

Иммунное опухолевое микроокружение и маркеры апоптоза при раке молочной железы у носительниц наследственных мутаций в гене *BRCA1*

А.И. Стукань^{1,2}, А.Ю. Горяинова^{1,2}, О.Ю. Чухрай¹, С.Д. Максименко¹, Е.Н. Имянитов³⁻⁵,
С.В. Шаров^{1,2}, З.К. Хачмамук¹

¹ГБУЗ «Клинический онкологический диспансер №1» Министерства здравоохранения Краснодарского края; Россия, 350040 Краснодар, ул. Димитрова, 146;

²ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет»; Россия, 350063 Краснодар, ул. Митрофана Седина, 4;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России; Россия, 197758 Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68;

⁴ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России; Россия, 194100 Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2;

⁵ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова»; Россия, 191015 Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41

Контакты: Анастасия Игоревна Стукань jolie86@bk.ru

Введение. Предполагается, что дефекты генов *BRCA1/2* способствуют повышению мутационной нагрузки и высокой иммуногенности. Однако показано, что *BRCA1/2*-ассоциированный рак молочной железы (РМЖ) не относится к категории иммуноактивных опухолей. Эти опухоли имеют низкую экспрессию генов иммунного ответа и демонстрируют иммуносупрессивный тип микроокружения, что говорит о необходимости модулирования иммунного ответа и поддержания оптимального баланса CD4/CD8-Т-лимфоцитов в опухоли. Кроме того, есть данные о наличии мутации TP53 в этих опухолях и нарушении процесса клеточной гибели, что также может быть фактором резистентности к терапии.

Цель исследования – оценить характер иммунного опухолевого окружения и механизмы клеточной гибели у больных *BRCA1*-ассоциированным РМЖ.

Материалы и методы. В проспективное исследование включено 20 больных *BRCA1*-ассоциированным РМЖ. Мутации *BRCA1/2* (185delAG, 4153delA, 5382insC, 3819delGTAA, 3875delGTCT, 300T>G, 2080delA, *BRCA2* 6174delT) определены методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Иммуногистохимическое исследование выполнялось на парафиновых срезах с использованием моноклональных антител к маркерам CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов, макрофагов (CD68, CD163), апоптоза (Bcl-2, p53), клеточной адгезии (Е-кадгерин, β-катенин).

Результаты. Высокое соотношение CD4/CD8, характеризующее иммуносупрессивное микроокружение, встречалось в 75 % случаев. Тип мутации *BRCA1* 5382insC связан с высоким уровнем CD4+ Т-лимфоцитов ($p < 0,05$), степень дифференцировки G₂ – с низким соотношением CD4/CD8 ($p = 0,039$) и высоким уровнем CD163 ($p = 0,02$, AUC = 0,739); T1 коррелирует с высоким уровнем CD8+ Т-лимфоцитов ($p = 0,038$) и высоким уровнем CD163 ($p = 0,033$). Высокий показатель Ki-67 связан с отсутствием экспрессии Bcl-2 ($p = 0,04$) и низким уровнем Е-кадгерина ($p = 0,02$). Отрицательная экспрессия Bcl-2 встречалась в 75 % случаев. Высокий уровень экспрессии p53 описан как основной тип экспрессии в этих опухолях и позволяет предположить нарушение механизма клеточной гибели у данных пациентов.

Выводы. В опухоли больных РМЖ с наследственными мутациями в гене *BRCA1* преобладает иммуносупрессивный тип микроокружения и выявлено нарушение механизма клеточной гибели. Основными направлениями будущей терапии этих опухолей могут выступать модификация иммунного микроокружения и активация механизмов клеточной гибели.

Ключевые слова: рак молочной железы, *BRCA1*-мутация, иммунное опухолевое микроокружение, апоптоз

Для цитирования: Стукань А.И., Горяинова А.Ю., Чухрай О.Ю. и др. Иммунное опухолевое микроокружение и маркеры апоптоза при раке молочной железы у носительниц наследственных мутаций в гене *BRCA1*. Опухоли женской репродуктивной системы 2022;18(2):29–39. DOI: 10.17650/1994-4098-2022-18-2-29-39

Tumor immune microenvironment and apoptotic markers in breast cancer patients carrying *BRCA1* gene mutations

A.I. Stukan^{1,2}, A.Yu. Goryainova^{1,2}, O.Yu. Chukhray¹, S.D. Maksimenko¹, E.N. Imyaninov³⁻⁵, S.V. Sharov^{1,2}, Z.K. Khachmamuk¹

¹Clinical Oncology Dispensary No. 1, Ministry of Health of Krasnodar Region; 146 Dimitrova St., Krasnodar 350040, Russia;

²Kuban State Medical University; 4 Mitrofana Sedina St., Krasnodar 350063, Russia;

³N.N. Petrov Research Institute of Oncology, Ministry of Health of Russia; 68 Leningradskaya St., Pesochnyy Settlement, Saint Petersburg 197758, Russia;

⁴Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Ministry of Health of Russia; 2 Litovskaya St., Saint Petersburg 194100, Russia

⁵I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, Ministry of Health of Russia; 41 Kirochnaya St., Saint Petersburg 191015, Russia

Contacts: Anastasiya Igorevna Stukan jolie86@bk.ru

Background. It is suggested that defects in *BRCA1/2* genes contribute to a high mutational load and high immunogenicity, which modulates immune microenvironment. At the same time, it was shown that *BRCA1/2*-associated breast cancer tumors do not belong to the category of immunoactive ones. These tumors have low expression of immune response genes and exhibit an immunosuppressive type of microenvironment. This indicates the need of antitumor immune response modulation and maintaining of the optimal balance of tumor CD4/CD8 T-lymphocytes ratio. In addition, there is evidence of the additional evaluation of *TP53* mutation in these tumors and disruption of the cell death process, which can also be a factor of resistance to therapy, including PARP inhibitors, and serve as a therapeutic target.

Materials and methods. The prospective study included 20 patients with *BRCA1*-associated breast cancer. *BRCA1/2* mutations (*BRCA1* 185delAG, 4153delA, 5382insC, 3819delGTAA, 3875delGTCT, 300T>G, 2080delA, *BRCA2* 6174delT) were detected in by real-time polymerase chain reaction. Immunohistochemical study was performed on paraffin embedded tissue blocks by an automated method on a ThermoScientific immunohistotainer using monoclonal antibodies. The expression of markers of tumor-infiltrating CD4+ and CD8+ T-lymphocytes, markers of macrophages (CD68, CD163), apoptosis (Bcl-2, p53), cell adhesion markers (E-cadherin, β -catenin) in breast cancer in carriers of *BRCA1* mutations was assessed.

Results. High CD4/CD8 ratio, which characterizes immunosuppressive microenvironment, occurred in 75 % of cases. *BRCA1* 5382insC mutation is associated with high level of CD4+ TILs ($p < 0.05$), G_2 is associated with a low CD4/CD8 ratio ($p = 0.039$) and a high level of CD163 ($p = 0.02$, AUC = 0.739); T1 correlates with high levels of CD8+ TILs ($p = 0.038$) and high levels of CD163 ($p = 0.033$). High Ki-67 is associated with a lack of Bcl-2 expression ($p = 0.04$) and a low level of E-cadherin ($p = 0.02$). Negative expression of Bcl-2 occurred in 75 % of cases. High level of p53 expression has been described as the main type of expression in these tumors, suggesting a combination of *TB53* and *BRCA1* mutations and a violation of cell death mechanism of in these tumors.

Conclusion. Breast cancer tumors of patients with hereditary mutations in *BRCA1* gene demonstrate immunosuppressive type of microenvironment and a violation of the cell death mechanism. The main directions of future therapy of these tumors may include tumor immune microenvironment modification and activation of cell death mechanisms.

Key words: breast cancer, *BRCA1* mutation, tumor immune microenvironment, apoptosis

For citation: Stukan A.I., Goryainova A.Yu., Chukhray O.Yu. et al. Tumor immune microenvironment and apoptotic markers in breast cancer patients carrying *BRCA1* gene mutations. Opuholi zhenskoy reproductivnoy systemy = Tumors of female reproductive system 2022;18(2):29–39. (In Russ.). DOI: 10.17650/1994-4098-2022-18-2-29-39

Введение

В литературе имеются сведения об особенностях микроокружения опухолей при наличии мутаций в генах *BRCA1/2* у больных раком молочной железы (РМЖ), раком яичников и раком предстательной железы. Предполагается, что *BRCA1*- и *BRCA2*-мутации модулируют иммунное микроокружение ввиду высокой мутационной нагрузки и, как следствие, высокой иммуногенности. Однако очевидно, что влияние герминальных и соматических *BRCA1/2*-мутаций на патогенетические аспекты опухолей различно. Изучение опухолевого микроокружения этих опухолей является основным предметом научных дискуссий с противоречивыми данными исследований. Показано, что мутации *BRCA1* приводят к более высоким показателям

дефицита гомологичной рекомбинации, чем мутация *BRCA2*. При этом *BRCA1*- и *BRCA2*-мутированные опухоли демонстрируют различную экспрессию генов. Вероятно, и подходы к разработкам терапевтических стратегий должны быть различными в зависимости от типа мутаций. *BRCA1*-дефицитные опухоли характеризуются повышением регуляции генов, связанных с эпителиально-мезенхимальным переходом. При опухолях с герминальной мутацией *BRCA2* повышена регуляция генов, участвующих в трансдукции сигнала эпидермального фактора роста (HER2/neu) и в передаче сигналов эстрогена. Кроме этого, влияние мутаций *BRCA1/2* на иммунное микроокружение при раке может представлять собой еще одну потенциальную терапевтическую мишень [1]. Главным образом, это

основано на том, что изменения в путях ответа на повреждение ДНК и высокая мутационная нагрузка могут свидетельствовать об эффективности ингибиторов контрольных точек иммунного ответа [2]. В исследовании В. Grandal и соавт. показан лучший ответ на неоадьювантную химиотерапию при *BRCA*-ассоциированном люминальном подтипе при наличии высокой лимфоцитарной инфильтрации [3]. I. M. H. Sonderstrup и соавт. при сравнении иммунной инфильтрации в первичной опухоли до лечения показали более высокий уровень опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в *BRCA1*-дефицитных опухолях по сравнению с *BRCA2*-дефицитными [4]. Особенности геномной нестабильности *BRCA1/2*-дефицитных опухолей, включая повышенную мутационную нагрузку, были отмечены в исследовании W. X. Wen и соавт. При этом только *BRCA1*-дефицитные опухоли характеризовались повышенной экспрессией PD-L1 и PD-1 и высоким уровнем инфильтрирующих опухоль Т-лимфоцитов [5].

В исследованиях показано, что носительство мутаций *BRCA1* может приводить к развитию РМЖ именно путем создания опухолевой ниши [6]. Так, потеря функции белка *BRCA1* в эпителиальных клетках молочной железы может существенно повлиять на стромальные клетки, находящиеся в микроокружении опухоли, что, в свою очередь, повышает метастатический потенциал *BRCA1*-дефицитных опухолевых клеток [7–9]. Установлено, что *BRCA1*-дефицитные клетки РМЖ могут трансформировать опухоль-ассоциированные фибробласты в измененный активированный фенотип, который авторы называли метастаз-ассоциированными фибробластами. Впоследствии они способны индуцировать метастатические свойства клеток рака молочной железы [10, 11]. На основании многочисленных данных разделение тройного негативного РМЖ на 6 подтипов согласно профилю экспрессии генов имеет существенную клиническую значимость. Иммунный подтип (IM) характеризуется высокой экспрессией генов иммунного ответа, базально-подобный 1 (BL1) — экспрессией генов клеточной пролиферации и репарации ДНК. Базально-подобный 2 (BL2) тип имеет миоэпителиальное происхождение и отличается активацией сигнальных механизмов EGF, NGF, MET, Wnt/ β -catenin и IGFR1. Подтип люминальный андроген-рецепторный (LAR) отличается экспрессией рецепторов андрогена. Мезенхимальный (M) и мезенхимально-подобный (MSL) подтипы экспрессируют гены, вовлеченные в эпителиально-мезенхимальный переход. Больные с BL1-типом демонстрируют благоприятный прогноз, BL2-опухоли характеризует плохой прогноз. При этом показано, что опухоли с герминальными *BRCA1/2*-мутациями не относятся к категории иммуноактивных опухолей РМЖ. Несмотря на высокую мутационную нагрузку, опухоли имеют низкую экспрессию генов иммунного ответа в микроокруже-

нии опухоли [1, 12, 13]. Однако из-за высокой мутационной нагрузки опухоли, связанные с герминальными мутациями *BRCA1/2*, все же считаются кандидатами для применения ингибиторов контрольных точек иммунного ответа, что является достаточно спорным ввиду вышеизложенных особенностей опухоли [14].

Значение маркеров опухоль-инфильтрирующих CD4⁺-, CD8⁺-Т-лимфоцитов и макрофагов в клиническом течении РМЖ. Изучение характера микроокружения опухоли больных РМЖ привело к пониманию важной роли опухоль-инфильтрирующих CD4⁺- и CD8⁺-Т-лимфоцитов в эффективном противоопухолевом ответе [11]. Показано, что опухоль-инфильтрирующие Т-регуляторные клетки индуцируют иммуносупрессивное микроокружение опухоли, препятствуя эффективной противоопухолевой защите, что становится важным фактором в разработке иммунотерапевтической стратегии при РМЖ [11, 15, 16]. Опухоль-инфильтрирующие CD8⁺-Т-лимфоциты и FoxP3⁺-Т-лимфоциты являются важными предикторами и прогностическими факторами в лечении больных РМЖ [17–19]. В исследовании Y. Huang и соавт. в качестве разделения уровня экспрессии выбраны медианы показателей. Выявлено, что при наличии высоких показателей CD4⁺-ОИЛ (CD4⁺-Т-лимфоциты >16) повышаются риски летального исхода и рецидивирования заболевания. В случае выявления высокого уровня CD8⁺-Т-лимфоцитов (>13) наблюдалось снижение риска смерти и рецидива. Также существенным маркером риска позднего рецидива и летального исхода при РМЖ является отношение числа CD4⁺-Т-лимфоцитов к числу CD8⁺-Т-лимфоцитов. Больные с низким уровнем индекса CD4/CD8 ($\leq 1,2$) имели низкий шанс смерти или рецидива в течение 5 лет наблюдения. При высоком соотношении CD4/CD8 (>1,2) отмечены низкие показатели общей и безрецидивной выживаемости. В мультивариантном анализе Кокса показатель опухоль-инфильтрирующих CD8⁺-Т-лимфоцитов независимо влияет на общую и безрецидивную выживаемость [11]. На ранних стадиях Th1-клетки являются доминирующей популяцией CD4⁺-Т-лимфоцитов. На поздней стадии доминирующей популяцией становятся FoxP3⁺-Treg- и Th17-лимфоциты [11, 15–19]. Таким образом, вероятно, главная задача в модулировании противоопухолевого иммунного ответа при РМЖ состоит в увеличении количества CD8⁺-Т-клеток и в поддержании оптимального баланса CD4/CD8 в опухолевом микроокружении. Эти показатели могут зависеть от активности опухоль-ассоциированных макрофагов (ОАМ), которые влияют на опухолевый рост и прогрессирование. M1-поляризованные макрофаги характеризуются экспрессией CD68. M2-поляризованные макрофаги — экспрессией как CD68, так и CD163. Они промотируют опухолевый

рост и метастазирование путем высвобождения хемокинов. Прогностическое значение локализации и плотности CD68+ и CD163+-ОАМ при РМЖ не до конца ясно. При тройном негативном фенотипе показано отсутствие корреляции CD68+-ОАМ в опухолевой строме и опухолевых очагах с общей и безрецидивной выживаемостью в одновариантном анализе. Высокая плотность CD68+-ОАМ в инвазивном РМЖ была ассоциирована с высокой васкуляризованностью и метастазами в лимфатические узлы, сниженными показателями общей и безрецидивной выживаемости [20]. Эти данные свидетельствуют о том, что CD68+-ОАМ индуцируют иммуносупрессивный тип ответа. Тем не менее, по другим данным, CD68+-ОАМ не коррелировали с клинико-патогистологическими характеристиками и общей и безрецидивной выживаемостью при тройном негативном РМЖ [21]. Однако следует понимать, что экспрессия CD68+ характерна для М1- и М2-подобных ОАМ. Вероятно, CD163 может выступать специфичным маркером М2-подобных ОАМ [22–25]. При тройном негативном РМЖ показана большая инфильтрация ОАМ, в особенности CD163+, в сравнении с другими типами РМЖ [20]. Тем не менее не выявлено прогностической значимости CD163+ ОАМ. М. Yang и соавт. показали, что повышенное количество CD163+-ОАМ в опухолевой строме коррелировало с неблагоприятными факторами прогноза и худшими показателями общей и безрецидивной выживаемости [21]. Вероятно, CD163+-ОАМ влияют на прогноз за счет не только модулирования иммунной реакции в опухолевой строме, но и прямого влияния ОАМ на опухолевые очаги. При этом установлено, что некоторые CD163+ клетки не окрашивались реактивом CD68. Это может быть обусловлено наличием иммуносупрессивных CD163-экспрессирующих миелоидных клеток [20].

Значение маркеров клеточной гибели Bcl-2 и p53 при РМЖ. Как известно, апоптоз в опухолевых клетках может быть индуцирован по внешнему и внутреннему путям. Fas-лиганд (FasL) и апоптоз-индуцирующий лиганд, ассоциированный с фактором некроза опухоли (TRAIL), запускает механизм клеточной гибели по внешнему пути апоптоза, активируя каспазу 8 в опухолевой клетке. Цитотоксические препараты и лучевая терапия повреждают ДНК и митохондрии, что приводит к активации внутреннего пути апоптоза, ассоциированного с каспазой 9. Несмотря на многочисленность участников митохондриального пути апоптоза, семейство белков Bcl-2 играет ключевую роль в этом типе клеточной гибели. Семейство белков Bcl-2 включает Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, активация которых способна вызвать резистентность к химиотерапии. Экспрессия Bcl-2 зачастую ассоциирована с люминальными типами РМЖ, а его ингибирование повышает эффективность химиотерапевтических агентов

ввиду активации механизма гибели опухолевых клеток. Вследствие антиапоптотического действия Bcl-2 способен выступить мишенью таргетной терапии при тройном негативном РМЖ, при этом в случае Bcl-2-отрицательного тройного негативного РМЖ показана эффективность доксорубина [26]. В исследовании С. V. Nguyen и соавт. окрашивание p53 и Bcl-2 оценивалось по пропорции ядерного и/или цитоплазматического окрашивания положительных опухолевых клеток. Отсутствие окрашивания (0+) устанавливалось при 0+, слабopоложительное – при окрашивании <10 % (1+), умеренно положительное – окрашивание 10–75 % ядер клеток (2+), положительное – при окрашивании >75 % клеток (3+). Окрашивание 0, 1+ признано отрицательным, 2+ и 3+ – положительным. Также в исследованиях оценивается комбинированный маркер p53–Bcl-2+, характеризующийся благоприятным прогнозом, p53+Bcl-2+ – промежуточным прогнозом, p53–Bcl-2– и p53+Bcl-2– – плохим прогнозом. Экспрессия мутантного p53 может быть связана с потерей экспрессии Bcl-2 и повышением клеточной пролиферации. В исследованиях показана негативная прогностическая роль гиперэкспрессии белка p53, который ассоциирован с низкой степенью дифференцировки, отсутствием экспрессии рецепторов эстрогена, отсутствием ответа на химиотерапию, снижением показателей выживаемости [27]. В исследованиях обнаружено, что большинство опухолей при тройном негативном фенотипе РМЖ с мутацией *BRCA1* также демонстрируют и наличие мутации *TP53* [28]. При этом на мышиных моделях выявлено, что сочетание мутаций *TP53* и *BRCA1* приводит к образованию опухоли молочной железы с тройным негативным фенотипом [29]. Кроме того, маркер апоптоза p53 является одним из регуляторов опухолевого иммунного микроокружения. Прогрессирование опухолевого процесса ассоциировано с уклонением от иммунологического контроля и потерей функции белка «дикого типа» p53, что приводит к воспалительному микроокружению [30]. При этом именно двойственная роль мутированного p53 в индукции про- и противовоспалительного микроокружения представляет сложности иммунологической эрадикации опухолевых клеток. Возможно, этот процесс связан с различными опухоленными стадиями рака и, следовательно, с различными потребностями в определенном микроокружении с соотношением клеточных популяций для опухолевого прогрессирования. Ввиду того, что основные стратегии терапии рака заключаются в снижении клеточной пролиферации и запуске программируемой клеточной гибели, это, вероятно, может быть применимо к *BRCA1/2*-дефицитному РМЖ.

Цель исследования – оценить характер иммунного опухолевого окружения и механизмы клеточной гибели у больных *BRCA1*-ассоциированным РМЖ.

Материалы и методы

В проспективное исследование включено 20 пациентов — носителей мутаций гена *BRCA1*, наблюдавшихся с РМЖ в ГБУЗ «Клинический онкологический диспансер № 1» г. Краснодара с 2020 по 2021 г. с доступным нативным биопсийным или операционным гистологическим материалом для иммуногистохимического исследования. Мутации *BRCA1/2* в лейкоцитах периферической крови выявлялись методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Детектировались 7 мутаций в гене *BRCA1* (185delAG, 4153delA, 5382insC, 3819delGTAAA, 3875delGTCT, 300T>G, 2080delA) и 1 мутация в гене *BRCA2* (6174delT).

Оценивалась экспрессия маркеров опухоль-инфильтрирующих CD4+- и CD8+-Т-лимфоцитов, маркеров макрофагов (CD68, CD163), апоптоза (Bcl-2, p53), маркеров клеточной адгезии (Е-кадгерин, β -катенин) при РМЖ у носителей мутаций *BRCA1*. На срезах с парафиновых блоков проводилось иммуногистохимическое исследование. Согласно протоколу, вначале парафиновые срезы подвергались предварительному нагреву до 60 °С, далее происходило восстановление антигена при pH 8,0 в течение 20 мин при температуре 97 °С и охлаждение до 65 °С. Иммуногистохимическое исследование выполнялось на парафиновых срезах автоматизированным методом на иммуногистостейнере ThermoScientific с использованием моноклональных антител к рецепторам эстрогена (clone SP1, Novocastra (Leica)), рецепторам прогестерона (clone 1E2, Novocastra (Leica)), HER2 (clone 4B5, Roche (Ventana)), Ki-67 (clone SP6 LabVision, 1:400), Е-кадгерину (clone SPM471 LabVision, 1:100), β -катенину (clone RB-9035-P LabVision, 1:100), p53 (clone 6066511 LabVision, 1:100), CD8 (clone, 1448 DBS, 1:100), CD4 (clone 4B12 Dako, 1:50), CD68 (clone KP1 DBS, 1:100), CD163 (clone 10D6 DBS, 1:200), Bcl-2 (clone 6072851 Leica, 1:50), CD31 (clone JC70 CM, 1:50) и системы визуализации Histo-Fine Universal Immuno-peroxidase Polymer anti-Mouse and Rabbit.

Доля клеток с ядерным окрашиванием рецепторов эстрогена и прогестерона рассчитана из расчета положительности в 1 % опухолевых клеток. Статус экспрессии HER2/neu установлен на основании рекомендаций Американской коллегии патологоанатомов и Американского общества клинической онкологии: ОИЛ при окраске гематоксилином и эозином. Использовали 3 категории инфильтрации: низкую (ОИЛ 0–10 %), промежуточную (ОИЛ 11–49 %) и высокую (ОИЛ 50–100 %). К отрицательной экспрессии отнесен низкий уровень.

Индекс пролиферативной активности опухоли оценивали по экспрессии Ki-67. Низкий индекс пролиферативной активности установлен при Ki-67 <30 %, высокий уровень — при Ki-67 \geq 30 %. При изучении экспрессии маркера p53 окрашивание 0–25 % опухо-

левых клеток означало отрицательную экспрессию p53, >25 % — положительную экспрессию, в том числе 26–50 % — слабую экспрессию, 51–100 % — гиперэкспрессию p53.

Уровни экспрессии маркеров CD4+-Т-лимфоцитов, CD8+-Т-лимфоцитов и соотношение CD4/CD8 были оценены согласно медианам значений в исследовании S. Tiainen и соавт. [24]. Маркеры макрофагов и миелоидных клеток CD68+, CD163+ оценены по медианам экспрессии, описанным в исследовании J. Blagih и соавт. [30]. На основании этих значений выполнено разделение на подгруппы в зависимости от высокого и низкого уровня экспрессии маркеров.

Статистический анализ выполнен с использованием статистического пакета IBM SPSS Statistics v. 22. Нормальность распределения непрерывных переменных оценена по критериям Шапиро–Уилка ввиду малой выборки. На этом основании применены описательные статистики, оценены средние величины со стандартной отклонения и медианы с интерквартильным размахом. Для независимых категориальных (бинарных) данных использованы таблицы сопряжения. Сравнительный анализ проводился с помощью точного теста Фишера. Различия считались значимыми при $p < 0,05$. Проведен расчет относительного риска (ОР) возникновения исхода в зависимости от фактора риска и 95 % доверительных интервалов. При значении ОР >1 фактор расценивается как значительный, а ОР <1 указывает на защитную роль воздействующего фактора.

Результаты

Средний возраст больных РМЖ с мутацией *BRCA1* составил 42 года. Обнаруженные типы мутаций: у 10 (50 %) больных выявлена мутация *BRCA1* 5382insC, у 3 (15 %) — *BRCA1* 300T>G, у 3 (15 %) — *BRCA1* 4153delA, у 2 (10 %) — *BRCA1* 3819delGTAAA, у 1 (5 %) — *BRCA1* 158delAG и у 1 (5 %) — *BRCA1* 3875delGTCT (рис. 1).

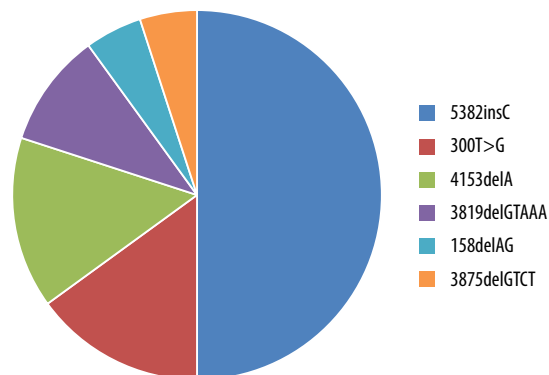


Рис. 1. Тип мутации *BRCA1* в исследовании

Fig. 1. Type of *BRCA1* mutation in the study

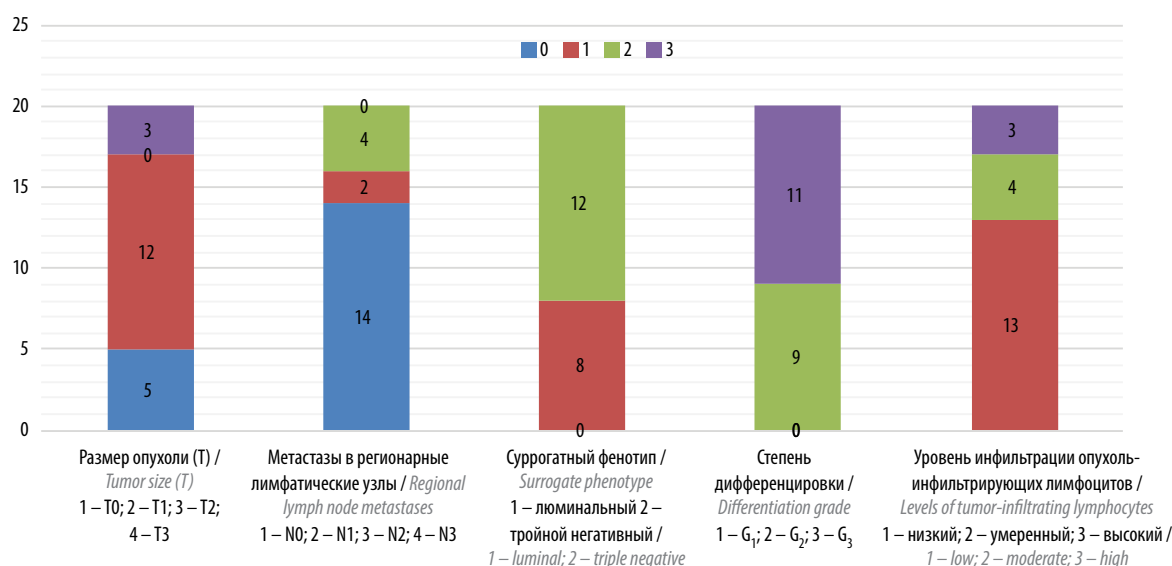


Рис. 2. Клинико-морфологические данные больных раком молочной железы с мутацией *BRCA1*

Fig. 2. Clinical and morphological characteristics of breast cancer patients with *BRCA1* mutations

Первичная распространенность T1 выявлена в 5 (25 %) случаях, T2 – в 12 (60 %), T4 – у 3 (15 %) больных. Метастатическое поражение регионарных лимфатических узлов N1 выявлено у 2 (10 %) больных, N2 – у 4 (20 %) пациентов, отсутствие метастазов в лимфатических узлах (N0) установлено у 14 (70 %) пациентов. При гистологическом анализе умеренная степень дифференцировки (G₂) обнаружена у 9 (45 %), низкая степень дифференцировки – у 11 (55 %) пациентов. Медиана уровня инфильтрации ОИЛ составила 7 % (диапазон 5–15 %). По уровню инфильтрации опухоли выделено 2 подтипа: отрицательный (1 балл) – у 13 (65 %) пациентов, положительный (2 и 3 балла) – у 7 (35 %). При иммуногистохимическом анализе тройной негативный суррогатный подтип выявлен у 12 (60 %) больных, люминальный A – у 3 (15 %), люминальный B – у 5 (25 %). Данные представлены на рис. 2.

Медиана показателя экспрессии рецепторов эстрогена составила 0 (0–60), показателя экспрессии рецепторов прогестерона – 0 (5–15). Медиана индекса пролиферативной активности (Ki-67) – 60 (11,25–77,5) %. Медиана показателя экспрессии маркера CD4⁺-Т-лимфоцитов составила 15 (6,25–33,75) %. Медиана экспрессии маркера CD8⁺-Т-лимфоцитов – 20 (10–40) %. Медиана соотношения CD4⁺-/CD8⁺-Т-лимфоцитов – 1 (0,6150–1,1575). Медиана показателя экспрессии маркера макрофагов CD68 – 30 (11,25–60,00) %. Проанализированы маркеры, участвующие в механизме клеточной гибели: медиана показателя экспрессии Bcl-2 составила 0 (0–70), медиана показателя экспрессии p53 – 75 (0–100) %. При этом возможно разделить пациентов по группам в зависимости от экспрессии Bcl-2: отрицательная экспрессия у 13 (65 %) пациентов, положительная экспрессия Bcl-2 – у 7 (35 %).

Отрицательная экспрессия p53 выявлена у 9 (45 %), положительная – у 11 (55 %) больных. Медиана показателей маркеров клеточной адгезии (ядерная и/или цитоплазматическая локализация β-катенина) – 100 %, что может свидетельствовать об активации эпителиально-мезенхимального перехода в опухоли при мутации *BRCA1*. Медиана показателя экспрессии E-кадгерина – 80 %. Данные представлены на рис. 3.

Установлено, что опухоли больных РМЖ с мутациями гена *BRCA1* характеризуются низким уровнем ОИЛ, который выявлялся у 13 (65 %) пациентов, в то время как высокий уровень ОИЛ обнаружен у 7 (35 %) пациентов. Далее при анализе характера иммунного микроокружения в опухоли пациентов за точку разделения на группы выбраны медианы уровней экспрессии маркеров. Таким образом, высокий уровень CD4⁺-Т-лимфоцитов установлен у 9 (45 %), низкий – у 11 (55 %); высокий уровень CD8⁺-Т-лимфоцитов – у 11 (55 %), низкий – у 9 (45 %) пациентов. При этом высокое соотношение CD4/CD8 было преобладающим в этих опухолях и встречалось в 15 (75 %) случаях, а низкое соотношение CD4/CD8 выявлено в 5 (25 %) случаях, что может свидетельствовать об иммуносупрессивном типе микроокружения. Отрицательная экспрессия Bcl-2 обнаружена у 15 (75 %), низкая – у 5 (25 %) больных. При этом высокий уровень экспрессии p53 выявлен у 11 (55 %), низкий – у 9 (45 %) пациентов.

При изучении корреляции клинико-морфологических характеристик опухоли больных РМЖ с мутациями гена *BRCA1* установлено отсутствие связи размера первичной опухоли (T) с экспрессией Bcl-2, p53, CD4⁺-Т-лимфоцитами, соотношением CD4/CD8 ($p > 0,05$). Выявлена связь размера опухоли T1 и низкой

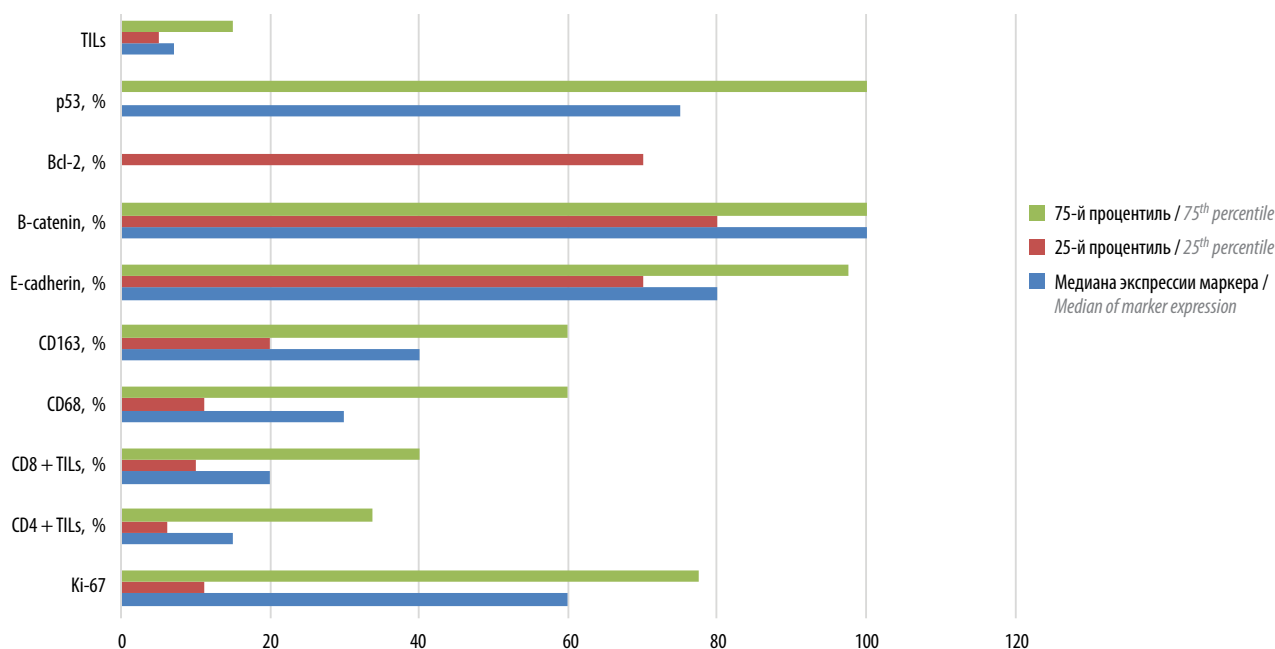


Рис. 3. Медиана уровня опухолю-инфильтрирующих лимфоцитов (TILs) и экспрессии иммуногистохимических маркеров с интерквартильным размахом

Fig. 3. Median levels of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and expression of immunohistochemical markers with their interquartile ranges

инфильтрации ОИЛ ($p = 0,021$; ОР 0,808; 95 % доверительный интервал (ДИ) 0,504–1,295), однако T1 коррелирует с высоким уровнем экспрессии маркера CD8+-Т-лимфоцитов ($p = 0,038$; ОР 1,833; 95 % ДИ 1,069–3,144). Степень метастатического поражения лимфатических узлов не связана с указанными иммуногистохимическими маркерами ($p > 0,05$). Однако выявлена односторонняя связь тройного негативного фенотипа РМЖ с мутацией *BRCA1* с отрицательной экспрессией Bcl-2 ($p = 0,05$; ОР 0,273; 95 % ДИ 0,046–1,616) и высокой экспрессией p53 ($p = 0,04$; ОР 3; 95 % ДИ 0,865–10,407), что может свидетельствовать о мутации *TP53* и нарушении механизма клеточной гибели у этих пациентов. Суррогатный фенотип опухоли не связан с экспрессией маркеров CD4+-, CD8+-Т-лимфоцитов, соотношением CD4/CD8 и уровнем ОИЛ ($p > 0,05$).

Тип мутации *BRCA1*5382insC в сравнении с другими представленными типами связан с высоким уровнем инфильтрации CD4+-Т-лимфоцитами ($p = 0,043$; ОР 1,5; 95 % ДИ 0,868–2,591), и не выявлено связи типа мутации с экспрессией маркеров Bcl-2, p53, CD8+-Т-лимфоцитов, соотношением CD4/CD8 и уровнем ОИЛ ($p > 0,05$).

Умеренная степень дифференцировки связана с низким соотношением CD4/CD8 ($p = 0,039$; ОР 2,2; 95 % ДИ 1,152–4,203), что характеризует благоприятное течение заболевания. Однако степень дифференцировки не связана с маркерами Bcl-2, p53, уровнями CD4+-, CD8+-Т-лимфоцитов и ОИЛ ($p > 0,05$).

Высокий индекс пролиферативной активности имеет достоверную одностороннюю связь с отсутствием экспрессии Bcl-2 ($p = 0,04$; ОР 1,833; 95 % ДИ 0,898–3,743) и не зависит от маркеров p53, CD4+-, CD8+-Т-лимфоцитов, соотношения CD4/CD8 и уровня ОИЛ ($p > 0,05$).

Уровень экспрессии CD68 не коррелировал с экспрессией маркеров Bcl-2, p53, Е-кадгерина, CD4+-, CD8+-Т-лимфоцитов, соотношением CD4/CD8 и уровнем ОИЛ ($p > 0,05$). Однако показана корреляция высокого уровня CD163 с низкой экспрессией Е-кадгерина ($p = 0,02$; ОР 3; 95 % ДИ 1,138–7,906). Данные иллюстрирует табл. 1.

Показатели экспрессии маркера ОАМ CD68 не коррелируют с размером опухоли, метастазами в лимфатические узлы, суррогатным типом опухоли, типом мутации *BRCA1*, степенью дифференцировки, уровнем пролиферативной активности ($p > 0,05$). Однако уровень маркера CD163 более медианы в исследовании связан с малым размером опухоли (T1) ($p = 0,033$; ОР 2; 95 % ДИ 1,076–3,717), умеренной степенью дифференцировки (G_2) ($p = 0,02$; ОР 2,852; 95 % ДИ 1,022–7,959; AUC = 0,739) (табл. 2).

Обсуждение

В представленном исследовании с включением больных *BRCA1*-ассоциированным РМЖ выявлено, что умеренная степень дифференцировки опухоли была связана с низким соотношением CD4/CD8 ($p = 0,039$) и высокой экспрессией маркера CD163 ($p = 0,02$,

Таблица 1. Корреляция клинико-морфологических параметров с иммуногистохимическими показателями больных раком молочной железы с мутацией *BRCA1*, *n*Table 1. Correlation between clinical/morphological characteristics and immunohistochemical parameters of the tumor in breast cancer patients with *BRCA1* mutations, *n*

Параметр Parameter	Bcl-2 +/- (5/15)	p53 <50/>50 (9/11)	E-cadherin <80/>80 (5/15)	TILs <10/>10 (13/7)	CD4+ ≤16/>16 (11/9)	CD8+ ≤13/>13 (9/11)	CD4/CD8 ≤1,2/>1,2 (15/5)
Размер опухоли: Tumor size: T1 T≥2 <i>p</i> > 0,05	1/4 4/11 <i>p</i> > 0,05	1/4 8/7 <i>p</i> = 0,319	5/7 0/8 <i>p</i> = 0,05	4/1 9/6 <i>p</i> = 0,021	2/3 9/6 <i>p</i> = 0,617	0/5 9/6 <i>p</i> = 0,038	0/5 5/10 <i>p</i> = 0,266
Регионарные лимфатические узлы: Regional lymph nodes: N0 N≥1 <i>p</i> > 0,05	4/10 1/5 <i>p</i> > 0,05	6/8 3/3 <i>p</i> > 0,05	9/3 5/3 <i>p</i> > 0,05	11/3 2/4 <i>p</i> = 0,122	9/5 2/4 <i>p</i> > 0,05	7/7 2/4 <i>p</i> = 0,642	3/11 2/4 <i>p</i> = 0,613
Иммуногистохими- ческий тип: Immunohistochemical type: люминальный luminal трижды негативный triple negative <i>p</i> = 0,048	4/4 1/11 <i>p</i> = 0,048	6/2 3/9 <i>p</i> = 0,04	4/8 4/4 <i>p</i> > 0,05	5/3 8/4 <i>p</i> > 0,05	5/3 6/6 <i>p</i> = 0,670	4/4 5/7 <i>p</i> > 0,05	2/6 3/9 <i>p</i> > 0,05
Тип мутации <i>BRCA1</i> : Type of <i>BRCA1</i> mutation: 5382insC другие other <i>p</i> > 0,05	2/8 3/7 <i>p</i> > 0,05	4/6 5/5 <i>p</i> > 0,05	6/6 4/4 <i>p</i> > 0,05	6/4 7/3 <i>p</i> > 0,05	1/9 7/3 <i>p</i> = 0,043	5/5 4/6 <i>p</i> > 0,05	2/8 3/7 <i>p</i> > 0,05
Степень дифференцировки: Differentiation grade: G ₂ G ₃ <i>p</i> = 0,127	4/5 1/10 <i>p</i> = 0,127	6/3 3/8 <i>p</i> = 0,175	4/7 3/5 <i>p</i> > 0,05	5/4 8/3 <i>p</i> = 0,642	4/5 7/4 <i>p</i> = 0,653	2/7 7/4 <i>p</i> = 0,092	0/9 5/6 <i>p</i> = 0,039
Ki-67: низкий low высокий high <i>p</i> = 0,04	4/4 1/11 <i>p</i> = 0,04	5/3 4/8 <i>p</i> = 0,362	6/6 3/5 <i>p</i> > 0,05	5/3 8/4 <i>p</i> > 0,05	5/3 6/6 <i>p</i> = 0,670	4/4 5/7 <i>p</i> > 0,05	2/6 3/6 <i>p</i> > 0,05
CD68: <Me 30 ≥Me 30 <i>p</i> > 0,05	3/7 2/8 <i>p</i> > 0,05	3/7 6/4 <i>p</i> > 0,05	5/5 7/3 <i>p</i> = 0,650	5/4 8/3 <i>p</i> > 0,05	6/4 5/5 <i>p</i> > 0,05	5/5 4/6 <i>p</i> > 0,05	3/7 2/8 <i>p</i> > 0,05
CD163: <Me 40 ≥Me 40 <i>p</i> > 0,05	2/8 3/7 <i>p</i> > 0,05	4/6 5/5 <i>p</i> > 0,05	3/7 9/1 <i>p</i> = 0,02	4/6 5/5 <i>p</i> > 0,05	5/5 6/4 <i>p</i> > 0,05	6/4 3/7 <i>p</i> = 0,37	4/6 1/9 <i>p</i> = 0,303

Примечание. TILs – опухоль-инфильтрирующие лимфоциты.
Note. TILs – tumor-infiltrating lymphocytes.

AUC = 0,739). Показано, что T1 при *BRCA1*-мутации коррелирует с высоким уровнем экспрессии маркера CD8+ -Т-лимфоцитов (*p* = 0,038) и с высоким уровнем экспрессии маркера CD163 (*p* = 0,033).

Отрицательная экспрессия Bcl-2 также присуща *BRCA1*-мутированным опухолям и встречалась в 75 % случаев. При этом высокий уровень экспрессии p53 описан как основной тип экспрессии в данных опухолях,

Таблица 2. Корреляция клинико-морфологических параметров с маркерами макрофагов в опухоли больных раком молочной железы с мутацией *BRCA1*Table 2. Correlation between clinical/morphological characteristics and tumor macrophage markers in breast cancer patients with *BRCA1* mutations, n

Параметр Parameter	CD68 <30/≥30	CD163 <40/≥40
Размер опухоли: Tumor size: T1 T≥2	3/7 2/8 $p > 0,05$	0/10 5/5 $p = 0,033$, двусторонняя $p = 0.033$, two-sided
Регионарные лим- фатические узлы: Regional lymph nodes: N0 N≥1	7/3 7/3 $p > 0,05$	0/4 8/2 $p = 0,628$
Иммуногистохими- ческий тип: Immunohistochemical type: люминальный luminal трижды негативный triple negative	4/6 4/6 $p = 0,650$	3/7 5/5 $p = 0,650$
Тип мутации <i>BRCA1</i> : Type of <i>BRCA1</i> mutation: 5382insC другие other	5/5 5/5 $p > 0,05$	3/7 7/3 $p = 0,179$
Степень дифферен- цировки: Differentiation grade: G ₂ G ₃	3/7 6/4 $p = 0,370$	2/8 7/3 $p = 0,035$, односторонняя $p = 0.035$, one-sided
Ki-67: низкий low высокий high	3/6 4/6 $p > 0,05$	2/7 5/5 $p = 0,350$

что позволяет предположить сочетание мутаций *TBS3* и *BRCA1* и нарушение механизма клеточной гибели у этих пациентов. Высокий индекс пролиферативной активности имеет достоверную одностороннюю связь с отсутствием экспрессии Bcl-2 ($p = 0,04$) и низкой экспрессией Е-кадгерина ($p = 0,02$).

В исследовании выявленные особенности *BRCA1*-мутированных опухолей в некоторой степени согласуются с данными международных исследований. Тем не менее определенные результаты требуют уточнения ввиду необходимости большего числа наблюдений в выборке для подтверждения их достоверности.

Заключение

Представленные данные отчетливо свидетельствуют о том, что опухолевое микроокружение как характеристика опухоли в настоящее время признается важным участником канцерогенеза. Тем не менее остается немало вопросов о том, как участники формирования опухолевого микроокружения при герминальных *BRCA1/BRCA2*-мутациях в опухолях РМЖ приводят к развитию РМЖ. Результаты нескольких экспериментальных и доклинических данных свидетельствуют о необходимости не столько изучения эпителиальных клеток, сколько расширения концепции роли опухолевого микроокружения. Многочисленные данные говорят о том, что различия в клетках опухоли между *BRCA1*- и *BRCA2*-дефицитным РМЖ приводят к различиям в иммунном ландшафте, инфильтрации иммунокомпетентными клетками и различным механизмам резистентности к терапии, что требует дальнейшего изучения в клинических исследованиях. Таким образом, следует осознать необходимость внедрения понятия «*BRCA1/2*-мутированное опухолевое микроокружение» и углубить понимание механизмов взаимодействия компонентов опухолевого микроокружения, которое промотирует развитие и прогрессирование РМЖ. Изучение механизмов формирования микроокружения опухоли может привести к разработке более эффективных стратегий терапии пациентов с РМЖ и герминальной мутацией *BRCA1*.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Przybytkowski E., Davis T., Hosny A. et al. An immune-centric exploration of *BRCA1* and *BRCA2* germline mutation related breast and ovarian cancers. BMC Cancer 2020;20:197. DOI: 10.1186/s12885-020-6605-1.
2. Nolan E., Savas P., Policheni A.N. et al. Combined immune checkpoint blockade as a therapeutic strategy for *BRCA1*-mutated breast cancer. Sci Transl Med 2017;9. DOI: 10.1126/scitranslmed.aal4922.
3. Grandal B., Evrein C., Laas E. et al. Impact of *BRCA* mutation status on tumor infiltrating lymphocytes (TILs), response to treatment, and prognosis in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. Cancers 2020;12:3681. DOI: 10.3390/cancers12123681.
4. Sonderstrup I.M.H., Jensen M.B., Ejlersen B. et al. Evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes and association with prognosis in *BRCA*-mutated breast cancer. Acta Oncol 2019;58:363–70. DOI: 10.1080/0284186x.2018.1539239.
5. Wen W.X., Leong C.O. Association of *BRCA1*- and *BRCA2*-deficiency with mutation burden, expression of PD-L1/PD-1, immune infiltrates,

- and T cell-inflamed signature in breast cancer. *PLoS One* 2019;14:e0215381. DOI: 10.1371/journal.pone.0215381.
6. Li C.M., Oren Y., Regev A., Brugge J.S. Abstract PR06: Contribution of mutant microenvironment to hereditary cancer: Single-cell gene expression profiling of a genetically engineered mouse model of human hereditary *BRCA1*-related breast cancer. *Cancer Res* 2018;78:PR06. DOI: 10.1158/1538-7445.mousemodels17-pr06.
 7. McCullough S.D., Hu Y., Li R. *BRCA1* in initiation, invasion, and metastasis of breast cancer: A perspective from the tumor microenvironment. In: *Metastasis of Breast Cancer*. Dordrecht: Springer, 2007. Pp. 31–46. DOI: 10.1007/978-1-4020-5867-7_3.
 8. Ghosh S., Lu Y., Katz A. et al. Tumor suppressor *BRCA1* inhibits a breast cancer-associated promoter of the aromatase gene (*CYP19*) in human adipose stromal cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;292:E246–E252. DOI: 10.1152/ajpendo.00242.2006.
 9. Weber F., Shen L., Fukino K. et al. Total-genome analysis of *BRCA1/2*-related invasive carcinomas of the breast identifies tumor stroma as potential landscaper for neoplastic initiation. *Am J Hum Genet* 2006;78:961–72. DOI: 10.1086/504090.
 10. Hemalatha S.K., Sengodan S.K., Nadhan R. et al. *BRCA1* defective breast cancer cells induce in vitro transformation of cancer associated fibroblasts (CAFs) to metastasis associated fibroblasts (MAFs). *Sci Rep* 2018;8:13903.
 11. Huang Y., Ma C., Zhang Q. et al. CD4+ and CD8+ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome. *Oncotarget* 2015;6:17462–78. DOI: 10.18632/oncotarget.3958.
 12. Wang D.Y., Jiang Z., Ben-David Y. et al. Molecular stratification within triple-negative breast cancer subtypes. *Sci Rep* 2019;9:19107. DOI: 10.1038/s41598-019-55710-w.
 13. Omarini C., Guaitoli G., Pipitone S. et al. Neoadjuvant treatments in triple-negative breast cancer patients: where we are now and where we are going. *Cancer Manag Res* 2018;10:91–103. DOI: 10.2147/cmars.146658.
 14. Goodman A.M., Kato S., Bazhenova L. et al. Tumor mutational burden as an independent predictor of response to immunotherapy in diverse cancers. *Mol Cancer Ther* 2017;16:2598–608. DOI: 10.1158/1535-7163.mct-17-0386.
 15. Ye J., Livergood R.S., Peng G. The role and regulation of human Th17 cells in tumor immunity. *Am J Pathol* 2013;182(1):10–20. DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.08.041.
 16. Wilke C.M., Kryczek I., Wei S. et al. Th17 cells in cancer: help or hindrance? *Carcinogenesis* 2011;32:643–9. DOI: 10.1093/carcin/bgr019.
 17. Fridman W.H., Pages F., Sautes-Fridman C., Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012;12:298–306. DOI: 10.1038/nrc3245.
 18. Mahmoud S.M., Paish E.C., Powe D.G. et al. An evaluation of the clinical significance of FOXP3+ infiltrating cells in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2011;127:99–108. DOI: 10.1007/s10549-010-0987-8.
 19. Mahmoud S.M., Paish E.C., Powe D.G. et al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol* 2011;29:1949–55. DOI: 10.1200/jco.2010.30.5037.
 20. Jamiyan T., Kuroda H., Yamaguchi R. et al. CD68- and CD163-positive tumor-associated macrophages in triple negative cancer of the breast. *Virch Arch* 2020;477:767–75. DOI: 10.1007/s00428-020-02855-z.
 21. Yang M., Li Z., Ren M. et al. Stromal infiltration of tumor-associated macrophages conferring poor prognosis of patients with basal-like breast carcinoma. *J Cancer* 2018;9:2308–16. DOI: 10.7150/jca.25155.
 22. Ni C., Yang L., Xu Q. et al. CD68- and CD163-positive tumor infiltrating macrophages in non-metastatic breast cancer: a retrospective study and meta-analysis. *J Cancer* 2019;10:4463–72. DOI: 10.7150/jca.33914.
 23. Zhao X., Qu J., Sun Y. et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in breast cancer: a meta-analysis of the literature. *Oncotarget* 2017;8:30576–86. DOI: 10.18632/oncotarget.15736.
 24. Tiainen S., Tumelius R., Rilla K. et al. High numbers of macrophages, especially M2-like (CD163-positive), correlate with hyaluronan accumulation and poor outcome in breast cancer. *Histopathology* 2015;66:873–83. DOI: 10.1111/his.12607.
 25. Sousa S., Brion R., Lintunen M. et al. Human breast cancer cells educate macrophages toward the M2 activation status. *Breast Cancer Res* 2015;17:101–10. DOI: 10.1186/s13058-015-0621-0.
 26. Honma N., Horii R., Ito Y. et al. Differences in clinical importance of Bcl-2 in breast cancer according to hormone receptors status or adjuvant endocrine therapy. *BMC Cancer* 2015;15:698. DOI: 10.1186/s12885-015-1686-y.
 27. Nguyen C.V., Nguyen Q.T., Vu H.T. Combined p53 and Bcl-2 immunophenotypes in prognosis of Vietnamese invasive breast carcinoma: a single institutional retrospective analysis. *Technol Cancer Res Treat* 2020;19:1533033820983081. DOI: 10.1177/1533033820983081.
 28. Liu X., Holstege H., van der Gulden H. et al. Somatic loss of *BRCA1* and p53 in mice induces mammary tumors with features of human *BRCA1*-mutated basal-like breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:12111–6. DOI: 10.1073/pnas.0702969104.
 29. Alexandrou S., George S.M., Ormandy C.J. et al. The proliferative and apoptotic landscape of basal-like breast cancer. *Int J Mol Sci* 2019;20:667. DOI: 10.3390/ijms20030667.
 30. Blagih J., Buck M.D., Voudsen K.H. p53, cancer and the immune response. *J Cell Sci* 2020;133:jcs237453. DOI: 10.1242/jcs.237453.

Вклад авторов

А.И. Стукань: обзор публикаций по теме статьи, сбор данных для анализа, интерпретация результатов, написание текста;
 О.Ю. Чухрай, С.Д. Максименко: получение данных для анализа;
 Е.Н. Имянитов: получение данных для анализа, критический анализ текста рукописи;
 С.В. Шаров: сбор данных для анализа;
 З.К. Хачмамук: обзор публикаций по теме статьи;
 А.Ю. Горяинова: обзор литературы, интерпретация результатов.

Authors' contributions

A.I. Stukan: review of publications on the topic of the article, data collection for analysis, interpretation of the results, writing the article;
 O.Yu. Chukhray, S.D. Maksimenko: obtaining data for analysis;
 E.N. Imyanitov: obtaining data for analysis, critical analysis of the text of the article;
 S.V. Sharov: data collection for analysis;
 Z.K. Khachmamuk: a review of publications on the topic of the article;
 A.Yu. Goryainova: literature review, interpretation of the results.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.И. Стукань / A.I. Stukan: <https://orcid.org/0000-0002-0698-7710>

О.Ю. Чухрай / O.Yu. Chukhray: <https://orcid.org/0000-0003-3041-520X>

С.Д. Максименко / S.D. Maksimenko: <https://orcid.org/0000-0003-2515-9125>

Е.Н. Имянитов / E.N. Imyaninov: <https://orcid.org/0000-0003-4529-7891>

С.В. Шаров / S.V. Sharov: <https://orcid.org/0000-0002-8715-2992>

З.К. Хачмамук / Z.K. Khachmamuk: <https://orcid.org/0000-0001-7745-4631>

А.Ю. Горяинова / A.Yu. Goryainova: <https://orcid.org/0000-0001-7127-7945>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Financing. The work was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов. Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет». Пациентки подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights. The study protocol was approved by the Biomedical Ethics Committee of the Kuban State University. The patients signed an informed consent to participate in the study.