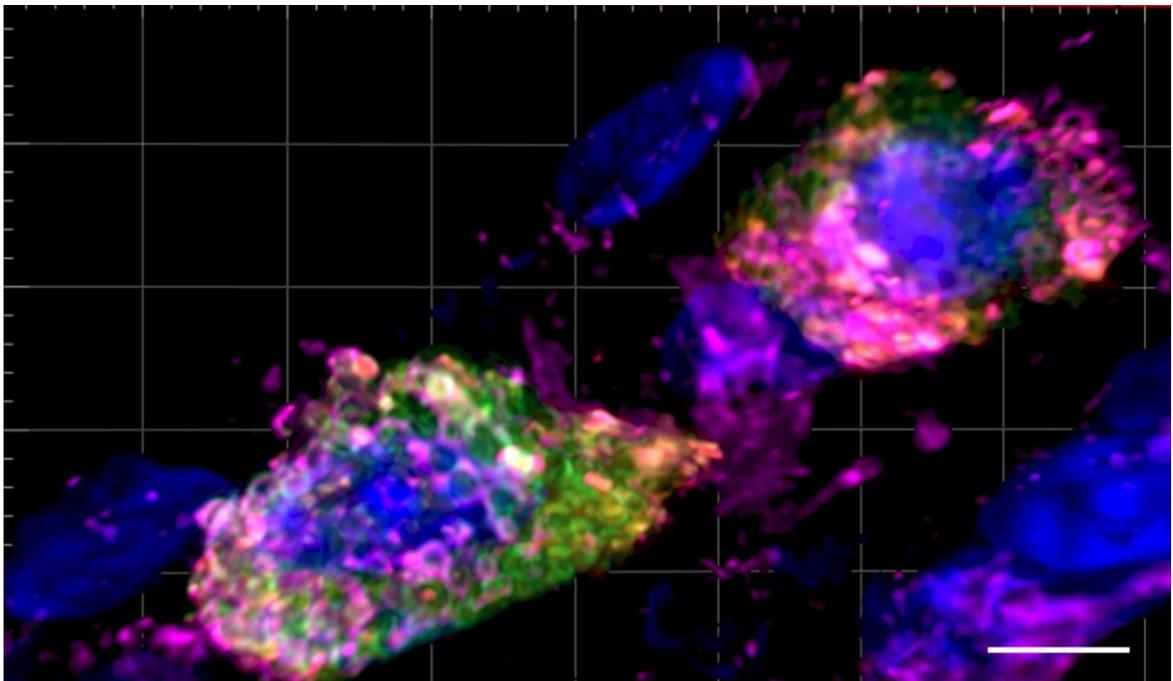


Рисунок 3.18 – ТНРМЖ. Мультиплексное иммуногистохимическое исследование тучных клеток. Совмещенное изображение иммуномечения триптазы (зеленый цвет), химазы (красный цвет) и NIS (фиолетовый цвет). Ядра контрастированы DAPI (синий цвет). Флуоресцентная микроскопия. Масштабная шкала – 5 мкм.

Таким образом, увеличение количества беременностей сопряжено с кратным снижением численности триптаза- и химаза-положительных клеток, но при этом сопровождается относительным увеличением пула клеток, экспрессирующих карбоксипептидазу А3, что указывает на качественное изменение состава компонентов секрета тучных клеток.

3.6 Корреляция между уровнем экспрессии NIS в атипичных клетках трижды негативного рака молочной железы и остаточной опухолевой нагрузки по системе RCB и критериям оценки ответа солидных опухолей по системе RECIST 1.1

В нашем исследовании была выявлена следующая статистически значимая корреляция: Низкая экспрессия NIS чаще ассоциирована с низкими значениями RCB (RCB-0 / RCB-I), что отражает высокий уровень чувствительности опухоли к НАХТ. Высокая экспрессия NIS чаще связана с RCB-II / RCB-III, то есть со значительной остаточной опухолевой нагрузкой и низкой эффективностью терапии. Основные клинико-патоморфологические характеристики когорты представлены в Таблицах 3.8–3.9.

Таблица 3.8 – Распределение пациенток по остаточной опухолевой нагрузке, режимам НАХТ и степени экспрессии NIS белка в клетках ТНРМЖ

Характеристики	Образцы ТНРМЖ (Общее количество n=161)				
	Экспрессия NIS				
	NIS 0	NIS 1+	NIS 2+	NIS 3+	p-value
Остаточная опухолевая нагрузка/RCB (n, %)					
0	33 (20.5%)	24 (14.9%)	16 (9.94%)	8 (4.97%)	<0,01
I	16 (9.94%)	16 (9.94%)	0	0	

<i>Продолжение Таблицы 3.8</i>					
Характеристики	Экспрессия NIS				
	NIS 0	NIS 1+	NIS 2+	NIS 3+	p-value
II	0	0	8 (4.97%)	32 (19.87%)	
III	0	0	0	8 (4.97%)	
Объективный клинический ответ опухоли на терапию/RECIST (n, %)					
Полный ответ (CR)	24 (14.9%)	16 (9.94%)	8 (4.97%)	0	< 0,05
Частичный ответ (PR)	17 (10.6%)	24 (14.9%)	16 (9.94%)	32 (19.87%)	
Стабилизация (SD)	0	0	0	8 (4.97%)	
Прогрессирование (PD)	8 (4.97%)	0	0	8 (4.97%)	
Режим химиотерапии					
Антрациклин + Таксан	16 (9.94%)	24 (14.9%)	16 (9.94%)	40 (24.84%)	<0,01 (RCB) <0,05 (RECIST)
Антрациклин + Таксан + Карбоплатин	33 (20.5%)	16 (9.94%)	8 (4.97%)	8 (4.97%)	<0,01 (RCB) <0,05 (RECIST)

Распределение пациенток в когорте по остаточной опухолевой нагрузке было следующим: полный патоморфологический ответ (RCB 0) достигнут у 81 пациента (50.3% когорты). Минимальная резидуальная опухоль (RCB I) определялась у 32

пациенток (19.9%), умеренная резидуальная опухоль (RCB II) — у 40 пациенток (24.8%), значительная остаточная опухолевая нагрузка (RCB III) — у 8 (5%).

Обнаружена корреляция между степенью экспрессии NIS и индексом остаточной опухолевой нагрузки по системе RCB. Коэффициент Кендалл-тау составил 0,481 ($p < 0,01$), что соответствует умеренной положительной связи. Более высокая экспрессия NIS соответствовала повышенной резистентности опухоли к неoadъювантной химиотерапии. Данная корреляция значима ($p < 0,01$) для обеих подгрупп режимов неoadъювантной химиотерапии: «антрациклин + таксан» (96 пациенток, 59,62%) и «антрациклин + таксан + карбоплатин» (65 пациенток, 40,37%) (Рисунок 3.19).

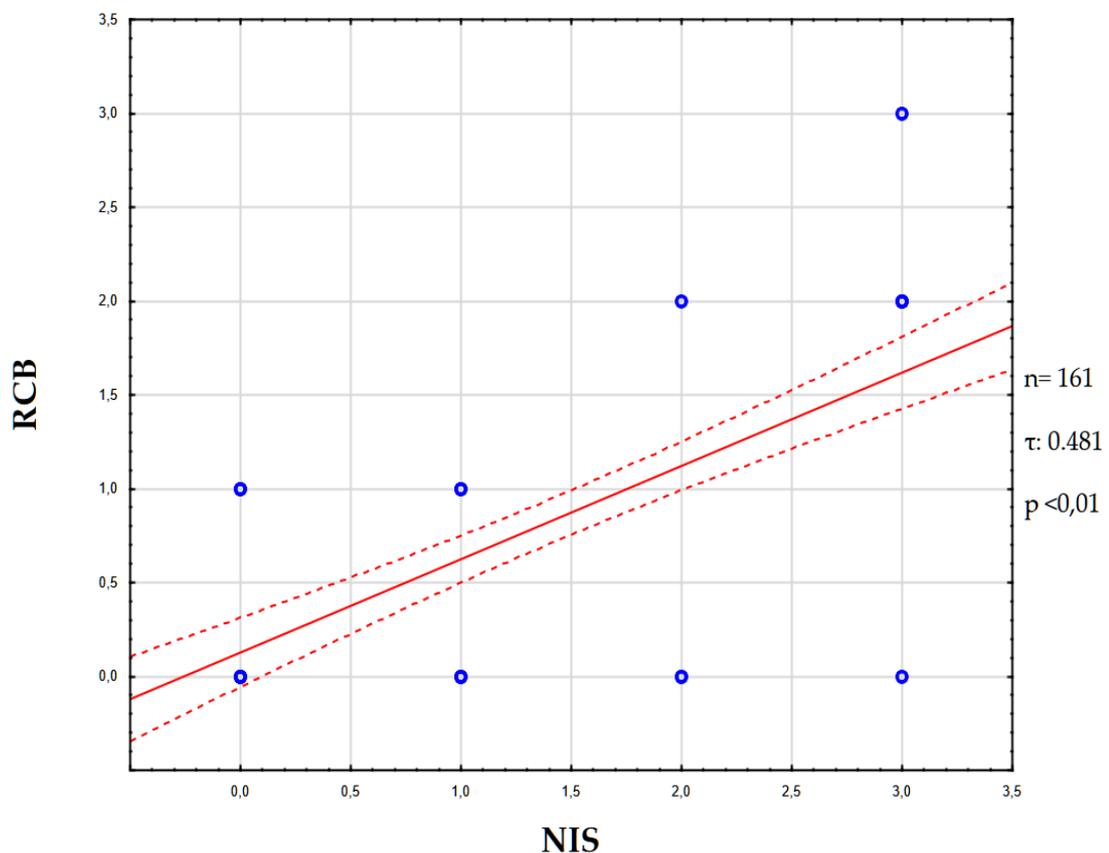


Рисунок 3.19 – График корреляции между экспрессией NIS и уровнем остаточной опухолевой нагрузки по системе RCB. Синие круги обозначают отдельные точки данных для каждого пациента (ось X: оценка экспрессии NIS от 0 до 3+; ось Y: оценка уровня RCB от 0 до 3). Сплошная красная линия указывает на линию регрессии, а штриховые красные линии отображают 95% доверительный интервал вокруг этой линии

Распределение пациенток в когорте по критериям оценки ответа солидных опухолей по системе RECIST 1.1 было следующим: полный ответ (CR) достигнут у 48 пациенток (29,8% когорты). Частичный ответ (PR) определялся у 89 пациенток (55,3%), стабилизация заболевания (SD) — у 8 пациенток (4,96%), прогрессирование заболевания (PD) — у 16 (9,94%).

Также в нашем исследовании была обнаружена обратная корреляционная взаимосвязь умеренной силы между степенью экспрессии NIS и клиническим ответом на неoadьювантную химиотерапию, оцениваемую по критериям оценки ответа солидных опухолей по системе RECIST 1.1. Коэффициент Кендалл-тау составил $-0,3506$ ($p < 0,05$). Таким образом, был получен аналогичный результат — более высокая экспрессия NIS соответствовала худшему ответу на химиотерапию (Рис. 3.20).

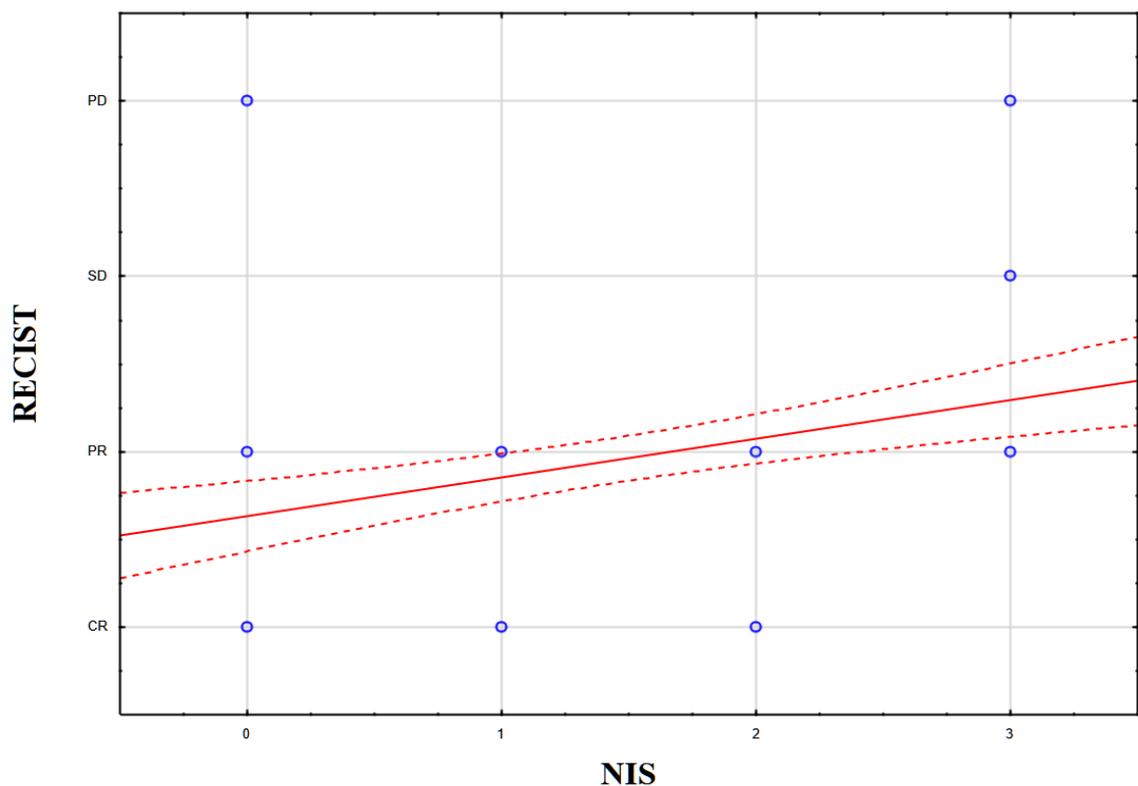


Рисунок 3.20 – График корреляции между экспрессией NIS и критериям оценки ответа солидных опухолей по системе RECIST 1.1. Синие круги обозначают отдельные точки данных для каждого пациента (ось X: оценка экспрессии NIS от 0 до 3+; ось Y: оценка уровня RECIST от CR до PD). Сплошная красная линия указывает на линию регрессии, а штриховые красные линии отображают 95%

доверительный интервал вокруг этой линии. Аббревиатуры: CR – полный ответ, PR – частичный ответ, SD – стабилизация, PD – прогрессирование опухоли

Таблица 3.9 – Клинико-морфологическая характеристика и экспрессия NIS

Характеристики	Образцы ТНPMЖ (Общее количество n=161)				
	Экспрессия NIS				
	NIS 0	NIS 1+	NIS 2+	NIS 3+	p-value
сТ стадия (n, %)					
1	1 (0.62%)	0	8 (4.97%)	0	0,507
2	40 (24.84%)	40 (24.84%)	8 (4.97%)	40 (24.84%)	
3	8 (4.97%)	0	0	0	
4	0	0	8 (4.97%)	8 (4.97%)	
сN стадия (n, %)					
0	40 (24.84%)	16 (9.94%)	16 (9.94%)	40 (24.84%)	0,240
1	0	8 (4.97%)	8 (4.97%)	0	
2	0	8 (4.97%)	0	0	
3	9 (5.59%)	8 (4.97%)	0	8 (4.97%)	
Лимфоваскулярная инвазия (n, %)					
Не обнаружена	40 (24.84%)	16 (9.94%)	16 (9.94%)	40 (24.84%)	0,390
Обнаружена	9 (5.59%)	24 (14.9%)	8 (4.97%)	8 (4.97%)	

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании проведена комплексная оценка экспрессии NIS в трижды негативном раке молочной железы (ТНРМЖ), включая влияние репродуктивных факторов (количество беременностей) на уровень экспрессии NIS и биологию опухоли, сравнительный анализ чувствительности и специфичности NIS по отношению к маммаглобину и GATA-3, связь экспрессии NIS с возрастом пациенток и мутационной нагрузкой (включая TP53), ко-локализацию NIS с TGF- β и p53, а также влияние репродуктивного анамнеза на иммунное микроокружение опухоли (Т-лимфоциты, сосудисто-макрофагальное звено и тучные клетки). Кроме того, изучена корреляция экспрессии NIS с ответом на неоадьювантную химиотерапию по индексам остаточной опухолевой нагрузки по системе RCB и критериям оценки ответа солидных опухолей по системе RECIST 1.1, подтвердившая роль NIS как маркера химиорезистентности.

4.1. Анализ экспрессии NIS в трижды негативном раке молочной железы в зависимости от количества беременностей

Один из ключевых аспектов биологии развития молочной железы связан с влиянием различных факторов на риск развития ЗНО. Известно, что беременность у молодых женщин снижает вероятность возникновения рака молочной железы, причем каждая последующая беременность дополнительно уменьшает этот риск приблизительно на 10%. Данный эффект обусловлен терминальной дифференцировкой люминального эпителия терминальных протоково-дольковых единиц, приводящей к значительному снижению пролиферативной активности эпителиоцитов. Согласно некоторым молекулярно-биологическим исследованиям озвученных изменений даже после одной беременности, достигшей 20 недели гестации, происходит изменение степени метилирования ДНК вследствие

активности транскрипционного фактора STAT5a, что является физиологически необходимым для быстрой реактивации генов, ответственных за метаболическую перестройку молочной железы и секрецию молока.

Экспрессия NIS может рассматриваться как показатель дезорганизации генетического аппарата опухолевых клеток, проявляется в виде аномальной внутриклеточной аккумуляции патологических форм данного белка. В нормальных условиях NIS экспрессируется в эпителиальных клетках протоков молочной железы преимущественно в поздние сроки беременности и во время лактации под влиянием эстрогена, прогестерона, окситоцина и пролактина. Его функция заключается в обогащении молока йодом для обеспечения нормального развития щитовидной железы новорожденного. Однако в опухолевых клетках ТНРМЖ гиперэкспрессия NIS является косвенным признаком генетических мутаций, приводящих, согласно проведенному нами биоинформатическому анализу и литературным данным, к гиперактивации сигнальных путей FOXA1 и PI3K/AKT/mTOR. Дезорганизация белоксинтезирующего аппарата опухолевых клеток приводит к накоплению в цитоплазме дефектных форм NIS, обладающих проонкогенными свойствами, такими как стимуляция миграции и метастазирования.

В нашем исследовании, включавшем 161 пациентку с ТНРМЖ, иммуногистохимическая оценка экспрессии NIS проводилась по модифицированной шкале Gainor. Статус беременности определялся на основании данных медицинской документации. В учет были взяты только беременности, завершившиеся родами. Статистический анализ, выполненный с использованием критерия Лиллиефорса и коэффициента корреляции Kendall-tau, подтвердил наличие отрицательной корреляции между репродуктивным анамнезом (гравидарным статусом) и уровнем экспрессии NIS. Данный результат согласуется с гипотезой о том, что терминальная дифференцировка эпителия во время беременности изменяет функционирование генетического аппарата, снижая его

восприимчивость к дезорганизации, проявляющейся в виде повышенной экспрессии NIS (Рисунок 4.1).

Полученные результаты обладают прогностическим значением. Предполагая потенциальное влияние NIS на прогноз заболевания у каждой пациентки, снижение его экспрессии у женщин с большим числом беременностей может свидетельствовать о меньшей агрессивности опухоли. Это открывает перспективы для дальнейших исследований роли NIS в биологии ТНРМЖ, включая оценку его как биомаркера для персонализированной терапии. В частности, анализ уровня экспрессии NIS в зависимости от репродуктивного анамнеза может способствовать уточнению прогноза и выбору оптимальной тактики лечения, подчеркивая необходимость учета репродуктивного статуса при комплексной оценке пациенток с ТНРМЖ (Рисунок 4.2).

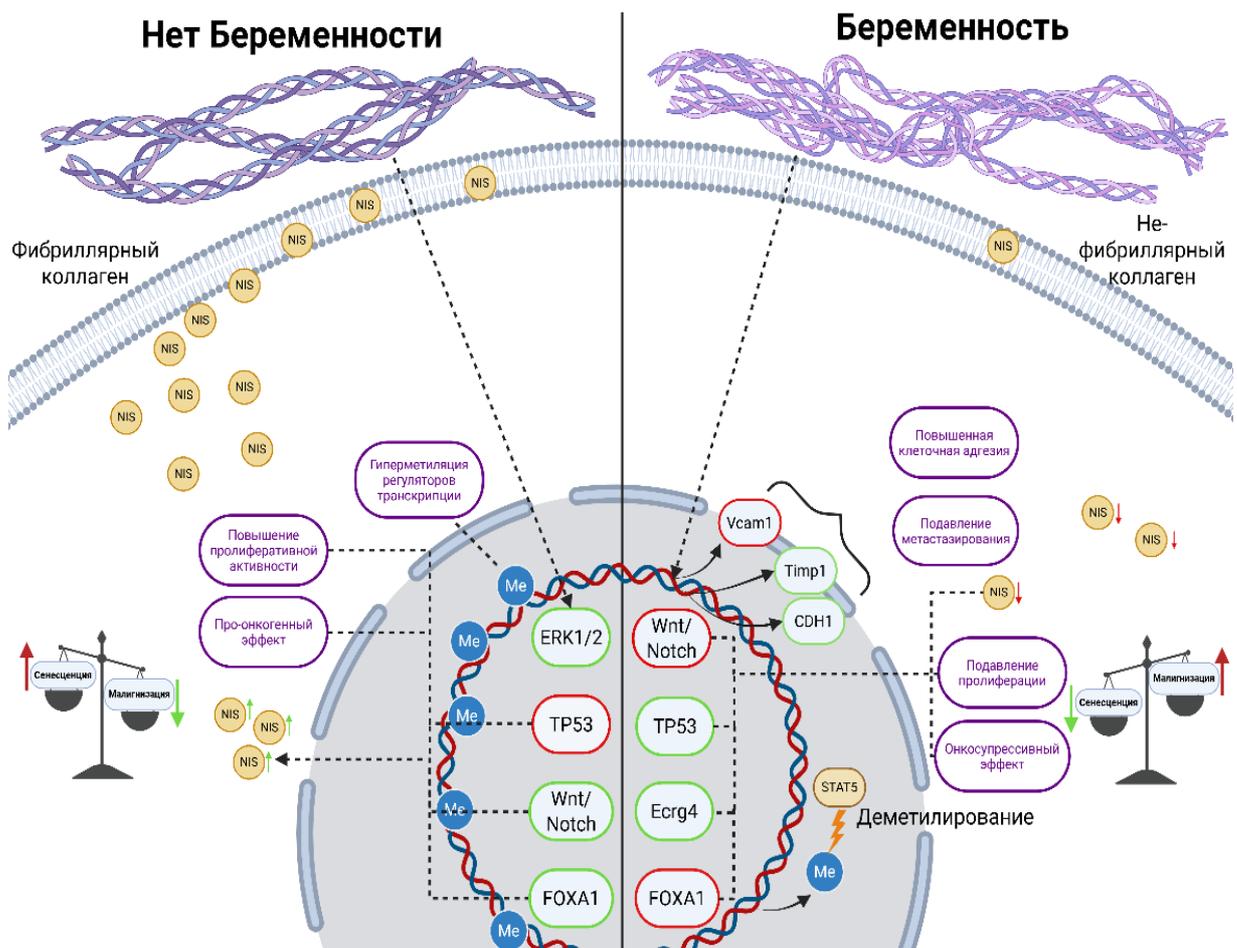


Рисунок 4.1 – Влияние беременности на биологию опухолевых клеток. Зеленые стрелки обозначают усиление эффекта, красные стрелки – подавляющий эффект

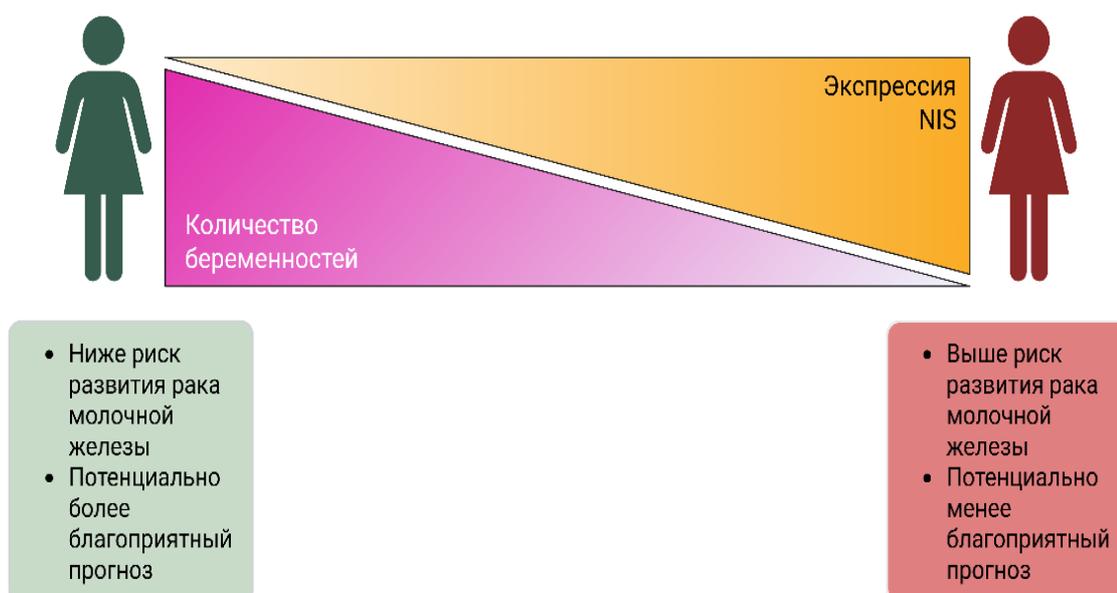


Рисунок 4.2 – Корреляция между экспрессией NIS и количеством перенесенных беременностей, закончившихся родами

4.2. Сравнительный анализ степени экспрессии NIS в клетках трижды негативного рака молочной железы с экспрессией маммаглобина и GATA-3

В рамках ретроспективного исследования, произведенного на когорте, включавшей в себя 161 пациентку с ТНРМЖ, была проведена сравнительная оценка иммуногистохимической экспрессии NIS, маммаглобина и GATA-3 в атипичных клетках. Морфологическое исследование всех образцов кор-биопсий молочных желез выявило картину инвазивной карциномы неспецифического типа, классифицируемой как G3 по Nottingham Grading system в модификации Bloom-Richardson. Атипичные клетки формировали солидные структуры, характеризующиеся плеоморфными ядрами, эксцентричным расположением и умеренной десмопластической реакцией стромы. Иммуногистохимическое исследование не продемонстрировало реакции с антителами к рецепторам эстрогена (ER -/0), прогестерона (PR -/0) и HER2/neu (-/0), что соответствует фенотипу ТНРМЖ.

Положительные иммуногистохимические реакции на NIS, маммаглобин и GATA-3 были зарегистрированы практически во всех исследованных образцах, с распределением следующим: NIS-позитивные реакции наблюдались у 112 женщин (70,0%), маммаглобин – у 50 (31,0%), а GATA-3 – у 102 (63,3%). У 83,7% пациенток было выявлено окрашивание на два и более антител. Иммунопозитивная реакция с использованием только одного маркера была отмечена у 10 женщин: NIS – у 4, GATA-3 – у 4, маммаглобин – у 2. Отсутствие окрашивания на все три маркера наблюдалось у 27 (16,7%) женщин. Таким образом, NIS продемонстрировал наибольшую чувствительность (70%), GATA-3 – умеренную (63,3%), а маммаглобин — относительно слабую (31,0%).

Полученные данные находятся в соответствии с результатами предшествующих исследований. Так, Tazebay et al. продемонстрировали NIS-экспрессию в 80% гормон-позитивных опухолей. В нашем исследовании NIS-позитивными оказались 70% случаев трижды негативного рака молочной железы, что сопоставимо с результатами Renier et al., где NIS-экспрессия была выявлена в 65% исследованных опухолей [136, 155]. Высокая чувствительность NIS сохраняется независимо от гормонального рецепторного профиля и степени дифференцировки клеток. Помимо молочной железы, NIS экспрессируется при карциномах щитовидной железы, слюнных желез и яичника, однако его отсутствие в нормальном эпителии молочной железы отличает его от GATA-3 и маммаглобина, что позволяет использовать NIS для подтверждения неопластического процесса при дифференциальной диагностике неспецифических изменений эпителия и новообразований [68].

Сравнительный анализ с другими маркерами подчеркивает преимущества NIS. Маммаглобин демонстрирует высокую чувствительность (до 84%) для гормон-позитивных карцином, однако при ТНРМЖ его чувствительность снижается до 7%. GATA-3 характеризуется чувствительностью от 33 до 96% для гормон-позитивных опухолей и 87% для ТНРМЖ, но обладает низкой специфичностью, поскольку экспрессируется в уротелиальных карциномах,

опухолях кожи, слюнных желез, нервной системы, почек, легких, мезотелиомах и лимфомах [84, 152, 163]. В отличие от них, NIS проявляет более высокую специфичность для малигнизированного эпителия молочной железы, при этом его экспрессия снижается в тиреокарциномах по мере снижения степени дифференцировки, однако сохраняется на высоком уровне в низкодифференцированных карциномах молочной железы [108].

В целом, NIS представляется перспективным иммуногистохимическим маркером для верификации ТНРМЖ, особенно при комбинированном использовании с GATA-3 (Рис. 4.3). Для оценки эффективности применения NIS в качестве маркера карцином молочной железы в метастатических очагах необходимы дальнейшие проспективные исследования.

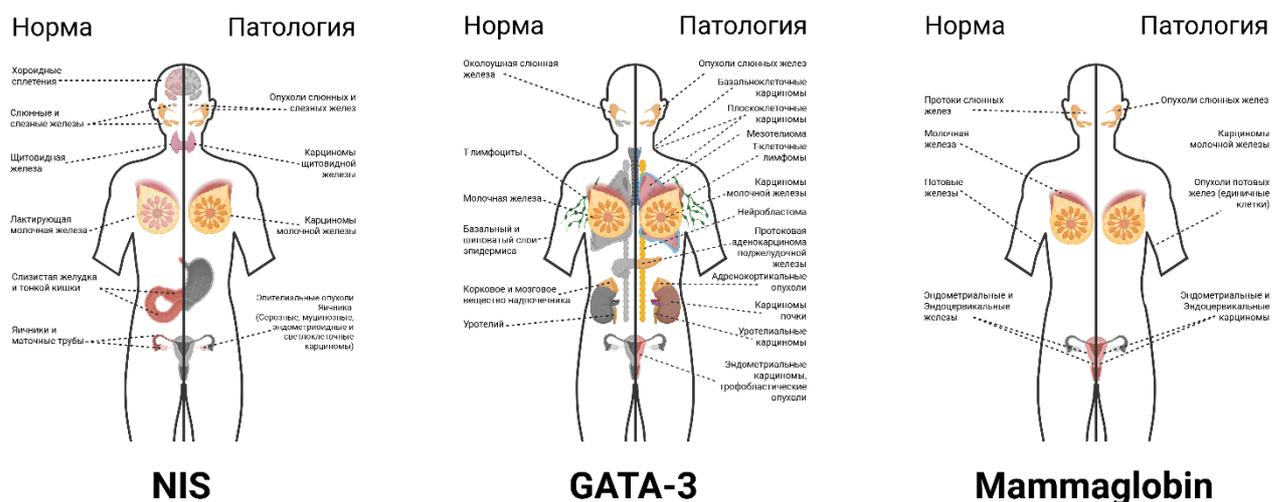


Рисунок 4.3 – Сравнительная экспрессия NIS, GATA3 и маммаглобина в здоровых тканях и в опухолях. Цветом обозначены органы, экспрессирующие маркер в норме или в патологии, серым указано отсутствие экспрессии указанного маркера

Также в ходе проведенного исследования была установлена слабая-умеренная отрицательная корреляция ($\tau = -0,369$) между количеством беременностей в анамнезе пациенток и степенью экспрессии NIS в ТНРМЖ. Данный результат свидетельствует о тенденции к снижению уровня экспрессии NIS в опухолевых клетках у женщин с более высоким числом беременностей. Полученные данные позволяют предположить, что наблюдаемый феномен может

быть связан с терминальной дифференцировкой эпителия молочной железы, происходящей в период беременности, потенциально подавляющей проонкогенные свойства атипичных клеток, происходящих из такого эпителия.

4.3. Анализ влияния возраста на экспрессию NIS в атипичных клетках трижды негативного рака молочной железы

В ходе анализа экспрессии NIS была выявлена закономерность, демонстрирующая связь данного маркера с демографическими характеристиками исследованной когорты. Несмотря на отсутствие статистически значимой линейной корреляции между уровнем экспрессии NIS и возрастом, рассматриваемым как непрерывная переменная, стратифицированный анализ по возрастным группам выявил существенные различия. Установлено, что частота NIS-позитивных опухолей значительно выше в группе пациенток старше 45 лет по сравнению с более молодыми женщинами (до 45 лет). Данный феномен может быть обусловлен несколькими биологическими механизмами. Так, возрастная граница в 45 лет часто совпадает с периодом перименопаузы и менопаузы, характеризующимся глобальными изменениями гормонального фона. Хотя РМЖ по определению не экспрессирует рецепторы эстрогена и прогестерона, системное гормональное воздействие может опосредованно влиять на регуляцию экспрессии транспортных белков, включая NIS, посредством альтернативных сигнальных путей.

Во-вторых, известно, что биологический профиль ТНРМЖ у молодых женщин часто характеризуется более агрессивным течением и повышенной встречаемостью опухолей, ассоциированных с мутациями генов TP53. При обращении к данным cBioPortal, базе данных Breast Cancer (METABRIC, Nature 2012 & Nat Commun 2016), в когорте ТНРМЖ (n=210) нами обнаружена более

высокая частота мутаций TP53 в группе пациенток с ТНРМЖ моложе 45 лет (n=64) – 82,81% по сравнению с 78,7% у женщин старше 45 лет (n=146) (Рисунок 4.4).

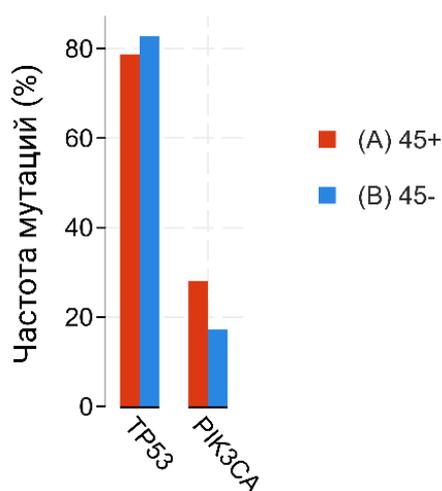


Рисунок 4.4 – Статистический анализ данных METABRIC. Сравнение частоты встречаемости мутаций в генах TP53 и PIK3CA между группами пациенток моложе 45 лет (синий цвет) и возрастом ≥ 45 лет (красный цвет)

Таким образом, мы предполагаем, что для более молодых пациенток характерны как большая мутационная нагрузка опухоли в целом, так и большая частота мутаций в гене TP53, в частности [93].

Согласно результатам нашего исследования выявлено, что степень пролиферативной активности ТНРМЖ имеет отрицательную корреляцию с возрастом пациента, т. е. у женщин молодого возраста опухолевые клетки обладают большей пролиферативной активностью, что в том числе согласуется с данными научной литературы [17]. Учитывая особенности выборки – отсутствие экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона в опухолевых клетках мы можем исключить влияние данных гормонов на пролиферативную активность. Однако, на наш взгляд, важную роль могут играть тиреоидные гормоны, одной из функций которых в том числе является регуляция пролиферативной активности клеток различной локализации [63]. Известно, что с возрастом уровень трийодтиронина линейно снижается, а также существуют исследования, указывающие на то, что прием ингибиторов тирозинкиназ, т. е. медикаментозный гипотиреоз,

ассоциирован с улучшением выживаемости пациентов с не-тиреоидными солидными злокачественными новообразованиями [95, 154]. Данная гипотеза находит свое подтверждение в работе Tawfik с соавт., в которой было продемонстрировано что раковые клетки карциномы молочной железы обладают способностью захватывать ТЗ, что стимулирует их пролиферативную активность [153].

4.4. Оценка ко-локализации TGF- β , p53 в NIS-позитивных клетках при трижды негативном раке молочной железы

В рамках изучения молекулярно-биологических особенностей ТНРМЖ нами был проведен анализ взаимосвязи между экспрессией натрий-йодного симпортера и ключевыми регуляторами клеточных процессов – белком p53 и трансформирующим фактором роста бета (TGF- β).

Мультиплексное иммуногистохимическое исследование продемонстрировало статистически значимую корреляционную взаимосвязь между интенсивностью экспрессии TGF- β и NIS в опухолевой ткани, сохраняющуюся как в центральных отделах опухоли, так и в перитуморальной зоне (коэффициент Спирмена $\rho = 0,41$).

Обнаруженный нами феномен прямо не согласуется с литературными данными, указывающими на роль TGF- β , как ингибитора экспрессии NIS [112, 182]. Так, в статье Yu с соавт., при обработке люминальных эпителиоцитов TGF- β с различными концентрациями йода наблюдался ингибиторный эффект TGF- β на уровень экспрессии мРНК NIS. Однако, данный эффект не был линейным, кроме того, повышение концентрации йода вплоть до контрольных значений при одновременном воздействии TGF- β сопровождалось усилением экспрессии NIS, чего не наблюдалось при обработке клеток исключительно раствором йода или комбинацией раствора йода и инсулиноподобного фактора роста-1. Таким образом,

мы можем утверждать, что TGF- β может обладать разнонаправленным эффектом на уровень экспрессии NIS в тканях молочной железы, а потому, потенциально и в ТНРМЖ.

Остальные исследования проводились исключительно на опухолевом и неопухолевом материале щитовидной железы, что не позволяет достоверно экстраполировать эти литературные данные на опухоли иных локализаций, зачастую принципиально отличающихся не только по фундаментальным биологическим особенностям, но даже по ключевым механизмам регуляции экспрессии NIS.

Например, известно, что основными регуляторами экспрессии NIS в щитовидной железе (и ее карциномах) являются PAX8 и NKX2.1 (TTF-1), не обладающие значимой ролью в работе клеточной машинерии как люминальных эпителиоцитов, так и производных из них карцином молочной железы [106, 137].

Потому, полученные нами данные представляют особую ценность, углубляя наше понимание биологических особенностей трижды негативного рака молочной железы.

Выявленные данные свидетельствуют о сложной взаимосвязи между молекулярными механизмами, определяющими биологическое поведение ТНРМЖ. Результаты иммуногистохимического исследования продемонстрировали значительную ко-экспрессию белков NIS и TGF- β в исследуемой когорте опухолей. Отсутствие статистически значимых различий между группами пациенток с различным репродуктивным анамнезом, а также независимость данной взаимосвязи от клинико-морфологических характеристик, позволяют предположить фундаментальную роль ко-экспрессии NIS и TGF- β в патогенезе злокачественных опухолей молочной железы. А имеющиеся литературные данные о роли TGF- β как проонкогенного цитокина, способствующего эпителиально-мезенхимальному переходу, инвазии опухоли, метастазированию и формированию химиорезистентного фенотипа ТНРМЖ согласуются и с нашими данными о том, что более высокая экспрессия NIS

коррелирует с худшим ответом на химиотерапию [62, 71, 81, 86, 100, 102, 127, 139, 150, 160, 162, 164, 170, 175]. Таким образом, мы можем предположить, что данный феномен частично объясняется влиянием TGF- β на биологию опухоли.

Оценка статуса белка p53 подтвердила высокую степень генетической нестабильности, характерную для данной когорты опухолей. Преобладание «null»-паттерна экспрессии (полное отсутствие окрашивания) в подавляющем большинстве случаев (155 из 161), указывает на наличие мутаций, приводящих к полной утрате функциональной активности белка p53, что согласуется с концепцией его роли как раннего драйверного события в развитии ТНРМЖ. Единичные случаи (n=6) aberrантного цитоплазматического окрашивания, вероятно, обусловлены специфическими антигенными детерминантами опухолевых клеток, приводящими к неспецифическому связыванию антител или нарушениям в процессе ядерного транспорта мутантной формы белка.

Выраженная внутриопухолевая гетерогенность экспрессии NIS (характеризующаяся мозаичным типом окрашивания), наряду с утратой функции p53 и повышенной активностью TGF- β , свидетельствует о выраженной дисрегуляции клеточных процессов ТНРМЖ. В совокупности полученные данные позволяют рассматривать экспрессию NIS в данном контексте не как функциональный элемент, определяющий метаболизм йода, а скорее как суррогатный маркер молекулярно-биологической нестабильности опухоли, ассоциированный с активностью сигнальных путей, поддерживающих ее агрессивный фенотип.

4.5. Количественная оценка иммунофенотипических изменений Т-лимфоцитарного звена в трижды негативном раке молочной железы в зависимости от числа перенесенных беременностей

Полученные в ходе исследования данные свидетельствуют о том, что репродуктивный анамнез выступает в роли значимого фактора, определяющего

структуру адаптивного иммунного ответа при трижды негативном раке молочной железы. Нами было выявлено принципиальное различие в иммунном статусе опухоли между группами пациенток, которое выражается в смене преобладающей популяции Т-лимфоцитов.

Для I группы пациенток характерен профиль с преобладанием иммуносупрессивных механизмов. Высокая плотность Т-хелперов ($CD4^+$) в сочетании с максимальными показателями регуляторных Т-клеток (как общей популяции $FOXP3^+$, так и специфических $CD4^+FOXP3^+$) указывает на выраженную реструктуризацию иммунного ландшафта опухоли. Хорошо известно, что обычно регуляторные Т-клетки способствуют защите опухоли от иммунного надзора, подавляя активность эффекторных клеток и выделяя ингибирующие факторы. Дефицит цитотоксических CD8-лимфоцитов в этой группе подтверждает предположение о том, что у пациенток с отсутствием беременностей в анамнезе противоопухолевый ответ выражен слабее относительно групп II и III.

Напротив, наличие беременностей в анамнезе сопряжено с усилением цитотоксического звена иммунитета. Последовательное нарастание плотности CD8-лимфоцитов, коррелирующее с увеличением количества беременностей, свидетельствует об активном распознавании опухолевых антигенов иммунной системой. Важно отметить, что данный процесс протекает на фоне кратного снижения численности регуляторных клеток. Однако, снижение количества Treg ($FOXP3^+ CD4^+$) клеток не сопровождается снижением их доли среди всех $CD4^+$ клеток, наоборот, в группе III (4 и более беременностей) соотношение количества $CD4^+FOXP3^+$ к клеткам экспрессирующим только $CD4^+$ составляет ~0,32 против 0,18 в группе I, что говорит о выраженной поляризации $CD4^+$ клеток в опухоли в зависимости от числа перенесенных беременностей. А одномоментное повышение количества Т-киллеров указывает на более активную и выраженную поляризацию Т-лимфоцитарного звена иммунитета в опухоли [13]

Литературные данные однозначно указывают на позитивное влияние большего количества TILs на прогноз при ТНРМЖ. Так, существуют

многочисленные исследования о позитивной корреляции между CD4⁺ инфильтрацией и патоморфологическим ответом на химиотерапию. Аналогичная информация существует и относительно CD8⁺ Т-цитотоксических клеток – более высокая степень инфильтрации ассоциирована с лучшим прогнозом и общей выживаемостью [98, 169]. Данные о FOXP3⁺ клетках противоречивы, существуют исследования, указывающие как на позитивное, так и негативное прогностическое влияние данной популяции клеток в случае ТНРМЖ [35, 59, 77, 168], однако на наш взгляд наиболее рациональным является изучение не столько изолированных популяций клеток, сколько их соотношения, например соотношения CD8⁺ к FOXP3⁺. В работе Miyashita с соавт., обнаружено что высокое соотношение CD8/FOXP3 является положительным прогностическим фактором [99]

Биологическая основа данного феномена может лежать в долговременных перестройках ткани молочной железы, происходящих после беременности и лактации. Процессы инволюции молочной железы сопровождаются воспалительной реакцией и перестройкой стромы, что, возможно, создает условия, облегчающие миграцию и накопление цитотоксических лимфоцитов при возникновении злокачественного процесса в будущем.

Наши данные позволяют предположить, что рожавшие пациентки, обладают исходно более активным иммунным профилем опухоли, что может иметь потенциальные прогностические и терапевтические преимущества при использовании методов лечения, направленных на стимуляцию собственного иммунитета. В то же время пациентки без беременностей в анамнезе, характеризующиеся преобладанием регуляторных клеток, могут требовать иных терапевтических подходов, направленных на преодоление иммуносупрессивного микроокружения.

4.6. Количественная оценка сосудистого и макрофагального звена (CD31, CD68, CD163) микроокружения трижды негативного рака молочной железы в зависимости от количества беременностей, завершившихся родами

Результаты мультиплексного иммуногистохимического исследования с последующим морфометрическим анализом демонстрируют, что влияние репродуктивного анамнеза на биологию ТНPMЖ затрагивает фундаментальные механизмы ангиогенеза и врожденного иммунитета. Выявленная нелинейная динамика экспрессии маркеров CD31⁺, CD68⁺ и CD163⁺ указывает на то, что физиологические процессы беременности и последующей инволюции молочной железы индуцируют долговременные изменения в строме, оказывающие существенное влияние на сценарий взаимодействия опухоли и микроокружения.

Особенности васкуляризации опухолевой ткани представляют собой важный аспект рассматриваемого феномена. В I-ой группе пациенток (отсутствие беременностей) наблюдается максимальная плотность микрососудистого русла (CD31⁺), что свидетельствует о высоком ангиогенном потенциале опухолей данной когорты. Напротив, у женщин II-ой группы (1–3 беременности в анамнезе) отмечается подавление неоангиогенеза: плотность сосудов снижается в несколько раз. Данный эффект может быть обусловлен приобретением стромой молочной железы, подвергшейся физиологической инволюции, свойств, ограничивающих формирование новых сосудов на ранних этапах канцерогенеза, или фиброзными изменениями, препятствующими активной васкуляризации. У пациенток III-ей группы (4 и более беременностей) наблюдается тенденция к восстановлению ангиогенного потенциала, с возвращением показателей плотности сосудистой сети к значениям, характерным для I-ой группы, что может отражать истощение компенсаторных механизмов ткани или формирование хронического проангиогенного фона.

Анализ макрофагального компонента выявил феномен функциональной инверсии в зависимости от количества беременностей, завершившихся родами. У пациенток с отсутствием беременностей в анамнезе на фоне высокой

васкуляризации наблюдается массивная инфильтрация макрофагами общего типа (CD68⁺) при относительно низком уровне их специфической поляризации. Это свидетельствует о реализации сценария классического воспаления, характеризующегося высокой клеточностью, достигаемой за счет активного рекрутинга моноцитов из кровотока через развитую сосудистую сеть.

В группе пациенток с 1–3 беременностями наблюдается существенная смена картины: на фоне резкого снижения васкуляризации и общего обеднения стромы макрофагами (семикратное падение CD68⁺) происходит селективное накопление специфических субпопуляций. Пиковые значения клеток с фенотипом CD68⁺CD163⁺ указывают на то, что ограниченное количество присутствующих в опухоли макрофагов подвергается строгой поляризации в сторону альтернативно активированного (M2) фенотипа. Таким образом, в условиях дефицита кровоснабжения и низкой клеточной инфильтрации опухоль компенсирует недостаток ресурсов путем качественной перестройки микроокружения, стимулируя имеющиеся макрофаги к выполнению проопухолевых функций.

У пациенток с 4 и более беременностями в анамнезе наблюдается тенденция к возврату к фенотипу, характерному для I-ой группы пациенток: происходит частичное восстановление общего пула макрофагов при снижении доли специфических M2-поляризованных форм. Это указывает на формирование микроокружения с хроническим воспалением, где регуляторные механизмы, характерные для пациенток II-ой группы, утрачивают свою эффективность.

Однако, с прогностической точки зрения поляризация макрофагов в сторону CD163-негативных форм является благоприятным прогностическим фактором [26, 79]. Имеющиеся литературные данные указывают на то, что высокая степень инфильтрации макрофагами является негативным прогностическим фактором [90, 176], и среди популяций макрофагов наиболее неблагоприятное влияние имеют CD163⁺ формы [128, 142] – их преобладание ассоциировано со снижением общей и безрецидивной выживаемости [31], худшим ответом на химиотерапию [124], большей степенью злокачественности опухоли [167], возникновением дистантных

метастазов [76], формированием эпителиально-мезенхимального перехода опухоли [119,178].

Таким образом, репродуктивный анамнез определяет стратегию формирования опухолевой стромы. У пациенток с отсутствием беременностей в анамнезе преобладает экстенсивный путь (активный ангиогенез и накопление клеток), тогда как у пациенток с 1–3 беременностями в анамнезе реализуется интенсивный путь адаптации, основанный на жесткой M2-поляризации макрофагов и их тесной кооперации с сосудистым руслом в условиях гиповаскуляризации.

4.7. Количественная оценка секрета тучных клеток (триптазы, химазы и карбоксипептидазы А3) в трижды негативном раке молочной железы в зависимости от количества беременностей, завершившихся родами

Результаты мультиплексного иммуногистохимического исследования с последующим морфометрическим анализом секрета тучных клеток позволил выявить существенные различия в составе микроокружения ТНРМЖ, обусловленные количеством беременностей, завершившихся родами. Полученные данные свидетельствуют о том, что репродуктивный анамнез оказывает влияние не только на количественное распределение иммунокомпетентных клеток в строме, но и определяет их функциональный фенотип.

У пациенток не имевших беременностей в анамнезе наблюдается провоспалительный профиль тучных клеток, характеризующийся высокой плотностью инфильтрации. Максимальная экспрессия триптазы и химазы в данной когорте указывает на присутствие активной популяции тучных клеток, предположительно участвующей в процессах неоангиогенеза и ремоделировании внеклеточного матрикса. Известно, что триптаза является мощным ангиогенным фактором, и ее повышенная концентрация у пациенток с отсутствием

беременностей в анамнезе коррелирует с данными о более высокой плотности сосудистой сети в этой же группе (CD31⁺ клеток)

В противоположность этому, большее количество перенесенных беременностей сопряжено с прогрессирующим обеднением стромы классическими тучными клетками. Данное явление наиболее выражено в группе пациенток с 4 и более беременностями в анамнезе, где наблюдается значительное истощение триптаза-положительной популяции, что проявляется снижением ее количества более чем в 12 раз. Это позволяет предположить существование уникальных регуляторных механизмов, изменяющих микроокружение опухоли у пациенток III-ей группы, затрагивающих преимущественно популяцию тучных клеток, что может являться следствием формирования механизмов иммунной толерантности, развивающихся в процессе повторных беременностей.

Также уникальным феноменом, обнаруженным нами, является диссонанс между профилями экспрессии классических протеаз (триптазы⁺/химазы⁺) и карбоксипептидазы⁺ А3 (CPA3⁺). У пациенток II-ой группы, на фоне снижения общего числа тучных клеток, наблюдается парадоксальное возрастание плотности CPA3-экспрессирующих клеток. Это свидетельствует о качественной перестройке популяции, фенотипическом сдвиге. Вероятно, в микроокружении рожавших женщин существуют механизмы, селективно способствующие изменению компонентов специфических протеаз тучных клеток в пользу CPA3⁺. Учитывая способность CPA3⁺ инактивировать эндогенные пептиды (например, эндотелин-1 и нейротензин), накопление CPA3-положительных клеток может отражать эволюционно сформированный механизм ограничения морфофункциональной перестройки молочной железы во время беременности, нашедший свое проявление в ситуации опухолевого роста.

Таким образом, влияние беременности на популяцию тучных клеток носит сложный и селективный характер. Мы наблюдаем переход от количественного преобладания клеток с ангиогенным потенциалом (Try⁺/Chu⁺) у пациенток I группы к формированию качественно иной, CPA3-доминантной популяции у

пациенток с репродуктивным анамнезом. Данные результаты подтверждают гипотезу о том, что биология ТНРМЖ у пациенток с различным репродуктивным анамнезом различается на уровне стромальных взаимодействий, что необходимо учитывать при оценке прогноза заболевания и планировании терапевтических стратегий.

Полученные нами данные согласуются также с исследованиями, указывавшими на способность тучных клеток формировать люминальный фенотип трижды негативного рака молочной железы, характеризующегося повышенной химиорезистентностью. [110, 123, 135].

Совокупность полученных данных позволяет заключить, что иммунное микроокружение NIS-позитивных атипичных клеток при ТНРМЖ является динамично изменяющейся структурой, чутко отражающей репродуктивную историю пациентки. Эти закономерности подчеркивают важность учета репродуктивного анамнеза при интерпретации биологии опухоли, выборе терапевтической тактики и прогнозировании клинического течения заболевания.

4.8. Анализ степени корреляции между уровнем экспрессии NIS в клетках трижды негативного рака молочной железы и ответом на неоадьювантную химиотерапию по индексам остаточной опухолевой нагрузки по системе RCB и критериям оценки ответа солидных опухолей по системе RECIST 1.1

Одним из ключевых результатов настоящего исследования явилось выявление статистически значимой корреляции между уровнем экспрессии натрий-йодного симпортера (NIS) и чувствительностью опухоли к неоадьювантной химиотерапии (НАХТ). Оценка эффективности лечения проводилась комплексно, с использованием как патоморфологических критериев (индекс RCB), так и клинико-рентгенологических (критерии RECIST 1.1).

Анализ распределения пациенток по классам остаточной опухолевой нагрузки по системе RCB показал, что у 50,3% когорты (n=81) был достигнут

полный патоморфологический ответ (RCB-0), что говорит о благоприятном прогнозе для данных пациенток. Минимальная резидуальная опухоль (RCB-I) была выявлена у 19,9% (n=32) пациенток, умеренная (RCB-II) – у 24,8% (n=40), а значительная (RCB-III) – у 5% (n=8). Сопоставление полученных данных с иммуногистохимическим статусом позволило выявить четкую закономерность: низкая экспрессия NIS ассоциирована с выраженным патоморфологическим ответом (классы RCB-0 и RCB-I), в то время как гиперэкспрессия белка коррелирует с сохранением значительного объема жизнеспособной опухолевой ткани (RCB-II и RCB-III). Статистический анализ подтвердил наличие умеренной положительной корреляционной связи между степенью экспрессии NIS и индексом RCB (коэффициент Кендалла $\tau = 0,481$; $p < 0,01$). Данный результат свидетельствует о том, что увеличение уровня NIS сопровождается повышением резистентности опухолевых клеток к цитостатическому воздействию. Важно отметить, что прогностическая значимость NIS сохранялась вне зависимости от применяемой схемы химиотерапии: корреляция была статистически достоверна ($p < 0,01$) как в подгруппе пациенток, получавших стандартную комбинацию «антрациклин + таксан» (59,62%), так и в подгруппе с интенсифицированным режимом «антрациклин + таксан + карбоплатин» (40,37%). Это позволяет рассматривать гиперэкспрессию NIS как универсальный маркер химиорезистентности для указанных схем терапии.

Оценка эффективности лечения по критериям оценки ответа солидных опухолей по системе RECIST 1.1 продемонстрировала сопоставимые результаты. Полный клинический ответ (CR) был зафиксирован у 29,8% пациенток, частичный ответ (PR) – у 55,3%. Стабилизация (SD) и прогрессирование (PD) заболевания наблюдались в 4,96% и 9,94% случаев соответственно. При анализе взаимосвязи с биомаркером была установлена обратная корреляция умеренной силы между уровнем NIS и качеством клинического ответа (коэффициент Кендалла $\tau = -0,3506$; $p < 0,05$). Полученные данные указывают на то, что высокая экспрессия NIS сопряжена с менее выраженным ответом на лечение: у пациенток с

гиперэкспрессией маркера чаще наблюдались стабилизация или прогрессирование заболевания на фоне проводимой НАХТ, в то время как отсутствие или низкая экспрессия NIS коррелировали с достижением объективного ответа (полного или частичного).

В ходе изучения литературных данных и поиске возможных молекулярно-биологических причин формирования NIS-ассоциированной химиорезистентности ТНРМЖ, нами было обнаружены данные, свидетельствующие о том, что ключевым регулятором экспрессии NIS в клетках карцином молочной железы является транскрипционный фактор FOXA1 [132, 133]. Однако, имеющиеся на данный момент исследования о взаимосвязи между NIS и FOXA1 проводились исключительно на культурах клеток и не имеют подтверждения на клиническом материале пациенток, что значительно ограничивает возможность экстраполяции этих данных в область реальной клинической практики.

Потому, для проверки нашей гипотезы о достоверности взаимосвязи между экспрессией NIS и активностью FOXA1 у пациенток с ТНРМЖ, мы обратились к открытым данным ресурса cBioportal, а именно двум крупнейшим исследованиям с данными экспрессии мРНК – BRCA TCGA Firehouse Legacy и BRCA TCGA Cell [67].

Используя данные пациенток (n=1091), полученные в ходе исследования Breast Invasive Carcinoma (TCGA, Firehouse Legacy), мы провели сравнительный анализ экспрессии мРНК NIS (SLC5A5) в двух подгруппах: FOXA1-Wild-type (FOXA1-WT; n=854) и FOXA1-мутантной группе, включая драйверные мутации, мутации усиления, амплификации (FOXA1-M; n=237). Все пересекающиеся образцы были исключены из исследования. В ходе анализа мы обнаружили статистически значимое повышение экспрессии мРНК NIS в подгруппе FOXA1-M по сравнению с FOXA1-WT (p-value: <0,001; q-value: <0,001). Кроме того, мы оценили групповую частоту со-мутации TP53, чтобы исключить влияние мутаций в этом гене на наши результаты. Статистически значимых различий в частоте со-мутаций в TP53 не обнаружено (p-value: 0.133; q-value: 0.821) (Рисунок 4.5).

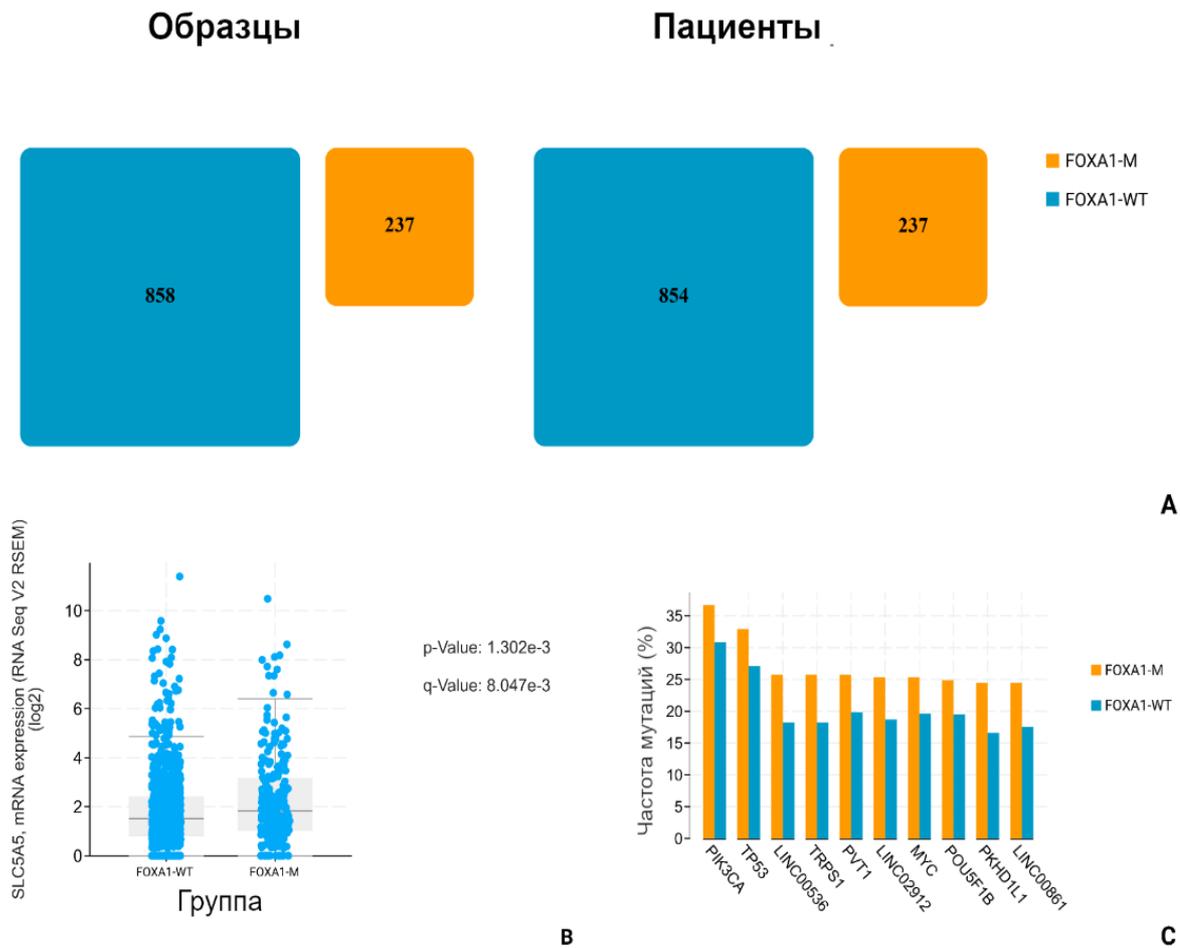


Рисунок 4.5 – Статистический анализ данных TCGA, Firehouse. А) Количество пациенток с вариантами FOXA1-M и FOXA1-WT; Б) Сравнение уровней мРНК SLC5A5; В) Наиболее распространенные ассоциированные мутации в группах FOXA1-M и FOXA1-WT

Используя данные пациенток (n=820), полученные в ходе исследования Invasive breast carcinoma (TCGA, Cell 2015), мы провели сравнительный анализ экспрессии мРНК NIS (SLC5A5) в двух группах: FOXA1-WT (n=627), FOXA1-M (n=182). Все пересекающиеся образцы были исключены из исследования. В ходе анализа мы нашли предполагаемое повышение экспрессии мРНК NIS в группе FOXA1-M по сравнению с группой FOXA1-WT (p-Value: 0.0141; q-Value: 0.0706), а при последующем выделении отдельной подгруппы только с амплификацией и мутациями усиления FOXA1-AMPGAIN (n=163) степень статистической значимости различий экспрессии мРНК NIS по сравнению с группой FOXA1-WT была выше (p-Value: <0,001; q-Value: 0.0160) (Рисунок 4.6).

Чтобы дополнительно оценить специфичность ассоциаций NIS-FOXA1 в ТНРМЖ, мы провели анализ подгруппы, ограниченный трижды негативными случаями (определяемыми как ER-отрицательные, PR-отрицательные и HER2-отрицательные) в наборах данных TCGA. В наборе данных Breast Invasive Carcinoma (TCGA, Firehose Legacy) подгруппа ТНРМЖ включала n=69 образцов, среди которых только 1 случай имел мутацию FOXA1 (без доступных данных экспрессии мРНК для NIS/SLC5A5), в то время как остальные образцы были FOXA1-wild-type. Аналогично, в наборе данных Invasive Breast Carcinoma (TCGA, Cell 2015) подгруппа ТНРМЖ включала n=51 образец, с мутациями FOXA1, выявленными только в 2 случаях. Статистически значимой корреляции между уровнями мРНК FOXA1 и экспрессией мРНК NIS/SLC5A5 в этих подгруппах не наблюдалось ($p > 0.05$). Примечательно, что мутации TP53 были преобладающими в >80% этих образцов ТНРМЖ, что согласуется с известными геномными профилями этого подтипа и затрудняет обнаружение взаимодействий wild-type форм гена FOXA1 и NIS.

Резюмируя проведенный нами биоинформатический анализ, мы подтвердили, что FOXA1 является значимым регулятором экспрессии NIS в реальном клиническом материале пациенток с РМЖ.

Вопрос о том, как конкретно FOXA1 влияет на химиорезистентность опухолей и прогноз остается дискуссионным. Известно, что его экспрессия в люминальных, гормон-позитивных подтипах, ассоциирована с лучшим ответом на гормональную терапию, более низкую степень злокачественности опухоли и меньший ее размер [180]. Однако, вероятно, все вышеперечисленные положительные эффекты связаны именно с модуляцией эстрогеновых рецепторов. Потому, в случае люминального В или трижды-негативного суррогатно-молекулярного генетического подтипа, при котором клетки опухоли не экспрессируют рецепторы к эстрогену в необходимом количестве, выступают на первый план остальные регуляторные и эффекторные функции FOXA1 как

транскрипционного фактора, способного поддерживать «люминальный» фенотип опухоли [113].

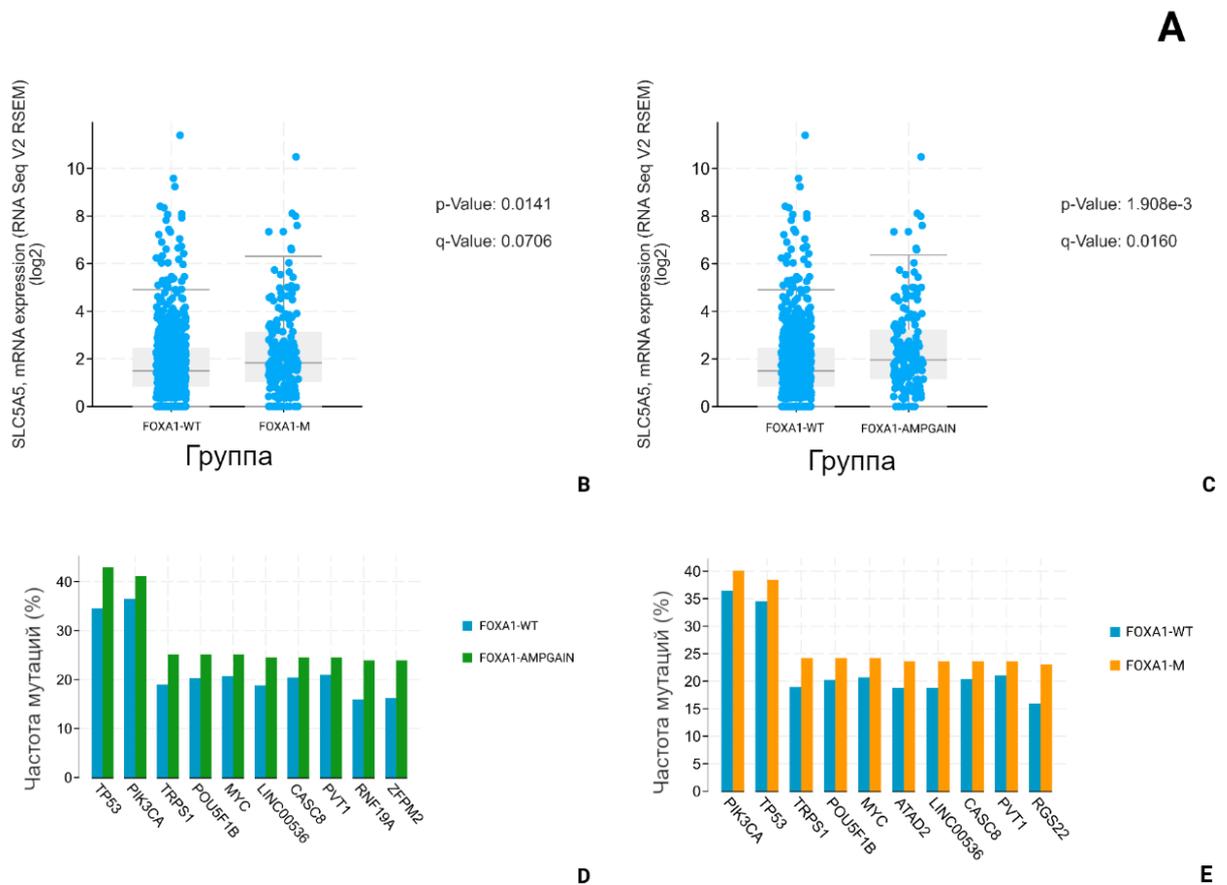
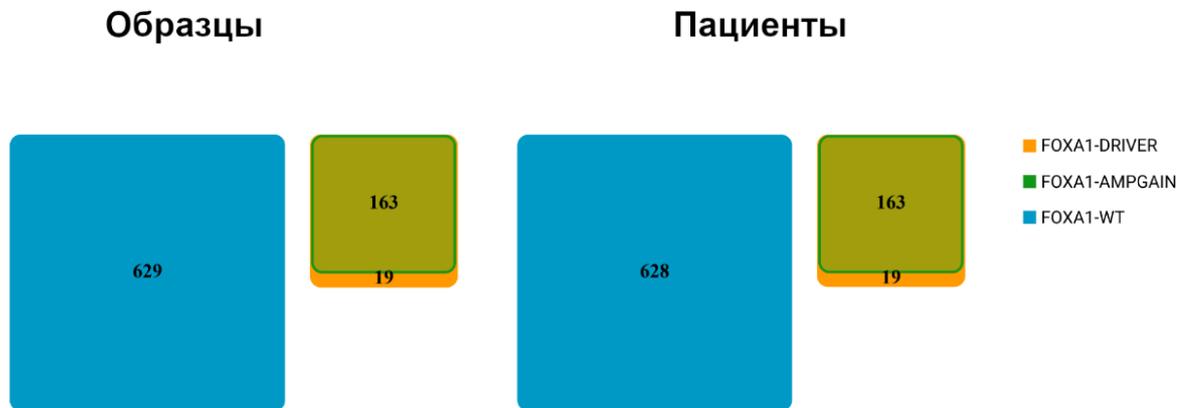


Рисунок 4.6 – Статистический анализ данных TCGA, Cell. А) Количество пациенток с вариантами FOXA1-M (FOXA1-DRIVER + FOXA1-AMPGAIN) и FOXA1-WT; В) Сравнение уровней мРНК SLC5A5 в группах FOXA1-WT и FOXA1-M; С) Сравнение уровней мРНК SLC5A5 в группах FOXA1-WT и FOXA1-

AMPGAIN; D) Наиболее распространенные ассоциированные мутации в группах FOXA1-WT и FOXA1- AMPGAIN; E) Наиболее распространенные ассоциированные мутации в группах FOXA1-WT и FOXA1-M

Как известно, люминальный А подтип рака молочной железы является резистентным ко многим цитостатическим и цитотоксическим препаратам, таким как паклитаксел и доксорубицин, потому согласно St. Gallen Consensus, проведение химиотерапии для Люминального А подтипа РМЖ является нерациональным [33]. Потому, вероятно, в отсутствие экспрессии эстрогеновых рецепторов, но с сохранной экспрессией FOXA1, клетки ТНРМЖ приобретают некоторые черты «люминального» фенотипа, становясь устойчивее к химиотерапии [113].

Таким образом, результаты исследования демонстрируют согласованность патоморфологических и клинических данных. Выявленная корреляция между высоким уровнем NIS и сниженной эффективностью терапии (высокий индекс остаточной опухолевой нагрузки по системе RCB и отсутствие объективного ответа по критериям оценки ответа солидных опухолей по системе RECIST 1.1) позволяет характеризовать NIS-позитивный статус как предиктор низкой чувствительности к стандартной неоадьювантной химиотерапии на основе антрациклинов и таксанов. Это открывает перспективы для использования NIS в качестве биомаркера для стратификации пациенток и, возможно, персонализации лечебной тактики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании проведена комплексный анализ экспрессии NIS при трижды негативном раке молочной железы (ТНРМЖ) с отсутствием мутаций в генах BRCA1/2 и CHEK2, включая влияние репродуктивного фактора (количество беременностей) на уровень экспрессии NIS и биологию опухоли, сравнительный анализ чувствительности и специфичности NIS по отношению к маммаглобину и GATA-3, связь экспрессии NIS с возрастом пациенток и мутационной нагрузкой (включая TP53), ко-локализацию NIS с TGF- β и p53, а также влияние репродуктивного анамнеза на иммунное микроокружение опухоли (Т-лимфоциты, сосудисто-макрофагальное звено и тучные клетки). Кроме того, изучена корреляция экспрессии NIS с ответом на неoadъювантную химиотерапию по индексам остаточной опухолевой нагрузки по системе RCB и критериям оценки ответа солидных опухолей по системе RECIST 1.1, подтвердившая роль NIS как маркера химиорезистентности.

При сравнении экспрессии NIS, маммаглобина и GATA-3 в раковых клетках позитивные реакции были зарегистрированы практически во всех образцах: NIS-позитивные реакции наблюдались у 112 пациенток (70,0%), маммаглобин – у 50 (31,0%), а GATA-3 – у 102 (63,3%). Таким образом, NIS представляется перспективным иммуногистохимическим маркером для верификации ТНРМЖ, особенно при комбинированном использовании с GATA-3. Это позволяет рассматривать NIS как перспективный маркер для дифференциальной диагностики при поиске гисто/органопринадлежности опухоли.

Также в ходе проведенного исследования была установлена слабая-умеренная отрицательная корреляция ($\tau = -0,369$) между количеством беременностей в анамнезе пациенток и степенью экспрессии NIS при ТНРМЖ. Данный результат свидетельствует о тенденции к снижению уровня экспрессии NIS в опухолевых клетках у пациенток с 4 и более беременностями. Полученные данные позволяют предположить, что наблюдаемый феномен может быть связан с

терминальной дифференцировкой эпителия молочной железы, происходящей в период беременности, потенциально подавляющей проонкогенные свойства атипичных клеток.

Кроме того, было установлено наличие зависимости экспрессии маркера от возраста: частота NIS-позитивных опухолей статистически значимо выше у пациенток старше 45 лет. Данный факт может быть обусловлен изменениями гормонального фона в периоды пери- и постменопаузы, а также накоплением мутационной нагрузки с возрастом.

В ходе изучения механизмов внеклеточной и внутриклеточной регуляции экспрессии NIS нами было обнаружена значительная степень ко-экспрессии NIS с трансформирующим фактором роста бета (TGF- β), сохранявшаяся во всех группах. Таким образом, мы предполагаем, что TGF- β является фактором, стимулирующим экспрессию NIS в ТНРМЖ.

В ходе исследования были обнаружены многочисленные статистически значимые различия в клеточном составе опухолевого микроокружения ТНРМЖ между группами в зависимости от числа перенесенных беременностей, завершившихся родами. Для группы пациенток с отсутствием беременностей в анамнезе характерны высокая плотность Т-хелперов (CD4⁺) в сочетании с максимальными показателями регуляторных Т-клеток (как общей популяции FOXP3⁺, так и специфических CD4⁺FOXP3⁺), что указывает на выраженную реструктуризацию иммунного ландшафта опухоли. Напротив, наличие беременностей в анамнезе ассоциировано с усилением цитотоксического звена иммунитета, что проявляется последовательным нарастанием плотности популяции CD8-лимфоцитов и относительным увеличением доли истинных Т-регуляторных клеток (CD4⁺FOXP3⁺) при снижении их абсолютного количества.

Результаты мультиплексного иммуногистохимического (ИГХ) исследования с последующим морфометрическим анализом демонстрируют, что влияние количества беременностей на биологию раковых клеток при ТНРМЖ затрагивает фундаментальные механизмы ангиогенеза и врожденного иммунитета.

Выявленная нелинейная динамика экспрессии маркеров CD31⁺, CD68⁺ и CD163⁺ указывает на то, что физиологические процессы беременности и последующей инволюции молочной железы индуцируют долговременные изменения в строме, оказывающие существенное влияние на сценарий взаимодействия опухоли и микроокружения. В результате проведенного ИГХ исследования обращала на себя внимание высокая сосудистая плотность в группе пациенток с отсутствием беременностей в анамнезе, в группе III наблюдалось уменьшение сосудистой плотности. Наименьшую плотность сосудов наблюдали в группе II.

При иммунофенотипическом анализе популяции макрофагов иммунного инфильтрата наиболее выраженная экспрессия CD68⁺ наблюдалась в I-ой группе пациенток. В группе II отмечали значительное снижение общего числа макрофагов, однако именно в этой когорте наблюдается пиковая концентрация специфических субпопуляций клеток с фенотипами CD68⁺CD163⁺ и CD31⁺CD68⁺CD163⁺. У пациенток с 4 и более беременностями показатели макрофагальной инфильтрации приближаются к уровню нерожавших.

Результаты мультиплексного иммуногистохимического исследования с последующим морфометрическим анализом секрета тучных клеток позволил выявить существенные различия в составе микроокружения ТНРМЖ в группах пациенток. Наблюдается переход от количественного преобладания клеток с ангиогенным потенциалом (триптазы, химазы) у пациенток с отсутствием беременностей в анамнезе к формированию качественно иной, карбоксипептидаза АЗ-доминантной популяции у женщин с репродуктивным анамнезом.

Клиническая значимость работы подтверждается выявленной взаимосвязью между уровнем NIS и чувствительностью опухоли к неoadъювантной химиотерапии (НАХТ). Низкая экспрессия NIS ассоциирована с выраженным патоморфологическим ответом (классы RCB-0 и RCB-I), в то время как гиперэкспрессия белка коррелирует с сохранением значительного объема жизнеспособной опухолевой ткани (RCB-II и RCB-III). Это позволяет рассматривать гиперэкспрессию NIS как универсальный маркер

химиорезистентности для указанных схем терапии. Оценка эффективности лечения по критериям оценки ответа солидных опухолей по системе RECIST 1.1 продемонстрировала сопоставимые результаты: при анализе взаимосвязи с биомаркером была установлена обратная корреляция умеренной силы между уровнем NIS и качеством клинического ответа (коэффициент Кендалла $\tau = -0,3506$; $p < 0,05$).

На основании полученных данных можно заключить, что ТНРМЖ представляет собой биологически гетерогенную группу опухолей, свойства которых в значительной степени детерминированы количеством перенесенных беременностей в анамнезе, завершившихся родами, а экспрессия натрий-йодного симпортера потенциально позволяет рассматривать NIS как важный прогностический биомаркер при планировании лечения (Рисунок 4.7).

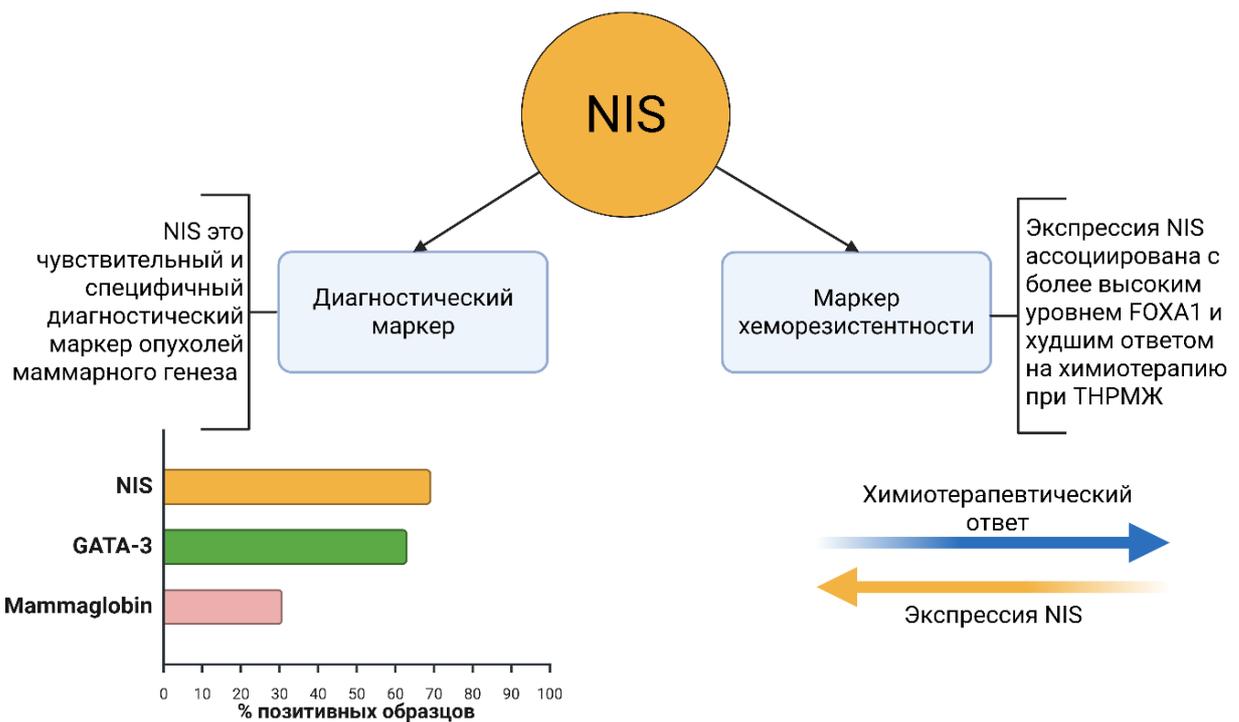


Рисунок 4.7 – Клинико-морфологическое значение натрий-йод симпортера

ВЫВОДЫ

1. Трижды негативный рак молочной железы характеризуется отрицательной корреляцией экспрессии NIS с количеством беременностей пациенток (τ -Кендалла = -0,369, $p < 0,05$).

2. При сравнительном анализе уровня экспрессии NIS в раковых клетках трижды негативного рака молочной железы было показано, что частота экспрессии NIS составляет 70%, что превышает показатели частоты экспрессии GATA-3 (63,3%) и маммаглобина (31,0%). Таким образом, NIS потенциально является одним из наиболее чувствительных маркеров, специфических для железистого эпителия молочной железы.

3. Более высокая частота экспрессии NIS при трижды негативном раке молочной железы характерна для пациенток старше 45 лет ($p < 0,05$).

4. При трижды негативном раке молочной железы наблюдается выраженная корреляционная взаимосвязь экспрессии NIS и TGF- β преимущественно в атипичных клетках (Pearson $r = +0,34$; Spearman $\rho = +0,41$), характерная для всех возрастных групп и не зависящая от числа перенесенных беременностей ($p < 0,05$).

5. При трижды негативном раке молочной железы выявили существенную гетерогенность популяции Т-лимфоцитов в зависимости от количества перенесенных беременностей в анамнезе. Отмечается преобладание элементов Т-регуляторных лимфоцитов (CD4, FOXP3) среди пациенток без перенесенных беременностей в анамнезе ($p < 0,00001$). Среди группы пациенток с множественными перенесенными беременностями отмечалось преобладание Т-цитотоксических лимфоцитов (CD8) в опухолевом микроокружении.

6. Трижды негативный рак молочной железы характеризуется значительными различиями в фенотипическом составе макрофагов опухолевого микроокружения. Наибольшее преобладание CD68⁺ клеток было характерно для пациенток с отсутствием беременностей в анамнезе ($p < 0,0001$). В группе пациенток с 1–3 беременностями было характерно преобладание макрофагов с

фенотипом CD68⁺CD163⁺ ($p < 0,0001$). Анализ плотности микрососудистого окружения продемонстрировал схожесть в плотности CD31⁺-клеток в группе I и группе III. В группе с 1–3 беременностями отмечалось значительное снижение плотности микрососудистого русла ($p=0,01235$).

7. При трижды негативном раке молочной железы большее число перенесенных беременностей сопровождается возрастанием среди тучных клеток доли экспрессирующих карбоксипептидазу А3 и снижением пула клеток, позитивных к триптазе и химазе ($p < 0,05$).

8. Высокая степень экспрессии NIS в атипичных клетках трижды негативного рака молочной железы коррелирует с меньшей частотой ответов на химиотерапию, оцениваемых по индексу остаточной опухолевой нагрузки по системе RCB ($\tau = 0,481$; $p < 0,01$) и критериям оценки ответа солидных опухолей по системе RECIST 1.1 ($\tau = -0,3506$; $p < 0,05$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Верификацию трижды негативного рака молочной железы рекомендуется проводить с использованием иммуногистохимического исследования на натрий-йод симпортер (NIS) в комбинации с GATA-3 для повышения эффективности дифференциальной диагностики.

2. В клинической практике при сборе репродуктивного анамнеза (количество беременностей) у пациенток с трижды негативным раком молочной железы необходимо сопоставить эти данные с уровнем экспрессии NIS, поскольку у женщин с 4-ми и более беременностями отмечается снижение экспрессии NIS, ассоциированное с меньшей агрессивностью опухоли.

3. Перед назначением неоадьювантной химиотерапии пациенткам с трижды негативным раком молочной железы можно рекомендовать иммуногистохимическую оценку экспрессии NIS, так как его повышенный уровень коррелирует с химиорезистентностью (по индексу остаточной опухолевой нагрузки по системе RCB и критериям оценки ответа солидных опухолей по системе RECIST 1.1), что позволяет оптимизировать лечебную стратегию и рассмотреть альтернативные подходы, включая таргетную терапию.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
- ЗНО – злокачественное новообразование
- ИГХ – иммуногистохимическое исследование
- ИПК-НСТ – инвазивная протоковая карцинома неспецифического типа
- НАХТ – неoadъювантная химиотерапия
- РМЖ – рак молочной железы
- РЩЖ – рак щитовидной железы
- ТНРМЖ – трижды негативный рак молочной железы
- ТТГ – тиреотропный гормон
- цАМФ – циклический аденозинмонофосфат
- ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход
- BRCA1 (англ. breast cancer gene 1) – ген BRCA1 CD10 – кластер дифференцировки 10
- CD45 (англ. cluster of differentiation 45) – кластер дифференцировки 45
- CD68 (англ. cluster of differentiation 68) – кластер дифференцировки 68
- СК (англ. cytokeratin) – цитокератин
- CPA3 (англ. Carboxypeptidase A3) — карбоксипептидаза A3
- CR — полный ответ (Complete Response)
- CX3CR1 (англ. CX3C chemokine receptor 1) – CX3C хемокиновый рецептор 1
- DAPI — 4',6-диамидино-2-фенилиндол
- D2-40 – моноклональное антитело к подоплатину
- EGF (англ. epidermal growth factor) – эпидермальный фактор роста
- ER (англ. estrogen receptor) – рецептор эстрогена (англ. estrogen receptor)
- FOXA-1 (англ. forkhead box A1) – фактор транскрипции FOXA-1
- FOXP3 — транскрипционный фактор forkhead box P3
- GATA-3 (англ. GATA binding protein 3) – фактор транскрипции GATA-связывающего белка 3

HER2/neu (англ. human epidermal growth factor receptor 2) – рецептор эпидермального фактора роста человека 2

HIF-1 α (англ. hypoxia-inducible factor 1-alpha) – гипоксия-индуцируемый фактор 1-альфа

IgA (англ. Immunoglobulin A) – иммуноглобулин А

Ki-67 (англ. Ki-67 proliferation marker) – маркер пролиферации Ki-67

LARG (англ. leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor) – лейкомия-ассоциированный Rho гуанин-нуклеотидный обменный фактор

LYVE-1 (англ. lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1) – лимфатический сосудистый эндотелиальный гиалуронановый рецептор 1

Mammaplobin – онкомаркер маммаглобин

MHC-II (англ. major histocompatibility complex II) – главный комплекс гистосовместимости II

MV-NIS (англ. measles virus-NIS) – вирус кори, экспрессирующий NIS

NIS (англ. sodium/iodide symporter) – натрий/йод-симпортер

p40/p63 – белки p40/p63

PD-1/PD-L1 (англ. programmed death 1 / programmed death ligand 1) – рецептор программируемой гибели 1 / лиганд рецептора программируемой гибели 1

PI3K/АКТ/mTOR (англ. phosphoinositide 3-kinase / protein kinase B / mammalian target of rapamycin) – сигнальный путь PI3K/АКТ/mTOR

PIK3CA (англ. phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha) – ген PIK3CA

PD — прогрессирование заболевания (Progressive Disease)

PR (англ. progesterone receptor) – рецептор прогестерона

PTEN (англ. phosphatase and tensin homolog) – ген PTEN гомолог фосфатазы и тензина

RANKL (англ. receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) – лиганд рецептора активатора ядерного фактора карра-В

RB1 (англ. retinoblastoma 1) – ген ретинобластомы 1

- RCB (англ. Residual cancer burden) – индекс остаточной опухолевой нагрузки
- RECIST (англ. Response evaluation criteria in solid tumors) – критерии оценки ответа солидных опухолей на лечение
- RhoA – Член семейства гомологов Ras A
- SD — стабилизация заболевания (Stable Disease)
- SLC5A5 (англ. Solute Carrier Family 5 Member 5) – член 5 семейства солют-транспортеров A
- SMMHC (англ. smooth muscle myosin heavy chain) – тяжелая цепь гладкомышечного миозина
- STAT5a (англ. signal transducer and activator of transcription 5a) – преобразователь сигнала и активатор транскрипции 5a
- TCGA (англ. The Cancer Genome Atlas) – атлас генома рака
- TGF- α (англ. transforming growth factor alpha) – трансформирующий фактор роста альфа
- TILs (англ. tumor-infiltrating lymphocytes) – опухоль-инфильтрирующие лимфоциты
- TNM (англ. tumor-node-metastasis) – классификация опухолей по TNM
- TP53 (англ. tumor protein p53) – ген TP53
- Wnt4 (англ. wntless-type MMTV integration site family member 4) – белок Wnt4
- α -SMA (англ. alpha-smooth muscle actin) – альфа-гладкомышечный актин

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бяхова, М. М. Злокачественное новообразование молочной железы в составе синдрома Коудена / М. М. Бяхова, А. Б. Семенова, В. Н. Галкин // Злокачественные опухоли. — 2022. — Т. 12, № 2. — С. 36–44. — DOI: 10.18027/2224-5057-2022-12-2-36-44.
2. Гузик, А. А. Экспрессия NIS в атипичных клетках трижды негативного рака молочной железы / А. А. Гузик, Д. В. Белокопытов, Г. А. Демяшкин // Донецкие чтения. — 2025. — С. 228–229.
3. Демяшкин, Г. А. NIS как диагностический маркер трижды негативного рака молочной железы / Г. А. Демяшкин, А. А. Гузик, Д. В. Белокопытов [и др.] // Человек и его здоровье. — 2025. — Т. 28, № 4. — С. 75–83.
4. Демяшкин, Г. А. Иммунофенотипическая характеристика светлоклеточного рака молочной железы / Г. А. Демяшкин, А. О. Рыжов, А. В. Сидорин // Медицинский вестник Северного Кавказа. — 2021. — Т. 16, № 3. — С. 303–305. — DOI: 10.14300/mnnc.2021.16071.
5. Демяшкин, Г. А. Морфологические и молекулярно-биологические особенности молочной железы: современный взгляд / Г. А. Демяшкин, Д. В. Белокопытов, А. А. Гузик [и др.] // Research'n Practical Medicine Journal. — 2025. — Т. 12, № 1. — С. 99–114. — DOI: 10.17709/2410-1893-2025-12-1-7.
6. Демяшкин, Г. А. Муцинозная карцинома молочной железы: иммунофенотипическая характеристика / Г. А. Демяшкин, Д. А. Пастухова, И. А. Сердюк [и др.] // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. — 2017. — Т. 7, № 2. — С. 40–45.
7. Демяшкин, Г. А. Экспрессия Ki-67 при трижды негативном раке молочной железы, возрастные особенности / Г. А. Демяшкин, Д. В. Белокопытов, А. А. Гузик // Южно-российский онкологический журнал. — 2025. — Т. 6, № 3. — С. 53–62. — DOI: 10.37748/2686-9039-2025-6-3-6.

8. Ермощенко, М. В. Хирургическая реабилитация больных с постмастэктомической лимфедемой верхней конечности / М. В. Ермощенко, М. О. Мясникова, А. Д. Зикирходжаев [и др.] // РМЖ. Медицинское обозрение. — 2023. — Т. 7, № 6. — С. 372–382. — DOI: 10.32364/2587-6821-2023-7-6-6. — EDN: FKVLUT.

9. Исаева, О. И. Сравнительная оценка иммунологического микроокружения при исследовании трепанобиоптатов и операционного материала инвазивной карциномы молочной железы / О. И. Исаева, А. Б. Семенова, А. В. Важенин // Уральский медицинский журнал. — 2019. — № 10 (178). — С. 45–48. — DOI: 10.25694/URMJ.2019.10.21.

10. Калинин, А. Ю. Транскриптомные характеристики макрофагов микроокружения опухоли у пациенток с трижды негативным раком молочной железы в зависимости от PD-L1 статуса опухоли / А. Ю. Калинин, И. А. Пацкан, С. В. Вторушин, Л. А. Таширева // Сибирский онкологический журнал. — 2025. — Т. 24, № 5. — С. 64–71. — DOI: 10.21294/1814-4861-2025-24-5-64-71.

11. Каприн, А. Д. Злокачественные новообразования в России в 2022 году (заболеваемость и смертность) / А. Д. Каприн, В. В. Старинский, А. О. Шахзадова. — Москва: МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2023. — 275 с.

12. Ким, О. Т. Хроническое воспаление при ассоциированных с ожирением заболеваниях / О. Т. Ким, В. А. Дадаева, Г. И. Нуруллина [и др.] // Профилактическая медицина. — 2025. — Т. 28, № 1. — С. 115–121. — DOI: 10.17116/profmed202528011115.

13. Мнихович, М. В., Ерофеева, Л. М., Борисов, Д. А., Тимофеев, Р. Г., Агафонова, Ю. С., Безуглова, Т. В., Ширипенко, И. А. Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты: возможности использования их потенциала в клинической практике при раке молочной железы / М. В. Мнихович, Л. М. Ерофеева, Д. А. Борисов [и др.] // Морфология. — 2023. — Т. 161, № 3. — С. 97–105. — DOI: 10.17816/morph.628871.

14. Партс, С. А. Роль мультимодальной организации амбулаторного приема в диагностике рака щитовидной железы / С. А. Партс, И. В. Решетов, Е. С. Кузьмина // Голова и шея. — 2024. — Т. 12, № 4. — С. 50–58. — DOI: 10.25792/HN.2024.12.4.50-58.

15. Ревкова, М. А. Особенности валидации герминальных вариантов в гене PMS2 у пациентов с наследственными опухолевыми синдромами / М. А. Ревкова, А. А. Криницина, М. В. Немцова // Медицинская генетика. — 2024. — Т. 23, № 2. — С. 34–45. — DOI: 10.25557/2073-7998.2024.02.34-45.

16. Свёшникова, А. Н., Адаманская, Е. А., Коробкина, Ю. Д., Пантелеев, М. А. Внутриклеточные сигнальные механизмы, вовлечённые в запрограммированную гибель нейтрофилов с выбросом внеклеточных ДНК-сетей / А. Н. Свешникова, Е. А. Адаманская, Ю. Д. Коробкина, М. А. Пантелеев // Педиатрическая гематология/онкология и иммунопатология. — 2025. — Т. 23, № 2. — С. 222–230. — DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-222-230.

17. Семенова, А. Б. Возможности молекулярно-генетических методов для эффективного выявления наследственных форм онкологических заболеваний среди лиц с повышенными рисками их развития / А. Б. Семенова, М. М. Бяхова, В. Н. Галкин // Здоровье мегаполиса. — 2023. — Т. 4, № 2. — С. 30–40. — DOI: 10.47619/2713-2617.zm.2023.v.4i2;30-40.

18. Семенова, А. Б. Микроокружение инвазивных карцином молочной железы «неспецифического» и «специфических» типов с учетом злокачественности новообразований (обзор литературы) / А. Б. Семенова, А. Ю. Шаманова // Уральский медицинский журнал. — 2014. — Т. 122, № 8. — С. 23–28.

19. Семенова, А. Б. Современные предпосылки для формирования молекулярно-генетических классификаций опухолей / А. Б. Семенова, А. В. Важенин, В. А. Семенов // Вестник Совета молодых ученых и специалистов Челябинской области. — 2018. — Т. 2, № 1 (20). — С. 87–89.

20. Стативко, О. А. Эффективность второй линии терапии после прогрессирования на ингибиторах CDK4 / О. А. Стативко, Е. В. Царева, Э. А. Хачатурян // Злокачественные опухоли. — 2023. — Т. 13, № 3. — С. 119–120.

21. Терешин, О. С. Повышение уровня пептидил-аргинин деиминазы 4 типа в крови при различных молекулярно-биологических подтипах рака молочной железы / О. С. Терешин, А. Б. Семенова, А. В. Важенин // Российский иммунологический журнал. — 2020. — Т. 23, № 1. — С. 97–102. — DOI: 10.46235/1028-7221-011-ISL.

22. Франк, Г. А. Порядок патолого-анатомической диагностики биопсийного и операционного материала при новообразованиях молочной железы: клинические рекомендации / Г. А. Франк, Ю. Андреева. — 2020.

23. Aine, M. Molecular analyses of triple-negative breast cancer in the young and elderly / M. Aine, C. Boyaci, J. Hartman [et al.] // Breast Cancer Research. — 2021. — Vol. 23, no. 1. — P. 20. — DOI: 10.1186/s13058-021-01392-0.

24. Akoglu, H. User's guide to correlation coefficients / H. Akoglu // Turkish Journal of Emergency Medicine. — 2018. — Vol. 18, no. 3. — P. 91–93. — DOI: 10.1016/j.tjem.2018.08.001.

25. Ali, S. Terminal differentiation and anti-tumorigenic effects of prolactin in breast cancer / S. Ali, D. Hamam, X. Liu [et al.] // Frontiers in Endocrinology. — 2022. — Vol. 13. — P. 993570. — DOI: 10.3389/fendo.2022.993570.

26. Allison, E. Breast Cancer Survival Outcomes and Tumor-Associated Macrophage Markers: A Systematic Review and Meta-Analysis / E. Allison, S. Edirimanne, J. Matthews [et al.] // Oncology and Therapy. — 2023. — Vol. 11, no. 1. — P. 27–48. — DOI: 10.1007/s40487-022-00214-3.

27. Atiakshin, D. Carboxypeptidase A3-A Key Component of the Protease Phenotype of Mast Cells / D. Atiakshin, A. Kostin, I. Trotsenko [et al.] // Cells. — 2022. — Vol. 11, no. 3. — P. 570. — DOI: 10.3390/cells11030570.

28. Baker, N. E. Reducing the aneuploid cell burden — cell competition and the ribosome connection / N. E. Baker, C. Montagna // *Disease Models & Mechanisms*. — 2022. — Vol. 15, no. 11. — P. dmm049673. — DOI: 10.1242/dmm.049673.
29. Birts, C. N. Prognostic significance of crown-like structures to trastuzumab response in patients with primary invasive HER2+ breast carcinoma / C. N. Birts, C. Savva, S. A. Laversin [et al.] // *Scientific Reports*. — 2022. — Vol. 12, no. 1. — P. 7802. — DOI: 10.1038/s41598-022-11696-6.
30. Biswas, S. K. The Mammary Gland: Basic Structure and Molecular Signaling during Development / S. K. Biswas, S. Banerjee, G. W. Baker [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2022. — Vol. 23, no. 7. — Art. 3883. — DOI 10.3390/ijms23073883.
31. Bobrie, A. Association of CD206 Protein Expression with Immune Infiltration and Prognosis in Patients with Triple-Negative Breast Cancer / A. Bobrie, O. Massol, J. Ramos [et al.] // *Cancers*. — 2022. — Vol. 14, no. 19. — P. 4829. — DOI: 10.3390/cancers14194829.
32. Breast tumours / WHO Classification of Tumours Editorial Board. — 5th ed. — Lyon : International Agency for Research on Cancer, 2019. — 640 p. — (WHO classification of tumours series ; vol. 2). — ISBN 978-92-832-4500-1.
33. Burstein, H. J. Tailoring treatment to cancer risk and patient preference: the 2025 St Gallen International Breast Cancer Consensus Statement on individualizing therapy for patients with early breast cancer / H. J. Burstein, G. Curigliano, M. Gnant [et al.] // *Annals of Oncology*. — 2025. — Vol. 36, no. 12. — P. 1433–1446. — DOI: 10.1016/j.annonc.2025.09.007.
34. Cai, Z. Perfluorooctanoic acid disrupts thyroid hormone biosynthesis by altering glycosylation of Na⁺/I⁻ symporter in larval zebrafish / Z. Cai, G. Zhou, X. Yu [et al.] // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. — 2025. — Vol. 297. — P. 118249. — DOI: 10.1016/j.ecoenv.2025.118249.
35. Caramelo, O. Prognostic relevance of specific TIL (CD4⁺, CD8⁺, and FOXP3 + T-cell infiltrates) in triple-negative breast cancer: Short- and long-term

outcomes / O. Caramelo, V. Almeida, A. Fidalgo [et al.] // *Breast Cancer*. — 2025. — DOI: 10.1007/s12282-025-01819-y.

36. Carleton, N. Reciprocal immune-epithelial interaction during breast cancer induction / N. Carleton, M. T. Lotze // *Journal for Immunotherapy of Cancer*. — 2025. — Vol. 13, no. 6. — Art. e011453. — DOI 10.1136/jitc-2024-011453.

37. Carter, J. M. Macrophagic «Crown-like Structures» Are Associated with an Increased Risk of Breast Cancer in Benign Breast Disease / J. M. Carter, T. L. Hoskin, M. A. Pena [et al.] // *Cancer Prevention Research*. — 2018. — Vol. 11, no. 2. — P. 113–119. — DOI: 10.1158/1940-6207.capr-17-0245.

38. Cassoni, A. M. TNM classification of malignant tumours / A. M. Cassoni [et al.] // *Clinical Oncology*. — 1998. — Vol. 10, no. 1. — P. 61. — DOI: 10.1016/s0936-6555(98)80120-9.

39. Chehayeb, R. J. Breastfeeding attributable fraction of triple negative breast cancer in the US / R. J. Chehayeb, N. Odzer, R. A. Albany [et al.] // *npj Breast Cancer*. — 2025. — Vol. 11, no. 1. — P. 40. — DOI: 10.1038/s41523-025-00755-6.

40. Chen, C. H. Characterization of the tumor immune microenvironment in pregnancy-associated breast cancer through multiplex immunohistochemistry and transcriptome analyses / C. H. Chen, I. C. Chen, C. L. Hsu [et al.] // *Breast Cancer Research*. — 2025. — Vol. 27, no. 1. — P. 154. — DOI: 10.1186/s13058-025-02097-4.

41. Cimino-Mathews, A. Novel uses of immunohistochemistry in breast pathology: interpretation and pitfalls / A. Cimino-Mathews // *Modern Pathology*. — 2021. — Vol. 34, suppl. 1. — P. 62–77. — DOI 10.1038/s41379-020-00697-3.

42. Concilio, S. C. Improved Noninvasive In Vivo Tracking of AAV-9 Gene Therapy Using the Perchlorate-Resistant Sodium Iodide Symporter from Minke Whale / S. C. Concilio, L. Suksanpaisan, L. Pham [et al.] // *Molecular Therapy*. — 2021. — Vol. 29, no. 1. — P. 236–243. — DOI: 10.1016/j.ymthe.2020.09.036.

43. Concilio, S. C. Species Differences in Monovalent Anion Substrate Selectivity in the Sodium Iodide Symporter (NIS) / S. C. Concilio, H. Zhekova, S. Noskov

[et al.] // *Biophysical Journal*. — 2019. — Vol. 116, no. 3. — P. 553a. — DOI: 10.1016/j.bpj.2018.11.2975.

44. Coughlin, S. S. *Epidemiology of Breast Cancer in Women* / S. S. Coughlin // *Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance*. — Cham : Springer International Publishing, 2019. — P. 9–29. — DOI: 10.1007/978-3-030-20301-6_2.

45. Dabbs, D. J. *Breast Pathology* / D. J. Dabbs. — Philadelphia, PA : Saunders, 2019. — 928 p. — ISBN 978-0-323-38961-7.

46. Darabi, N. The sodium iodide symporter (NIS) as theranostic gene: Potential role in pre-clinical therapy of extra-thyroidal malignancies / N. Darabi, M. Keshavarz, I. Nabipour [et al.] // *Clinical and Translational Imaging*. — 2023. — Vol. 11, no. 2. — P. 113–125. — DOI: 10.1007/s40336-023-00540-0.

47. de Bruijn, I. AACR Project GENIE Consortium Members from Analysis and Visualization of Longitudinal Genomic and Clinical Data from the AACR Project GENIE Biopharma Collaborative in cBioPortal / I. de Bruijn, R. Kundra, B. Mastrogiacomo [et al.]. — 2023. — DOI: 10.1158/0008-5472.24710450.

48. De la Vieja, A. Role of iodide metabolism in physiology and cancer / A. De la Vieja, P. Santisteban // *Endocrine-Related Cancer*. — 2018. — Vol. 25, no. 4. — P. R225–R245. — DOI: 10.1530/ERC-17-0515.

49. Deepak, K. G. K. Tumor microenvironment: Challenges and opportunities in targeting metastasis of triple negative breast cancer / K. G. K. Deepak, R. Vempati, G. P. Nagaraju [et al.] // *Pharmacological Research*. — 2020. — Vol. 153. — P. 104683. — DOI: 10.1016/j.phrs.2020.104683.

50. Delgado-González, E. Molecular Iodine Improves the Efficacy and Reduces the Side Effects of Metronomic Cyclophosphamide Treatment against Mammary Cancer Progression / E. Delgado-González, E. D. L. Ríos-Arellano, B. Anguiano, C. Aceves // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2024. — Vol. 25, no. 16. — P. 8822. — DOI: 10.3390/ijms25168822.

51. Demyashkin, G. Elevated NIS Expression Correlates with Chemoresistance in Triple-Negative Breast Cancer: Potential Link to FOXA1 Activity / G. Demyashkin,

A. Guzik, M. Parshenkov [et al.] // *Medical Sciences*. — 2025. — Vol. 13, no. 4. — P. 250. — DOI: 10.3390/medsci13040250.

52. Demyashkin, G. Parity and NIS Expression in Atypical Cells of Triple-Negative Breast Cancer, and Prognosis / G. Demyashkin, E. Kogan, T. Demura [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2025. — Vol. 26, no. 20. — P. 9947. — DOI: 10.3390/ijms26209947.

53. Derakhshan, F. Pathogenesis of Triple-Negative Breast Cancer / F. Derakhshan, J. S. Reis-Filho // *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. — 2022. — Vol. 17, no. 1. — P. 181–204. — DOI: 10.1146/annurev-pathol-042420-093238.

54. DeVita, V. T. Devita, Hellman, and Rosenberg's cancer: Principles and practice of oncology / V. T. DeVita, S. A. Rosenberg, T. S. Lawrence. — 12th ed. — Philadelphia : LWW, 2023. — 2638 p. — ISBN 9781975184742.

55. Dinkel, Z. Collagen architecture in triple negative breast cancer / Z. Dinkel, A. Baker, A. Akins [et al.] // *PLOS One*. — 2025. — Vol. 20, no. 5. — P. e0324655. — DOI: 10.1371/journal.pone.0324655.

56. Dowsett, M. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group / M. Dowsett, T. O. Nielsen, R. A'Hern [et al.] // *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. — 2011. — Vol. 103, no. 22. — P. 1656–1664. — DOI: 10.1093/jnci/djr393.

57. Elfstrum, A. K. Defining and targeting macrophage heterogeneity in the mammary gland and breast cancer / A. K. Elfstrum, A. S. Bapat, K. L. Schwertfeger // *Cancer Medicine*. — 2024. — Vol. 13, no. 3. — P. e7053. — DOI: 10.1002/cam4.7053.

58. Emara, H. M. A comprehensive review on targeted therapies for triple negative breast cancer: an evidence-based treatment guideline / H. M. Emara, N. K. Allam, R. A. Youness // *Discover Oncology*. — 2025. — Vol. 16, no. 1. — P. 547. — DOI: 10.1007/s12672-025-02227-6.

59. Fathima, Z. S. Suha Fathima Z., Suresh T.N.R., Kattapur A.K. Immunohistochemical expression of tumor-infiltrating lymphocytes CD8 and FOXP3 in

invasive ductal carcinoma of breast / Z. S. Fathima, T. N. R. Suresh, A. K. Kattepur // BMC Cancer. — 2025. — Vol. 25, no. 1. — P. 1550. — DOI: 10.1186/s12885-025-14892-5.

60. Feigman, M. J. Pregnancy reprograms the epigenome of mammary epithelial cells and blocks the development of premalignant lesions / M. J. Feigman, M. A. Moss, C. Chen [et al.] // Nature Communications. — 2020. — Vol. 11, no. 1. — P. 2649. — DOI: 10.1038/s41467-020-16479-z.

61. Feng, F. A Nonpump Function of Sodium Iodide Symporter in Thyroid Cancer via Cross-talk with PTEN Signaling / F. Feng, L. Yehia, Y. Ni [et al.] // Cancer Research. — 2018. — Vol. 78, no. 21. — P. 6121–6133. — DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1954.

62. Fernández-Méndez, C., Santisteban, P. A critical balance between PAX8 and the Hippo mediator TAZ determines sodium/iodide symporter expression and function / C. Fernández-Méndez, P. Santisteban // Thyroid. — 2022. — Vol. 32, no. 3. — P. 315–325. — DOI: 10.1089/thy.2021.0191.

63. Fowden, A. L. Developmental regulation of fetal mitochondrial respiratory function towards term: the role of glucocorticoid and thyroid hormones / A. L. Fowden, K. L. Davies, E. J. Camm [et al.] // Journal of Endocrinology. — 2025. — Vol. 267, no. 1. — DOI: 10.1530/JOE-25-0135.

64. Fu, M. , Ren, Z., Gao, Y., Zhang, H., Guo, W., Zhang, W. Study of iodine transport and thyroid hormone levels in the human placenta under different iodine nutritional status / M. Fu, Z. Ren, Y. Gao [et al.] // British Journal of Nutrition. — 2024. — Vol. 131, no. 9. — P. 1488–1496. — DOI: 10.1017/S0007114524000084.

65. Gadisi, R. P. , Naicker, M., Naidoo, S., Pillay, A., The extra-thyroidal distribution of sodium iodide symporter / R. P. Gadisi, M. Naicker, S. Naidoo [et al.] // Frontiers in Endocrinology. — 2025. — Vol. 16. — P. 1567405. — DOI: 10.3389/fendo.2025.1567405.

66. Gainor, D. L. Sodium Iodide Symporter Expression in Adenoid Cystic Carcinoma of the Head and Neck / D. L. Gainor, D. J. Chute, R. R. Lorenz // JAMA

Otolaryngology–Head & Neck Surgery. — 2015. — Vol. 141, no. 8. — P. 739–744. — DOI: 10.1001/jamaoto.2015.0970.

67. Gazola, A. A. Precision oncology platforms: practical strategies for genomic database utilization in cancer treatment / A. A. Gazola, W. Lautert-Dutra, L. F. Archangelo [et al.] // *Molecular Cytogenetics*. — 2024. — Vol. 17, no. 1. — P. 28. — DOI: 10.1186/s13039-024-00698-w.

68. Godbole, M. Sodium iodide symporter, estrogen receptor, and progesterone receptor expression in carcinoma breast—an immunohistochemical analysis / M. Godbole, A. Tandon, A. Shrivastava [et al.] // *Indian Journal of Pathology and Microbiology*. — 2011. — Vol. 54, no. 4. — P. 745–751. — DOI: 10.4103/0377-4929.91514.

69. Gong, Z. Sodium-iodide symporter and its related solute carriers in thyroid cancer / Z. Gong, M. Wei, A. C. Vlantis [et al.] // *Journal of Endocrinology*. — 2024. — Vol. 261, no. 1. — DOI: 10.1530/joe-23-0373.

70. Gorbokon, N. Mammaglobin-A expression is highly specific for tumors derived from the breast, the female genital tract, and the salivary gland / N. Gorbokon, P. Timm, D. Dum [et al.] // *Diagnostics*. — 2023. — Vol. 13, no. 6. — P. 1202. — DOI: 10.3390/diagnostics13061202.

71. Han, Y. TGF- β 1-based restoration of sodium iodide symporter expression in radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer via engineered MSCs / Y. Han, V. F. Koehler, J. Nagarajah [et al.] // *Molecular Therapy*. — 2025. — Vol. 33, no. 12. — P. 6130–6145. — DOI: 10.1016/j.ymthe.2025.10.033.

72. Herve, L. Oxytocin Induces Mammary Epithelium Disruption and Could Stimulate Epithelial Cell Exfoliation / L. Herve, V. Lollivier, H. Quesnel [et al.] // *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. — 2018. — Vol. 23, no. 3. — P. 139–147. — DOI: 10.1007/s10911-018-9400-8.

73. Hitchcock, J. R. Dynamic architectural interplay between leucocytes and mammary epithelial cells / J. R. Hitchcock, K. Hughes, O. B. Harris [et al.] // *The FEBS Journal*. — 2020. — Vol. 287, no. 2. — P. 250–266. — DOI: 10.1111/febs.15126.

74. Hori, S. Undescribed Breast Blood Supply from the Brachial Artery: Circumflex Mammary Artery / S. Hori, A. Hori, N. Kennoki [et al.] // *CardioVascular and Interventional Radiology*. — 2025. — Vol. 48, no. 11. — P. 1587–1593. — DOI: 10.1007/s00270-025-04174-9.
75. Ivanova, M. , Porta, F. M., D’Ercole, M., Pescia, C., Sajjadi, E., Cursano, G., De Camilli, E., Pala, O., Mazzarol, G., Venetis, K., Guerini-Rocco, E., Curigliano, G., Viale, G., Fusco, N. Standardized pathology report for HER2 testing in compliance with 2023 ASCO/CAP updates and 2023 ESMO consensus statements on HER2-low breast cancer / M. Ivanova, F. M. Porta [et al.] // *Virchows Archiv*. — 2024. — P. 3–14. — DOI: 10.1007/s00428-023-03656-w.
76. Jamiyan, T. CD68- and CD163-positive tumor-associated macrophages in triple negative cancer of the breast / T. Jamiyan, H. Kuroda, R. Yamaguchi [et al.] // *Virchows Archiv*. — 2020. — Vol. 477, no. 6. — P. 767–775. — DOI: 10.1007/s00428-020-02855-z.
77. Jamiyan, T. Prognostic impact of a tumor-infiltrating lymphocyte subtype in triple negative cancer of the breast / T. Jamiyan, H. Kuroda, R. Yamaguchi [et al.] // *Breast Cancer*. — 2020. — Vol. 27, no. 5. — P. 880–892. — DOI: 10.1007/s12282-020-01084-1.
78. Jenkins, T. M. Updates in the Use of Immunohistochemical Stains in Breast and Gynecologic Pathology / T. M. Jenkins, C. R. Mehr // *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. — 2024. — Vol. 148, no. 1. — P. 33–47. — DOI: 10.5858/arpa.2022-0467-RA.
79. Jeong, H. Tumor-Associated Macrophages as Potential Prognostic Biomarkers of Invasive Breast Cancer / H. Jeong, I. Hwang, S. H. Kang [et al.] // *Journal of Breast Cancer*. — 2019. — Vol. 22, no. 1. — P. 38. — DOI: 10.4048/jbc.2019.22.e5.
80. Jhiang, S. M. Na⁺/I⁻ symporter expression, function, and regulation in non-thyroidal tissues and impact on thyroid cancer therapy / S. M. Jhiang, J. A. Sipos // *Endocrine-Related Cancer*. — 2021. — Vol. 28, no. 10. — P. T167–T177. — DOI: 10.1530/ERC-21-0035.

81. Kalfeist, L., Ledys, F., Petit, S., Poirrier, C., Mohammed, S. K., Galland, L., Derangère, V., Ilie, A., Rageot, D., Aucagne, R., Bellaye, P.-S., Truntzer, C., Thibaudin, M., Rialland, M., Ghiringhelli, F., Limagne, E., Ladoire, S. Co-targeting TGF- β and PD-L1 sensitizes triple-negative breast cancer to experimental immunogenic cisplatin-eribulin chemotherapy doublet / L. Kalfeist, F. Ledys, S. Petit [et al.] // *Journal of Clinical Investigation*. — 2025. — Vol. 135, no. 13. — P. e184422. — DOI: 10.1172/JCI184422.
82. Kashyap, D. Heterogeneity of the Tumor Microenvironment Across Molecular Subtypes of Breast Cancer / D. Kashyap, A. Bal, S. Irinike [et al.] // *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. — 2023. — Vol. 31, no. 8. — P. 533–543. — DOI: 10.1097/PAI.0000000000001139.
83. Kelkar, M. G. Tumor suppressor protein p53 exerts negative transcriptional regulation on human sodium iodide symporter gene expression in breast cancer / M. G. Kelkar, B. Thakur, A. Derle [et al.] // *Breast Cancer Research and Treatment*. — 2017. — Vol. 164, no. 3. — P. 603–615. — DOI: 10.1007/s10549-017-4297-2.
84. Khazaeli Najafabadi, M. Role of GATA3 in tumor diagnosis: A review / M. Khazaeli Najafabadi, E. Mirzaeian, S. Memar Montazerin [et al.] // *Pathology - Research and Practice*. — 2021. — Vol. 226. — P. 153611. — DOI: 10.1016/j.prp.2021.153611.
85. Kim, J. Global patterns and trends in breast cancer incidence and mortality across 185 countries / J. Kim, A. Harper, V. McCormack [et al.] // *Nature Medicine*. — 2025. — Vol. 31, no. 4. — P. 1154–1162. — DOI: 10.1038/s41591-025-03502-3.
86. Kim, S. Berberine Suppresses Cell Motility Through Downregulation of TGF- β 1 in Triple Negative Breast Cancer Cells / S. Kim, J. Lee, D. You [et al.] // *Cellular Physiology and Biochemistry*. — 2018. — Vol. 45, no. 2. — P. 795–807. — DOI: 10.1159/000487171.
87. Kim, Y. A. Expression of Sodium Iodide Symporter in Breast Cancer Tissues / Y. A. Kim, H. S. Min, H. Y. Ahn [et al.] // *International Journal of Thyroidology*. — 2025. — Vol. 18, no. 2. — P. 157–167. — DOI: 10.11106/ijt.2025.18.2.157.

88. Kitzberger, C. Mesenchymal Stem Cell–mediated Image-guided Sodium Iodide Symporter (NIS) Gene Therapy Improves Survival of Glioblastoma-bearing Mice / C. Kitzberger, R. Spellerberg, Y. Han [et al.] // *Clinical Cancer Research*. — 2023. — Vol. 29, no. 5. — P. 930–942. — DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-22-1433.
89. Kumar, N. The unique risk factor profile of triple-negative breast cancer: a comprehensive meta-analysis / N. Kumar, S. Ehsan, S. Banerjee [et al.] // *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. — 2024. — Vol. 116, no. 8. — P. 1210–1219. — DOI: 10.1093/jnci/djae056.
90. Kuroda, H. Tumor microenvironment in triple-negative breast cancer: The correlation of tumor-associated macrophages and tumor-infiltrating lymphocytes / H. Kuroda, T. Jamiyan, R. Yamaguchi [et al.] // *Clinical and Translational Oncology*. — 2021. — Vol. 23, no. 12. — P. 2513–2525. — DOI: 10.1007/s12094-021-02652-3.
91. Köhrle, J. Selenium, Iodine and Iron-Essential Trace Elements for Thyroid Hormone Synthesis and Metabolism / J. Köhrle // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2023. — Vol. 24, no. 4. — Art. 3393. — DOI 10.3390/ijms24043393.
92. Lacoste, C. Iodide transporter NIS regulates cancer cell motility and invasiveness by interacting with the Rho guanine nucleotide exchange factor LARG / C. Lacoste, J. Hervé, M. Bou Nader [et al.] // *Cancer Research*. — 2012. — Vol. 72, no. 21. — P. 5505–5515. — DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0516.
93. Lalkota, B. P. The role of p53 and ki67 in predicting clinical outcome in breast cancer patients / B. P. Lalkota, B. J. Srinivasa, M. V. Swamy [et al.] // *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. — 2023. — Vol. 19, no. 2. — P. 208–213. — DOI: 10.4103/jcrt.JCRT_1830_20.
94. Lan, Q. Mesenchyme instructs growth while epithelium directs branching in the mouse mammary gland / Q. Lan, E. Trela, R. Lindström [et al.] // *eLife*. — 2024. — Vol. 13. — P. e93326. — DOI: 10.7554/eLife.93326.
95. Lechner, M. G. Hypothyroidism During Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy Is Associated with Longer Survival in Patients with Advanced Nonthyroidal Cancers /

M. G. Lechner, C. M. Vyas, O. P. R. Hamnvik [et al.] // *Thyroid*. — 2018. — Vol. 28, no. 4. — P. 445–453. — DOI: 10.1089/thy.2017.0587.

96. Lee, S. Y. Prognostic value of residual cancer burden after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: a comprehensive subtype-specific analysis / S. Y. Lee, T. K. Yoo, S. B. Lee [et al.] // *Scientific Reports*. — 2025. — Vol. 15, no. 1. — P. 13977. — DOI: 10.1038/s41598-025-98176-9.

97. Leon-Ferre, R. A., Jonas S. F., Salgado R., Loi S., De Jong V., Carter J. M., et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative Breast Cancer / R. A. Leon-Ferre, S. F. Jonas, R. Salgado [et al.] // *JAMA*. — 2024. — Vol. 331, no. 13. — P. 1135–1144. — DOI: 10.1001/jama.2024.3056.

98. Li, M. Predictive and Prognostic Role of Peripheral Blood T-Cell Subsets in Triple-Negative Breast Cancer / M. Li, J. Xu, C. Jiang [et al.] // *Frontiers in Oncology*. — 2022. — Vol. 12. — P. 842705. — DOI: 10.3389/fonc.2022.842705.

99. Li, R. The role of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer and the research progress of adoptive cell therapy / R. Li, L. Cao // *Frontiers in Immunology*. — 2023. — Vol. 14. — Art. 1194020. — DOI 10.3389/fimmu.2023.1194020.

100. Li, Z. Heat treatment-induced autophagy promotes breast cancer cell invasion and metastasis via TGF- β 2-mediated epithelial-mesenchymal transitions / Z. Li, C. Lu, F. Wang [et al.] // *PeerJ*. — 2023. — Vol. 11. — P. e14640. — DOI: 10.7717/peerj.14640.

101. Liu, B. Enhanced desmosome assembly driven by acquired high-level desmoglein-2 promotes phenotypic plasticity and endocrine resistance in ER⁺ breast cancer / B. Liu, Y. Liu, S. Yang [et al.] // *Cancer Letters*. — 2024. — Vol. 600. — P. 217179. — DOI: 10.1016/j.canlet.2024.217179.

102. Liu, N. Significance of combined TGF- β 1 and survivin expression on the prognosis of patients with triple-negative breast cancer / N. Liu, D. Qi, J. Jiang [et al.] // *Oncology Letters*. — 2022. — Vol. 23, no. 6. — P. 193. — DOI: 10.3892/ol.2022.13313.

103. Liu, X. Mast cells in colorectal cancer tumour progression, angiogenesis, and lymphangiogenesis / X. Liu, X. Li, H. Wei [et al.] // *Frontiers in Immunology*. — 2023. — Vol. 14. — P. 1209056. — DOI: 10.3389/fimmu.2023.1209056.
104. Loizides, S. Triple negative breast cancer: Immunogenicity, tumor microenvironment, and immunotherapy / S. Loizides, A. Constantinidou // *Frontiers in Genetics*. — 2023. — Vol. 13. — P. 1095839. — DOI: 10.3389/fgene.2022.1095839.
105. Lowrie, D. J. *Histology: An Essential Textbook* / D. J. Lowrie. — New York: Thieme Medical Publishers, 2020. — 428 p. — ISBN 978-1-62623-413-0.
106. Lu, S. PAX8 Expression in Breast Cancer / S. Lu, E. Yakirevich, J. Hart [et al.] // *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. — 2021. — Vol. 29, no. 4. — P. 293–298. — DOI: 10.1097/PAI.0000000000000883.
107. Lund, E. Curvilinear incidence models for parity in the entire fertility range for cancers of the breast, ovary, and endometrium: A follow-up of the Norwegian 1960 Census / E. Lund, L. R. Busund, L. Holden // *International Journal of Cancer*. — 2025. — Vol. 156, no. 11. — P. 2118–2126. — DOI 10.1002/ijc.35312.
108. Luo, N. F. Role of sodium iodide symporter overexpression in inhibiting thyroid cancer cell invasion and stem cell maintenance by inhibiting the β -catenin/LEF-1 pathway / N. F. Luo, J. L. Li, J. Lv [et al.] // *Heliyon*. — 2024. — Vol. 10, no. 6. — P. e27840. — DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e27840.
109. Magacz, M. R. Impact of Modified Lactoperoxidase Systems on Glycolytic Metabolism and Virulence Factors in *Streptococcus mutans* / M. R. Magacz, A. Skalniak, P. Mamica [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2026. — Vol. 27, no. 2. — P. 799. — DOI: 10.3390/ijms27020799.
110. Majorini, M. T. Infiltrating Mast Cell-Mediated Stimulation of Estrogen Receptor Activity in Breast Cancer Cells Promotes the Luminal Phenotype / M. T. Majorini, V. Cancila, A. Rigoni [et al.] // *Cancer Research*. — 2020. — Vol. 80, no. 11. — P. 2311–2324. — DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-19-3596.
111. Maliniak, M. L. Detection of crown-like structures in breast adipose tissue and clinical outcomes among African-American and White women with breast cancer /

M. L. Maliniak, A. M. Cheriyan, M. E. Sherman [et al.] // *Breast Cancer Research*. — 2020. — Vol. 22, no. 1. — P. 65. — DOI: 10.1186/s13058-020-01308-4.

112. Matos, L. P. L. Regulation of thyroid sodium-iodide symporter in different stages of goiter: Possible involvement of reactive oxygen species / L. P. L. Matos, R. C. C. Penha, L. C. Cardoso-Weide [et al.] // *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. — 2018. — Vol. 45, no. 4. — P. 326–334. — DOI: 10.1111/1440-1681.12887.

113. Metovic, J. FOXA1 in Breast Cancer: A Luminal Marker with Promising Prognostic and Predictive Impact / J. Metovic, F. Borella, M. D'Alonzo [et al.] // *Cancers*. — 2022. — Vol. 14, no. 19. — P. 4699. — DOI: 10.3390/cancers14194699.

114. Mielu, L. M. Targeted radioiodine therapy of ovarian cancer via the sodium/iodide symporter (NIS) / L. M. Mielu, L. Rodal-Bravo, C. Diego-Hernández [et al.] // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. — 2025. — Vol. 193. — P. 118873. — DOI: 10.1016/j.biopha.2025.118873.

115. Molinuevo, R. Physiological DNA damage promotes functional endoreplication of mammary gland alveolar cells during lactation / R. Molinuevo, J. Menendez, K. Cadle [et al.] // *Nature Communications*. — 2024. — Vol. 15, no. 1. — P. 3288. — DOI: 10.1038/s41467-024-47668-9.

116. Moukarzel, L. A. Impact of obesity and white adipose tissue inflammation on the omental microenvironment in endometrial cancer / L. A. Moukarzel, L. Ferrando, A. Stylianou [et al.] // *Cancer*. — 2022. — Vol. 128, no. 18. — P. 3297–3309. — DOI: 10.1002/cncr.34356.

117. Mulder, T. A. Maternal Thyroid Function During Pregnancy and Early Adolescent Regional Differences in Cerebral Gray Matter Morphology / T. A. Mulder, R. L. Muetzel, R. P. Peeters [et al.] // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. — 2026. — Vol. 111, no. 2. — P. 572–579. — DOI: 10.1210/clinem/dgaf349.

118. Murrow, L. M. Mapping hormone-regulated cell-cell interaction networks in the human breast at single-cell resolution / L. M. Murrow, R. J. Weber, J. A. Caruso [et

al.] // *Cell Systems*. — 2022. — Vol. 13, no. 8. — P. 644–664. — DOI: 10.1016/j.cels.2022.06.005.

119. Ni, C. CD68- and CD163-positive tumor infiltrating macrophages in non-metastatic breast cancer: A retrospective study and meta-analysis / C. Ni, L. Yang, Q. Xu [et al.] // *Journal of Cancer*. — 2019. — Vol. 10, no. 19. — P. 4463–4472. — DOI: 10.7150/jca.33914.

120. Nikitski, A. V. Inhibition of ALK-Signaling Overcomes STRN-ALK-Induced Downregulation of the Sodium Iodine Symporter and Restores Radioiodine Uptake in Thyroid Cells / A. V. Nikitski, V. Condello, S. S. Divakaran, Y. E. Nikiforov // *Thyroid*. — 2023. — Vol. 33, no. 4. — P. 464–473. — DOI 10.1089/thy.2022.0533.

121. Ntostoglou, K. Distinct profiles of proliferating CD8+/TCF1+ T cells and CD163+/PD-L1+ macrophages predict risk of relapse differently among treatment-naïve breast cancer subtypes / K. Ntostoglou, S. D. P. Theodorou, T. Proctor [et al.] // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. — 2024. — Vol. 73, no. 3. — P. 46. — DOI: 10.1007/s00262-024-03630-8.

122. Oh, J. M. Molecular mechanisms of radioactive iodine refractoriness in differentiated thyroid cancer: Impaired sodium iodide symporter (NIS) expression owing to altered signaling pathway activity and intracellular localization of NIS / J. M. Oh, B. C. Ahn // *Theranostics*. — 2021. — Vol. 11, no. 13. — P. 6251–6277. — DOI: 10.7150/thno.57689.

123. Okano, M. Triple-Negative Breast Cancer with High Levels of Annexin A1 Expression Is Associated with Mast Cell Infiltration, Inflammation, and Angiogenesis / M. Okano, M. Oshi, A. L. Butash [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2019. — Vol. 20, no. 17. — P. 4197. — DOI: 10.3390/ijms20174197.

124. Omilian, A. R. CD163+ macrophages in the triple-negative breast tumor microenvironment are associated with improved survival in the Women’s Circle of Health Study and the Women’s Circle of Health Follow-Up Study / A. R. Omilian, R. Cannioto, L. Mendicino [et al.] // *Breast Cancer Research*. — 2024. — Vol. 26, no. 1. — P. 75. — DOI: 10.1186/s13058-024-01831-8.

125. Ormiston, K. Obesity and lack of breastfeeding: a perfect storm to augment risk of breast cancer? / K. Ormiston, A. Kulkarni, G. Sarathy [et al.] // *Frontiers in Oncology*. — 2024. — Vol. 14. — Art. 1432208. — DOI 10.3389/fonc.2024.1432208.

126. Oshi, M. CD8 T Cell Score as a Prognostic Biomarker for Triple Negative Breast Cancer / M. Oshi, M. Asaoka, Y. Tokumaru [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2020. — Vol. 21, no. 18. — P. 6968. — DOI: 10.3390/ijms21186968.

127. Panagi, M. TGF- β inhibition combined with cytotoxic nanomedicine normalizes triple negative breast cancer microenvironment towards anti-tumor immunity / M. Panagi, C. Voutouri, F. Mpekris [et al.] // *Theranostics*. — 2020. — Vol. 10, no. 4. — P. 1910–1922. — DOI: 10.7150/thno.36936.

128. Pelekanou, V. CD68, CD163, and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) co-localization in breast tumor microenvironment predicts survival differently in ER-positive and -negative cancers / V. Pelekanou, F. Villarroel-Espindola, K. A. Schalper [et al.] // *Breast Cancer Research*. — 2018. — Vol. 20, no. 1. — P. 154. — DOI: 10.1186/s13058-018-1076-x.

129. Poole, V. L. Targeting Src tyrosine kinase to enhance radioiodide uptake in breast cancer / V. L. Poole, M. M. Alshahrani, S. Manivannan [et al.] // *Endocrine-Related Cancer*. — 2025. — Vol. 32, no. 8. — DOI: 10.1530/ERC-24-0312.

130. Raimondi, V. Oncolytic viruses: a potential breakthrough immunotherapy in cancer treatment / V. Raimondi, R. Vescovini, M. Dessena [et al.] // *Frontiers in Immunology*. — 2024. — Vol. 15. — P. 1483806. — DOI: 10.3389/fimmu.2024.1483806.

131. Rao, M. , Khade, S., Chaudhary, R., Singh, P., Yadav, G., Elhence, P., Nalwa, A., Sharma, R., Goel, A. D. Comparison of GATA-3, Mammaglobin and GCDFP-15 expression in primary, metastatic and triple negative breast carcinomas: an Indian scenario / M. Rao, S. Khade, R. Chaudhary [et al.] // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. — 2023. — Vol. 24, no. 2. — P. 509–515. — DOI: 10.31557/APJCP.2023.24.2.509.

132. Rathod, M. FOXA1 Regulation Turns Benzamide HDACi Treatment Effect-Specific in 591 BC, Promoting NIS Gene-Mediated Targeted Radioiodine Therapy / M. Rathod, M. Kelkar, S. Valvi [et al.] // *Molecular Therapy - Oncolytics*. — 2020. — Vol. 19. — P. 93–104. — DOI: 10.1016/j.omto.2020.08.015.

133. Rathod, M. Mannose glycosylation is an integral step for NIS localization and function in human breast cancer cells / M. Rathod, S. Chatterjee, S. Dutta [et al.] // *Journal of Cell Science*. — 2019. — Vol. 132, no. 20. — P. jcs232058. — DOI: 10.1242/jcs.232058.

134. Ravera S., Nicola J. P., Salazar-De Simone G., Sigworth F. J., Karakas E., Amzel L. M., Bianchet M. A., Carrasco N. Structural insights into the mechanism of the sodium/iodide symporter / S. Ravera, J. P. Nicola, G. Salazar-De Simone [et al.] // *Nature*. — 2022. — Vol. 612, no. 7941. — P. 795–801. — DOI: 10.1038/s41586-022-05530-2.

135. Reddy, S. M. Poor Response to Neoadjuvant Chemotherapy Correlates with Mast Cell Infiltration in Inflammatory Breast Cancer / S. M. Reddy, A. Reuben, S. Barua [et al.] // *Cancer Immunology Research*. — 2019. — Vol. 7, no. 6. — P. 1025–1035. — DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0619.

136. Renier, C. Endogenous NIS Expression in Triple-Negative Breast Cancers / C. Renier, C. Yao, M. Goris [et al.] // *Annals of Surgical Oncology*. — 2009. — Vol. 16, no. 4. — P. 962–968. — DOI: 10.1245/s10434-008-0280-9.

137. Riesco-Eizaguirre, G. The complex regulation of NIS expression and activity in thyroid and extrathyroidal tissues / G. Riesco-Eizaguirre, P. Santisteban, A. De la Vieja // *Endocrine-Related Cancer*. — 2021. — Vol. 28, no. 10. — P. T141–T165. — DOI: 10.1530/ERC-21-0217.

138. Ross, M. H. *Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology* / M. H. Ross, W. Pawlina. — Philadelphia : LWW, 2020. — 928 p. — ISBN 978-1-4963-8342-6.

139. Schug, C. Radiation-Induced Amplification of TGFB1-Induced Mesenchymal Stem Cell-Mediated Sodium Iodide Symporter (NIS) Gene 131I Therapy

/ C. Schug, C. Kitzberger, W. Sievert [et al.] // *Clinical Cancer Research*. — 2019. — Vol. 25, no. 19. — P. 5997–6008. — DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-4092.

140. Shaaban, A. M. Shaaban A. Diagnostic pitfalls in needle core biopsy of the breast: an update / A. M. Shaaban // *Diagnostic Histopathology*. — 2025. — Vol. 31, no. 12. — P. 701–706. — DOI: 10.1016/j.mpdhp.2025.10.003.

141. Shah, S. , Lucke-Wold, B. Image-Guided Mesenchymal Stem Cell Sodium Iodide Symporter (NIS) Radionuclide Therapy for Glioblastoma / S. Shah, B. Lucke-Wold // *Cancers*. — 2024. — Vol. 16, no. 16. — P. 2892. — DOI: 10.3390/cancers16162892.

142. Shinohara, H. Spatial and Quantitative Analysis of Tumor-Associated Macrophages: Intratumoral CD163-/PD-L1+ TAMs as a Marker of Favorable Clinical Outcomes in Triple-Negative Breast Cancer / H. Shinohara, M. Kobayashi, K. Hayashi [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2022. — Vol. 23, no. 21. — P. 13235. — DOI: 10.3390/ijms232113235.

143. Slepicka, P. F. Pregnancy and Breast Cancer: Pathways to Understand Risk and Prevention / P. F. Slepicka, S. L. Cyrill, C. O. dos Santos // *Trends in Molecular Medicine*. — 2019. — Vol. 25, no. 10. — P. 866–881. — DOI: 10.1016/j.molmed.2019.06.003.

144. Slepicka, P. F. The molecular basis of mammary gland development and epithelial differentiation / P. F. Slepicka, A. V. H. Somasundara, C. O. dos Santos // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. — 2021. — Vol. 114. — P. 93–112. — DOI: 10.1016/j.semcdb.2020.09.014.

145. Smith, G. H. Does the Mouse Mammary Gland Arise from Unipotent or Multipotent Mammary Stem/Progenitor Cells? / G. H. Smith, D. Medina // *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. — 2018. — Vol. 23, no. 1-2. — P. 1–3. — DOI: 10.1007/s10911-018-9394-2.

146. Spellerberg, R. , Benli-Hoppe, T., Kitzberger, C., Schmohl, K. A., Stauss, C., Schwenk, N., ... & Spitzweg, C. Selective sodium iodide symporter (NIS) gene therapy of glioblastoma mediated by EGFR-targeted lipopolyplexes / R. Spellerberg, T.

Benli-Hoppe, C. Kitzberger [et al.] // *Molecular Therapy - Oncolytics*. — 2021. — Vol. 23. — P. 432–446. — DOI: 10.1016/j.omto.2021.10.011.

147. Spellerberg, R. Dual EGFR- and TfR-targeted gene transfer for sodium iodide symporter gene therapy of glioblastoma / R. Spellerberg, T. Benli-Hoppe, C. Kitzberger [et al.] // *Molecular Therapy Oncolytics*. — 2022. — Vol. 27. — P. 272–287. — DOI 10.1016/j.omto.2022.10.013.

148. Spitzweg, C. The sodium iodide symporter (NIS): novel applications for radionuclide imaging and treatment / C. Spitzweg, P. J. Nelson, E. Wagner [et al.] // *Endocrine-Related Cancer*. — 2021. — Vol. 28, no. 10. — P. T193–T213. — DOI: 10.1530/erc-21-0177.

149. Srikanthan, A. Young Women with Breast Cancer: The Current Role of Precision Oncology / A. Srikanthan, A. A. Awan, S. McGee, M. Rushton // *Journal of Personalized Medicine*. — 2023. — Vol. 13, no. 11. — P. 1620. — DOI: 10.3390/jpm13111620.

150. Stüber, T. Inhibition of TGF- β -receptor signaling augments the antitumor function of ROR1-specific CAR T-cells against triple-negative breast cancer / T. Stüber, R. Monjezi, L. Wallstabe [et al.] // *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. — 2020. — Vol. 8, no. 1. — P. e000676. — DOI: 10.1136/jitc-2020-000676.

151. Sukumar, J. Triple-negative breast cancer: promising prognostic biomarkers currently in development / J. Sukumar, K. Gast, D. Quiroga [et al.] // *Expert Review of Anticancer Therapy*. — 2021. — Vol. 21, no. 2. — P. 135–148. — DOI: 10.1080/14737140.2021.1840984.

152. Sun, H. A., Ding Q. Updates on utility of immunohistochemistry in diagnosis of metastatic breast cancer / H. Sun, A. A. Sahin, Q. Ding // *Human Pathology*. — 2025. — Vol. 162. — P. 105821. — DOI: 10.1016/j.humpath.2025.105821.

153. Tawfik, I. Breast cancer cells utilize T3 to trigger proliferation through cellular Ca²⁺ modulation / I. Tawfik, K. Schlick, J. Ostaku [et al.] // *Cell Communication and Signaling*. — 2024. — Vol. 22, no. 1. — P. 533. — DOI: 10.1186/s12964-024-01917-y.

154. Taylor, P. N. Age-related variation in thyroid function — a narrative review highlighting important implications for research and clinical practice / P. N. Taylor, A. Lansdown, J. Witzak [et al.] // *Thyroid Research*. — 2023. — Vol. 16, no. 1. — P. 7. — DOI: 10.1186/s13044-023-00149-5.

155. Tazebay, U. H. The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer / U. H. Tazebay, I. L. Wapnir, O. Levy [et al.] // *Nature Medicine*. — 2000. — Vol. 6, no. 8. — P. 871–878. — DOI: 10.1038/78630.

156. Thomas, N. Tumor-Infiltrating Lymphocyte Scoring in Neoadjuvant-Treated Breast Cancer / N. Thomas, S. Garaud, M. Langouo [et al.] // *Cancers*. — 2024. — Vol. 16, no. 16. — P. 2895. — DOI: 10.3390/cancers16162895.

157. Toro-Tobon, D. Toro-Tobon D., Morris J. C., Hilger C., Peskey C., Durski J. M., Ryder M. Clinical outcomes of radioactive iodine redifferentiation therapy in previously iodine-refractory differentiated thyroid cancers / D. Toro-Tobon, J. C. Morris, C. Hilger [et al.] // *Thyroid®*. — 2024. — Vol. 34, no. 1. — P. 70–81. — DOI: 10.1089/thy.2023.0456.

158. Varga, Z. , Maccio, U. Molecular pathology in breast disease: diagnostic, prognostic, and therapeutic tools / Z. Varga, U. Maccio // *Virchows Archiv*. — 2024. — Vol. 484, no. 2. — P. 247–261. — DOI: 10.1007/s00428-023-03709-0.

159. Vickers, R. Immune cell contribution to mammary gland development / R. Vickers, W. Porter // *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. — 2024. — Vol. 29, no. 1. — P. 16. — DOI: 10.1007/s10911-024-09568-y.

160. Vishnubalaji, R. Epigenetic regulation of triple negative breast cancer (TNBC) by TGF- β signaling / R. Vishnubalaji, N. M. Alajez // *Scientific Reports*. — 2021. — Vol. 11, no. 1. — P. 15410. — DOI: 10.1038/s41598-021-94514-9.

161. Wang, L. Targeting ER β in Macrophage Reduces Crown-like Structures in Adipose Tissue by Inhibiting Osteopontin and HIF-1 α / L. Wang, R. P. Zhao, X. Y. Song [et al.] // *Scientific Reports*. — 2019. — Vol. 9, no. 1. — P. 15762. — DOI: 10.1038/s41598-019-52265-8.

162. Wu, G. TGF- β induced reprogramming and drug resistance in triple-negative breast cells / G. Wu, Y. Li // *BMC Pharmacology and Toxicology*. — 2022. — Vol. 23, no. 1. — P. 23. — DOI: 10.1186/s40360-022-00561-x.

163. Wu, Y. Diagnostic utility and sensitivities of matrix Gla protein (MGP), TRPS1 and GATA3 in breast cancer: focusing on metastatic breast cancer, invasive breast carcinoma with special features, and salivary gland-type tumours / Y. Wu, F. Chen, L. Pan [et al.] // *Pathology*. — 2024. — Vol. 56, no. 4. — P. 516–527. — DOI: 10.1016/j.pathol.2024.01.003.

164. Xu, X. TGF- β plays a vital role in triple-negative breast cancer (TNBC) drug-resistance through regulating stemness, EMT and apoptosis / X. Xu, L. Zhang, X. He [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 2018. — Vol. 502, no. 1. — P. 160–165. — DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.05.139.

165. Xue, X. Research of SLC7A11 to estimate the prognosis and immune infiltration landscape for breast cancer / X. Xue, Y. Zhi, L. Wang [et al.] // *Discover Oncology*. — 2025. — Vol. 16, no. 1. — P. 1693. — DOI: 10.1007/s12672-025-03510-2.

166. Yang, Q. STAT6 blockade ameliorates thyroid function in Graves' disease via downregulation of the sodium/iodide symporter / Q. Yang, Q. Zhang, F. Pan, B. Zha // *Endocrine Connections*. — 2024. — Vol. 13, no. 12. — DOI: 10.1530/EC-24-0428.

167. Ye, J. H. Tumor-associated macrophages are associated with response to neoadjuvant chemotherapy and poor outcomes in patients with triple-negative breast cancer / J. H. Ye, X. H. Wang, J. J. Shi [et al.] // *Journal of Cancer*. — 2021. — Vol. 12, no. 10. — P. 2886–2892. — DOI: 10.7150/jca.47566.

168. Yeong, J. Higher densities of Foxp3⁺ regulatory T cells are associated with better prognosis in triple-negative breast cancer / J. Yeong, A. A. Thike, J. C. T. Lim [et al.] // *Breast Cancer Research and Treatment*. — 2017. — Vol. 163, no. 1. — P. 21–35. — DOI: 10.1007/s10549-017-4161-4.

169. Yi, J. Prediction model for triple-negative breast cancer prognosis and immunotherapy efficacy based on single-cell sequencing of CD8⁺ T cells / J. Yi, Y. Qiao,

Z. Xiong [et al.] // *Journal of Cancer*. — 2025. — Vol. 16, no. 11. — P. 3343–3354. — DOI: 10.7150/jca.115507.

170. Yi, M. Anti-TGF- β /PD-L1 bispecific antibody promotes T cell infiltration and exhibits enhanced antitumor activity in triple-negative breast cancer / M. Yi, Y. Wu, M. Niu [et al.] // *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. — 2022. — Vol. 10, no. 12. — P. e005543. — DOI: 10.1136/jitc-2022-005543.

171. Yu, B. Measles Oncolytic Virus as an Immunotherapy for Recurrent/Refractory Pediatric Medulloblastoma and Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumor: Results from PNOC005 / B. Yu, C. Kline, O. Hoare [et al.] // *Clinical Cancer Research*. — 2025. — Vol. 31, no. 16. — P. 3463–3475. — DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-24-3721.

172. Yıldırım, S. The impact of carboplatin on pathologic complete response and survival based on HER2 low and HER2 zero status in triple negative breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy / S. Yıldırım, T. Başoğlu, A. Doğan [et al.] // *BMC Cancer*. — 2025. — Vol. 25, no. 1. — P. 833. — DOI: 10.1186/s12885-025-14252-3.

173. Zhang, C. X. -X. Novel Compound Heterozygous Pathogenic Mutations of SLC5A5 in a Chinese Patient With Congenital Hypothyroidism / C. X. Zhang, J. X. Zhang, L. Yang [et al.] // *Frontiers in Endocrinology*. — 2021. — Vol. 12. — P. 620117. — DOI: 10.3389/fendo.2021.620117.

174. Zhang, H. L. 13-cis-retinoic acid modulates porcine ovarian granulosa cell differentiation via retinoic acid signaling-FoxA1 axis: Implications for ovarian follicular development and luteinization / H. L. Zhang, H. B. Wang, Y. X. Mi [et al.] // *Theriogenology*. — 2026. — Vol. 250. — P. 117682. — DOI: 10.1016/j.theriogenology.2025.117682.

175. Zhang, M. Role of transforming growth factor- β 1 in triple negative breast cancer patients / M. Zhang, J. Wu, K. Mao [et al.] // *International Journal of Surgery*. — 2017. — Vol. 45. — P. 72–76. — DOI: 10.1016/j.ijssu.2017.07.080.

176. Zhang, W. J. Tumor-associated macrophages correlate with phenomenon of epithelial-mesenchymal transition and contribute to poor prognosis in triple-negative breast cancer patients / W. J. Zhang, X. H. Wang, S. T. Gao [et al.] // *Journal of Surgical Research*. — 2018. — Vol. 222. — P. 93–101. — DOI: 10.1016/j.jss.2017.09.035.

177. Zhang, Y. Prognostic significance and value of further classification of lymphovascular invasion in invasive breast cancer: a retrospective observational study / Y. Zhang, H. Wang, H. Zhao [et al.] // *Breast Cancer Research and Treatment*. — 2024. — Vol. 206, no. 2. — P. 397–410. — DOI: 10.1007/s10549-024-07318-6.

178. Zhang, Y. Single-cell transcriptional atlas of tumor-associated macrophages in breast cancer / Y. Zhang, F. Zhong, L. Liu // *Breast Cancer Research*. — 2024. — Vol. 26, no. 1. — P. 129. — DOI: 10.1186/s13058-024-01887-6.

179. Zhekova, H. R. Mapping of Ion and Substrate Binding Sites in Human Sodium Iodide Symporter (hNIS) / H. R. Zhekova, T. Sakuma, R. Johnson [et al.] // *Journal of Chemical Information and Modeling*. — 2020. — Vol. 60, no. 3. — P. 1652–1665. — DOI: 10.1021/acs.jcim.9b01114.

180. Zhou, M. AGR2 and FOXA1 as prognostic markers in ER-positive breast cancer / M. Zhou, X. L. Gan, Y. X. Ren [et al.] // *BMC Cancer*. — 2023. — Vol. 23, no. 1. — P. 743. — DOI: 10.1186/s12885-023-10964-6.

181. Zhou, X. Molecular Regulatory Mechanisms of Mammary Gland Development: A Review / X. Zhou, A. Ullah, L. Shi [et al.] // *Animals*. — 2025. — Vol. 15, no. 23. — P. 3480. — DOI: 10.3390/ani15233480.

182. Zhuang, J. Upregulation of FLT1 activates the TGF- β 1/Smad3 pathway to promote iodide resistance in thyroid cancer / J. Zhuang, B. Huang, J. Li [et al.] // *Cancer Treatment and Research Communications*. — 2025. — Vol. 45. — P. 100991. — DOI: 10.1016/j.ctarc.2025.100991.