

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ «ТОМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

Денисов Евгений Владимирович

ВНУТРИОПУХОЛЕВАЯ МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ  
РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ. КЛИНИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-  
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ

3.1.6 – онкология, лучевая терапия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Научные консультанты:

д.б.н., профессор, член-корр. РАН

Чердынцева Надежда Викторовна

д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ

Перельмутер Владимир Михайлович

Санкт-Петербург, 2022

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ВНУТРИОПУХОЛЕВАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ	22
1.1 Определение внутриопухолевой гетерогенности	22
1.1.1 История изучения внутриопухолевой гетерогенности	24
1.1.2 Типы внутриопухолевой гетерогенности	26
1.1.3 Гипотезы и механизмы формирования внутриопухолевой гетерогенности	28
1.1.4 Роль внутриопухолевой гетерогенности в прогрессии онкологических заболеваний	33
1.1.5 Вклад внутриопухолевой гетерогенности в эффективность противоопухолевой терапии	37
1.1.6 Перспективы противоопухолевой терапии с учётом внутриопухолевой гетерогенности	39
1.2 Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность	43
1.2.1 Определение внутриопухолевой морфологической гетерогенности рака молочной железы	44
1.2.2 Гипотезы формирования внутриопухолевой морфологической гетерогенности рака молочной железы	46
1.2.2.1 Клональная эволюция как причина морфологической неоднородности РМЖ	47
1.2.2.2 Опухолевые стволовые клетки как причина морфологической неоднородности РМЖ	48
1.2.2.3 Опухолевая инвазия как причина морфологической неоднородности РМЖ	48
1.2.2.4 Опухолевое микроокружение как среда для формирования морфологической неоднородности РМЖ	53
1.2.3 Роль внутриопухолевой морфологической гетерогенности в прогрессии рака молочной железы	57

1.2.4 Вклад внутриопухолевой морфологической гетерогенности в эффективность терапии рака молочной железы	58
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	62
2.1 Клинико-патологические характеристики больных раком молочной железы	62
2.2 Дизайн исследования	68
2.3 Методы исследования	68
2.3.1 Морфологический анализ	68
2.3.2 Иммунофлюоресцентное окрашивание	69
2.3.3 Лазерная микродиссекция	74
2.3.4 Полногеномная амплификация и микроматричная сравнительная геномная гибридизация	77
2.3.5 Выделение РНК	77
2.3.6 Полнотранскриптомная амплификация и микроматричное экспрессионное профилирование	78
2.3.7 Полнотранскриптомная амплификация и количественная ПЦР	80
2.3.8 РНК-секвенирование	82
2.3.9 Статистическая обработка данных	84
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	86
3.1 Пространственная организация морфологических структур РМЖ	86
3.2 Количество опухолевых стволовых клеток в морфологических структурах РМЖ	88
3.3 Цитогенетический профиль морфологических структур РМЖ	92
3.4 Транскрипционный профиль морфологических структур РМЖ	97
3.4.1 Схожесть одного и того же типа морфологических структур по экспрессионному профилю	97
3.4.2 Общие и специфические гены для разных типов морфологических структур	100
3.4.3 Биологические процессы и сигнальные пути, выраженные в морфологических структурах РМЖ	104

3.5 Особенности микроокружения морфологических структур РМЖ	109
3.5.1 Частота обнаружения макрофагов и фибробластов в микроокружении морфологических структур РМЖ	110
3.5.2 Количество макрофагов и фибробластов в микроокружении морфологических структур РМЖ	111
3.5.3 Экспрессия генов-регуляторов функционального статуса макрофагов и фибробластов в морфологических структурах РМЖ	113
3.6 Метастатический фенотип морфологических структур РМЖ	117
3.6.1 Экспрессия генов эпителиального и мезенхимального фенотипов в морфологических структурах РМЖ	118
3.6.2 Сигнальные пути клеточной миграции и инвазии в морфологических структурах РМЖ	121
3.6.3 Частота лимфогенного и гематогенного метастазирования у больных РМЖ, не получавших НАХТ, в зависимости от ВОМГ	125
3.6.4 Частота лимфогенного и гематогенного метастазирования у больных РМЖ, получавших НАХТ, в зависимости от ВОМГ	125
3.7 Химиорезистентный фенотип морфологических структур РМЖ	132
3.7.1 Экспрессия генов химиорезистентности в морфологических структурах РМЖ	132
3.7.2 Морфологическое строение химиорезистентных опухолей молочной железы	141
3.8 Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность как модель для идентификации маркёров метастазирования РМЖ	145
3.8.1 Поиск маркеров инвазии РМЖ	145
3.8.2 Ассоциация экспрессии KIF14, MIEAP и EZR с гематогенным метастазированием РМЖ	150
3.8.3 Коэкспрессия KIF14, MIEAP и EZR в торпедоподобных структурах РМЖ	154
3.8.4 Транскрипционные особенности KIF14- и MIEAP-позитивных клеток и EZR-негативных клеток РМЖ	155

3.9 Модель формирования ВОМГ: ассоциация с прогрессией РМЖ и эффективностью химиотерапии	164
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	171
ВЫВОДЫ	184
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	187
ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ДАННОЙ ТЕМЫ	188
СОКРАЩЕНИЯ И УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ	190
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	192
ПРИЛОЖЕНИЕ	228

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность темы исследования**

Рак молочной железы (РМЖ) является ведущей онкологической патологией у женщин. В структуре смертности женщин от онкологических заболеваний РМЖ также имеет наибольший удельный вес [13, 94]. Такая удручающая статистика напрямую связана как с проблемами ранней диагностики заболевания, так и с низкой эффективностью терапии и отсутствием высокоэффективных методов предсказания и предотвращения риска прогрессирования РМЖ, неудачи в разработке которых во многом объясняются внутриопухолевой гетерогенностью данного заболевания.

Внутриопухолевая гетерогенность (ВОГ) представляет собой феномен сосуществования в пределах опухоли клеток как опухолевых, так и иммунных и стромальных с различными биологическими характеристиками. ВОГ вносит большой вклад в рост опухоли, инвазию, лимфогенное и гематогенное метастазирование, рецидивирование и рассматривается как ключевой фактор, определяющий развитие новообразования, поддержание онкогенного потенциала, выживание опухолевых клеток в условиях динамичного микроокружения и их устойчивость к лекарственному воздействию [209, 214, 278].

Выделяют три типа ВОГ: генетическая, эпигенетическая, и фенотипическая. Генетическая ВОГ проявляется в наличии опухолевых клеток с различными генными мутациями и хромосомными абберациями [82]. Эпигенетическая ВОГ подразумевает различия опухолевых клеток в профиле метилирования ДНК, модификации гистонов и экспрессии некодирующих РНК [34, 129]. Фенотипическая ВОГ наблюдается на уровне различий опухолевых клеток в размере, форме, рецепторном статусе, дифференцировке, паттернах инвазии и т.д. [46, 213].

Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность (ВОМГ), являющаяся вариантом фенотипической ВОГ, встречается при большинстве онкологических заболеваний и представляет собой наличие в пределах

опухоли различных морфологических (гистологических / инвазивных / инфильтративных) структур, отражающих специфические пространственные формирования опухолевых клеток. В опухоли может быть представлен какой-то один тип морфологических структур, либо несколько вариантов сразу. В зависимости от преобладания определенного варианта морфологических структур в опухоли, злокачественные новообразования классифицируют на гистологические подтипы, характеризующиеся индивидуальным прогнозом и ответом на терапию [49, 307]. Оценка количества определённых структур в ткани опухоли используется для установления степени злокачественности (tumor grading) злокачественных новообразований [47, 146]. Наличие определённых морфологических особенностей в опухолевой ткани ассоциировано с прогнозом клинического течения заболевания и ответом на лечение [122, 347]. Комплексная оценка морфологического строения злокачественных новообразований с помощью подходов машинного обучения позволяет предсказывать молекулярный профиль опухолевых клеток [45, 161].

Инвазивная карцинома неспецифического типа (от англ. *invasive carcinoma of no special type, IC NST*), составляющая основную долю РМЖ (до 80% всех случаев) демонстрирует значительную ВОМГ. Инвазивный компонент опухолевой ткани молочной железы представлен одиночными опухолевыми клетками и структурами опухолевых клеток различных форм и размеров [10, 18, 175]. Тубулярные (также описываемые как “*hollow-like*”) структуры образованы опухолевыми клетками, стоящими в 1-2 ряда и формирующими подобие трубок. Определение количества тубулярных структур в опухоли используется для оценки степени злокачественности РМЖ [47]. Солидные структуры представлены полями разной величины и формы, включающими сотни опухолевых клеток. Трабекулярные структуры, часто описываемые в англоязычной литературе как “*cords of tumor cells*”, сформированы 1-3 рядами опухолевых клеток. Альвеолярные (“*morula-like*”) структуры – это скопления округлой формы, насчитывающие до 30

опухолевых клеток. Дискретные группы представлены как отдельными опухолевыми клетками, так и их скоплениями (2-5 клеток). Количество различных типов морфологических структур в опухолевой ткани варьирует от случая к случаю [10, 17, 18]. Реже встречаются структуры по типу карциноида и комедо-некроза (“comedo”), а также крибровые, папиллярные и микропапиллярные формирования опухолевых клеток, представляющие собой внутрипротоковые компоненты [175]. Выделяют также так называемые "опухолевые почки" (tumor buds), представляющие собой одиночные опухолевые клетки и/или небольшие кластеры (2-6 клеток), расположенные на инвазивном фронте опухоли [184, 206, 294].

В настоящее время данные о природе внутриопухолевой морфологической гетерогенности РМЖ немногочисленны, отсутствуют сведения о механизмах формирования и специфических маркерах различных структур опухолей молочной железы. С одной стороны, можно предположить, что развитие ВОМГ при РМЖ связано с клональной эволюцией, где различные морфологические структуры являются генетически-обособленными популяциями опухолевых клеток со специфическими нарушениями, предопределяющими их форму. Ранее связь морфологического разнообразия опухоли и клональной эволюции была показана для IC NST трижды-негативного подтипа и метапластического РМЖ [112, 253]. При этом морфологические особенности опухолей молочной железы связаны не только с изменениями генома, но и с уровнем метилирования ДНК, экспрессии микроРНК и различных генов, в т.ч. входящих в мультиплексную прогностическую панель PAM50 [135]. С другой стороны, не исключается вклад опухолевых стволовых клеток (ОСК) в формирование морфологических структур. Известно, что  $CD44^+CD24^-$  ОСК преобладают в базальноподобных опухолях молочной железы с низкодифференцированным инфильтративным компонентом, который в основном представлен солидными структурами [134, 138]. Помимо этого, морфологически обособленные формирования опухолевых клеток могут



указывать на специфические паттерны инвазивного роста. Согласно литературным данным, опухолевая инвазия может реализовываться через миграцию одиночных клеток (индивидуальная инвазия), либо групп клеток (коллективная инвазия) [101, 102]. Механизмы инвазии опухолевых клеток также различны: клетки могут двигаться по образу и подобию фибробластов (мезенхимальное движение) либо лейкоцитов (амебовидное движение) [101, 102]. Различные молекулы, главным образом белки актинового цитоскелета и адгезии, вовлечены в регуляцию и реализацию клеточной миграции и могут предопределять морфогенез опухолевых клеток [22, 101, 102, 247].

ВОМГ ассоциирована с прогрессированием РМЖ и эффективностью противоопухолевой терапии. Комплексный анализ морфологического строения ткани опухоли и генной экспрессии в опухолевых клетках обладает прогностической значимостью в отношении выживаемости больных трижды-негативным РМЖ [319]. Оценка морфологии опухолевой ткани, ассоциированной с экспрессией рецептора эпидермального фактора роста Her2/ERBB2, позволяет предсказывать эффективность терапии трастузумабом и выживаемость больных РМЖ [57]. Непосредственные и отдаленные результаты лекарственного лечения больных РМЖ также связаны с наличием и количеством определённых типов морфологических структур в ткани опухоли. Наличие "опухолевых почек" (tumor buds) ассоциировано с большим размером опухоли, лимфоваскулярной инвазией, низкой безрецидивной и общей выживаемостью больных РМЖ [184, 206, 294, 316]. Опухолевая прогрессия в целом (размер опухоли и частота лимфогенного и гематогенного метастазирования) более выражена в случаях с большим количеством различных типов морфологических структур [17]. Частота лимфогенного метастазирования возрастает по мере увеличения процента альвеолярных структур в инфильтративном компоненте РМЖ [10]. Показатель количественного отношения трабекулярных структур к тубулярным, равный двум, свидетельствует о повышении риска одиночного метастазирования (либо в кости, либо в печень) в 3 раза, а сочетанного (в

кости и печень одновременно) в 5 раз по сравнению со значением коэффициента, равным единице [18]. У пременопаузальных больных с рецидивами в послеоперационном рубце чаще встречаются солидные или альвеолярные структуры, тогда как случаи с рецидивированием вне рубца характеризуются частым присутствием трабекулярных формирований [3]. Наличие альвеолярных структур и высокое морфологическое разнообразие опухолей молочной железы ассоциировано с резистентностью к неoadъювантной химиотерапии [8]. Однако, молекулярные факторы и механизмы, которые могли бы объяснить ассоциацию морфологических структур с риском прогрессирования РМЖ и эффективностью химиотерапии, в настоящее время не известны.

Таким образом, актуальность исследования природы ВОМГ при РМЖ и её вклада в опухолевую прогрессию и эффективность лечения не вызывает сомнений. Литературные данные и собственные предположения диктуют направление изучения в плане понимания вклада клональной эволюции, ОСК, инвазивного роста и опухолевого микроокружения в механизмы развития ВОМГ. Принимая во внимание ассоциацию ВОМГ с прогрессированием РМЖ и эффективностью химиотерапии, использование такого комплексного подхода позволит выявить конкретные молекулы, связанные с агрессивностью течения данного заболевания. В целом, данное исследование позволит создать платформу для разработки новых высокоинформативных критериев предсказания эффективности химиотерапии и оценки риска прогрессирования РМЖ и поиска новых терапевтических мишеней.

### **Степень разработанности темы**

Внутриопухолевая гетерогенность, впервые упоминаемая ещё в трудах немецкого патолога Давида Ганземана в 1890 г. и описываемая на морфологическом уровне на протяжении 1950 – 1990-х годов, приобрела наибольшую популярность и актуальность в 21-м веке, когда в практике

онкологических исследований стали широко применяться молекулярно-генетические методы. Именно в это время наблюдается всплеск исследований внутриопухолевой генетической гетерогенности, который привел к появлению и экспериментальной валидации двух основных гипотез её развития – роли клональной эволюции и опухолевых стволовых клеток – и демонстрации её вклада в метастазирование, рецидивирование и эффективность терапии злокачественных новообразований.

Значительно меньший прогресс достигнут в изучении внутриопухолевой морфологической гетерогенности злокачественных новообразований, в частности для инвазивной карциномы неспецифического типа, являющейся наиболее часто встречающейся гистологической формой РМЖ. Несколькими исследованиями показана зависимость эффективности НАХТ [8], лимфогенного [9, 10] и гематогенного [18] метастазирования и рецидивирования [3, 15] РМЖ от внутриопухолевой морфологической гетерогенности. Обнаружены различия в пролиферативном потенциале различных морфологических структур [6] и выраженности воспалительного инфильтрата между ними [6, 15]. Показана зависимость количества типов морфологических структур от локализации и синхронности/метахронности РМЖ [7, 11]. Тем не менее, ничего не известно о природе внутриопухолевой морфологической гетерогенности. Данное обстоятельство послужило основанием для проведения исследования, направленного на изучение биологической природы внутриопухолевой морфологической гетерогенности и идентификацию факторов её вклада в эффективность НАХТ и прогрессию РМЖ.

**Цель:** выявить клеточные и молекулярно-генетические факторы, ассоциированные с формированием внутриопухолевой морфологической гетерогенности инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа и её вкладом в эффективность неoadъювантной химиотерапии и метастазирование.

### **Задачи:**

1. Оценить пространственную организацию различных морфологических структур инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа.
2. Изучить связь внутриопухолевой морфологической гетерогенности инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа с хромосомными нарушениями и с наличием опухолевых стволовых клеток.
3. Изучить клеточный состав микроокружения различных морфологических структур инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа и их транскрипционный потенциал регуляции иммуно-воспалительных реакций.
4. Изучить транскрипционный профиль различных морфологических структур инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа.
5. Определить транскрипционный профиль химиорезистентности и инвазивности различных морфологических структур инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа.
6. Изучить ассоциацию различных морфологических структур с эффективностью неоадьювантной химиотерапии и риском метастазирования инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа.
7. Идентифицировать молекулярные факторы, ассоциированные с метастазированием инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа, на основе анализа генетических и транскрипционных особенностей внутриопухолевой морфологической гетерогенности.

### **Научная новизна исследования**

Впервые определена молекулярно-генетическая природа внутриопухолевой морфологической гетерогенности при инвазивной карциноме молочной железы неспецифического типа. Установлено, что формирование различных морфологических структур носит неклональный

характер и ассоциировано со стволовостью, эпителиально-мезенхимальным переходом и инвазивным ростом.  $CD44^+CD24^-$  опухолевые стволовые клетки преобладают в многоклеточных структурах, главным образом в альвеолярных структурах, и практически отсутствуют в дискретных группах опухолевых клеток. Количество экспрессирующихся генов мезенхимального фенотипа возрастает в ряду: альвеолярные, тубулярные, солидные, трабекулярные и дискретные группы опухолевых клеток.

Впервые показано, что различные морфологические структуры рака молочной железы характеризуются специфическим микроокружением. Установлено, что опухоль-ассоциированные макрофаги и фибробласты чаще встречаются вблизи солидных структур и дискретных групп опухолевых клеток.

Впервые для каждого типа морфологических структур описан метастатический и химиорезистентный фенотипы, проведено их сопоставление с вкладом в метастазирование и эффективность неоадьювантной химиотерапии и выделены новые маркеры для оценки риска прогрессирования рака молочной железы. Альвеолярные структуры с выраженным  $CD44^+CD24^-$  стволовым фенотипом и экспрессирующие большее количество генов химиорезистентности, а также трабекулярные структуры с выраженным мезенхимальным фенотипом, ассоциированы с высокой частотой лимфогенного и гематогенного метастазирования (патенты RU 2623150 и 2627649), низкой безметастатической выживаемостью и чаще встречаются в опухолях, устойчивых к неоадьювантной химиотерапии.

Впервые описаны торпедоподобные структуры инвазивного компонента опухолевой ткани молочной железы, состоящие из двух-трех параллельных рядов опухолевых клеток и представляющие образования вытянутой, преимущественно треугольной формы с широким основанием и заостренным концом. Впервые показана прогностическая ценность экспрессии белков KIF14, MIEAP (SPATA18) и EZR на концах торпедоподобных структур в

отношении вероятности гематогенного метастазирования рака молочной железы.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Результаты диссертационного исследования предоставляют информацию о клеточных и молекулярных факторах, ассоциированных с развитием внутриопухолевой морфологической гетерогенности рака молочной железы и её вкладом в опухолевую прогрессию и эффективность химиотерапии. Формирование различных морфологических структур не связано с хромосомными aberrациями, а ассоциировано с экспрессией генов эпителиально-мезенхимального перехода, наличием  $CD44^+CD24^-$  опухолевых стволовых клеток и опухоль-ассоциированных макрофагов и фибробластов. Различия в степени выраженности  $CD44^+CD24^-$  стволовости и эпителиальных и мезенхимальных характеристик, а также в экспрессии генов химиорезистентности, вероятно, являются причиной дифференциального вклада морфологических структур в лимфогенное и отдаленное метастазирование рака молочной железы и эффективность неоадьювантной химиотерапии.

Оценка внутриопухолевой морфологической гетерогенности представляет собой простой и информативный метод определения вероятности прогрессирования рака молочной железы. Присутствие в опухоли альвеолярных и трабекулярных структур ассоциировано с высоким риском отдаленного метастазирования рака молочной железы у больных, получавших неоадьювантную химиотерапию. При этом альвеолярные структуры ассоциированы с гематогенным метастазированием только при отсутствии ответа на химиотерапию, тогда как связь трабекулярных структур с опухолевой прогрессией характерна для пациенток, чувствительных к химиолечению.

Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность представляет собой привлекательную модель для изучения клеточных и молекулярных

особенностей метастазирования рака молочной железы. В этом плане сравнительный анализ транскриптома морфологических структур, различающихся по степени выраженности экспрессии генов, вовлеченных в регуляцию эпителиально-мезенхимального перехода, является эффективным инструментом для поиска маркеров инвазии и метастазирования рака молочной железы. Так, с использованием данного подхода выделены гены *KIF14*, *SPATA18* (MIEAP) и *EZR*, оценка особенностей белковой экспрессии которых в опухолевой ткани позволила обнаружить новый тип морфологических структур – торпедоподобные структуры и показать их прогностическую значимость в отношении риска гематогенного метастазирования рака молочной железы.

### **Методология и методы исследования**

В качестве материала исследования были формалин-фиксированные парафин-залитые (FFPE) и свежие образцы ткани инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа. Исследование проводилось с помощью гистологических, иммуногистохимических и молекулярно-генетических методов. Полученные данные обрабатывались с использованием биоинформатических и статистических методов. Гематоксилин и эозин-окрашенные срезы FFPE образцов опухоли и световая микроскопия использовались для анализа представленности различных типов морфологических структур в образцах опухолевой ткани. Иммуноокрашенные срезы FFPE образцов опухоли и конфокальная микроскопия использовались для оценки пространственной организации морфологических структур, наличия CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> опухолевых стволовых клеток в различных морфологических структурах и опухоль-ассоциированных макрофагов и фибробластов в их микроокружении. Гематоксилин и эозин-окрашенные срезы свежих образцов ткани опухоли и лазерная микродиссекция использовались для получения различных морфологических структур. Сравнительная геномная гибридизация и

полнотранскриптомный анализ на основе микроматриц применялись для цитогенетического и экспрессионного профилирования микродиссектированных морфологических структур. Данные полнотранскриптомного анализа использовались для сравнительной характеристики различных морфологических структур по экспрессии генов, вовлеченных в инвазию, в частности в эпителиально-мезенхимальный переход, и в химиорезистентность. Инвазивный и химиорезистентный фенотип каждого типа морфологических структур сравнивался с их вкладом в вероятность метастазирования рака молочной железы и эффективность неoadьювантной химиотерапии. Транскриптом морфологических структур с выраженным мезенхимальным фенотипом служил основой для поиска маркеров инвазии и риска гематогенного метастазирования рака молочной железы. РНК-секвенирование, совмещенное с лазерной микродиссекцией в режиме флуоресценции, использовалось для изучения транскриптома опухолевых клеток, экспрессирующих маркеры высокого риска метастазирования. На основании полученных результатов были предложены рекомендации по оценке внутриопухолевой морфологической гетерогенности и ассоциированных маркеров в клинической практике с целью предсказания риска прогрессии рака молочной железы и эффективности химиотерапии.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа не связана с хромосомными нарушениями. Морфологические структуры представляют собой транскрипционно-обособленные популяции клеток, отличающиеся друг от друга экспрессией генов эпителиального и мезенхимального фенотипов, выраженностью сигнальных путей опухолевой инвазии и долей CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> опухолевых стволовых клеток.



2. Микроокружение различных типов морфологических структур инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа и их транскрипционный потенциал регуляции иммунно-воспалительных реакций различны.

3. Альвеолярные и трабекулярные структуры ассоциированы с эффективностью неоадьювантной химиотерапии больных инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа. Химиорезистентность альвеолярных структур связана с высоким количеством CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> опухолевых стволовых клеток, трабекулярных – с выраженным эпителиально-мезенхимальным переходом.

4. Альвеолярные и трабекулярные структуры ассоциированы с гематогенным метастазированием у больных инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа, получавших неоадьювантную химиотерапию. Ассоциация альвеолярных структур с гематогенным метастазированием характерна только для больных раком молочной железы с отсутствием ответа на неоадьювантную химиотерапию, а трабекулярных структур – для пациентов с химиочувствительными опухолями.

5. Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность является эффективной моделью для изучения клеточных и молекулярных особенностей инвазии и метастазирования инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Результаты диссертационного исследования достоверны и обоснованы, что обеспечивается достаточным количеством исследованного материала. В исследование включено 700 больных раком молочной железы. В работе использовались современные гистологические, иммуногистохимические и молекулярно-генетические методы и адекватные методы биоинформатического и статистического анализа данных.

Результаты диссертационной работы были представлены на 3-м Норвежском симпозиуме по раку "Рост и пролиферация: молекулярные регуляторы рака" (Осло, 2011), конференции по раку молочной железы ИМРАКТ (Брюссель, 2013), I Международной конференции "Высокопроизводительное секвенирование в геномике" (Новосибирск, 2013), Всероссийской научной школе-конференции для молодых ученых РАМН «Современная онкология: достижения и перспективы» (Новосибирск, 2013), VI съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Ростов-на-Дону, 2014), 23-м конгрессе Европейской ассоциации исследования рака (Мюнхен, 2014), Международной молодежной научной конференции «Современные проблемы генетики, клеточной биологии и биотехнологии» (Томск, 2014), конференции "Прощай плоская биология: 3D модели и опухолевое микроокружение" (Берлин, 2014), VII съезде Российского общества медицинских генетиков (Санкт-Петербург, 2015), конференции ЕМВО «Клеточные и молекулярные механизмы взаимоотношения опухоли и микроокружения» (Томск, 2015), Международной научной конференции "Хромосома 2015" (Новосибирск, 2015), конференции Национального института исследования рака (Ливерпуль, 2015), Международных конференциях "Физика рака: трансдисциплинарные проблемы и клиническое применение" (Томск, 2016, 2017), 10-й Международной конференции по биоинформатике регуляции и структуры геномов и системной биологии (Новосибирск, 2016), XX-XXI Российском онкологическом конгрессе (Москва, 2016), 28-м симпозиуме EORTC-NCI-AACR по молекулярным мишеням и терапии рака (Мюнхен, 2016), 3-м и 4-м Международных симпозиумах Лионского центра исследования рака (Лион, 2017, 2019), 1-й конференции EACR-MRS "Семена и почва: *in vivo* модели метастазирования" (Берлин, 2017), 22-й Международной конференции им. Чарльза Хайдельберга (Томск, 2018), 45-м конгрессе Международного общества онкологии и биомаркеров (Гамбург, 2018), Сателлитном симпозиуме V Всероссийской конференции по молекулярной онкологии (Москва, 2018), I-III Научно-

практических школах «Секвенирование единичных клеток» (Томск, 2019-2021), Научно-практической конференции «Фундаментальная и клиническая онкология: достижения и перспективы развития» (Томск, 2019), 6-й конференции ZOO “Клеточная адгезия и миграция при воспалении и раке” (Роттердам, 2019), V конгрессе с международным участием “Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное” (Санкт-Петербург, 2020), III Байкальском медицинском молодежном форуме (Улан-Удэ, 2021).

Диссертационная работа была выполнена при финансовой поддержке ФЦП "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 гг." (проекты № 16.740.11.0606 “Идентификация молекулярно-генетических маркеров морфологической гетерогенности опухолей молочной железы” и № 8595 “Роль генетической компоненты в развитии внутриопухолевой морфологической гетерогенности рака молочной железы”), Гранта Президента РФ (№ 16.120.11.1259-МК “Идентификация опухоль-стромальных особенностей химиорезистентности и химиочувствительности рака молочной железы”) и Российского научного фонда (№ 14-15-00318 “Клонально-инвазивная архитектура опухоли как новая исследовательская платформа для разработки предиктивных и прогностических критериев рака молочной железы”).

### **Внедрение результатов**

Результаты диссертационного исследования внедрены и используются в экспериментальной работе лаборатории биологии опухолевой прогрессии, отделения общей и молекулярной патологии и отделения общей онкологии Научно-исследовательского института онкологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (акт внедрения от 11.02.2022 г.).

## **Личное участие автора в получении результатов**

Автором самостоятельно изучена литература по тематике исследования, сформулированы цель и задачи диссертационной работы и проведено планирование экспериментов. Самостоятельно сформированы исследуемые группы больных инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа, выполнена лазерная микродиссекция различных морфологических структур из срезов опухолевой ткани молочной железы, выделены из части микродиссектированного материала образцы РНК и принято участие в постановке микроматричного экспрессионного анализа. В сотрудничестве с сотрудниками НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ автором разработан протокол совмещения полногеномной амплификации микродиссектированных образцов и микроматричной сравнительной геномной гибридизации и выполнены соответствующие эксперименты. В сотрудничестве с сотрудниками отделения общей и молекулярной патологии НИИ онкологии Томского НИМЦ автором разработан протокол иммуноокрашивания срезов опухолевой ткани молочной железы, минимизирующий деградацию РНК, и выполнена лазерная микродиссекция части образцов опухолевых клеток, позитивных и негативных по экспрессии белков KIF14, MIEAP и EZR. Автором самостоятельно подобран протокол подготовки кДНК-библиотек из образцов РНК, полученных из микродиссектированного материала иммуноокрашенных срезов ткани опухоли молочной железы, и выполнены запуски РНК-секвенирования на приборе NextSeq500. Самостоятельно проведена статистическая обработка данных исследования, анализ и обсуждение полученных результатов и подготовлен иллюстративный материал.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Основные результаты работы, научные положения и выводы, описанные в диссертационной работе, соответствуют паспорту специальности «3.1.6 – Онкология, лучевая терапия» («биологические науки»).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликованы 63 работы, в том числе 18 статей в журналах, рекомендованных Перечнем ВАК РФ. Имеется 2 патента РФ на изобретение, 1 свидетельство о регистрации базы данных.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 256 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы и приложения. Библиографический указатель включает 358 публикаций, в том числе 22 отечественных и 336 иностранных авторов. Работа иллюстрирована 26 таблицами и 41 рисунком.

## ГЛАВА 1. ВНУТРИОПУХОЛЕВАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ

Опухолевая гетерогенность – это одна из ключевых характеристик злокачественных новообразований. В то же время, гетерогенность опухоли представляет важнейшую проблему при лечении онкологических заболеваний ввиду её значительной роли в инвазии, метастазировании и рецидивировании и влияния на эффективность химио-, радио- и таргетной терапии.

Традиционно, выделяют несколько уровней опухолевой гетерогенности (Рисунок 1), когда различия наблюдаются между опухолями одинакового происхождения как у разных пациентов (межиндивидуальная гетерогенность), так и у одного больного (внутрииндивидуальная гетерогенность), а также между опухолевыми клетками в пределах первичного (внутриопухолевая гетерогенность, ВОГ) или метастатического (внутриметастатическая) очага. Внутрииндивидуальная гетерогенность обнаруживается в случаях, когда различия обнаруживаются между первичной опухолью и рецидивом либо метастазами. Известно, что метастазы, произошедшие из одной опухоли, также отличаются друг от друга (внутрииндивидуальная межметастатическая гетерогенность).

### 1.1 Определение внутриопухолевой гетерогенности

ВОГ подразумевает наличие каких-либо биологических различий между опухолевыми клетками в пределах одной первичной опухоли. Этот термин также используется для обозначения разнообразия в пределах опухолевого микроокружения, а именно различий между эндотелиальными, стромальными и воспалительными клетками. Выделяют 10 ключевых характеристик, которые лежат в основе ВОГ: активация сигнальных путей, избегание иммунного надзора, индукция старения, продукция факторов роста, клеточная миграция, метастазирование, ангиогенез, генетическая нестабильность, ответ на противоопухолевую терапию, и метаболизм [27]. Каждая из этих характеристик может варьировать по степени выраженности

между опухолевыми клетками одной опухоли или между опухолями одного происхождения [27].

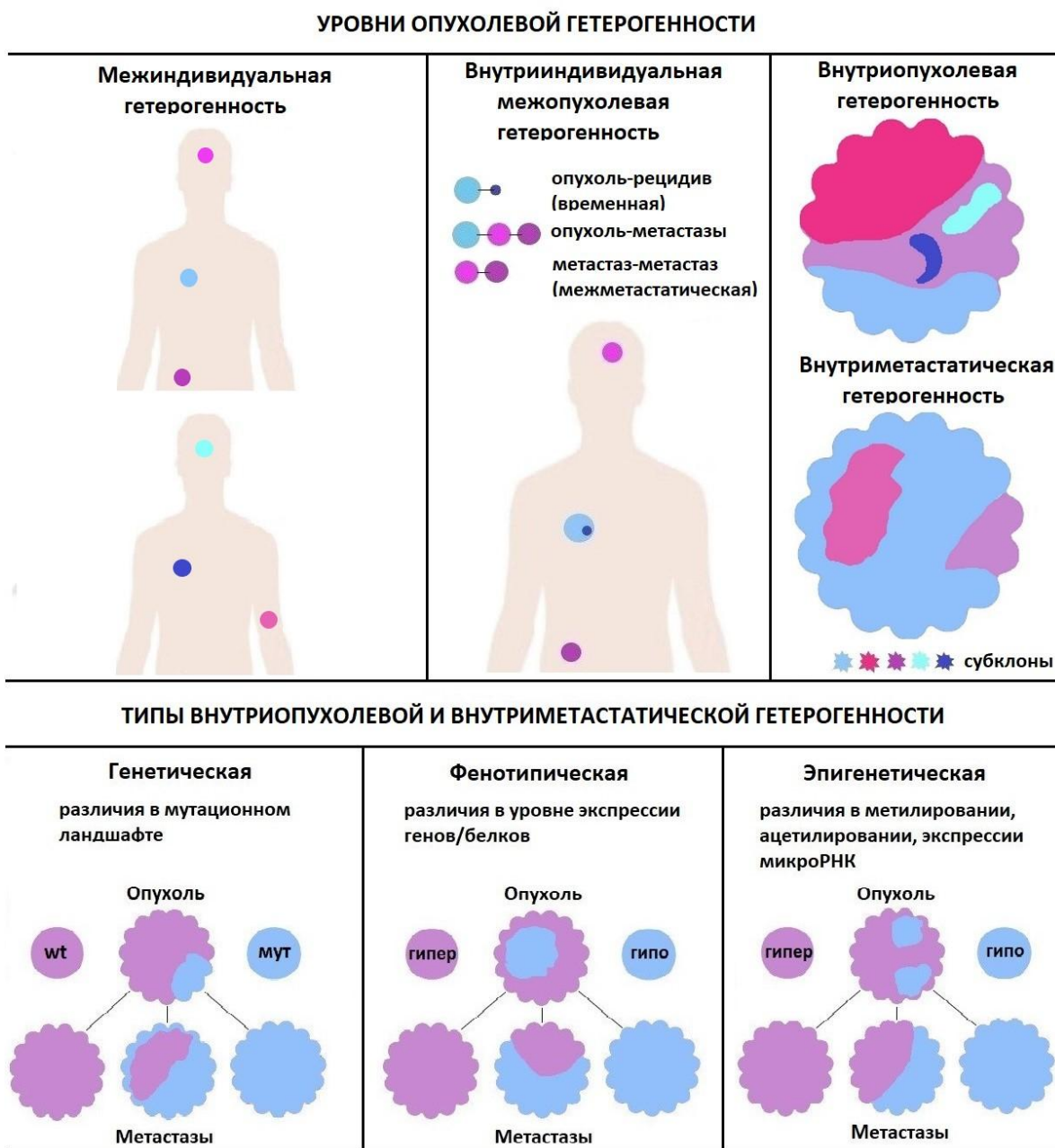


Рисунок 1 – Уровни и типы опухолевой гетерогенности (согласно [125] с собственными модификациями). Wt (от англ. wild-type) – дикий тип (отсутствие мутаций); мут – мутации; гипер – гиперэкспрессия/гиперметилирование; гипо – гипоекспрессия/гиперметилирование.

Фактически, под ВОГ подразумевается наличие различных популяций опухолевых клеток (клонов), которые занимают специфические “ниши” в микроокружении опухоли, характеризуются индивидуальным “поведением” и постоянно взаимодействуют друг с другом и окружающими их неопухолевыми клетками [296]. Такие взаимодействия могут быть как негативными (конкуренция, каннибализм и т.д.), так и позитивными (мутуализм, синергизм и др.) и в значительной степени влияют на прогрессирование рака и эффективность терапии [255, 296]. Например, опухолевые клетки могут кооперировать друг с другом для более продуктивной инвазии и метастазирования [65, 257, 287, 296], тогда как конкуренция и клеточный каннибализм, вероятно, являются стратегиями выживания клеток рака или метастазов в неблагоприятных условиях среды [93, 96, 204]. Реципрокные взаимодействия между различными клонами способствуют усиленному росту опухоли и снижают чувствительность к терапии [245]. ВОГ динамически изменяется в процессе развития рака и имеет тенденцию к увеличению в процессе роста опухоли [46, 56]. Так, популяционная структура опухоли может изменяться под влиянием химиотерапии, которая либо полностью уничтожает опухолевые клетки, либо убивает только чувствительные клоны, предоставляя благоприятные условия для пролиферации резистентных клеток и, таким образом, изменяя фенотип опухоли в целом [95, 163, 277].

Таким образом, гетерогенную опухоль можно рассматривать как динамичную и эволюционирующую экосистему, структура которой варьирует при изменении селективного давления факторов внешней и внутренней среды [268, 296].

### 1.1.1 История изучения внутриопухолевой гетерогенности

Проблема ВОГ приобрела наибольшее значение в последние годы вследствие огромного прогресса в области высокопроизводительного секвенирования и исследований, проводимых на единичных клетках (от англ.



single-cell studies), которые предоставили колоссальный объем данных относительно генетического ландшафта опухолей. Однако, первые упоминания о гетерогенности рака прослеживаются еще на заре фундаментальной и клинической онкологии. Гетерогенность опухолей была описана Иоганном Мюллером, первым онкопатологом, который впервые в 1883 г. применил методы микроскопии для анализа образцов опухолей человека. Позднее его ассистент, Рудольф Вирхов, описал “внутриопухолевый плеоморфизм раковых клеток” (от англ. "intratumoral pleomorphism of cancer cells"). Коллега Р. Вирхова, Давид фон Ганземан установил, что многие опухоли имеют различную структуру в разных участках и описал так называемую “степень манифестации или дедифференцировки” опухолевого процесса, которая может варьировать от одного региона к другому как в пределах первичной опухоли, так и в пределах метастаза [44]. Таким образом впервые была показана внутриопухолевая морфологическая гетерогенность онкологических заболеваний.

В начале 20-го века, известный цитогенетик Теодор Бовери в своей книге “К проблеме происхождения злокачественных опухолей” (1914 г.) допустил, что фенотипические различия между опухолевыми клетками могут быть связаны с хромосомными нарушениями [329].

В 50-х годах прошлого столетия оценка внутриопухолевого морфологического разнообразия вошла в основу гистологической классификации рака молочной железы (РМЖ) по системе Блума-Ричардсона (от англ. Bloom–Richardson grading system), которая используется и по настоящее время для определения степени злокачественности опухоли. Данная классификация подразумевает оценку трёх параметров: количество тубулярных структур в опухолях молочной железы, выраженность ядерного плеоморфизма и доля клеток в состоянии митоза [47].

В 70-х годах 20-го века появилось несколько работ, демонстрирующих различия между опухолевыми клетками в чувствительности к

противоопухолевым агентам в условиях *in vitro* и *in vivo*. Так, химиочувствительность была разной для клеток меланомы [41], саркомы [132] и рака молочной железы [84]. В это же время было сообщено о наличии клеток с различным (диплоидным, тетраплоидным и анеуплоидным) набором хромосом в пределах одной опухоли молочной железы [84]. Т.е. впервые была описана внутриопухолевая генетическая гетерогенность.

В 1976 году Питер Новелл опубликовал важнейшую работу, в которой осветил ключевую концепцию в онкологии: “Опухоль инициируется посредством индуцированного изменения в одиночной, ранее нормальной клетке, которое делает её неопластической и предоставляет селективное преимущество в росте над соседними здоровыми клетками. Со временем, эволюционный процесс приводит к последовательному отбору сублиний (от англ. *sublines*), которые становятся всё больше ненормальными как генетически, так и биологически” [242]. Другими словами Питер Новелл впервые подчеркнул ключевую роль клональной эволюции в канцерогенезе и формировании ВОГ.

Спустя 20 лет, в 1996 году, коллективом авторов под руководством Сверре Хейм был проведён подробный цитогенетический анализ 125 случаев РМЖ и показана цитогенетическая поликлональность опухолей, т.е. наличие клонов опухолевых клеток с различными изменениями кариотипа и хромосомными абберациями. Такая поликлональность чаще встречалась в опухолях молочной железы с большей степенью злокачественности [246].

С 2000 года и по настоящее время, в связи с широким внедрением методов секвенирования в исследовательскую практику, появились сотни и тысячи исследований, показавших и охарактеризовавших различные типы ВОГ (подробно рассмотрены ниже).

### 1.1.2 Типы внутриопухолевой гетерогенности

Выделяют три типа ВОГ: генетическая, эпигенетическая, и фенотипическая (Рисунок 1). Геномная нестабильность приводит к

формированию генетической ВОГ посредством увеличения мутабельности и появления опухолевых клонов со специфическими генными мутациями и хромосомными aberrациями [56, 82]. Эпигенетическая ВОГ возникает вследствие изменений в структуре хроматина (метилирование ДНК и модификация гистонов) и экспрессии некодирующих РНК [34, 129]. Всё это приводит к формированию опухолевых клонов, несущих уникальные эпигенетические профили. Генетическая и эпигенетическая ВОГ являются ресурсом для клональной эволюции рака. Эпигенетические изменения позволяют генетически схожим опухолевым клеткам динамично модулировать клеточный гомеостаз, регулировать сигналинги и изменять фенотипы [34, 129]. Кроме того, модификации в эпигенетическом ландшафте могут регулировать фенотипическое проявление различных генетических нарушений, возникающих в процессе эволюции опухоли [34, 129].

Фенотипическая ВОГ наблюдается на уровне различий опухолевых клеток в размере, форме, рецепторном статусе, дифференцировке, паттернах инвазии и т.д. [46, 213]. Обычно, данный тип гетерогенности является результатом генетической и эпигенетической ВОГ, хотя существуют данные, указывающие на то, что фенотипическая неоднородность не всегда связана с генными и/или хромосомными нарушениями [234]. Так, фенотип опухолевых клеток зависит от особенностей микроокружения и чрезвычайно пластичен, что прослеживается при смене одного клеточного состояния на другое в процессе эпителиально-мезенхимального (ЭМП), мезенхимально-амебоидного и др. переходов [200, 249].

ВОГ, обусловленную негенетическими причинами, классифицируют на детерминированную и стохастическую. Формирование детерминированной ВОГ связано с эпигенетическими нарушениями, реорганизацией хроматина и изменением экспрессии микроРНК. Часто этот вариант ВОГ представляют в виде модели эпигенетического ландшафта, предложенной Конрадом Уэддингтоном в 1957 г. [317]. Согласно данной модели, появление фенотипически различных клеток происходит в пространственно-временных

траекториях, представляющих совокупность внутренних (например, генетический полиморфизм) и внешних (микроокружение опухоли) факторов [90, 209]. Стохастическая гетерогенность подразумевает под собой фенотипические различия между генетически идентичными опухолевыми клетками. Такой тип ВОГ может возникать вследствие случайных изменений в протекании биохимических процессов, а также в ходе кратковременных процессов, ведущих к развитию детерминированной гетерогенности. Стохастические процессы могут провоцировать временную резистентность к терапии, а также способствовать переходу из одного детерминированного состояния в другое [171, 209].

Часто выделяют пространственную ВОГ, когда различия наблюдаются между участками одной и той же опухоли. Предполагается, что различные регионы опухоли представляют собой специфические ниши микроокружения, занятые определёнными клонами опухолевых клеток [150]. Пространственная ВОГ является следствием того, что различные участки микроокружения обеспечивают специфические условия для эволюции опухолевых клонов [56, 150]. Данное утверждение вытекает из работы Gerlinger с соавторами [111], хотя противоречит другим исследованиям, показавшим возможность “перемешивания” опухолевых клеток в пределах опухоли [338].

### 1.1.3 Гипотезы и механизмы формирования внутриопухолевой гетерогенности

Изменение микроокружения, недостаток питательных веществ и кислорода, взаимоотношение опухолевых клеток друг с другом и с окружающими их иммунными и стромальными клетками являются движущими факторами в развитии ВОГ. В настоящее время, существует три основные гипотезы (Рисунок 2), объясняющие механизм формирования ВОГ: гипотеза клональной эволюции, гипотеза мутаторного фенотипа и гипотеза ОСК [235, 274].

Модель клональной эволюции (Рисунок 2), как уже было сказано выше, была предложена Питером Новеллом в 1976 г. [242]. Согласно ей, опухоль образуется из нестволовой клетки, а опухолевая прогрессия происходит посредством увеличения геномной нестабильности и появления и выживания более приспособленных и агрессивных клонов в условиях постоянного давления со стороны внешних факторов. Т.е. основной тезис гипотезы клональной эволюции заключается в том, что появление опухоли и ВОГ происходит благодаря генетическим нарушениям в соматических клетках.

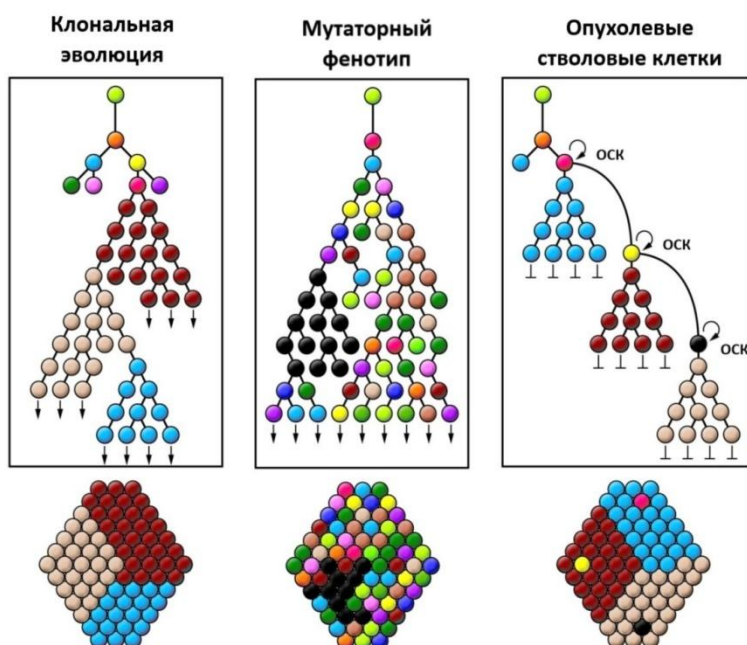


Рисунок 2 – Формирование ВОГ через клональную эволюцию, опухолевые стволовые клетки (ОСК) и мутаторный фенотип [274]. Клоны опухолевых клеток обозначены разными цветами.

В настоящее время клональную эволюцию опухолей рассматривают в рамках теории Чарльза Дарвина (Рисунок 3А), согласно которой наследственная изменчивость является ресурсом для образования новых клеточных клонов, а естественный отбор – платформой для выживания более приспособленных популяций клеток. Представление этого процесса в виде модели "эволюционного дерева" Ч. Дарвина предполагает, что опухолевый

рост подобен растущему дереву, от ствола которого ответвляется множество менее крупных ветвей разного размера, с которыми можно отождествить вновь образующиеся опухолевые клоны, занимающие свои ниши в микроокружении [121, 209, 210, 296] (Рисунок 3Б). При этом появление функционально значимой (драйверной) мутации способствует клональной экспансии, т.е. дивергенции опухолевого клона и образованию эволюционного нового субклона. Напротив, мутации-“пассажиры”, которые возникают чаще и в большем количестве, несмотря на свою нейтральность, вероятно, формируют генетическое русло клональной эволюции и ресурс для появления новых “драйверов”, а также являются основной причиной генетической ВОГ [118, 172]. Мутации-“пассажиры” также определяют молекулярный портрет опухолевых клеток, а их количество может служить инструментом для измерения молекулярного возраста клонов опухоли [308]. Кроме того, предполагается, “пассажиры” являются одной из причин повышенного рекрутирования опухоль-ассоциированных лимфоцитов в ткань опухоли [196].

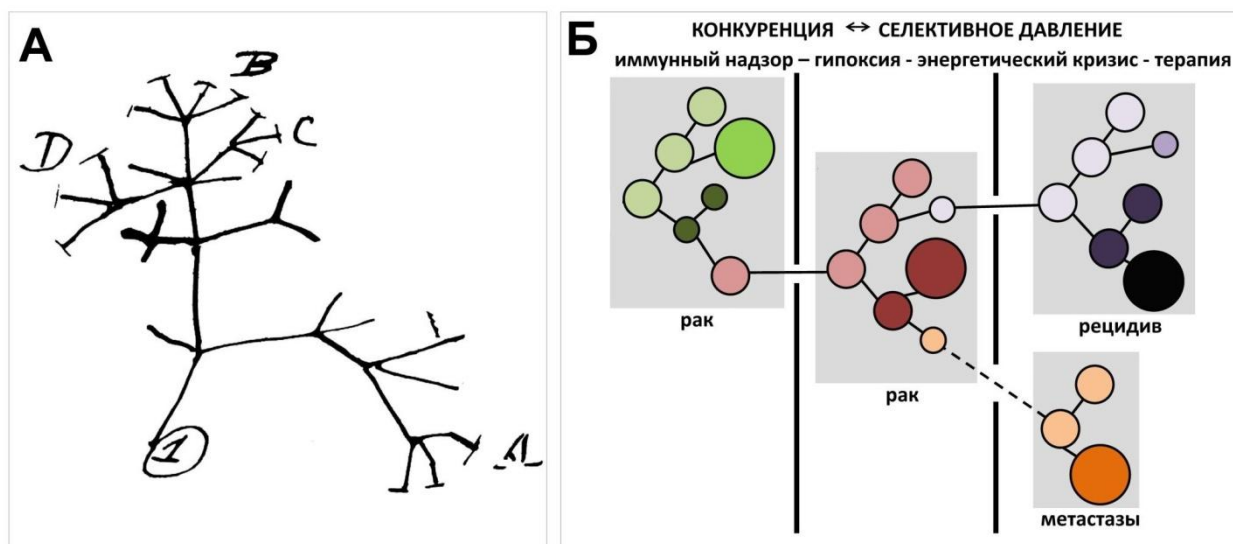


Рисунок 3 – Эволюционное дерево опухоли и формирование ВОГ. А, зарисовка эволюционного дерева жизни из блокнота Ч. Дарвина (1837 г.). Б, эволюционное дерево опухоли. Опухолевые клоны показаны в виде кругов

различных цветов. Размер кругов отражает представленность клонов в опухоли и “объем” микроокружения, занимаемого ими.

По функциональности мутации могут быть фоновыми ("background") или центровыми ("foreground"). Фоновые мутации обнаруживаются во всех опухолевых клетках и, вероятно, необходимы для поддержания клеточной пролиферации и увеличения мутабельности. Центровые мутации ответственны за образование новых клонов и могут усиливать клеточную пролиферацию, приводя к появлению агрессивно и быстро растущих опухолевых клеток [289, 301]. Фоновые и центровые мутации могут быть “драйверами” или “пассажирами” в зависимости от их функционального эффекта и пенетрантности.

Гипотеза мутаторного фенотипа, впервые предложенная Лауренсом Лоеб в 1974 г. [194], также учитывает роль клональной эволюции в развитии ВОГ, но справедлива для тех случаев, когда опухоль характеризуется большим разнообразием минорных клонов, а не наличием нескольких доминантных популяций (Рисунок 2). В рамках данной гипотезы мутабельность опухолевых клеток увеличивается значительно, вероятно, посредством повреждения генов, кодирующих ДНК-полимеразы. В этом случае также наблюдается клональная экспансия, однако движущим фактором являются не конкретные драйверные мутации, а большое количество случайных нарушений [233, 308]. Модель мутаторного фенотипа подтверждается исследованием Vielas и соавторов, указывающим на то, уровень мутирования в 200 раз выше в опухолевых, чем в нормальных клетках [43, 235].

Гипотеза ОСК, также известная как иерархическая гипотеза, гласит о том, что опухолевый рост подобен физиологическим процессам, таким как развитие и репарация тканей, но инициируется генетическими нарушениями в стволовой клетке (Рисунок 2). Как и обычные стволовые клетки, ОСК обладают повышенным пролиферативным потенциалом и способностью к

ассиметричному делению, формируя дочерние ОСК и различные опухолевые клоны [214, 259].

Помимо вышеупомянутых механизмов, которые рассматривают моноклональное происхождение опухоли, т.е. её появление из одной клетки, в случаях, когда опухолевый процесс носит поликлональный характер, исходное разнообразие нормальных соматических или стволовых клеток может быть связано с развитием ВОГ. Феномен генетической, эпигенетической и фенотипической гетерогенности здоровых клеток в пределах одной ткани получил название “соматический мозаицизм” [79]. Фактически, каждая клетка организма человека генетически уникальна [79, 100, 186]. Частота генетических изменений в соматических клетках относительно высока, что, вероятно, играет большую роль в различных физиологических и патологических процессах, включая развитие рака [79, 186]. Например, показано, что индивидуумы с выраженным соматическим мозаицизмом характеризуются повышенным онкологическим риском. При этом, высокий уровень мозаицизма в смежной с опухолью нормальной ткани ассоциирован с плохим прогнозом заболевания [100]. Вероятно, что мутации, возникающие в нормальных клетках, как и уровень генетической нестабильности, всего лишь “наследуются” опухолевыми клетками. Тем не менее, изучение вклада соматического мозаицизма в развитие и прогрессию рака затруднительно [100]. Главным образом, это связано с трудностью оценки мутационного ландшафта в нормальных клетках до их злокачественной трансформации. Однако, поиск драйверных мутаций, характерных для опухолей, в нормальных тканях человека могло бы помочь в понимании механизмов канцерогенеза. Так, подобные исследования позволили ли бы пролить свет на феномен агрессивного поведения некоторых опухолей еще на этапе их раннего развития. Тем более, что недавние работы уже показали относительно высокую частоту мутаций, в т.ч. драйверных для канцерогенеза, в нормальных тканях человека [208, 345].



#### 1.1.4 Роль внутриопухолевой гетерогенности в прогрессии онкологических заболеваний

ВОГ, представленная фактически популяциями опухолевых клеток с различным потенциалом прогрессирования, непосредственно связана с инвазией, рецидивированием и метастазированием злокачественных новообразований. Различные исследования показали, что поликлональные опухоли, т.е. содержащие более одного клона, агрессивнее, чем моноклональные. В целом, риск неблагоприятного исхода у онкобольных повышается, когда в опухолях присутствует больше 2-х клонов клеток. Тем не менее, опухоли, содержащие более 5-ти клонов, демонстрируют менее плохой прогноз (Рисунок 4). Иными словами, значительное клональное разнообразие является скорее препятствием, чем залогом успешного прогрессирования опухолей [30].

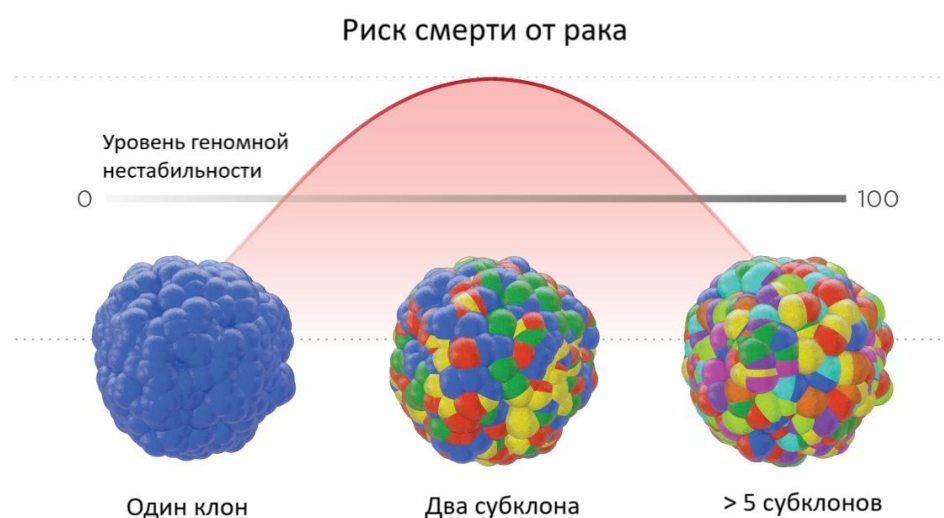


Рисунок 4 – Риск смерти от рака в зависимости от уровня клонального разнообразия злокачественных новообразований (<https://biodesign.asu.edu/news/evolutionary-trade-offs-color-cancer-prognoses>)

В настоящее время, опухоль рассматривается как динамическая экосистема, поддерживаемая клонами опухолевых клеток, каждый из которых “специализируется” в выполнении определённой роли: секреции

ростовых факторов, продукции протеолитических факторов, необходимых для осуществления инвазии, и индукции ангиогенеза (Рисунок 5). В поликлональных опухолях ВОГ обычно поддерживается за счёт одного клона, который секретирует специфические ростовые факторы. Когда этот клон удаляется, опухоль либо перестаёт расти, либо подвергается некрозу [296]. В каждой опухоли представлено, по крайней мере, два клона опухолевых клеток: инвазивный и неинвазивный (или со слабым потенциалом к инвазии). Миграция неинвазивного клона осуществляется через кооперацию с клоном опухолевых клеток, характеризующимся высокой инвазивностью. Такая “кооперативная инвазия” (от англ. cooperative invasion) происходит за счёт того, что инвазивные клетки прокладывают путь для неинвазивных клеток посредством разрушения внеклеточного матрикса через секрецию протеаз и подтягивают их за собой благодаря межклеточной адгезии [65, 257, 287].

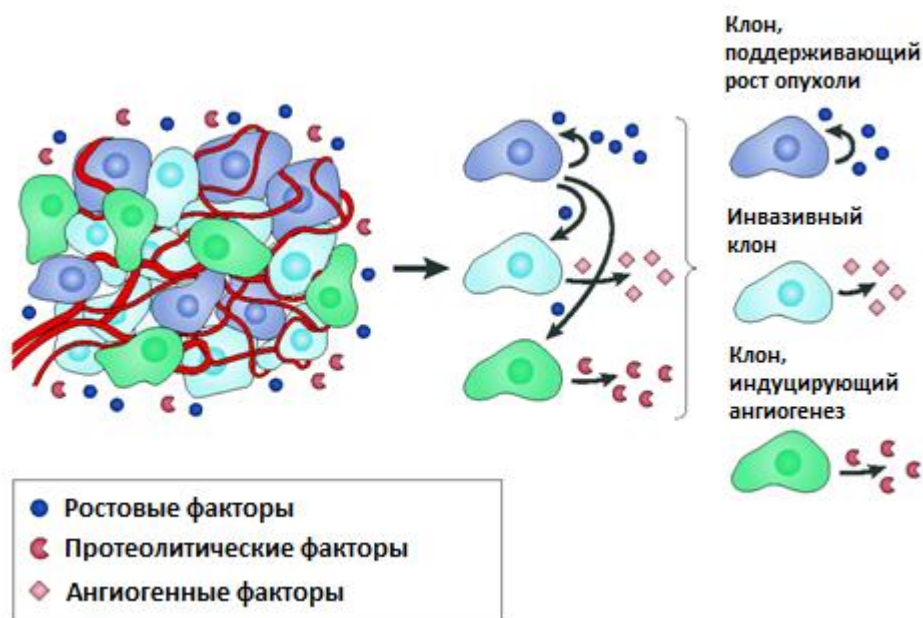


Рисунок 5 – Модель клональной кооперации клонов опухолевых клеток в пределах одной опухоли [296].

Неоднородность опухолевых клеток по инвазивному потенциалу, а также их различие в паттерне инвазии, т.е. способах и механизмах миграции,

усиливает ВОГ. Так, предполагается, что инвазивный рост может осуществляться либо индивидуально (миграция одиночных клеток), либо коллективно (движение групп клеток). Помимо этого, движение опухолевых клеток может осуществляться по образу и подобию фибробластов (мезенхимальный вариант миграции) или лейкоцитов (амебоидный вариант миграции) [101, 102]. Такое многообразие паттернов инвазивного роста, вероятно, обуславливает неоднородность морфологического строения опухоли или, проще говоря, ВОМГ.

ВОГ является ресурсом для появления клонов, которые образуют как локорегионарные, так и отдаленные метастазы. Интересно, что придя в лимфоузлы или другие ткани/органы, опухолевый клон также эволюционирует, формирует дочерние клоны и, таким образом, генерирует внутриметастатическую гетерогенность. Такая эволюция, вероятно, является основной причиной различий мутационного ландшафта между опухолью и метастазами [111, 281], а также между метастазами в разных органах, произошедших из одного первичного очага [267]. В первичной опухоли метастатическим может быть как один (например, минорный) клон, так и несколько клонов сразу. Предложено несколько гипотез метастазирования, отличающихся временем образования метастатического (-их) клона (-ов). Согласно одной из них, диссеминация наблюдается на поздней стадии опухолевого процесса путем клональной экспансии существующих клонов [209]. При этом приобретение клеткой метастатического фенотипа является заключительной стадией опухолевого процесса. В таком случае, метастазы рассматриваются как наиболее злокачественные и агрессивные клоны клеток, которые могут доминировать в первичной опухоли. В некоторых случаях, метастазирование может быть инициировано редким клоном [52, 143, 299]. Данная гипотеза получила название “модель последовательной прогрессии опухоли” [209]. Поздняя диссеминация опухолевых клонов описана для рака яичников [211], рака молочной железы [343] и колоректального рака [180]. Другая гипотеза гласит о том, что опухоль диссеминирует на ранних этапах

развития или до момента формирования первичного очага [141]. Раннее метастазирование подтверждается схожестью профилей метилирования доброкачественных пролиферативных процессов молочной железы и метастазов в регионарные лимфоузлы [20, 21]. Дивергенция первичной опухоли и метастазов от общего клонального предшественника подтверждается тем, что мутации, обнаруживаемые в метастазах, не представлены или встречаются крайне редко в первичной опухоли [209, 267, 281]. Раннее появление метастазов и их независимая от опухоли эволюция описаны при раке молочной железы [137], колоректальном раке [142], раке почки [111, 309], раке яичников [211] и увеальной меланоме [97]. Иногда выделяют третью гипотезу (стохастическую), которая предполагает, что метастазирование – это случайный процесс, а его вероятность пропорциональна количеству клеток в опухоли [14, 117]. Несмотря на то, по какой из моделей будет проходить опухолевая прогрессия, локорегионарное и отдаленное метастазирование, вероятно, будет успешным только при условии появления дополнительных драйверных мутаций, не характерных для первичной опухоли [343].

Сами по себе метастазы также являются ресурсом для появления клонов клеток, способных заселять другие ткани и органы. Такое “metastasis-to-metastasis seeding” происходит линейно, т.е. последовательно, поражая один орган за другим, или в виде “ветвящейся” (от англ. “branched”) модели, когда клетки одного метастатического очага заселяют остальные органы-мишени [52, 137, 272, 330].

Рецидивы, как принято считать в настоящее время, являются потомками минорных клонов первичной опухоли, выживших после терапии. Это хорошо прослеживается на примере злокачественных заболеваний крови. Рецидивы лимфобластного лейкоза на более чем 50% состоят из предкового минорного клона, сформировавшегося ещё до обнаружения основного заболевания [225]. Рецидивы множественной миеломы образуются из клона, который на момент постановки диагноза был минорным и выжил после химиотерапии

[163]. Участие минорного клона опухолевых клеток в рецидивировании также показано при глиобластоме [244], полиморфной аденокарциноме [279] и других злокачественных новообразований.

### 1.1.5 Вклад внутриопухолевой гетерогенности в эффективность противоопухолевой терапии

ВОГ вносит значительный вклад в устойчивость злокачественных новообразований к химио, радио- и таргетной терапии. Опухоли с изначально высоким уровнем гетерогенности, т.е. с большим генетическим разнообразием и выраженной клональной архитектурой, представленной наличием большого количества клонов, более устойчивы к терапии, чем случаи с меньшей ВОГ (Рисунок 6).

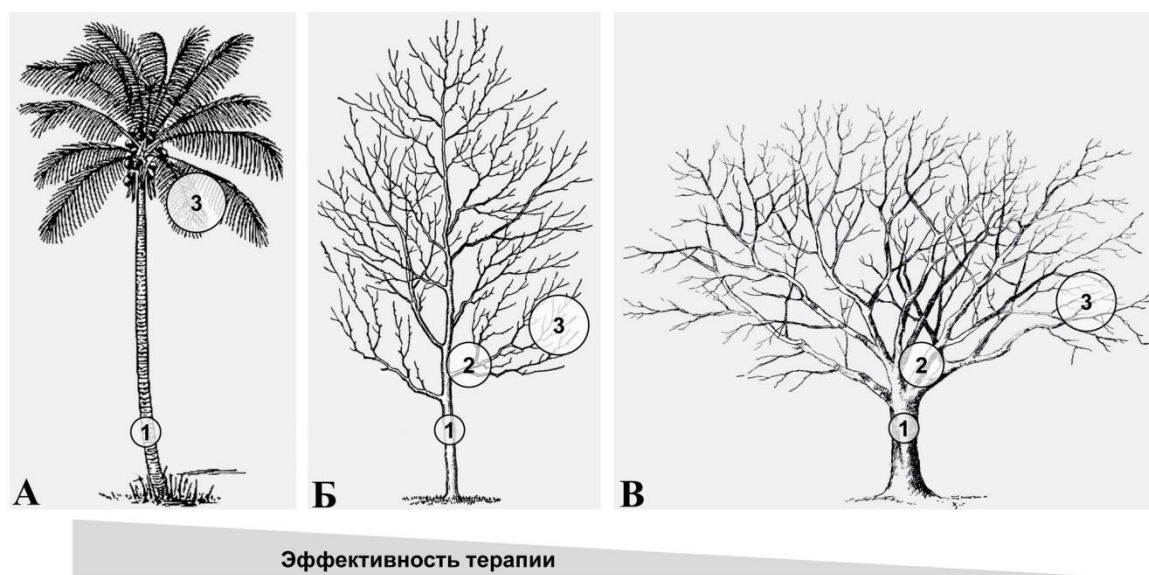


Рисунок 6 – Типы клональной архитектуры опухолей (А, Б и В) [342]. Цифрами 1, 2 и 3 обозначены первичные и вторичные драйверы и мутации "пассажиры" (3). Вторичные драйверы отражают клональное разнообразие опухоли.

Ввиду специфических генетических, эпигенетических и фенотипических особенностей, различные клоны опухоли демонстрируют индивидуальный профиль чувствительности или устойчивости к лекарственным препаратам

[278]. Химио-, радио- или таргетная терапия, как правило, эффективна в плане уничтожения доминантных (мажорных) клонов опухолевых клеток, тем самым, создавая вакантную нишу, которая может заниматься минорными клеточными популяциями, изначально устойчивыми к лечению. Клональная эволюция, индуцированная химиотерапией, и, как следствие, изменение популяционной структуры опухолей является одной из основных причин неудач в противоопухолевом лечении. Фактически, химиотерапия, а также таргетная терапия, при неадекватном назначении может только усиливать внутриопухолевую гетерогенность и, тем сам, приводить к неэффективному лечению и неблагоприятному исходу [95, 240, 277]. Изменение клонального состава опухоли под влиянием химиотерапии и отбор резистентных опухолевых клеток показаны при РМЖ, раке легких и колоректальном раке и других онкозаболеваниях [95, 169, 181, 285]. Например, применение ингибиторов тирозинкиназы EGFR у больных аденокарциномой легкого с активирующими мутациями гена *EGFR* может приводить к развитию лекарственной устойчивости к данному виду терапии за счёт подавления роста чувствительных клонов опухолевых клеток и “стимуляции” распространения резистентных популяций [188, 193, 305]. Подобное обнаружено и в случае таргетной терапии больных раком легкого, направленной на ингибирование тирозинкиназы ALK [283, 285]. Тем не менее, использование высокопроизводительного секвенирования для поиска резистентных мутаций/клонов и назначение нацеленных на них препаратов позволило значительно продлить и улучшить качество жизни онкологических больных [193, 280, 285].

Помимо гетерогенности собственно опухолевых клеток, эффект противоопухолевой терапии модифицируется особенностями микроокружения, которые, как указывалось выше, значительно варьируют в пределах опухоли. Неоднородность опухолевого микроокружения сама по себе приводит к снижению чувствительности к назначаемой терапии. Например, эффективная концентрация лекарственных препаратов

достигается не во всех участках опухоли из-за неоднородности сосудистой сети [205]. Ответ опухолевых клеток на терапию лучше в условиях нормальной оксигенации, чем при гипоксии [119, 209]. Клетки микроокружения, продуцирующие факторы роста и способствующие росту и увеличению жизнеспособности опухолевых клеток, также формируют барьер против лекарственной терапии. Например, опухоль-ассоциированные нейтрофилы посредством секреции факторов роста вызывают рекрутирование макрофагов и Т-регуляторных клеток и способствуют прогрессии гепатоцеллюлярной карциномы и её устойчивости к сорафенибу [356]. Опухоль-ассоциированные фибробласты индуцируют Wnt-сигнальный путь в опухолевых клетках и резистентность ко многим химиопрепаратам [98].

Таким образом, для эффективного лечения онкологических больных необходимо комплексное представление о структуре злокачественного новообразования, учитывающее ВОГ как первичного, так и метастатического очага. При этом важным является не только понимание популяционной структуры опухоли, но и особенностей её микроокружения.

#### 1.1.6 Перспективы противоопухолевой терапии с учётом внутриопухолевой гетерогенности

В настоящее время, литературные данные о роли ВОГ в прогрессии и лекарственной устойчивости онкологических заболеваний не находят применение в клинической практике. Многообразие клонального состава опухоли делает низкоэффективными современные схемы терапии, включающие, как правило, 2-3 препарата, и “выбивающие” только чувствительные субклоны, тогда как оставшиеся резистентные опухолевые клетки могут быть причиной рецидивов [78]. Таким образом, выбор адекватной стратегии терапии гетерогенных новообразований остается открытым. Тем не менее, эффективное лечение, учитывающее ВОГ, может строиться на основе комбинации следующих вариантов терапии:

1. Таргетная терапия, направленная на драйверные мутации. Согласно современным представлениям, драйверные мутации являются первопричиной формирования злокачественных опухолей и критически необходимы для жизни опухолевых клеток. Более того, в отличие от мутаций-пассажира, “драйверы” характерны либо для всех популяций опухолевых клеток (так называемые “первичные драйверы”), либо для клеток, составляющих различные субклоны (“вторичные драйверы”). Соответственно, разработка и применение препаратов, способных прицельно (таргетно) ингибировать белки, кодируемые генами с драйверными мутациями, является привлекательной стратегией противоопухолевого лечения. В настоящее время, таргетная терапия, нацеленная на генетические “драйверы” опухолей, является стандартом в лечении различных онкологических заболеваний: аденокарциномы лёгкого (мутации в *EGFR* – препараты gefitinib, osimertinib и др.), меланомы (мутации *BRAF* – dabrafenib, cobimetinib и др.), колоректальном раке (мутации *KRAS* – cetuximab, panitumumab) и т.д. [28, 176, 187, 221, 222]. Таргетная терапия также может быть средством для регуляции клональной архитектуры опухолей. При условии знания соответствующих “драйверов”-мишеней, посредством неё возможно уничтожение химиорезистентных субклонов и ОСК и последующее назначение конвенционального химиотерапевтического лечения [35, 285].

2. Персонализированное назначение химиотерапии с учётом клональной архитектуры опухолей. Поскольку первичная опухоль неоднородна по своей структуре в чувствительности к химиотерапии, определение клонального состава и характеристика химиорезистентного портрета субклонов может быть эффективным алгоритмом для назначения лекарственного лечения, нацеленного на все популяции опухолевых клеток. К сожалению, современные технологии предсказания ответа на химиотерапию (Oncotype, Mammaprint и др.) основаны на анализе совокупной ДНК/РНК, полученной из опухоли целиком [166], и не



учитывают клональную архитектуру, в частности различия опухолевых клеток в химиорезистентности. Тем не менее, эти методы могут более эффективно применяться для определения профиля химиочувствительности резидуальной опухоли, т.е. резистентного субклона (или субклонов), оставшихся после химиотерапии.

3. Таргетная терапия функционально-обособленных групп клеток. Внутриопухолевая фенотипическая гетерогенность подразумевает наличие функционально различных популяций опухолевых клеток в паренхиматозном компоненте. Такая функциональная разнородность может проявляться в протекании различных процессов, наибольший интерес среди которых вызывает миграция и инвазия опухолевых клеток, которая является первой ступенью на пути метастазирования онкологических заболеваний. Соответственно, терапевтическое воздействие должно быть сфокусировано на блокировании молекулярных путей, приводящих к формированию локомоторного фенотипа. Параллельно, терапия должна быть направлена на опухолевые клетки, которые участвуют в формировании преметастатических ниш за счёт секреции экзосом, содержащих различные интегрин, ростовые факторы, мРНК и некодирующие РНК [332, 357].

4. Антигипоксическая терапия. В последнее время термин “ВОГ” стал применяться для обозначения любого рода различий в пределах одной первичной опухоли. Так, неоднородность опухоли по кислородному насыщению также является одним из проявлений ВОГ. Гипоксия рассматривается как ключевой фактор изменения опухолевого фенотипа. Опухолевые клетки, испытывающие недостаток кислорода, переключаются на анаэробный метаболизм, демонстрируют повышенную мутабельность и, как следствие, генетическую нестабильность, индуцируют ангиогенез, способны к инвазии и характеризуются устойчивостью к лучевой и химиотерапии [119]. Соответственно, разработка препаратов, подавляющих молекулярные программы, опосредованные гипоксией, и/или повышающих кислородное насыщение через нормализацию сосудистой сети и

реоксигенацию опухоли, может быть дополнительным методом терапии в комплексной стратегии противоопухолевого лечения. В этом плане, в качестве возможных антигипоксических препаратов и средств рассматривают молекулы, ингибирующие факторы, индуцибельные гипоксией (HIF-1 $\alpha$  и HIF-2  $\alpha$ ), кислородные наноносители и генераторы и т.д. [149]. Например, в 2021 году был одобрен первый ингибитор HIF-2 $\alpha$ , белзутифан (МК-6482), для лечения пациентов с почечно-клеточной карциномой, ассоциированной с синдромом фон Гиппеля-Линдау (VHL) [156].

5. Эпигенетическая терапия. Опухолевые клетки демонстрируют гиперметилирование промоторов генов-супрессоров и генов репарации ДНК [312]. Кроме того, в клетках опухоли изменяется профиль метилирования и ацетилирования гистонов, что приводит к реорганизации хроматина, и, как одно из следствий, к нарушению репарации ДНК вследствие ограничения доступа белков репарации к сайтам ДНК, содержащим ошибки. В соответствии с этим, возможной стратегией терапии злокачественных новообразований может быть использование препаратов, ингибирующих ДНК- и гистоновые метилтрансферазы и деацетилазы, катализирующие метилирование и ацетилирование. Эффективность таких ингибиторов в противоопухолевом лечении уже подтверждена на моделях *in vitro* и *in vivo* [346]. Опухолевые клетки испытывают излишнюю потребность в метионине в основном из-за нехватки фермента метилтиоаденозинфосфорилазы (MTAP). Соответственно, использование метионин-деградирующих ферментов и/или безметиониновая диета в самостоятельном режиме или в комплексе с химиотерапией является перспективным направлением в противоопухолевом лечении [66].

6. Терапия, направленная на опухолевое микроокружение. Опухоль – это система различных клеток, находящихся в динамическом равновесии и кооперации друг с другом. Выше уже указывалось, что опухолевое микроокружение, т.е. воспалительные, стромальные и эндотелиальные

клетки, в значительной степени определяют путь развития онкологических заболеваний, регулируя их прогрессию и модифицируя ответ на терапию. Таким образом, перспективным представляется воздействие на микроокружение опухоли с целью разрушения “опухолевой” ниши и формирования среды, непригодной для развития опухолевых клеток. Такая терапия включает в себя использование антиангиогенных молекул (анти-VEGF терапия), ингибиторов PD-1/PD-L1 (иммунотерапия) и интегринов, противовоспалительных агентов, и т.д. [98, 228].

## 1.2 Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность

ВОМГ встречается при большинстве онкологических заболеваний и представляет собой наличие в пределах опухоли различных морфологических (гистологических/инвазивных/инфильтративных) структур, которые отражают специфические пространственные образования опухолевых клеток. В опухоли может быть представлен какой-то один тип морфологических структур, либо несколько вариантов сразу. При этом, количество типов структур в опухоли варьирует от случая к случаю. В зависимости от преобладания определенного варианта морфологических структур в опухоли, злокачественные новообразования классифицируют на гистологические подтипы, характеризующиеся индивидуальным прогнозом и ответом на терапию [49, 307]. Оценка количества определённых структур используется в определении степени злокачественности опухолей (tumor grading) [47, 146]. Анализ выраженности определённых морфологических особенностей предлагается для прогнозирования клинического течения заболевания и ответа на лечение [57, 122, 135, 347]. Комплексная оценка морфологического строения злокачественных новообразований с помощью подходов машинного обучения позволяет предсказывать молекулярный профиль опухолевых клеток [45, 161].

### 1.2.1 Определение внутриопухолевой морфологической гетерогенности РМЖ

РМЖ не является исключением; значительная морфологическая неоднородность характерна и для опухолей молочной железы. Наиболее часто встречающийся гистологический тип РМЖ (до 80% случаев), инвазивная карцинома неспецифического типа (*invasive carcinoma of no special type, IC NST*), демонстрирует чрезвычайно разнообразный инвазивный компонент (Рисунок 7).

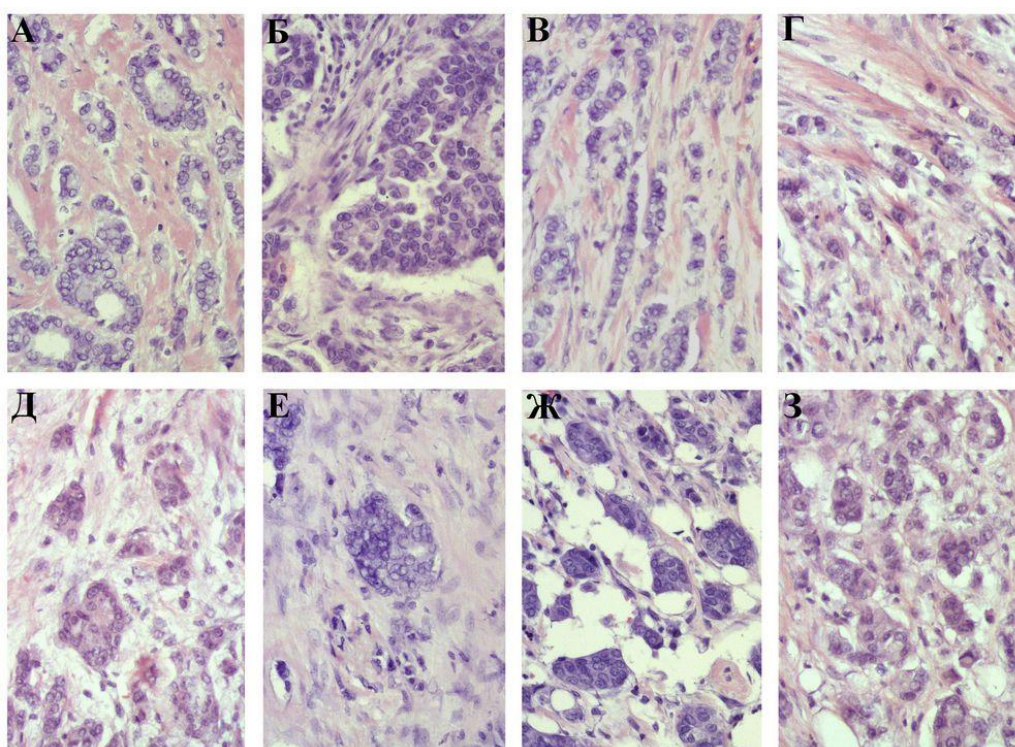


Рисунок 7 – Различные типы морфологических структур IC NST: А, тубулярные структуры; Б, солидная структура; В, трабекулярные структуры; Г, дискретные группы опухолевых клеток; Д-З, варианты альвеолярных структур. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x200.

Опухолевые клетки молочной железы могут быть представлены по отдельности (одиночные клетки), объединены в небольшие дискретные группы (до 5 клеток) или организованы в тубулярные (*hollow-like*), альвеолярные (кластеры, *morula-like*), солидные и трабекулярные структуры

[10, 175]. Дискретные группы опухолевых клеток, характеризующиеся низкой дифференцировкой, демонстрируют максимальную пролиферативную активность (высокая экспрессия маркера Ki-67) и минимальную экспрессию  $\alpha$ -катенина. Напротив, наиболее дифференцированные тубулярные структуры представлены 1-2 рядами опухолевых клеток, формирующими подобие колец, и характеризуются наименьшей пролиферативной активностью и максимальной экспрессией  $\alpha$ -катенина [6]. Определение количества тубулярных структур в опухоли используется для оценки степени злокачественности РМЖ [47].

Альвеолярные структуры – это скопления округлой формы, состоящие из 10-30 клеток. Солидные структуры представляют собой бесформенные массы, состоящие из сотен опухолевых клеток. Трабекулярные структуры – это либо короткие линейные объединения, образованные одним рядом опухолевых клеток, либо широкие клеточные кластеры, состоящие из 2-3 рядов клеток [10, 17, 18]. Количество типов структур варьирует от опухоли к опухоли. Встречаются случаи с одним (любым типом) структур; однако, большинство опухолей молочной железы (> 80%) содержит 2-4 типа структур [8, 18]. В опухолях с одним вариантом структур равновероятно наличие любого их типа, тогда как в опухолевой ткани с двумя типами структур чаще всего в качестве вторых обнаруживаются трабекулярные объединения [348].

Реже встречаются структуры по типу карциноида и комедо-некроза (“comedo”), а также криброзные, папиллярные и микропапиллярные формирования опухолевых клеток, представляющие собой внутрипротоковые компоненты [175]. Выделяют также так называемые “опухолевые почки” (tumor buds), представляющие собой одиночные опухолевые клетки и/или небольшие кластеры (2-6 клеток), расположенные на инвазивном фронте опухоли [184, 206, 294].

Большее количество разных типов структур характерно для билатерального РМЖ независимо от синхронности или метасинхронности

процесса. При двустороннем раке также чаще выявляются тубулярные и дискретные варианты опухолевых клеток [11]. При метакронном билатеральном РМЖ по сравнению с односторонней локализацией процесса реже выявляются трабекулярные структуры [7].

Данные морфологические структуры не уникальны для IC NST. Они также встречаются при других гистологических типах РМЖ, например, при инвазивной микропапиллярной карциноме молочной железы (частота встречаемости ~ 2%) [232]. Более того, некоторые гистотипы РМЖ диагностируются на основании преобладания того или иного типа структур в опухоли. Например, для тубулярной карциномы молочной железы характерно наличие тубулярных структур в инвазивном компоненте [175].

### 1.2.2 Гипотезы формирования внутриопухолевой морфологической гетерогенности РМЖ

Фактически, гипотезы, описывающие механизм возникновения ВОГ в целом, могут иметь отношение и к ВОМГ РМЖ. Т.е., различные морфологические структуры могут быть либо субклонами опухолевых клеток, появившимися в ходе клональной эволюции и несущими специфические генетические нарушения, либо “дифференцированными” потомками ОСК. Помимо этого, ВОМГ при РМЖ может быть проявлением паттернов опухолевой инвазии, возникающих в ходе коллективно-индивидуальных переходов и в процессе перепрограммирования клеточного фенотипа (например, ЭМП). При этом, независимо от того, по какому сценарию идёт формирование ВОМГ при РМЖ, значительное влияние на морфогенез может оказывать опухолевое микроокружение, главным образом воспалительные и стромальные клетки.

### 1.2.2.1 Клональная эволюция как причина морфологической неоднородности РМЖ

Разные варианты хромосомных aberrаций или генных мутаций, являющиеся триггерами клональной эволюции, могут модифицировать фенотип опухолевых клеток и влиять на их способность объединяться друг с другом, формируя специфические пространственные структуры. В настоящее время, данные о связи генетических нарушений с морфологической гетерогенностью новообразований молочной железы немногочисленны. Так, показано, что при метапластическом РМЖ, характеризующимся гетерогенным гистологическим строением и негативным прогнозом (по сравнению с другими гистотипами, в т.ч. IC NST), клональная эволюция причастна к формированию морфологически отличных компонентов опухоли, которые несут специфические генетические нарушения. Например, дольковая, сквамозная и веретенчатая области опухоли характеризуются амплификациями специфических хромосомных участков [112]. Для IC NST трижды-негативного подтипа получены схожие данные: каждый из морфологически обособленных регионов первичной опухоли несёт специфические генетические изменения. В частности, амплификации и делеции на плечах хромосомы 9p и 9q обнаруживаются на участках опухоли с апокриновой дифференцировкой и отсутствуют в неапокриновых зонах [253]. В исследовании, проведенном на 850 случаях РМЖ, показано что морфологические особенности РМЖ связаны не только с изменениями генома, но и с уровнем метилирования ДНК и экспрессии микроРНК и различных генов, в т.ч. входящих в мультиплексную прогностическую панель PAM50 [135]. На основе данных о корреляции генетических изменений и морфологии злокачественных новообразований, в т.ч. РМЖ, был разработан метод, позволяющий предсказывать мутационный ландшафт опухолевых клеток с использованием гистологических срезов и машинного обучения [161].

### 1.2.2.2 Опухолевые стволовые клетки как причина морфологической неоднородности РМЖ

Туморогенные (например, ОСК с фенотипом  $CD44^+CD24^-$ ) и нетуморогенные опухолевые клетки молочной железы не отличаются морфологически друг от друга [25]. Тем не менее, известно, что расположение ОСК в опухоли молочной железы неоднородно и может быть привязано к морфологическому строению.  $CD44^+CD24^-$  ОСК, характеризующиеся мезенхимальным фенотипом и первоначально неподвижные, преимущественно располагаются в зоне инвазивного фронта опухоли. Напротив, эпителиально-подобные ОСК с экспрессией альдегиддегидрогеназы (ALDH), демонстрирующие высокий пролиферативный потенциал, в основном располагаются в центре опухоли [192]. Взаимосвязь стволовости и морфологического строения опухолей молочной железы также прослеживается в том, что различные молекулярные подтипы РМЖ гистологически отличны друг от друга и содержат разное количество ОСК. Главным образом, эти различия обнаруживаются между люминальным и трижды-негативным, в частности базальноподобным РМЖ. Так,  $CD44^+CD24^-$  ОСК преобладают в базальноподобных опухолях молочной железы с низкодифференцированным инфильтративным компонентом, который в основном представлен солидными структурами [134, 138].

### 1.2.2.3 Опухолевая инвазия как причина морфологической неоднородности РМЖ

Миграция опухолевых клеток и инвазия осуществляется различными способами и механизмами (Рисунок 8). Клетки могут двигаться группами (коллективная миграция) или в одиночном формате (индивидуальная), используя мезенхимальный или амёбовидный тип движения [101, 102, 331]. Коллективная миграция – это процесс направленного движения клеток, физически и функционально связанных между собой с помощью молекул клеточной адгезии. У движущейся группы выделяется ведущий и задний



слои, которые различаются по морфологии и экспрессионному профилю клеток. Ведущий слой представлен мезенхимально-подобными клетками (клетки-лидеры от англ. *leaders*) с менее выраженной структурной организацией, которые способны реагировать на внеклеточные сигналы (например, хемокины) за счет поверхностных рецепторов, формировать ламеллиподии и активно секретировать протеазы и интегрины [22, 247, 331]. Задний фронт состоит из плотно упакованных клеток (клетки-последователи от англ. *followers*), характеризующихся наличием более прочных межклеточных контактов и формирующих «скрытые» ламеллиподии, направленные к субстрату. Коллективная клеточная миграция зависит от межклеточной адгезии и передачи механических усилий между клетками-лидерами и последователями [247]. Морфология мигрирующих групп клеток различна и варьирует от "нитей" (одной или двух клеток в диаметре) до "широких клеточных масс", представленных разнообразными пространственными объединениями (Рисунок 8): кластерами, тяжами, кордами, и т.д. [101, 102].

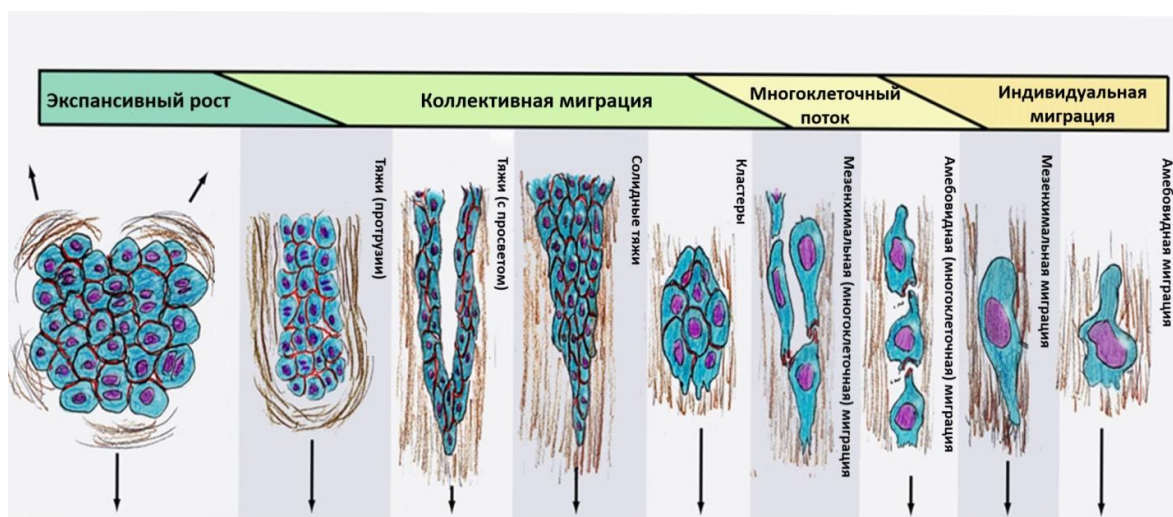


Рисунок 8 – Варианты инвазивного роста злокачественных опухолей [101]

Индивидуальная миграция – это направленное движение одиночных опухолевых клеток по типу фибробластов (мезенхимальная миграция) или

лейкоцитов (амёбовидная). Приобретение клеткой подвижности связано с существенными изменениями её цитоскелета, морфологии, разрушением межклеточных контактов и т.д. [22]. Мезенхимальный тип движения характеризуется участием большого количества молекул и ступенчатостью процесса. В норме этот механизм характерен для кератиноцитов в условиях репаративной регенерации, эндотелиоцитов и фибробластов. Выделяют пять основных этапов реализации мезенхимального движения клетки: формирование на переднем крае клетки псевдоподии за счет полимеризации актина, возникновение фокального контакта между клеткой и внеклеточным матриксом с помощью интегринов, активация протеолитических ферментов (матриксных металлопротеиназ, катепсины и др.) для ремоделирования окружающего матрикса, сокращение тела клетки за счет актомиозина, отделение заднего края клетки и «подтягивание» его по направлению движения [103, 249]. Амёбовидное движение опухолевых клеток сходно с передвижением одноклеточного организма *Dictyostelium discoideum*. В норме таким образом передвигаются циркулирующие стволовые клетки и лейкоциты. Движение осуществляется с помощью так называемых бляшек – выпячиваний цитоплазматической мембраны за счет актомиозиновых сокращений. Характерной особенностью амёбовидного движения является высокая деформируемость клетки и её адаптация к окружающим структурам матрикса. Помимо этого, клетки в состоянии амёбовидной миграции характеризуются округлой формой, отсутствием клеточной адгезии и протеаз (так как этот тип движения чаще встречается в случаях «мягкого» матрикса) [1, 249, 331]. Недавно было предположено, что амёбовидная миграция является скорее не самостоятельным типом движения опухолевых клеток, а клеточным состоянием, формирующимся в процессе эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) и поддерживаемым цитокиновым сигналингом через молекулы STAT3 и NF-κB. В таком состоянии опухолевые клетки демонстрируют стволовые признаки и лекарственную

резистентность и секретируют различные факторы, способствующие инвазии, проницаемости сосудов и уходу от иммунного надзора [120].

Благодаря высокой пластичности опухолевые клетки способны менять способ и тип движения. В настоящее время известно несколько процессов, посредством которых происходит смена клеточного движения с коллективного на индивидуальный, с мезенхимального на амёбовидный и, наоборот. ЭМП сопровождается потерей клетками эпителиальной морфологии и приобретением мезенхимальных черт, в т.ч. потенций к мезенхимальному типу движения. ЭМП индуцируется и поддерживается главным образом белками семейств Snail, Twist и ZEB. Существует также и обратный вариант – мезенхимально-эпителиальный переход, который, как предполагают, имеет место в метастатических нишах, где опухолевые клетки меняют свой фенотип с мезенхимального на эпителиальный и, тем самым, переключаются с режима локомоции на пролиферацию и формируют макрометастаз [38, 241]. Приобретение опухолевыми клетками способности к амёбовидному движению происходит в результате коллективно-амёбовидного и мезенхимально-амёбовидного переходов. Первый из них протекает при потере интегринов семейства  $\beta 1$  и экспрессии факторов, индуцируемых гипоксией (например, HIF-1) [103, 179, 331]. Мезенхимально-амёбовидный переход наблюдается при подавлении экспрессии протеолитических ферментов, активности интегринов и повышении активности ГТФаз RhoA и ROCK в клетках,двигающихся мезенхимально, а также при изменении жёсткости внеклеточного матрикса [249, 320, 328]. Выделяют также амёбовидно-мезенхимальный переход, однако механизмы его протекания менее изучены. Хотя, предполагается, что нарушение баланса малых ГТФаз и преобладание активности Rac над RhoA приводит к переключению фенотипа опухолевой клетки с амёбовидного на мезенхимальный [22]. Ранее было высказано предположение, что ЭМП через изменение экспрессии молекул клеточной адгезии может приводить к формированию ВОМГ при РМЖ. С этой позиции, тубулярные структуры

следует рассматривать как производное наиболее «полноценных» эпителиальных клеток, а дискретно расположенные клетки – как конечную «мезенхимную» фазу такой трансформации. Остальные структуры (альвеолярные, трабекулярные и солидные) могут быть рассмотрены как отражение определенных этапов ЭМП [17].

Причастность инвазивного роста к формированию специфических пространственных структур опухолей ранее описана в разных исследованиях. При различных злокачественных новообразованиях, в т.ч. и РМЖ, идентифицированы так называемые "опухолевые почки" (tumor buds) [184, 206, 294]. Данные образования представляют собой отдельные (одиочные) опухолевые клетки и/или небольшие кластеры (2-6 клеток), как правило, расположенные на инвазивном фронте опухоли [48, 122, 174, 184, 206, 294]. Опухолевые клетки, формирующие "почки", находятся на этапе промежуточного (гибридного) ЭМП, но демонстрируют преобладание мезенхимальных черт на эпителиальными [122]. "Опухолевые почки", главным образом кластеры, двигаются коллективно, а их наличие ассоциировано с большим размером опухоли, лимфоваскулярной инвазией, плохой безрецидивной и общей выживаемостью больных РМЖ [184, 294, 316]. На моделях мышей показано, что кластеры, составляющие "почки", имеют поликлональное происхождение, т.е. образованы генетически различными опухолевыми клетками, а обусловленное ими гематогенное метастазирование является наиболее частой формой прогрессии РМЖ. Другими словами, более 90% всех отдаленных метастазов РМЖ происходит из таких кластеров. Большая часть опухолевых кластеров позитивна по экспрессии кератина 14 (К14), нокаут которого приводит к подавлению гематогенного метастазирования [69]. Предполагается, что такие кластеры целиком способны попадать в кровоток посредством интравазации [36] или через разрушенный эндотелий [140]. Тем самым, это приводит к появлению в крови онкологических больных циркулирующих опухолевых кластеров, которые в большей степени ассоциированы с высокой вероятностью

отдаленного метастазирования, чем циркулирующие одиночные опухолевые клетки [23]. Тем не менее, это противоречит другим работам, в которых говорится о сборке кластеров в крови из одиночных циркулирующих клеток. По описанию "опухолевые почки" схожи с дискретными группами опухолевых клеток. Тем не менее, последние обнаруживаются не только в зоне инвазивного роста опухоли (в отличие от "почек"), но и в толще опухолевой ткани.

#### 1.2.2.4 Опухолевое микроокружение как среда для формирования морфологической неоднородности РМЖ

Микроокружение опухоли представлено репертуаром различных клеток, например стромальными (фибробласты), воспалительными (макрофаги, лимфоциты, нейтрофилы и др.), эндотелиальными и мезенхимальными стволовыми клетками, адипоцитами, а также разными компонентами внеклеточного матрикса: коллаген, фибронектин, тенасцин и т.д. [236]. Многочисленные исследования показывают, что инвазивный рост и метастазирование могут индуцироваться и поддерживаться фибробластами и макрофагами, одними из ключевых игроков опухолевого микроокружения [70, 101, 236]. Не вызывает сомнений и тот факт, что стромальные и иммунные клетки, окружающие опухолевые клетки, выступают в роли драйверов клональной эволюции опухоли и способствуют формированию ВОГ [121, 210]. Сами по себе клетки опухолевого микроокружения также гетерогенны и представлены различными популяциями [40, 236], а их распределение в опухоли зависит от её морфологического строения [54, 218]. Так различия в воспалительном инфильтрате наблюдаются между разными типами морфологических структур РМЖ. Инфильтрат более выражен вблизи дискретных групп опухолевых клеток и скуден около тубулярных структур [6, 15].

Опухоль-ассоциированные фибробласты (от англ. cancer-associated fibroblasts, CAFs) принимают участие в формировании внеклеточного

матрикса, индукции пролиферации и миграции опухолевых клеток [98]. CAFs рассматривают как клеточное состояние, в котором могут быть резидентные фибробласты, опухолевые клетки в процессе ЭМП, стволовые клетки жировой ткани, костномозговые мезенхимальные стволовые клетки и эндотелиальные клетки, подвергающиеся эндотелиально-мезенхимальному переходу [358]. Однако характерной чертой для большинства клеток в состоянии CAFs является продукция гладкомышечного альфа-актина ( $\alpha$ SMA) и белка активации фибробластов (FAP) [98, 158, 358].

CAFs, находящиеся на границе между опухолью и нормальной тканью молочной железы (так называемая “интерфейсовая” зона) продуцируют циклооксигеназу 2 (COX-2), ядерный фактор NF- $\kappa$ B, гипоксический фактор HIF-1, FAP, различные микроРНК и др., и, тем самым, индуцируют ЭМП [144, 158, 199, 322, 340]. CAFs также секретируют различные металлопротеиназы и активаторы пламиногена, разрушающие внеклеточный матрикс. Таким образом фибробласты формируют “тоннели”, которые используются опухолевыми клетками для миграции [158, 199]. Формирование тоннелей может стимулироваться опухолевыми клетками, находящимися в состоянии апоптоза и секретирующими апоптотические везикулы, которые индуцируют движение CAFs. Интересно, что апоптоз в этом случае в опухолевых клетках индуцируется CAFs [147]. CAFs способствуют инвазии, в частности через базальную мембрану, также без секреции матриксных металлопротеиназ, а посредством “растягивания” мембраны и формирования в ней щелей для опухолевых клеток [115]. Кроме того, CAFs формируют механический градиент давления в пределах опухоли посредством продукции белков внеклеточного матрикса, что в итоге также способствует опухолевой инвазии и метастазированию [158, 199]. Подробно участие CAFs в опухолевой инвазии продемонстрировано на “межпальцевой” (от англ. interdigital) модели роста опухоли [160]. CAFs рекрутируются в ответ на факторы, секретируемые опухолевыми клетками, локализуются в перитуморальном пространстве, подвергаются десмопластической

трансформации и формируют коллективные образования. Такие группы CAFs охватывают опухоль от периферии к центру, при этом паракринные продукты, продуцируемые ими, интенсифицируют рекрутирование. Формирование плотного матрикса CAFs и создаваемый таким образом механический градиент провоцирует инвазию опухолевых клеток. Такая "межпальцевая" инвазия часто наблюдается на срезах опухолевой ткани молочной железы, где CAFs координируют миграцию опухолевых клеток и инвазивный рост [160, 199]. Доступны и другие данные, подтверждающие вовлеченность CAFs в опухолевую инвазию и метастазирование. Так, известно, что головной мозг в норме не содержит фибробластов. Тем не менее, фибробласты выявляются в более чем 80% метастазов РМЖ в головной мозг [92].

CAFs гетерогенны и представлены функционально различными субпопуляциями [358]. При РМЖ описано минимум четыре типа CAFs, занимающих специфические ниши в опухолевом микроокружении [75]. При этом популяционный состав CAFs меняется в процессе опухолевой прогрессии, а количественное соотношение различных типов фибробластов связано с исходом РМЖ [104].

Опухолевые макрофаги представлены фенотипически различными клетками, большая часть из которых экспрессирует рецептор CD68 [136]. Выделяют минимум два типа макрофагов: провоспалительные (M1 тип) и противовоспалительные (M2 тип) макрофаги. Предполагается, что именно макрофаги 2-го типа способствуют опухолевой прогрессии. Из-за этого в литературе их часто называют опухоль-ассоциированными макрофагами (от англ. tumor-associated macrophages, TAMs) [231, 282]. Предложены различные маркёры для идентификации макрофагов 2-го типа, среди которых рецептор CD168 [50], скавенджер рецептор RS1 (стабилилин 1) [173] и др.

TAMs приписывают роль "ключей" в "открывании" сигнальных путей опухолевой инвазии. Подобно CAFs, TAMs способны индуцировать ЭМП в опухолевых клетках [350], например, через секрецию хемокинов CCL2 [178],

CCL5 [201] и CCL12 [292], активацию COX-2/STAT3 и EGFR/ERK1/2 сигналингов [106, 133]. Опухолевые клетки в свою очередь активируют макрофаги посредством продукции различных ростовых факторов (например, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF, CSF2)) и метаболитов [238, 282]. Такие реципрокные взаимоотношения между опухолевыми клетками и TAMs лежат в основе метастазирования РМЖ [292]. Помимо этого, опухолевые клетки секретируют фактор CSF-1, который рекрутирует макрофаги в очаги рака. В свою очередь, TAMs продуцируют эпидермальный фактора роста (EGF), который является хемотаксической молекулой для опухолевых клеток. Таким образом осуществляется синхронная миграция опухолевых клеток и макрофагов. При этом подавление продукции EGF или CSF-1 тормозит хемотаксис и миграцию обоих типов клеток [260]. Участие TAMs в инвазивном росте РМЖ контролируется со стороны других клеток опухолевого микроокружения. Например, CD4<sup>+</sup> Т клетки способствуют приобретению макрофагами инвазивного фенотипа через секрецию интерлейкина 4 (IL-4). Подавление экспрессии IL-4 не вовлекает макрофаги в инвазию, и метастазирование РМЖ резко снижается [81]. Фибробласты и перициты, продуцируя фактор роста герегулин (heregulin) и хемокин CXCL12, также способствуют синхронной миграции опухолевых клеток и TAMs [260]. Макрофаги способны индуцировать коллагеновый фибрилlogenез через синтез коллагена 1 и усиливать инвазивный рост, так как опухолевые клетки используют коллагеновые волокна для более быстрой миграции [269]. Описаны и другие механизмы, посредством которых TAMs способствуют инвазии и метастазированию опухолевых клеток [32]. Интересно, что TAMs могут быть вовлечены в запуск метастатического каскада еще на этапе предопухолевых изменений, как показано на модели развития РМЖ, через продукцию хемокина CCL2, привлечение CD206<sup>+</sup>/Tie2<sup>+</sup> макрофагов, активацию Wnt-1 и снижение E кадгерина. Более того, макрофаги, рекрутированные в предопухолевые изменения, формируют



своего рода “порталы” для последующей интравазации опухолевых клеток [189].

1.2.3 Роль внутриопухолевой морфологической гетерогенности в прогрессии рака молочной железы

Оценка внутриопухолевого морфологического разнообразия, в частности количества тубулярных структур, выраженности ядерного плеоморфизма и частоты клеток в состоянии митоза, используется в гистологической классификации РМЖ по системе Блума-Ричардсона (Bloom–Richardson grading system) для определения степени злокачественности опухоли. Злокачественность РМЖ тем выше, чем меньше в опухоли тубулярных структур, более выражен ядерный плеоморфизм и больше митотических клеток [47].

Комплексный анализ морфологического строения ткани опухоли и генной экспрессии в опухолевых клетках обладает прогностической значимостью в отношении выживаемости больных трижды-негативным РМЖ [319]. Оценка морфологии опухолевой ткани, ассоциированной с экспрессией рецептора эпидермального фактора роста Her2/ERBB2, позволяет предсказывать эффективность терапии трастузумабом и выживаемость больных РМЖ [57].

Непосредственные и отдаленные результаты лекарственного лечения больных РМЖ также связаны с наличием и количеством определённых типов морфологических структур в ткани опухоли. Наличие "опухолевых почек" (tumor buds) ассоциировано с большим размером опухоли, лимфоваскулярной инвазией, плохой безрецидивной и общей выживаемостью больных РМЖ [184, 206, 294, 316]. Опухолевая прогрессия в целом (размер опухоли, частота лимфогенного и гематогенного метастазирования) более выражена в случаях с большим количеством различных типов морфологических структур [17].

Частота лимфогенного метастазирования возрастает по мере увеличения процента альвеолярных структур в инфильтративном компоненте РМЖ [10]. При отсутствии альвеолярных структур локорегионарные метастазы определялись в 5% случаев. В случаях, когда доля альвеолярных структур среди остальных структур инфильтративного компонента составляла 10%, лимфогенные метастазы выявлялись в 33% случаев. Частота метастазов в локорегионарные лимфоузлы резко возрастала у пациентов, в опухолях которых содержание альвеолярных структур достигало 75%, а при их доле более 75% лимфогенное метастазирование наблюдалось в 100% случаев [9].

Риск гематогенного метастазирования возрастает при показателе количественного отношения трабекулярных структур к тубулярным (Тр/Туб), равном 2. Так в 3 раза возрастает частота одиночных метастазов (либо в кости, либо в печень) и в 5 раз – частота сочетанного метастазирования. При этом вероятность отдаленного метастазирования в лёгкие не зависит от коэффициента Тр/Туб [18].

Частота рецидивов в рубце увеличивается при наличии в опухолях солидных структур или при большем содержании альвеолярных структур. Рецидивы вне послеоперационного рубца чаще выявляются в случаях с наличием трабекулярных структур [3]. Развитие рецидивов также связано с отсутствием в микроокружении морфологических структур каких-либо популяций лейкоцитов: вблизи альвеолярных и солидных структур – CD25+ Т-регуляторных клеток и CD68+ макрофагов и вблизи дискретных групп опухолевых клеток – CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов, а также CD25+ лимфоцитов [15].

#### 1.2.4 Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность и эффективность лечения РМЖ

Результативность НАХТ больных РМЖ зависит от ВОМГ. В группе пациенток с частичной или полной регрессией реже встречаются случаи с наличием трех и четырех типов структур в сравнении с больными со

стабилизацией или прогрессированием опухолевого процесса. Т.е., опухоли с большим количеством различных типов структур менее чувствительны к НАХТ. Кроме того, у пациенток с полной или частичной регрессией реже выявляются альвеолярные структуры по сравнению с больными, у которых эффект НАХТ не выражен. Подобная закономерность наблюдается и в отношении трабекулярных структур. Другими словами, наличие альвеолярных и трабекулярных структур в опухолях молочной железы предопределяет отсутствие ответа на НАХТ. Интересно, что частота встречаемости различных типов структур не различается между пациентами с наличием и без НАХТ [8].

### **Резюме**

В течение последних лет, ВОГ остается одной из самых горячих тем исследований в современной онкологии. Такое пристальное внимание исследовательского общества к проблеме ВОГ в первую очередь связано с её ключевой ролью в эффективности терапии и прогрессировании онкологических заболеваний, что диктует необходимость разработки и внедрения методов оценки и/или регуляции опухолевого разнообразия в диагностику и лечение рака. Если генетическая ВОГ является наиболее популярным предметом исследования, то морфологическое разнообразие в пределах опухолей и его механизмы остаются полностью неизученными. Тем не менее, морфологические характеристики опухолей на протяжении долгого времени используются для определения степени злокачественности онкологических заболеваний [47, 146]. Кроме того, важность ВОМГ подчеркивается данными работ, показавших ассоциацию между эффективностью терапии, лимфогенным и отдаленным метастазированием и выживаемостью онкологических больных, с одной стороны, и специфическими гистологическими паттернами (морфологическими структурами) опухолевых клеток, с другой стороны [184, 294, 297, 347].

Подобное наблюдается и для ВОМГ при РМЖ. Первые работы подчеркнули значительную роль ВОМГ в прогрессии РМЖ и эффективности предоперационной химиотерапии [8-10, 17, 18]. Однако, механизмы формирования ВОМГ при РМЖ, а также факторы, которые могли бы объяснить природу ассоциации различных морфологических структур с прогнозом заболевания и результативностью терапии, в настоящее время не известны. С одной стороны, образование разных морфологических структур может быть связано с реализацией программы ЭМП. В этом ракурсе, тубулярные структуры из-за их высокой дифференцировки и близости по форме к нормальным протокам молочной железы, вероятно, представляют производное наиболее “полноценных” эпителиальных клеток. Напротив, дискретные варианты опухолевых клеток, скорее, представляют конечную мезенхимную фазу такой трансформации. Другие же структуры могут отражать промежуточные состояния ЭМП [17]. Принимая во внимание важнейшую роль ЭМП в приобретении клетками локомоторного фенотипа, можно предположить, что ВОМГ при РМЖ является отражением различных паттернов инвазивного роста. С другой стороны, морфологическая гетерогенность РМЖ может быть связана с дифференцировкой ОСК, влиянием опухолевого микроокружения и/или клональной эволюцией, приводящей к появлению специфических генетических нарушений в опухолевых клетках.

Вышеописанное, вероятно, может объяснять и механизмы вклада ВОМГ в прогрессию РМЖ и эффективность химиотерапии. Так, связь альвеолярных структур с лимфогенным метастазированием может объясняться наличием в их составе опухолевых клеток с гено- и фенотипом, достаточным для формирования метастазов. Кроме того, допускается наличие двух механизмов лимфогенного метастазирования (связанного и несвязанного с альвеолярными структурами), поскольку в части случаев с локорегионарными метастазами данные структуры не обнаруживаются [10]. Связь коэффициента  $T_p/T_{уб}$ , в частности трабекулярных структур, с

гематогенным метастазированием в кости или печень может объясняться наличием на опухолевых клетках, формирующих данные морфологические структуры, лигандов, способствующих их адгезии в сосудистом русле костного мозга и печени. В этой связи сравнение фенотипов трабекулярных и тубулярных структур могло бы позволить выявить молекулы, вовлеченные в формирование метастазов в костях и печени [18]. В целом, детальный анализ генотипа и фенотипа различных морфологических структур, а также их микроокружения, несомненно, предоставил бы исчерпывающую информацию относительно механизмов формирования ВОМГ и её вклада в прогрессию РМЖ и результативность лечения.

Таким образом, настоящее исследование было направлено на изучение природы внутриопухолевой морфологической гетерогенности рака молочной железы и идентификацию факторов, обуславливающих её вклад в прогрессию данного заболевания и эффективность химиотерапии.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Клинико-патологические характеристики больных раком молочной железы

В работу вошло 700 больных IC NST (возраст от 21 до 90 лет, T<sub>1-4</sub>N<sub>0-3</sub>M<sub>0</sub>), проходивших лечение в отделении общей онкологии НИИ онкологии Томского НИМЦ с 1990 по 2015 гг., из которых:

- 676 пациенток (249 без НАХТ и 427 с НАХТ; таблица 1) вошли в морфологический анализ наличия опухолевых структур и исследование их ассоциации с метастазированием и эффективностью химиотерапии;

- 45 больных (без НАХТ; таблица 2) вошли в иммунофлюоресцентное исследование количества CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> ОСК в различных структурах и макрофагов и фибробластов в их микроокружении;

- 80 пациенток (46 без НАХТ и 34 с НАХТ; таблица 3) вошли в иммуногистохимическое исследование (ИГХ) ассоциации экспрессии инвазивных маркеров в морфологических структурах с метастазированием;

- 12 пациенток (без НАХТ; таблица 4) были включены в молекулярно-генетическое исследование хромосомных aberrаций и экспрессионного профиля структур с помощью микрочипов (микроматриц), поиск на основе полученных данных маркеров опухолевой инвазии и анализ транскриптома клеток с различным инвазивным фенотипом.

Варианты схем НАХТ и ее эффективности приведены в таблицах 1 и 3.

Постановка диагноза IC NST проводилась согласно рекомендациям ВОЗ [175]. Классификация на молекулярные подтипы выполнялась на основе результатов ИГХ окрашивания образцов РМЖ на рецепторы к эстрогенам (ER, от англ. estrogen receptor), прогестерону (PR, от англ. progesterone receptor) и эпидермальному фактору роста (HER2) и маркеру пролиферации Ki-67 согласно рекомендациям Санкт-Галлена (2015): люминальный А (экспрессия ER и/или PR, отсутствие HER2, Ki-67 менее чем 20%), люминальный В HER2<sup>-</sup> (экспрессия ER и/или PR, отсутствие HER2, Ki-67

более или равен 20%), люминальный В HER2<sup>+</sup> (экспрессия ER и/или PR и HER2), HER2<sup>+</sup> (отсутствие ER, PR, наличие HER2), и трижды-негативный (отсутствие ER, PR, HER2) [71]. Для ИГХ использовали следующие антитела: анти-ER (клон 1D5, мышь, моноклональные, RTU, Dako, Дания), анти-PR (клон PgR636, мышь, моноклональные, RTU, Dako, Дания), анти-HER2 (A0485, кролик, поликлональные, 1:800, Dako, Дания), и анти-Ki-67 (клон MIB-1, мышь, моноклональные, RTU, Dako, Дания). ИГХ проводили по стандартному протоколу. Препараты, окрашенные на ER и PR, анализировали с помощью метода HSCORE [164]. Экспрессию HER2 оценивали по шкале 0-3+. Опухоли с уровнем экспрессии HER2 на 3+ и 2+ (при условии подтверждения с помощью флюоресцентной гибридизации *in situ*, FISH) характеризовали как HER2-позитивные, а случаи с 0 и 1+ как негативные. При отсутствии амплификации при FISH анализе опухоли с уровнем 2+ также относили к HER2-негативным. В случае анализа экспрессии Ki-67 считали процент иммуноокрашенных опухолевых клеток. Анализировали по крайней мере 10 полей зрения по 1000 клеток на образец (увеличение 400х).

Эффективность НАХТ оценивалась по результатам инструментального исследования (УЗИ и маммография) по шкале ВОЗ. Под наличием объективного ответа на НАХТ подразумевалась полная или частичная регрессия опухоли, под отсутствием – стабилизация или прогрессирование.

Исследование выполнялось в соответствии с Хельсинкской декларацией (1964), дополненной в 1975 и 1983 гг. На исследование было получено разрешение этического комитета (№ 10 от 29 сентября 2011 г.) Томского НИИ онкологии. От всех пациентов получено информированное согласие на добровольное участие в исследовании.

Работа выполнена на оборудовании Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» Томского НИМЦ и Томского регионального центра коллективного пользования.

Таблица 1 – Клинико-патологическая характеристика пациентов, вошедших в морфологическое и ассоциативное исследование

Параметр	Показатель	Пациенты без НАХТ (n=249), N (%)	Пациенты с НАХТ (n=427), N (%)
Возраст	≤50 лет	77 (31,0)	230 (53,8)
	>50 лет	172 (69,0)	197 (46,2)
Состояние менструальной функции	сохранена	169 (67,9)	224 (52,4)
	менопауза	80 (32,1)	203 (47,6)
Размер опухоли (T)	T <sub>1</sub>	145 (58,2)	101 (23,7)
	T <sub>2</sub>	95 (38,2)	266 (62,3)
	T <sub>3</sub>	8 (3,2)	48 (11,2)
	T <sub>4</sub>	1 (0,4)	12 (2,8)
Степень злокачественности	1	22 (8,8)	23 (5,3)
	2	204 (81,9)	284 (66,6)
	3	23 (9,3)	36 (8,4)
	нет данных	0 (0,0)	84 (19,7)
Лимфогенные метастазы (N)	N <sub>0</sub>	146 (58,6)	213 (49,9)
	N <sub>1</sub>	65 (26,1)	138 (32,3)
	N <sub>2</sub>	26 (10,5)	64 (15,0)
	N <sub>3</sub>	12 (4,8)	12 (2,8)
Гематогенные метастазы (M)	M <sub>0</sub>	222 (89,2)	127 (29,7)
	M <sub>1</sub>	27 (10,8)	219 (51,3)
	нет данных	0 (0,0)	81 (19,0)
Экспрессия рецепторов к эстрогенам	есть	184 (74,0)	167 (39,1)
	нет	65 (26,0)	158 (37,0)
	нет данных	-	102 (23,8)
Экспрессия рецепторов к прогестерону	есть	159 (63,9)	154 (36,1)
	нет	90 (36,1)	173 (40,5)
	нет данных	-	100 (23,4)
Экспрессия рецепторов к эпидермальному фактору роста (HER2)	-	202 (81,1)	160 (37,5)
	+	1 (0,4)	76 (17,9)
	++	19 (7,6)	26 (6,0)
	+++	7 (2,9)	8 (1,8)
	нет данных	20 (8,0)	157 (36,8)
Молекулярно-генетический тип	люминальный	195 (78,3)	153 (35,8)
	A	126 (50,6)	89 (20,8)
	B HER2 <sup>-</sup>	41 (16,5)	47 (11,0)
	B HER2 <sup>+</sup>	28 (11,2)	17 (3,9)
	трижды-негативный	36 (14,5)	96 (22,5)
	HER2-позитивный	17 (6,8)	26 (6,1)
	нет данных	1 (0,4)	152 (35,6)
Схема НАХТ	CMX/CMF	-	205 (48,0)
	CAH	-	57 (13,4)
	таксотер	-	31 (7,2)
	FAC	-	120 (28,1)
	нет данных	-	14 (3,3)
Эффект НАХТ	полная	-	27 (6,3)



	регрессия		
	частичная регрессия	-	183 (42,9)
	стабилизация	-	133 (31,2)
	прогрессия	-	21 (4,9)
	нет данных	-	63 (14,7)
Примечание: НАХТ – неоадьювантная химиотерапия; СМХ – циклофосфан, метотрексат, капецитабин; СМФ – циклофосфан, метотрексат, 5-фторурацил; ФАС – 5-фторурацил, доксорубин, циклофосфан; САХ – циклофосфан, доксорубин, капецитабин.			

Таблица 2 – Клинико-патологическая характеристика пациентов, вошедших в иммунофлюоресцентное исследование

Параметр	Показатель	Пациенты (n=45), N (%)
Возраст	≤50 лет	17 (37,7)
	>50 лет	28 (62,3)
Размер опухоли (T)	T <sub>1</sub>	21 (46,7)
	T <sub>2</sub>	23 (51,1)
	T <sub>3</sub>	1 (2,2)
	T <sub>4</sub>	0
Степень злокачественности	1	5 (11,1)
	2	37 (82,2)
	3	3 (6,7)
Лимфогенные метастазы (N)	N <sub>0</sub>	28 (62,2)
	N <sub>1</sub>	11 (24,4)
	N <sub>2</sub>	2 (4,5)
	N <sub>3</sub>	3 (6,7)
	нет данных	1 (2,2)
Гематогенные метастазы (M)	M <sub>0</sub>	42 (93,3)
	M <sub>1</sub>	3 (6,6)
Экспрессия рецепторов к эстрогенам	есть	44 (97,8)
	нет	1 (2,2)
Экспрессия рецепторов к прогестерону	есть	38 (84,4)
	нет	7 (15,6)
Экспрессия рецепторов к эпидермальному фактору роста (HER2)	–	7 (15,6)
	+	25 (55,6)
	++	10 (22,2)
	+++	3 (6,6)
Молекулярный подтип	люминальный	45 (100,0)
	A	11 (24,5)
	B HER2 <sup>-</sup>	23 (51,0)
	B HER2 <sup>+</sup>	11 (24,5)
	трижды-негативный	0 (0,0)
	HER2-позитивный	0 (0,0)

Таблица 3 – Клинико-патологическая характеристика пациентов, вошедших в иммуногистохимическое исследование

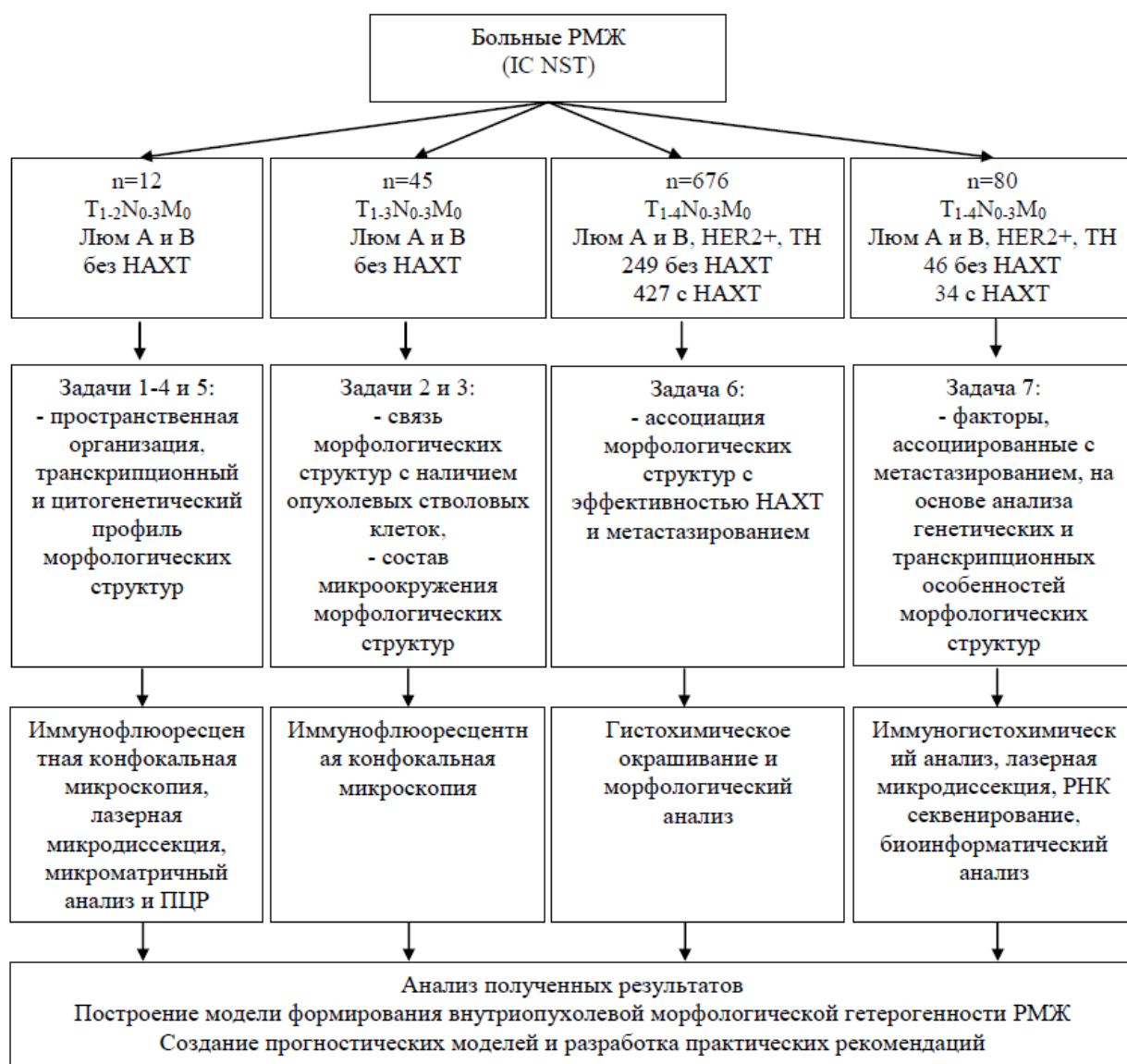
Клинико-патологический параметр	Показатель	Пациенты (n=80), N (%)
Возраст	≤50 лет	43 (53,8)
	>50 лет	36 (45,0)
	нет данных	1 (1,2)
Состояние менструальной функции	сохранена	41 (51,2)
	менопауза	34 (42,5)
	нет данных	5 (6,3)
Размер опухоли (T)	T <sub>1</sub>	29 (36,2)
	T <sub>2</sub>	37 (46,3)
	T <sub>3</sub>	3 (3,7)
	T <sub>4</sub>	7 (8,8)
	нет данных	4 (5,0)
Лимфогенные метастазы (N)	N <sub>0</sub>	45 (56,2)
	N <sub>1</sub>	17 (21,3)
	N <sub>2</sub>	7 (8,8)
	N <sub>3</sub>	6 (7,5)
	нет данных	5 (6,2)
Гематогенные метастазы (M)	M <sub>0</sub>	41 (51,3)
	M <sub>1</sub>	39 (48,7)
Экспрессия рецепторов к эстрогенам	есть	43 (53,7)
	нет	9 (11,3)
	нет данных	28 (35,0)
Экспрессия рецепторов к прогестерону	есть	41 (51,2)
	нет	9 (11,3)
	нет данных	30 (37,5)
Экспрессия рецепторов к эпидермальному фактору роста (HER2)	–	20 (25,0)
	+	27 (33,7)
	++	5 (6,2)
	+++	9 (11,3)
	нет данных	19 (23,8)
Молекулярно-генетический тип	люминальный	47 (58,7)
	A	21 (26,2)
	B HER2 <sup>–</sup>	23 (28,7)
	B HER2 <sup>+</sup>	3 (3,8)
	трижды-негативный	17 (21,2)
	HER2-позитивный	9 (11,3)
	нет данных	7 (8,8)
НАХТ	есть	34 (42,5)
	нет	46 (57,5)
Схема НАХТ	CMX/CMF	2 (5,9)
	CAH	2 (5,9)
	Таксотер	3 (8,8)
	FAС	8 (23,5)
	нет данных	19 (55,9)
Эффект НАХТ	полная регрессия	0
	частичная регрессия	10 (29,4)

	стабилизация	7 (20,6)
	прогрессия	2 (5,9)
	нет данных	15 (44,1)
Примечание: НАХТ – неоадьювантная химиотерапия; СМХ – циклофосфан, метотрексат, капецитабин; СМФ – циклофосфан, метотрексат, 5-фторурацил; FAC – 5-фторурацил, доксорубин, циклофосфан; САХ – циклофосфан, доксорубин, капецитабин.		

Таблица 4 – Клинико-патологическая характеристика пациентов, вошедших в молекулярно-генетическое исследование

Пациенты	Возраст	СЗ	TNM	Молекулярный подтип	ER	PR	HER2	Ki-67 (%)	Анализ
1	46	2	T <sub>1b</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Люм В HER2 <sup>-</sup>	+	+	0	34	Микро чипы
2	40	2	T <sub>2</sub> N <sub>2</sub> M <sub>0</sub>	Люм В HER2 <sup>-</sup>	+	+	1+	24	
3	49	2	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Люм В HER2 <sup>+</sup>	+	+	2+	45	
4	59	2	T <sub>2</sub> N <sub>3</sub> M <sub>0</sub>	Люм В HER2 <sup>-</sup>	+	+	1+	24	ПЦР
5	65	2	T <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Люм В HER2 <sup>-</sup>	+	+	1+	45	
6	49	2	T <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Люм В HER2 <sup>+</sup>	+	+	2+	38	
7	42	3	T <sub>1</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	Люм В HER2 <sup>-</sup>	+	+	1+	37	
8	53	1	T <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Люм А	+	+	1+	19	
9	62	2	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Люм В HER2 <sup>-</sup>	+	-	0	34	
10	65	1	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Люм В HER2 <sup>+</sup>	+	-	2+	27	
11	49	2	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Люм В HER2 <sup>-</sup>	+	+	1+	24	РНК-сек
12	62	3	T <sub>1</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	Люм В HER2 <sup>+</sup>	-	-	2+	44	
Примечание: СЗ – степень злокачественности; ER – рецепторы к эстрогенам; PR – рецепторы к прогестерону; РНК-сек – РНК-секвенирование. Случаи с HER2 2+ были подтверждены с помощью FISH.									

## 2.2 Дизайн исследования



## 2.3 Методы исследования

### 2.3.1 Морфологический анализ

С помощью морфологического анализа оценивалось присутствие различных типов морфологических структур в образцах биопсийного и операционного материала, полученных от больных РМЖ. Для этого подготавливали срезы (5-6 мкм) из 2-6 формалин-фиксированных парафин-залитых (FFPE) образцов опухолевой ткани молочной железы и проводили их окраску гематоксилином и эозином по стандартному протоколу. Срезы депарафинизировали и обезвоживали с помощью ксилола (2 раза по 10 мин)

и 100% этанола (2 раза по 5 мин). Окрашивание 0,1% раствором гематоксилина проводилось в течение 10 мин с последующей промывкой в деионизованной воде (5 мин). Окрашивание 0,5% раствором эозина проводилось в течение 1 мин, далее срезы промывались в деионизованной воде и подвергались регидратации посредством погружения через батарею этиловых спиртов: 50% (10 раз), 70% (10 раз), 95% (30 сек) и 100% (1 мин). В конце срезы несколько раз погружались в ксилол и заключались под покровные стекла.

Срезы просматривались 2-3 врачами-патологами на предмет представленности тубулярных, альвеолярных, солидных, трабекулярных и дискретных групп опухолевых клеток. Тубулярные структуры идентифицировали как скопления из 1-2 рядов опухолевых клеток, формирующих подобие колец. Альвеолярные структуры определяли как опухолевые образования округлой формы, состоящие из 10-30 клеток. Солидные структуры выявляли как бесформенные массы, состоящие из сотен опухолевых клеток. Трабекулярные структуры идентифицировали как короткие линейные объединения, образованные одним рядом опухолевых клеток, и широкие клеточные кластеры, состоящие из 2-3 рядов клеток. К дискретным группам относили одиночные (единичные, отдельные) опухолевые клетки и скопления из 2-5 клеток [10, 17, 18].

### 2.3.2 Иммунофлюоресцентное окрашивание

Иммунофлюоресцентное окрашивание использовали для решения четырёх задач: 1) анализа трёхмерной организации различных морфологических структур РМЖ; 2) оценки количества CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> ОСК в различных морфологических структурах РМЖ; 3) оценки количества макрофагов и фибробластов в микроокружении различных морфологических структур РМЖ; 4) подготовки срезов с целью последующей лазерной микродиссекции клеток, позитивных и негативных по экспрессии белков

KIF14, MIEAP, EZR из торпедоподобных структур опухолей молочной железы.

Для задач 1-3 протокол иммунофлюоресцентного окрашивания был единым за исключением используемых антител и времени инкубации с ними (таблица 5).

Таблица 5 – Антитела, использованные в иммунофлюоресцентном окрашивании, и условия его проведения

	Толщина срезов	Первичные антитела, время инкубации	Вторичные антитела, время инкубации
3D организация	40 мкм	цитокератин 7 (мышь, RTU, клон OV-TL, Дако, Дания), 30 мин.	козьи антитела к IgG (H+L) мыши (родамин, Thermo Fisher Scientific, США), 30 мин.
CD44 <sup>+</sup> CD24 <sup>-</sup> ОСК	6-7 мкм	CD44 (мышь, 1:50, v.6, клон VFF7, Leica Biosystems, Германия), 60 мин.	козьи антитела к IgG (H+L) мыши (Alexa fluor 488, Thermo Fisher Scientific, США), 45 мин.
		CD24 (первично конъюгированные с фикоэритрином, 1:50, клон 910019, Novus Bio, США), 60 мин.	–
Макрофаги и фибробласты	6-7 мкм	CD68 (мышь, RTU, клон KP1, Дако, Дания), 45 мин.	козьи антитела к IgG (H+L) мыши (Alexa fluor 488, Abcam, США), 45 мин.
		aSMA (мышь, RTU, клон 1A4, Дако, Дания), 45 мин.	
		RS1 (кролик, 1:1000, Novus Bio, США), 45 мин.	козьи антитела к IgG (H+L) кролика (Cy3, Abcam, США), 45 мин.
		FAP (кролик, 1:2000, Abcam, США), 45 мин.	

Основные этапы иммунофлюоресцентного окрашивания были следующими:

1. Подготовка срезов из FFPE образцов опухолевой ткани и монтирование их на стекла с поли-L-лизиновым покрытием (Thermo Fisher Scientific, США).

2. Депарафинизация срезов через серию ксилолов (3 раза по 10 мин) и спиртов (3 раза по 5 мин), отмывка в дистиллированной воде в течение 10 мин.

3. Демаскировка ткани в буфере ЭДТА (pH 8,0) при 97 °C в течение 20 мин, отмывка в фосфатном буфере (PBS) (Дакко, Дания).

4. Блокирование эндогенной пероксидазной активности: инкубация с Peroxidase blocking reagent (Дакко, Дания) в течение 10 мин и отмывка в PBS.

5. Блокирование неспецифического связывания антител: инкубация с 3% раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) в 1xPBS с 0,02% Tween-20 (Amresco, США) в течение 60 мин.

6. Инкубация с первичными антителами в темноте при комнатной температуре и отмывка в PBS (таблица 5).

7. Инкубация с вторичными конъюгированными антителами в темноте при комнатной температуре и отмывка в PBS (таблица 5).

8. Окраска ядерным красителем DAPI (Thermo Fisher Scientific, США) в течение 2 мин.

9. Заключение в среду VECTASHIELD (Vector Labs, США).

Для каждого из исследований использовали отрицательный контроль – ткань опухоли, окрашенную по представленному протоколу, исключая этап инкубации с первичными антителами.

Оценку результатов иммунофлюоресцентного окрашивания проводили с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 780 и программы ZEN-2012-SP1 (версия 8.1, Carl Zeiss, Германия). Визуализацию трёхмерной (3D) организации морфологических структур выполняли на основе 40-90 оптических срезов (z-стеков) с дистанцией 0,2-0,5 мкм. ОСК идентифицировали по мембранной экспрессии CD44 и отсутствию CD24 (CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>). ОСК подсчитывали в 10 структурах каждого типа (тубулярных, альвеолярных, солидных и трабекулярных) и 100 дискретных группах на один образец. Определяли частоту встречаемости CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> клеток в морфологических структурах и долю (%) CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> клеток среди

других опухолевых клеток, составляющих морфологические структуры. Проценты  $CD44^+CD24^-$  ОСК в разных структурах по каждому случаю представляли в виде арксинус-трансформированных величин и подсчитывали среднее значение (M) и стандартную ошибку (SE). Нормальную ткань молочной железы, прилежащую к опухоли и окрашенную на маркеры CD44 и CD24, использовали как негативный контроль.

Два типа популяций макрофагов ( $CD68^+RS1^-$  и  $CD68^+RS1^+$ ) и фибробластов ( $\alpha SMA^+FAP^+$  и  $\alpha SMA^-FAP^+$ ) анализировали в микроокружении каждого типа морфологических структур. В частности, подсчитывали частоту и абсолютное количество этих клеток в микроокружении структур. Приблизительно оценивалось 50 микроокружений каждого типа структур на образец. Ширина учитываемого микроокружения была в размере 2-3 диаметров клетки.

Для решения задачи 4 (подготовка срезов с целью последующей лазерной микродиссекции клеток, позитивных и негативных по экспрессии белков KIF14, MIEAP, EZR из торпедоподобных структур опухолей молочной железы) разработан протокол иммунофлюоресцентного окрашивания, предотвращающий деградацию РНК в клетках срезов, подготовленных из свежих образцов РМЖ. Для этого 7 мкм срезы образцов опухоли помещали на стёкла с PET-мембраной (Carl Zeiss, Германия), предварительно обработанные ингибитором РНКаз RNAZap (Thermo Fisher Scientific, США). Срезы фиксировали в метаноле (Sigma, США) в течение 5 мин и отмывали в PBS, содержащем ингибитор РНКаз RNAlater (Thermo Fisher Scientific, США) в соотношении 5:1, в течение 2 мин. Затем срезы инкубировали в течение 5 мин с первичными антителами к цитокератину 7 (CK7, OV-TL, 1:50, Agilent, США), KIF14 (HPA038061, 1:500, Sigma, США) или SPATA18/MIEAP (HPA036854, 1:100, Sigma, США) или EZR (HPA021616, 1:500, Sigma, США) в растворе PBS:RNAlater (5:1) и отмывали 2 раза раствором PBS:RNAlater (5:1) по 2 мин. После этого срезы инкубировали в течение 5 мин с вторичными антителами к IgG (H+L) мыши



(Alexa fluor 488, Abcam, США) и к IgG (H+L) кролика (Alexa fluor 555, Abcam, США), разведенными в растворе PBS:RNAlater (5:1). В конце, добавляли краситель DAPI в растворе PBS:RNAlater (5:1) для окрашивания ядер. Срезы отмывали 2 раза в течение 5 сек раствором PBS при комнатной температуре, обезвоживали через батарею этиловых спиртов (80%, 96% и 100%) и высушивали. В качестве контроля неспецифического связывания срезы инкубировали только с какими-то одними первичными или вторичными антителами.

Целостность РНК (Рисунок 9) в срезах после иммуноокрашивания оценивали с помощью показателя RIN (от англ. RNA integrity). РНК выделяли с помощью набора RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen, США) согласно инструкции производителя и с добавлением на этапе элюирования ингибитора РНКаз (Ribolock RNase inhibitor, Fermentas, Литва). Образцы РНК анализировали с помощью автоматического гель-электрофореза на приборе 2200 TapeStation и набора реагентов High Sensitivity RNA ScreenTape (Agilent, США).

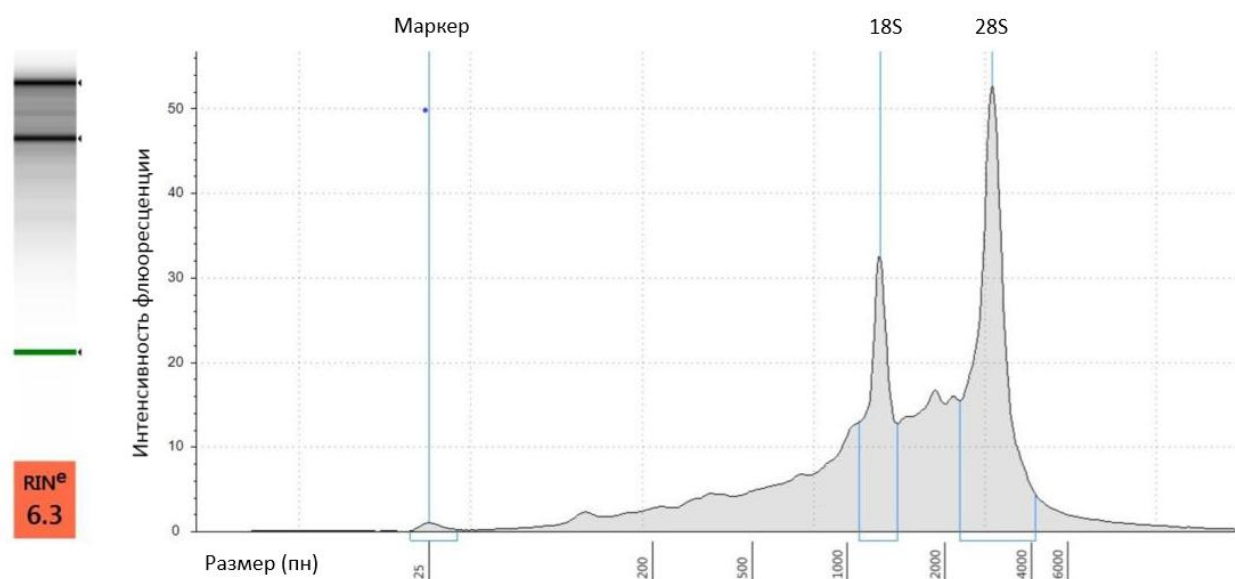


Рисунок 9 – Показатель RIN образца РНК, полученного из иммуноокрашенных срезов опухолевой ткани молочной желез. 18S и 28S – субъединицы рибосомальной РНК; пн – пара нуклеотидов.

### 2.3.3 Лазерная микродиссекция

Лазерную микродиссекцию PALM (Carl Zeiss, Германия) использовали для получения двух вариантов клеточного материала.

В первом случае с помощью PALM выделяли тубулярные, солидные, альвеолярные, трабекулярные структуры и дискретные группы опухолевых клеток из опухолевой ткани молочной железы. Для этого подготавливали 5 мкм срезы из свежемороженых образцов опухоли молочной железы и проводили их окраску гематоксилином и эозином согласно протоколу LCM – RNA handling (Carl Zeiss, Германия). Идентификация морфологических структур в опухолевых срезах проводилась согласно описанию, указанному в разделе 2.3.1 Морфологический анализ. Микродиссектированный материал использовали для анализа хромосомных нарушений с помощью микроматричной сравнительной геномной гибридизации (от англ. array comparative genome hybridization, aCGH), микроматричного экспрессионного профилирования и валидации его результатов посредством количественной ПЦР в режиме реального времени.

Для aCGH лазерной микродиссекции подвергались три образца из разных участков каждой опухоли молочной железы (Рисунок 10). Всего в исследование вошло 3 случая с РМЖ. Из каждого опухолевого образца выделяли все пять типов морфологических структур: 2-3 (~20-30 клеток) тубулярных, альвеолярных и трабекулярных структуры, одна (~70-80 клеток) солидная структура и 10 дискретных групп (до 20 клеток). Микродиссектированный материал (всего 45 образцов) катапультировался в крышки пробирок с адгезивным наполнителем (Carl Zeiss, Германия) и хранился при комнатной температуре до проведения полногеномной амплификации.

Для экспрессионного анализа выделяли все пять типов структур из одного или всех трёх образцов каждой опухоли молочной железы (n=10, Рисунок 10). В целом, из каждой опухоли было получено по 90-120 (~900-1500 клеток) тубулярных, альвеолярных и трабекулярных структур, 50-60 (до

5000 клеток) солидных структур и 300-350 дискретных групп (~400-600 клеток). Кроме того, проводили микродиссекцию гистологически нормального эпителия протоков (90-120 образцов или ~900-1500 клеток) из каждого из 10 образцов ткани молочной железы, прилежащей к опухоли. В 7 из 10 опухолей были обнаружены и, соответственно, выделены все пять типов структур, тогда как в 3 опухолях отсутствовали тубулярные структуры. Микродиссектированный материал (всего 57 образцов) катапультировался в крышки пробирок, заполненные лизирующим буфером (RLT lysis buffer, Qiagen, США) с содержанием β-меркаптоэтанола и хранился при -80°C до выделения РНК.

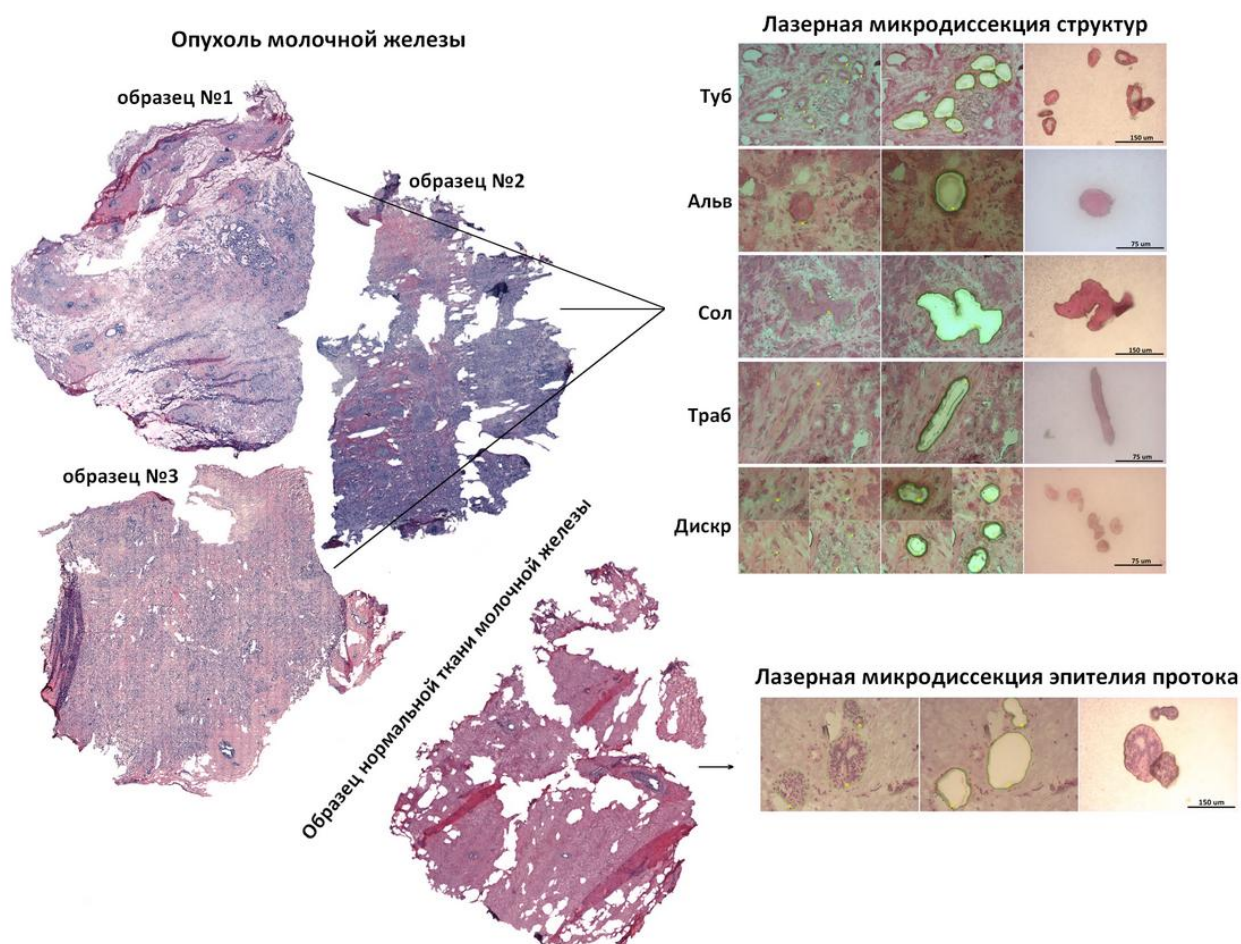


Рисунок 10 – Получение морфологических структур из ткани РМЖ с помощью лазерной микродиссекции. Туб – тубулярные; Альв – альвеолярные; Сол – солидные; Траб – трабекулярные; Дискр – дискретные.

Различия в количестве микродиссектированных образцов структур, использованных для aCGH и экспрессионного анализа, были связаны с требованиями протоколов для проведения полногеномной и полнотранскриптомной амплификации.

Во втором случае PALM использовалась для получения опухолевых клеток, позитивных и негативных по экспрессии белков KIF14, MIEAP, EZR из торпедоподобных структур опухолей молочной железы (n=4). Количество клеток в пределах каждого из микродиссектированных образцов варьировало от 50 до 200 (Рисунок 11). В целом, было получено 24 микродиссектированных образца: по 4 образца каждого типа клеток – KIF14<sup>+</sup>, KIF14<sup>-</sup>, MIEAP<sup>+</sup>, MIEAP<sup>-</sup>, EZR<sup>+</sup>, и EZR<sup>-</sup> клеток. Микродиссектированный материал катапультировался в крышки пробирок, заполненные лизирующим буфером (Buffer RL, Norgen, Канада) с содержанием β-меркаптоэтанола и хранился при -80°C до выделения РНК..

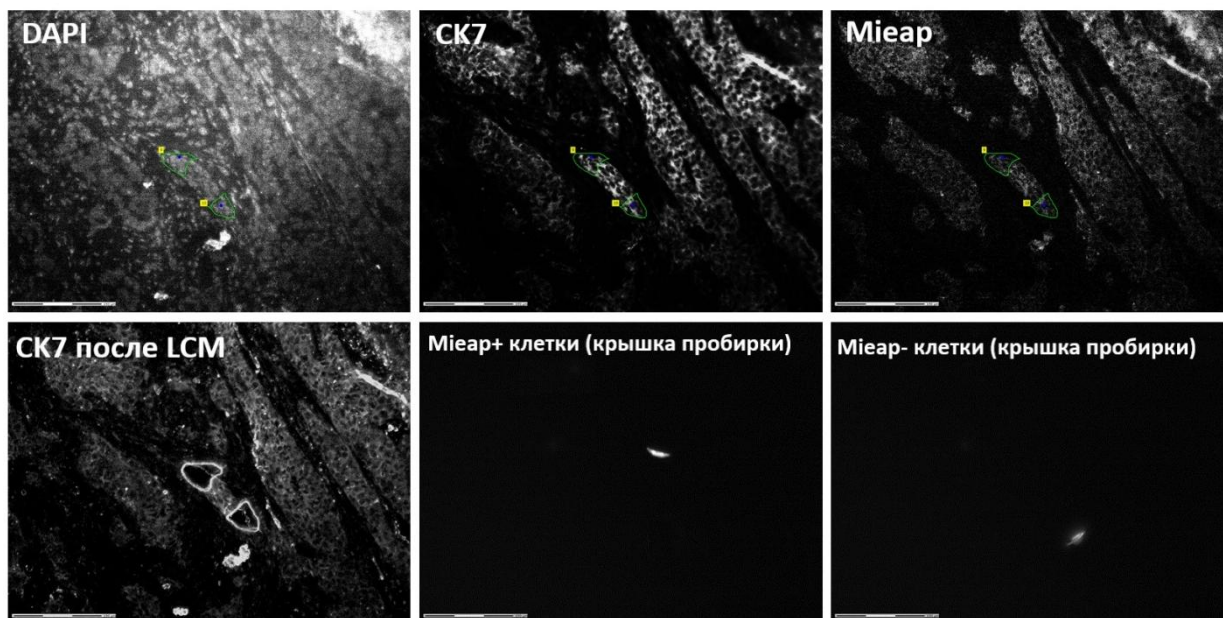


Рисунок 11 – Лазерная флюоресцентная микродиссекция MIEAP<sup>+</sup> и MIEAP<sup>-</sup> клеток из торпедоподобных структур РМЖ. DAPI – ядерный краситель; CK7 – цитокератин 7 (эпителиальный маркер); LCM – лазерная микродиссекция.

#### 2.3.4 Полногеномная амплификация и микроматричная сравнительная геномная гибридизация

Микродиссектированные образцы (n=45) морфологических структур использовали для проведения полногеномной амплификации с помощью набора PicoPLEX WGA согласно инструкции производителя (Rubicon Genomics, Inc., США) и собственным модификациям, касающимся уменьшения количества циклов амплификации в случае использования большого количества клеток: 12 циклов для 10-30 клеток (тубулярные, альвеолярные, трабекулярные и дискретные группы) и 9 циклов для 100 клеток (солидные структуры). Амплифицированная ДНК очищалась от остатков реакционной смеси с помощью QIAquick PCR Purification (Qiagen, США). Концентрация ДНК оценивалась спектрофотометрически (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific, США). Качество образцов ДНК анализировали с использованием кассет Genomic DNA Screen Tape и станции автоматического гель-электрофореза 2200 TapeStation (Agilent, США). В качестве позитивного контроля при полногеномной амплификации использовали ДНК индивида женского пола (Agilent, США). Образцы ДНК хранились при  $-80^{\circ}\text{C}$  до постановки aCGH.

Для aCGH использовали микроматрицы SurePrint G3 Unrestricted CGH ISCA v2, 8x60K (Agilent, США). Подготовка образцов ДНК проводилась с помощью набора SureTag DNA Labeling Kit согласно инструкции производителя (Agilent, США). Микрочипы анализировали с помощью сканера SureScan Microarray Scanner (Agilent, США) и программного обеспечения CytoGenomics v. 3.0.2.11 (Agilent, США). Данные aCGH были загружены в базу данных GEO (Gene Expression Omnibus) и доступны под номером GSE80758.

#### 2.3.5 Выделение РНК

Микродиссектированные образцы нормальных протоков молочной железы и различных морфологических структур (n=57) использовали для

выделения РНК с помощью набора RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen, США) согласно инструкции производителя и с добавлением на этапе элюирования ингибитора РНКаз (Ribolock RNase inhibitor, Fermentas, Литва). Качество образцов РНК оценивали с помощью показателя RIN на станции автоматического гель-электрофореза 2200 TapeStation с использованием набора реагентов High Sensitivity R6K ScreenTape (Agilent, США). Показатель RIN варьировал от 2,5 до 7,7 (средний ~5,6). Полученные образцы РНК использовали для полнотранскриптомной амплификации и микроматричного экспрессионного профилирования (n=18, см. раздел 2.3.6) и количественной ПЦР (n=39, раздел 2.3.7).

Микродиссектированные образцы опухолевых клеток, позитивных и негативных по экспрессии белков KIF14, MIEAP и EZR и полученных из торпедоподобных структур опухолей молочной железы (n=24), использовали для выделения РНК с помощью набора Single Cell RNA Purification Kit (Norgen, Канада) согласно инструкции производителя и с добавлением на этапе элюирования ингибитора РНКаз (Ribolock RNase inhibitor, Fermentas, Литва). Полученные образцы РНК использовали для подготовки кДНК-библиотек (раздел 2.3.8).

### 2.3.6 Полнотранскриптомная амплификация и микроматричное экспрессионное профилирование

Образцы РНК, выделенные из пяти типов морфологических структур опухолевой ткани и нормальных протоков молочной железы трёх пациенток с РМЖ (всего 18 образцов), использовали для полнотранскриптомной амплификации с помощью набора Ovation PicoSL WTA System V2 kit (NuGEN Technologies, Inc., США) согласно инструкции производителя. Амплифицированные продукты (кДНК) очищали от остатков реакционной смеси, используя набор QIAquick PCR Purification (Qiagen, США). Концентрация кДНК оценивалась спектрофотометрически (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific, США). Образцы кДНК помещались на  $-80^{\circ}\text{C}$  и

хранились до проведения микроматричного транскрипционного профилирования.

Транскриптомное профилирование выполняли с помощью микроматриц SurePrint G3 Human GE v2, 8x60K (Agilent, США). Подготовку образцов кДНК для гибридизации на микроматрицы проводили с помощью набора SureTag DNA labeling kit (Agilent, США) согласно прилагаемому протоколу с некоторыми модификациями: гибридизация 2 мкг меченой кДНК при 65°C на протяжении 22 часов и отсутствие фрагментации кДНК до гибридизации. Визуализация микрочипов проводилась с помощью сканера SureScan Microarray Scanner (Agilent, США). Считывание и экстрагирование сигналов выполнялись с помощью программы Feature Extraction v. 10.7.3.1 (Agilent, США). Программа limma [109, 288] в среде R использовалась для обработки полученных данных. Нормализация интенсивности сигналов выполнялась согласно рекомендациям limma [270]. Так, убирались высоко и низкоинтенсивные точки, влияющие на разброс медианы и среднего значения флюоресцентного сигнала по образцам, и точки с положительными и отрицательными контролями, проводилась коррекция интенсивности сигналов относительно фона и нормализовались данные между разными образцами. Также, для одинаковых генов усреднялись значения сигналов и выбирались интенсивные точки с различными нуклеотидными последовательностями, характеризующими альтернативный сплайсинг. В конце проводили сравнение данных с разных микроматриц посредством построения линейных моделей. Логарифм-трансформированные сигналы (log-fold-change) брались для анализа уровня экспрессии транскриптов в различных морфологических структурах, нормализованного к клеткам нормальных протоков молочной железы.

Для функционального аннотирования, в частности для поиска биологических процессов и канонических сигнальных путей, выраженных в каждом типе морфологических структур, использовали транскрипты, гипер- и гипоэкспрессирующиеся при уровне  $|\log\text{-fold-change}| \geq \log_2 1,5$  и значении

статистической значимости ( $p$  без поправки на множественные сравнения)  $< 0,05$ . Анализ выраженности биологических процессов (The Gene Ontology (GO)) выполнялся с помощью ресурса GeneMANIA [324]. В GO анализ вошли общие и специфические гены для разных морфологических структур, поиск которых выполнялся с помощью Venn-анализа (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>). Точный критерий Фишера с поправкой Бенджамини-Хохберга использовали для идентификации процессов, статистически значимо ассоциированных с тем или иным типом морфологических структур ( $p < 0,05$ ). Анализ выраженности канонических сигнальных путей в каждом типе структур проводили с использованием программы QIAGEN's Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Qiagen, США). Статистическую значимость выраженности сигнальных путей оценивали с помощью точного критерия Фишера. Результаты представляли с использованием следующих параметров: отрицательный десятичный логарифм уровня статистической значимости ( $-\log_{10}(p\text{-value})$ ), доля генов (ratio), составляющих тот или иной сигнальный путь, и процент гипер- и гипоекспрессирующихся генов.

### 2.3.7 Полнотранскриптомная амплификация и количественная ПЦР

Данные микроматричного экспрессионного профилирования валидировали с помощью количественной ПЦР. Для этого, случайным образом были выбраны 6 несвязанных друг с другом генов (таблица 6), и оценен уровень их экспрессии в образцах нормальных протоков молочной железы и различных морфологических структур (всего 39 образцов), полученных от 7 пациенток с РМЖ. Образцы РНК морфологических структур и нормальных протоков ( $n=39$ ) амплифицировали с помощью набора QuantiTect Whole Transcriptome (Qiagen, США). Количественная ПЦР выполнялась в триплетах на амплификаторе Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия). Реакционная смесь включала следующие компоненты: 10 mM dNTPs, 40 mM  $MgCl_2$ , Taq ДНК полимеразы, 10x буфер (160 mM



(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 670 мМ Трис-НСl, 15 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Tween-20), прямой и обратный праймеры, TaqMan зонд, кДНК матрица и деионизованная вода. Образцы подвергались термоциклированию согласно следующей программе: денатурация при 94°C в течение 10 мин (1 цикл); денатурация при 94°C в течение 6 сек и отжиг при 60°C – 10 сек (50 циклов). Считывание сигнала проводилось на зеленом светофилтре на этапе отжига. Программа Vector NTI Advance (Thermo Fisher Scientific, США) и база нуклеотидных последовательностей NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>) использовались для дизайна олигонуклеотидов (таблица 6).

Таблица 6 – Олигонуклеотиды, использованные в количественной ПЦР

Гены	5'-3' прямой и обратный праймеры и FAM/BHQ1 зонды
<i>FN1</i>	CCATCACAGGGTACAGAATAGTCT CACTGAGGGTGACGGAGTTT TAGCAGCACAGAACTCAACCTTCCT
<i>NAT1</i>	TTACTAAGAAAGGGGATCATGGA TCAGTTAATGTTTCCAAGTCCAA TGAAGCATATCTTGAAAGAATTGGCT
<i>CERS2</i>	GATGTCAAGCGAAAGGAT TTC GCTCGGATGTAATTGGCAA CCACCATCATCTCATCAGCTTTTC
<i>LOXL2</i>	CAACGCCTTCCAGGAGAC CGAGCACTTCACTCCACTCA CACGGAGATGTCAACAGCAACAAA
<i>ITGB5</i>	CCTCAGGGAGCCAGAGTGT GCTTCCAGATAGCCAGGAGT TCGGTAGCATCCTCCTTGTTGG
<i>UBE2S</i>	GATCTGCGTCAACGTGCTC CACTTGATGGTCAGCAGTACG AGAGGGACTGGACGGCTGAGCT
<i>ACTB1</i>	GAGAAGATGACCCAGATCATGTT ATAGCACAGCCTGGATAGCAA AGACCTTCAACACCCCAGCCAT
<i>GAPDH</i>	GCCAGCCGAGCCACATC GGCAACAATATCCACTTTACCAGA CGCCCAATACGACCAAATCCG
Примечания: FAM – флюорофор; BHQ1 – тушитель флюоресценции.	

Метод Pfaffl использовался для подсчёта уровня экспрессии генов [258]:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{t, \text{target}}(\text{calibrator} - \text{test})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{t, \text{ref}}(\text{calibrator} - \text{test})}},$$

где  $E$  – эффективность реакции;  $C_t$  – пороговый цикл генов-мишеней (target) и гена-рефери (ref);  $\Delta C_{t, \text{target}}(\text{calibrator} - \text{test}) = C_t$  гена мишени в калибраторе минус  $C_t$  гена мишени в исследуемом образце;  $\Delta C_{t, \text{ref}}(\text{calibrator} - \text{test}) = C_t$  гена-рефери в калибраторе минус  $C_t$  гена-рефери в исследуемом образце [258]. РНК, полученная из нормальных протоков молочной железы, использовалась в качестве калибратора. В качестве генов-рефери использовали *ACTB1* и *GAPDH*. Числовые данные уровня экспрессии генов подвергались логарифмической ( $\log_2$ ) трансформации. Таким образом, результаты количественной ПЦР были представлены как  $\log_2$ -изменения в уровне экспрессии генов интереса относительно генов-рефери и нормального эпителия молочной железы.

### 2.3.8 РНК-секвенирование

Метод РНК-секвенирования использовался для анализа транскриптома опухолевых клеток, позитивных и негативных по экспрессии белков KIF14, MIEAP, EZR и полученных из торпедоподобных структур опухолей молочной железы с помощью лазерной микродиссекции. Выбор данных белков был обусловлен ассоциацией их экспрессии на концах торпедоподобных структур с метастазированием РМЖ.

Образцы РНК ( $n=24$ ) KIF14<sup>+</sup>, KIF14<sup>-</sup>, MIEAP<sup>+</sup>, MIEAP<sup>-</sup>, EZR<sup>+</sup> и EZR<sup>-</sup> клеток использовали для приготовления кДНК-библиотек с помощью набора SMARTER Stranded Total RNA-Seq kit v. 2 (Takara, США). Размер кДНК-библиотек, оцениваемый с помощью набора реагентов HS D1000 ScreenTape и станции автоматического гель-электрофореза 2200 Tape Station (Agilent, США), варьировал от 200 до 800 пн (средний размер 360-380 пн; рисунок 12). Концентрация кДНК-библиотек оценивалась с помощью набора dsDNA HS kit и флюориметра Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США) и варьировала от

1,33 до 15,7 нг/мкл в зависимости от количества клеток в микродиссектированных образцах. Секвенирование кДНК-библиотек проводили в режиме одноконцевого прочтения (75 циклов) на приборе NextSeq 500 (Illumina, США). Количество кластеров варьировало от 204 до 235 (>75%, прошедших фильтрацию), количество прочтений > 20 млн. на образец.

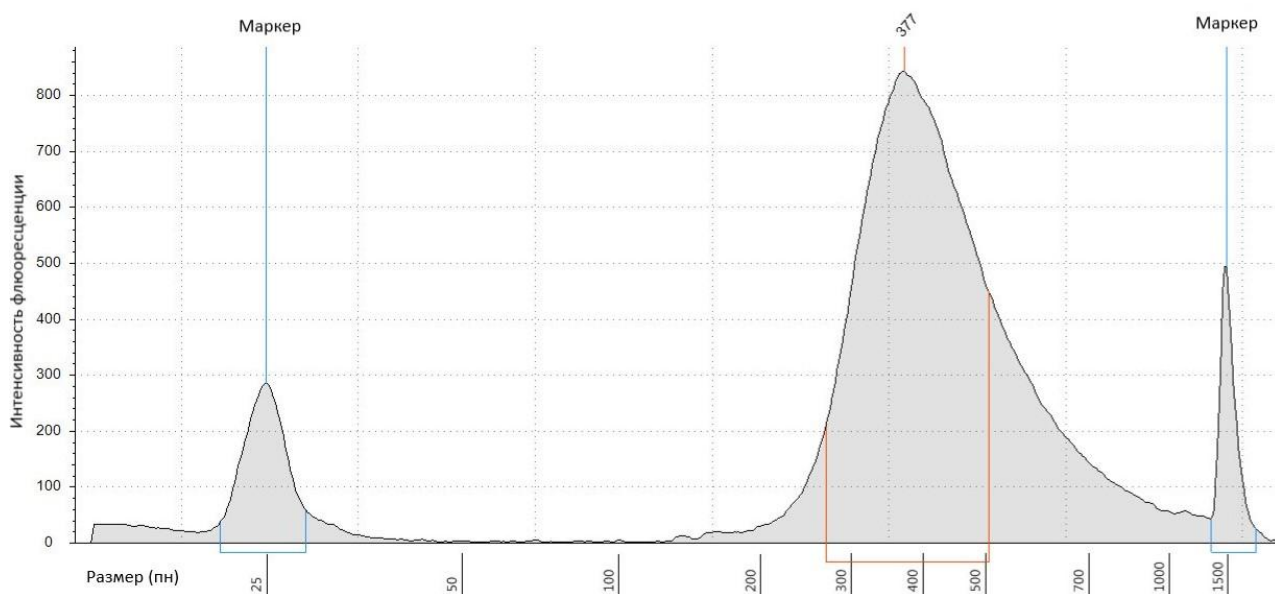


Рисунок 12 – Электрофореграмма анализа качества кДНК-библиотеки, полученной из KIF14<sup>+</sup> опухолевых клеток. Пн – пара нуклеотидов.

Биоинформатический анализ включал картирование прочтений (ридов) с помощью программы STAR v. 2.7.3a [87]. В качестве референса была использована геномная сборка GRCh38 и аннотация GENCODE.R27. Количество ридов в кодирующих и некодирующих участках генома в каждом из образцов оценивалось с помощью инструмента featureCounts [185]. Информация о дифференциально экспрессирующихся генах между образцами KIF14<sup>+</sup> и KIF14<sup>-</sup>, MIEAP<sup>+</sup> и MIEAP<sup>-</sup>, EZR<sup>+</sup> и EZR<sup>-</sup> клеток была получена с помощью программного пакета DESeq2 [197]. Функциональное аннотирование, в частности идентификация биологических процессов и сигнальных путей, выраженных в KIF14<sup>+</sup>, MIEAP<sup>+</sup> и EZR<sup>-</sup> клетках, было

выполнено с помощью онлайн-инструмента Enrichr [335]. Для функционального аннотирования использовали дифференциально экспрессирующиеся гены с  $p < 0,05$ .

### 2.3.9 Статистическая обработка данных

t-критерий Стьюдента с поправкой на множественные сравнения Бенджамини-Хохберга, интегрированный в расширение Limma [109, 288] среды R, использовался для подсчёта значимости различий в экспрессии генов между различными морфологическими структурами опухолевой ткани и нормальными протоками молочной железы.

Статистическая значимость различий в уровне экспрессии генов (РНК-секвенирование) между KIF14<sup>+</sup> и KIF14<sup>-</sup>, MIEAP<sup>+</sup> и MIEAP<sup>-</sup>, EZR<sup>+</sup> и EZR<sup>-</sup> клетками торпедоподобных структур опухолей молочной железы оценивалась с помощью теста Вальда с учетом поправки Бенджамини-Хохберга на множественные сравнения, интегрированного в программный пакет DESeq2 [197] среды R.

Различия в количестве генов эпителиального и мезенхимального фенотипа между разными морфологическими структурами оценивали с помощью теста ANOVA. Корреляция данных микроматричного экспрессионного профилирования и результатов количественной ПЦР выполнялась с использованием линейной регрессии и коэффициента детерминации ( $r^2$ ). Ассоциацию хромосомных aberrаций с различными типами морфологических структур оценивали с помощью иерархического кластерного анализа и подсчёта евклидового расстояния. Различия в количестве CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> ОСК между разными морфологическими структурами оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Различия в частоте обнаружения макрофагов и фибробластов вблизи разных морфологических структур подсчитывали с помощью точного критерия Фишера, тогда как анализ различий в количестве данных клеток между микроокружениями структур проводили с использованием тест Фридмана и

Вилкоксона для зависимых выборок. Зависимость частоты метастазирования РМЖ и вероятности ответа на НАХТ от наличия в опухоли тех или иных типов структур оценивали с помощью критериев  $\chi^2$  и Фишера. Показатели безметастатической выживаемости больных РМЖ с присутствием в опухоли морфологических структур и экспрессией белков KIF14, MIEAP и EZR анализировали с помощью метода Каплан-Майера и логрангового критерия (log-rank test). Модель пропорциональных рисков Кокса (Cox proportional hazard model) использовалась для оценки ассоциации безметастатической выживаемости больных РМЖ с наличием морфологических структур и экспрессией белков KIF14, MIEAP и EZR. Ассоциация представляли как отношение рисков (HR) с 95% доверительным интервалом и значением (log-rank test). Статистический анализ выполнялся в программе STATISTICA 8.0 (Statsoft, Inc., США). Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Также обсуждались различия на уровне тенденции ( $p < 0,1$ ).

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1 Пространственная организация морфологических структур РМЖ

Представления о форме и составе различных морфологических структур РМЖ построены на морфологическом анализе гистохимически окрашенных срезов опухолевой ткани [9, 10, 17]. Однако такой подход не позволяет получить информацию о пространственном строении морфологических структур. В настоящем исследовании, впервые была изучена организация морфологических структур посредством 3D моделирования микрофотографий, полученных с помощью конфокальной микроскопии серийных иммуноокрашенных срезов ткани опухоли молочной железы.

Тубулярные структуры представляют собой формирования по типу “трубок” или “колец”, состоящие из одного слоя опухолевых клеток (Рисунок 13А). Для части этих структур характерна неправильная форма, проявляющаяся в наличии более одного ряда опухолевых клеток на какой-либо стороне структур. Альвеолярные структуры имеют округлую (сфероидальную) форму и содержат до 30 опухолевых клеток (Рисунок 13Б). Солидные структуры представляют собой бесформенные скопления различного размера, включающие десятки-сотни опухолевых клеток. Некоторые солидные структуры имеют клеточные выпячивания – протрузии (от англ. protrusions). (Рисунок 13В). Трабекулярные структуры сформированы 1-2 рядами опухолевых клеток (Рисунок 13Г). Дискретные группы опухолевых клеток включают в себя как единичные (одионочные) опухолевые клетки (Рисунок 13Е), так и скопления из 2-5 клеток с ярко выраженной эпителиальной морфологией (формой) (Рисунок 13Д). Все типы структур окружены различным количеством стромальных и воспалительных клеток.

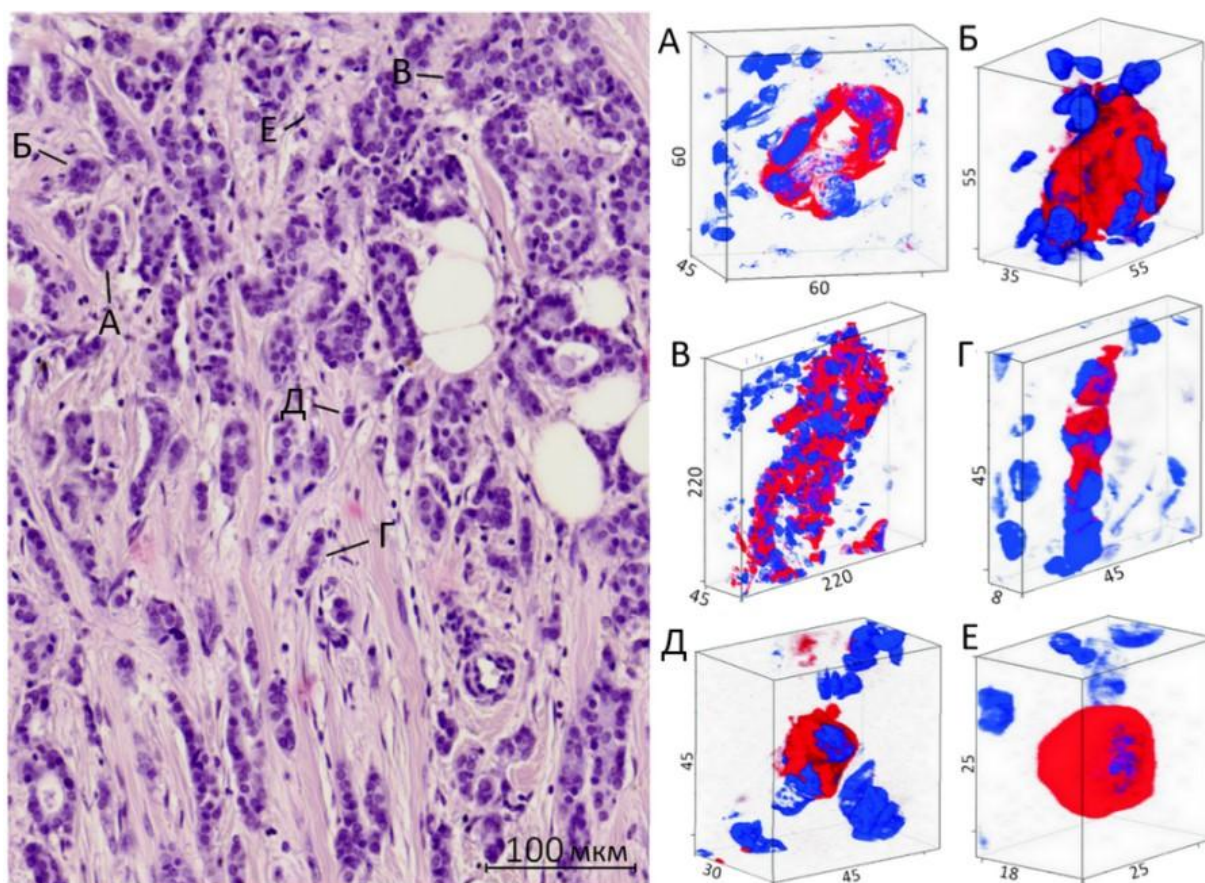


Рисунок 13 – Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность РМЖ (слева) и 3D визуализация пространственной организации различных морфологических структур (справа). А, тубулярная структура; Б, альвеолярная структура; В, солидная структура; Г, трабекулярная структура; Д, Е, дискретные группы опухолевых клеток. Гистохимическая (гематоксилин и эозин; слева) и иммунофлюоресцентная (красный цвет – цитокератин 7 (эпителиальный маркер), синий – краситель DAPI; справа) окраски. Цифрами на правой части рисунка указаны длины в мкм.

Таким образом, различные типы морфологических структур представляют собой формирования опухолевых клеток, различающиеся между собой пространственной организацией и количеством клеток. Полученные данные подтверждают ранее высказанные предположения о форме морфологических структур [9, 10, 17].

### 3.2 Количество CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> опухолевых стволовых клеток в морфологических структурах РМЖ

С целью подтверждения ассоциации ВОМГ со стволовостью был проведен анализ количества CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> клеток, впервые описанных как ОСК при РМЖ [25], в морфологических вариантах опухолевых клеток (n=36) люминальных А, В HER2<sup>-</sup> и В HER2<sup>+</sup> подтипов РМЖ с помощью конфокальной иммунофлюоресцентной микроскопии. Контроль окрашивания на белок CD24, в частности CD24-позитивные клетки, представлены в Приложении 1 (таблица 1). Именно данный молекулярный подтип характеризуется наибольшей представленностью различных типов морфологических структур по сравнению с HER2-положительными и трижды-негативными опухолями [348].

CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> клетки были обнаружены в 75,0% (27/36) случаев с люминальным А, В HER2<sup>-</sup> и В HER2<sup>+</sup> РМЖ. При этом их частота и количество не была связана с люминальным подтипом: А, В HER2<sup>-</sup> и В HER2<sup>+</sup> (таблицы 7 и 8).

Таблица 7 – Частота встречаемости CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> ОСК у больных РМЖ в зависимости от молекулярного подтипа заболевания

Молекулярный подтип	Частота встречаемости ОСК, % (абс.)
Люминальный А	66,7 (8/12)
Люминальный В HER2 <sup>-</sup>	72,7 (11/13) p <sub>1</sub> =0,378
Люминальный В HER2 <sup>+</sup>	72,7 (8/11) p <sub>1</sub> =1,000 p <sub>2</sub> =0,630
Примечание: ОСК – опухолевые стволовые клетки; p <sub>1</sub> – уровень статистической значимости по сравнению с люминальным А; p <sub>2</sub> – уровень статистической значимости по сравнению с люминальным В HER2 <sup>-</sup> .	



Таблица 8 – Доля CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> ОСК у больных РМЖ в зависимости от молекулярного подтипа заболевания

Молекулярный подтип	Доля ОСК, Ме (Q1-Q3)
Люминальный А	13,87 (7,14-24,34)
Люминальный В HER2 <sup>-</sup>	7,93 (1,93-20,29) p <sub>1</sub> =0,120
Люминальный В HER2 <sup>+</sup>	10,00 (3,44-14,85) p <sub>1</sub> =0,117 p <sub>2</sub> =0,999
Примечание: ОСК – опухолевые стволовые клетки; Ме – медиана; Q1-Q3 – квантили; p <sub>1</sub> – уровень статистической значимости по сравнению с люминальным А; p <sub>2</sub> – уровень статистической значимости по сравнению с люминальным В HER2 <sup>-</sup> .	

Чаще всего CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> ОСК обнаруживались в солидных (96,4%) и альвеолярных (91,6%) структурах. Частота обнаружения этих клеток в трабекулярных, тубулярных и дискретных группах составила 75,0%, 57,9% и 33,3%, соответственно. Средняя доля CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> клеток в морфологических структурах была следующей: 0,11 (0,09-0,14) в солидных, 0,13 (0,11-0,15) в альвеолярных, 0,09 (0,06-0,11) в трабекулярных, 0,05 (0,03-0,08) в тубулярных и 0,004 (0,002-0,007) в дискретных. Наиболее выраженные различия в количестве CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> ОСК были между дискретными группами и всеми остальными структурами (p<0,05; Рисунок 14).

Закономерность в частоте и количестве CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> ОСК в различных морфологических структурах сохранялась и при учёте молекулярного подтипа РМЖ. Вне зависимости от подтипа РМЖ CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> ОСК чаще встречались в альвеолярных и солидных структурах и реже в дискретных группах опухолевых клеток. Однако различия были статистически значимыми только при люминальном В подтипе при сравнении альвеолярных и солидных структур с дискретными вариантами опухолевых клеток (таблица 9).

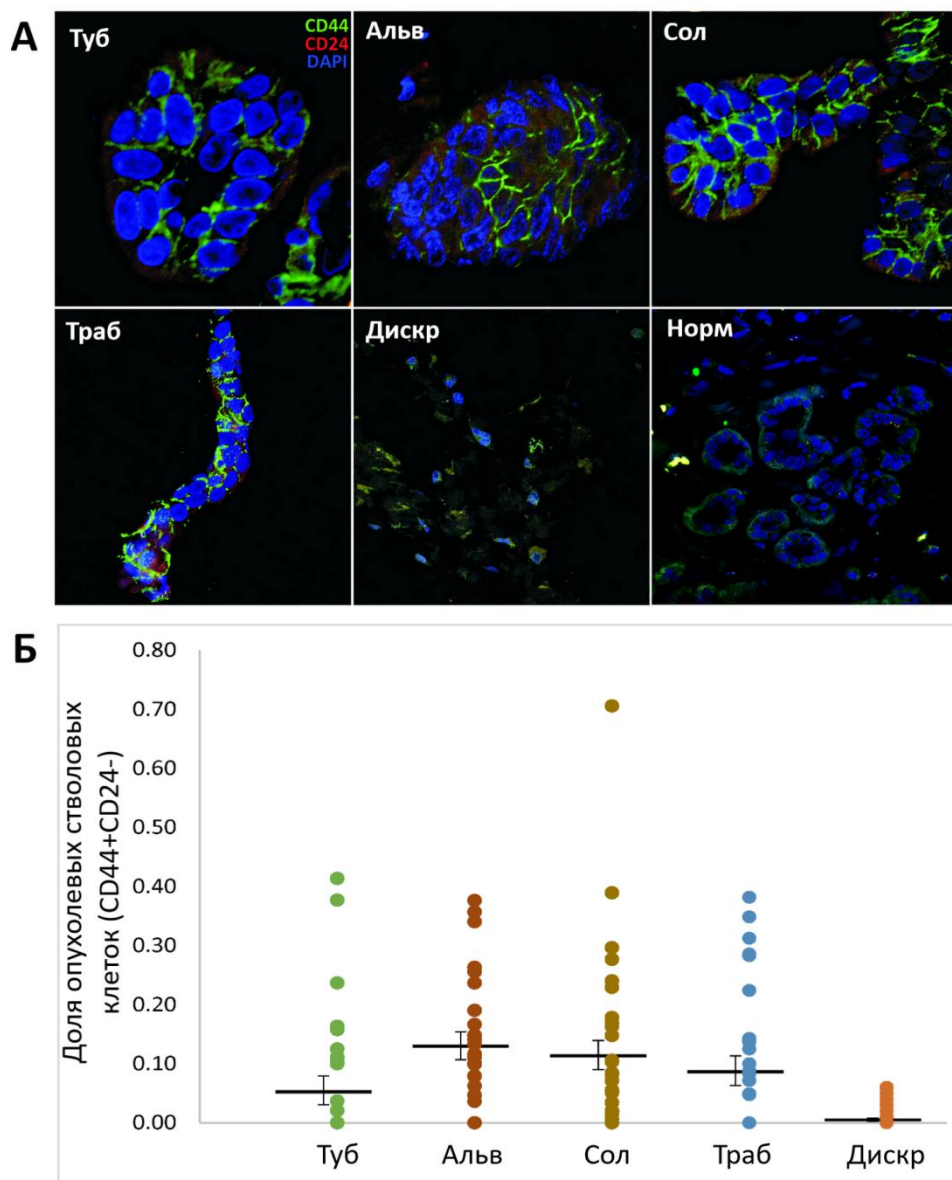


Рисунок 14 – Наличие (А) и доля CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> ОСК в морфологических структурах РМЖ. Туб – тубулярные структуры; Альв – альвеолярные структуры; Сол – солидные структуры; Траб – трабекулярные структуры; Дискр – дискретные группы опухолевых клеток; Норм – нормальные протоки молочной железы (негативный контроль с отсутствием CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> клеток). Статистически значимые различия: тубулярные против альвеолярных, солидных и дискретных ( $0,0006 < p < 0,03$ ; t-критерий Стьюдента), альвеолярные против тубулярных и дискретных ( $p=0,0006$  и  $0,00000005$ , соответственно), солидные против тубулярных и дискретных ( $p=0,03$  и  $0,0000001$ , соответственно), трабекулярные против дискретных ( $p=0,00003$ ) и дискретные против всех остальных структур ( $0,00000005 < p < 0,02$ ).

Таблица 9 – Частота встречаемости CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> ОСК среди клеток различных морфологических структур у больных РМЖ в зависимости от молекулярного подтипа заболевания

Тип структуры	Частота встречаемости ОСК, % (абс.)		
	Люминальный А	Люминальный В HER2 <sup>-</sup>	Люминальный В HER2 <sup>+</sup>
Тубулярная	40,0 (4/10)	44,4 (4/9)	37,5 (3/8)
Альвеолярная	72,7 (8/11)	81,8 (9/12)	66,7 (6/9)
Солидная	66,7 (8/12)	84,6 (11/13)	72,7 (8/11)
Трабекулярная	72,7 (8/11)	50,0 (6/12)	55,6 (5/9)
Дискретные группы опухолевых клеток	33,3 (4/12) p <sub>1</sub> =1,000 p <sub>2</sub> =0,100 p <sub>3</sub> =0,220 p <sub>4</sub> =0,100	25,0 (3/12) p <sub>1</sub> =0,397 p <sub>2</sub> =0,039 p <sub>3</sub> =0,005 p <sub>4</sub> =0,400	18,2 (2/11) p <sub>1</sub> =0,603 p <sub>2</sub> =0,065 p <sub>3</sub> =0,030 p <sub>4</sub> =0,160
Примечание: ОСК – опухолевые стволовые клетки; p <sub>1-4</sub> – уровень статистической значимости различий между дискретными группами опухолевых клеток и другими морфологическими структурами (тубулярными, альвеолярными, солидными и трабекулярными).			

Доля CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> ОСК была наименьшей в дискретных вариантах опухолевых клеток по сравнению с остальными морфологическими структурами, независимо от молекулярного подтипа РМЖ (таблица 10). Большое количество CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> ОСК было характерно для многоклеточных структур (таблица 10).

Таким образом, CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> ОСК преобладают в многоклеточных опухолевых структурах, в особенности в альвеолярных структурах, и практически отсутствуют в дискретных группах, представленных либо единичными клетками, либо скоплениями из 2-5 клеток. Полученные данные могут косвенно отражать известную способность ОСК формировать сферические колонии или маммосферы [88], схожие по форме с альвеолярными структурами.

Таблица 10 – Доля CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> ОСК среди клеток различных морфологических структур у больных РМЖ в зависимости от молекулярного подтипа заболевания

Тип структуры	Доля ОСК от клеток структуры, Me (Q1-Q3)		
	Люминальный А	Люминальный В HER2 <sup>-</sup>	Люминальный В HER2 <sup>+</sup>
Тубулярная	16,06 (12,28-32,36)	3,69 (0,00-23,68)	10,00 (2,07-12,50)
Альвеолярная	14,06 (10,12-26,31)	9,52 (5,59-27,70)	14,78 (9,85-17,26)
Солидная	16,31 (8,78-27,97)	8,45 (2,05-16,90)	5,32 (3,85-15,91)
Трабекулярная	13,72 (4,87-28,30)	8,47 (0,00-17,85)	12,50 (7,45-28,64)
Дискретные группы опухолевых клеток	3,50 (2,25-4,75) p=0,033	0,00 (0,00-3,75) p=0,007	0,00 (0,00-3,50) p=0,030
Примечание: ОСК – опухолевые стволовые клетки; Me – медиана; Q1-Q3 – квантили; p – уровень статистической значимости различий между структурами различного типа.			

### 3.3 Цитогенетический профиль морфологических структур РМЖ

В литературе доступны немногочисленные сведения о том, что разнообразие морфологического строения РМЖ может быть связано со специфическими хромосомными aberrациями, возникающими в опухолевых клетках [112, 253]. Для подтверждения связи ВОМГ при РМЖ с хромосомными нарушениями было проведено цитогенетическое профилирование различных морфологических структур с использованием микроматричной сравнительной геномной гибридизации (aCGH). В исследование использовали три опухоли молочной железы, каждая из которых была представлена тремя образцами. Из каждого такого образца получали по пять типов морфологических структур, которые подвергались aCGH.

В целом, количество хромосомных нарушений варьировало от опухоли к опухоли (Рисунок 15А). Наиболее частыми aberrациями были амплификации регионов хромосом 1q, 16p, 17q, 22q и делеции участков 7q, 13q, 16q, 17p.

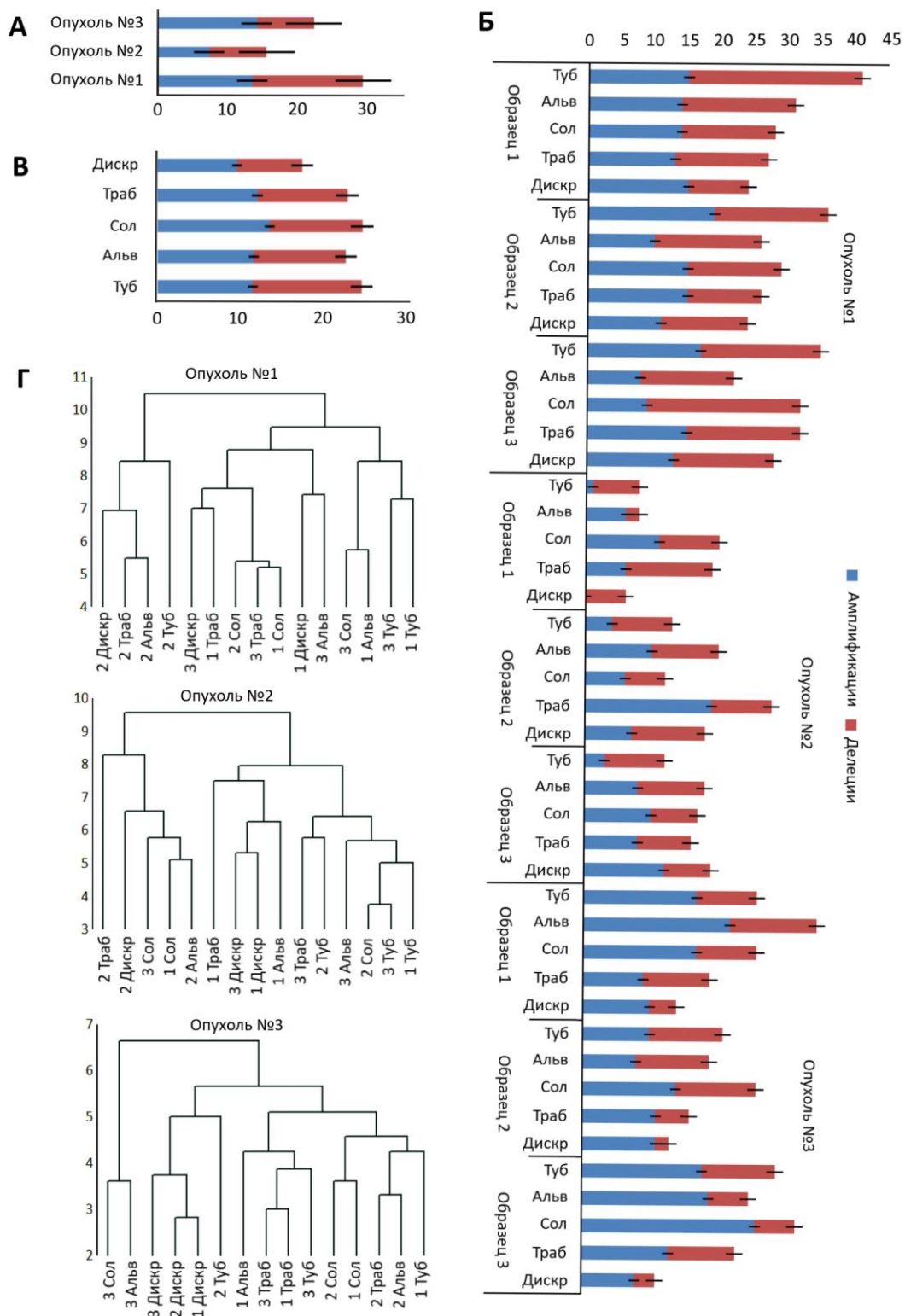


Рисунок 15 – Ассоциация ВОМГ РМЖ с хромосомными aberrациями. А, Количество хромосомных aberrаций в изученных опухолях молочной железы. Б, Количество хромосомных aberrаций в различных морфологических структурах трёх разных образцов (1-3) каждой опухоли молочной железы (1-3). В, Среднее количество хромосомных нарушений в

различных морфологических структурах. Г, Кластерный анализ схожести различных морфологических структур друг с другом по общим хромосомным aberrациям. Туб – тубулярные структуры; Альв – альвеолярные структуры; Сол – солидные структуры; Траб – трабекулярные структуры; Дискр – дискретные группы опухолевых клеток.

Кроме того, часто обнаруживалась трисомия по 20-й хромосоме и моносомия по хромосомам 6, 7 и 13 (Рисунок 16).

Количество хромосомных aberrаций в различных морфологических структурах варьировало от 6 до 41 ( $22,4 \pm 8,2$ ; Рисунок 15Б). Хромосомные нарушения выявлялись реже всего в дискретных группах опухолевых клеток (среднее количество делеций и амплификаций – 7,8 и 9,7, соответственно) и чаще в солидных (делеций и амплификаций – 11,1 и 13,6, соответственно) и тубулярных (делеций и амплификаций – 13,0 и 11,6, соответственно) структурах (Рисунок 15В).

Хромосомные aberrации, одинаковые для всех проанализированных морфологических структур ( $n=15$ : по 5 структур из каждого из трёх образцов опухоли), были обнаружены только для двух случаев РМЖ (таблица 11). В первом случае (опухоль №1) общей aberrацией была амплификация участка 11q13.5-q14.1, во втором (опухоль №3) – амплификация 1q и моносомия по 13-й хромосоме. В оставшемся случае РМЖ (опухоль №2) моносомия по 6-й хромосоме детектировалась только в 80% (12/15) образцов структур (Приложение 2, таблицы 1-3).

Вероятно, что в первых двух случаях наличие общих хромосомных нарушений свидетельствует об их раннем появлении в процессе канцерогенеза, тогда как отсутствие таких aberrаций в другой опухоли молочной железы может говорить о позднем развитии хромосомной нестабильности.

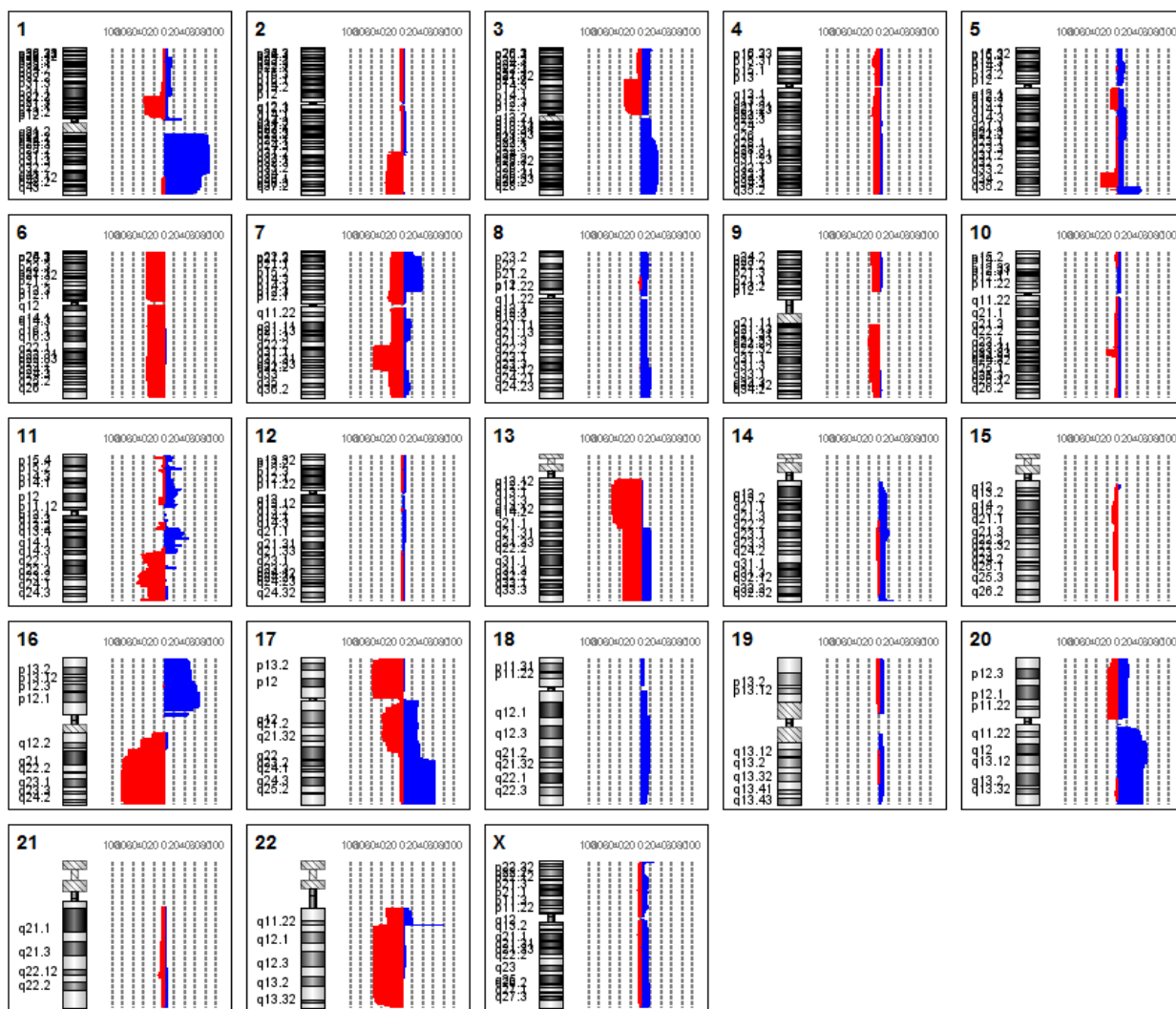


Рисунок 16 – Типы хромосомных нарушений в различных типах морфологических структур РМЖ

Интересно, что амплификация 22q11.2, которая была одной из частных aberrаций в опухоли №3 (93,3% структур), также выявлялась в опухоли №1 (66%) и №2 (20%). Эта амплификация затрагивает только один ген, кодирующий микроРНК 650 (miR-650). Предыдущие исследования описали вклад экспрессии miR-650 в плохой прогноз различных злокачественных новообразований [293]. В случае РМЖ показано, что амплификация miR-650 вовлечена в активацию транскрипционного фактора STAT5A и связана с низкими показателями общей выживаемости [195].

Таблица 11 – Общие хромосомные нарушения для различных морфологических структур, полученных из трёх разных образцов каждой опухоли молочной железы

Опухоль	Хромосомные нарушения и их частота			
	100,0%	93,3%	86,6%	80,0%
1	амп 11q13.5-q14.1	амп 5q35.1-q35.3 дел 7q22.1-q32.1 амп 17q22-q25.3 моносомия 22	дел 2q31.1-q37.3 дел 17p11.2-p13.3	дел 5q33.2-q35.1
2	-	-	-	моносомия 6
3	амп 1q моносомия 13	дел 1p13.1-p31.1 амп 22q11.22	амп 1p12 дел 17p	амп 17q
Примечание: амп – амплификация; дел – делеция.				

Для проверки схожести различных морфологических структур в хромосомных нарушениях был проведён кластерный анализ (Рисунок 15Г). В опухоли №1 морфологические структуры (за исключением солидных структур), полученные из 2-го образца опухоли, кластеризовались вместе. Во-первых, это наблюдение может указывать на наличие клонального “предка”, общего для структур данного региона опухоли. Во-вторых, эти данные могут указывать на независимость клональной эволюции в данном участке опухоли №1. Интересные результаты получены для опухоли №3 (Рис. 15Г). Дискретные группы опухолевых клеток трёх разных образцов данной опухоли были более схожи друг с другом в профиле хромосомных aberrаций, чем с другими структурами. Данное наблюдение указывает на наличие хромосомных нарушений, общих для дискретных групп. В действительности, дупликация хромосомного региона 11p13, содержащего ген *PAH6*, была обнаружена во всех трёх образцах дискретных групп опухолевых клеток.

Таким образом, полученные данные указывают на отсутствие строгой ассоциации между ВОМГ РМЖ и хромосомными нарушениями. Тем не менее, для дискретных групп опухолевых клеток одной из исследованных



опухолей молочной железы обнаружена специфическая aberrация, заключающаяся в амплификации гена *PAX6*. По данным литературы известно, что гиперэкспрессия *PAX6* вовлечена в индукцию EMT, миграции, инвазии и метастазирования РМЖ [155, 310]. Весьма вероятно, что данное генетическое нарушение может быть ответственно за образование дискретных групп опухолевых клеток. Однако данное предположение требует подтверждения в дальнейших исследованиях.

### 3.4 Транскрипционный профиль морфологических структур РМЖ

Для того чтобы понять, насколько варианты морфологических структур различаются между собой в экспрессионном профиле, и схожи ли структуры одного типа разных опухолей молочной железы между собой, был проведен полнотранскриптомный анализ с использованием микроматриц.

#### 3.4.1 Валидация корректности микроматричного экспрессионного профилирования морфологических структур

Для подтверждения корректности результатов микроматричного экспрессионного профилирования, представленных ниже, был проведён ПЦР-анализ уровня экспрессии 6 несвязанных друг с другом генов (*FNI*, *NAT1*, *CERS2*, *LOXL2*, *ITGB5* и *UBE2S*) в различных морфологических структурах других опухолей молочной железы (n=7). В целом, была обнаружена положительная корреляция между уровнями мРНК, полученными с помощью микроматриц и количественной ПЦР ( $r^2=0,838$ ;  $p<0,05$ ; Рисунок 17).

#### 3.4.1 Схожесть одного и того же типа морфологических структур по экспрессионному профилю

Кластерный анализ дифференциально-экспрессирующихся транскриптов при наименьших значениях  $p$  (FDR) показал сходство морфологических структур одного и того же типа, полученных из трёх

разных опухолей молочной железы. Исключением были солидные структуры из опухоли №3, которые кластеризовались с тубулярными структурами. Схожесть в экспрессионном профиле также наблюдалась для образцов нормальных протоков, полученных из смежной с опухолью ткани молочной железы.

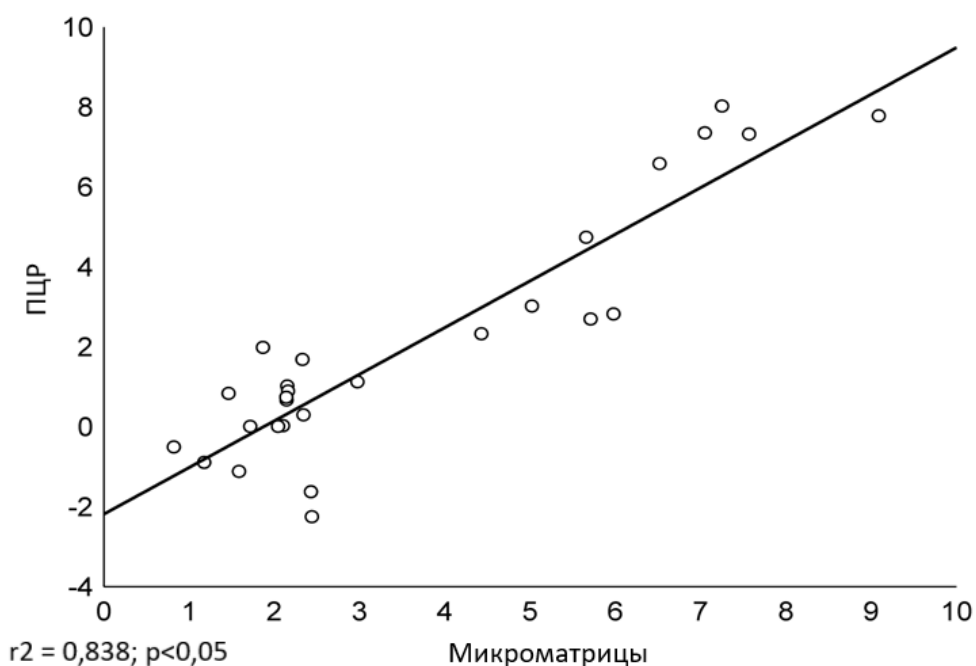


Рисунок 17 – Корреляция данных микроматричного экспрессионного профилирования и количественного ПЦР-анализа различных морфологических структур РМЖ. На рисунке представлены значения десятичного логарифма интенсивности флуоресценции и натурального логарифма уровня амплификации 6 несвязанных генов, полученные с помощью микроматриц (ось X) и количественной ПЦР (ось Y), соответственно.

В целом, тубулярные структуры были более близки по профилю экспрессии к альвеолярным структурам, чем к другим морфологическим вариантам. Дискретные группы опухолевых клеток значительно отличались от остальных структур (Рисунок 18А).

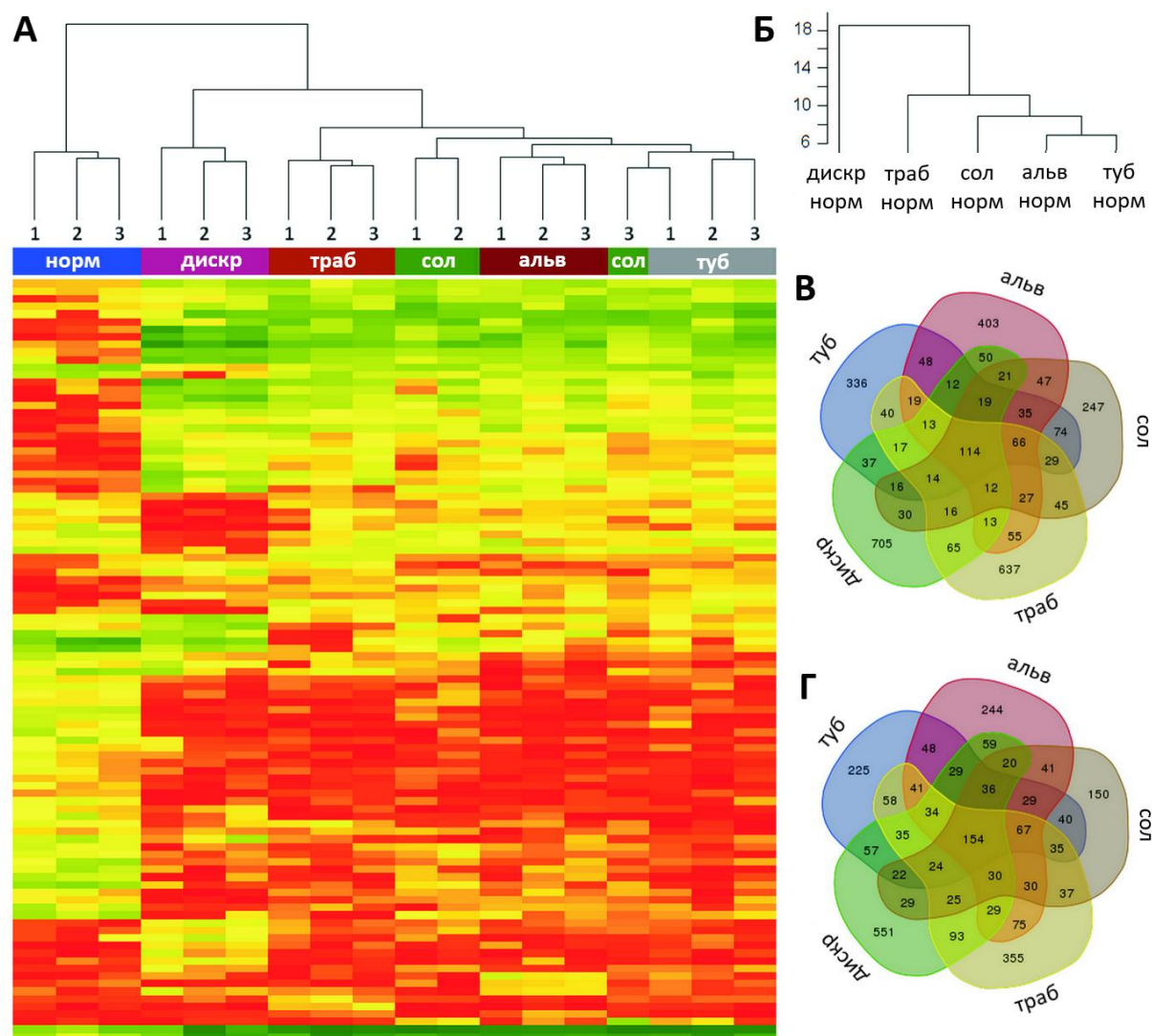


Рисунок 18 – Транскрипционный профиль различных типов морфологических структур РМЖ. А, Тепловая карта топ 100 дисрегулированных транскриптов в нормальных протоках и морфологических структурах и иерархический кластерный анализ. 1-3 – случаи РМЖ. Б, Иерархический кластерный анализ морфологических структур на основании экспрессии всех транскриптов, нормализованных относительно неизмененного эпителия молочной железы. Ось Y показывает расстояние между кластерами. В, Г, количество специфических и общих транскриптов, гипер- и гипозэкспрессирующихся в морфологических структурах ( $p < 0,05$ ). Туб – тубулярные структуры; Альв – альвеолярные структуры; Сол – солидные структуры; Траб – трабекулярные структуры; Дискр – дискретные группы опухолевых клеток.

Сравнение экспрессионных профилей морфологических структур, нормализованных к неизмененному эпителию молочной железы, также подтвердило вышеобозначенные различия. В частности, различия в экспрессии транскриптов возрастали в ряду: тубулярные = альвеолярные, солидные, трабекулярные и дискретные группы опухолевых клеток (Рисунок 18Б).

### 3.4.2 Общие и специфические гены для разных типов морфологических структур

Различное количество гипо- и гиперэкспрессирующихся генов обнаружено в морфологических структурах по сравнению с нормальным эпителием молочной железы (Рисунок 18В,Г). Среди транскриптов, гиперэкспрессирующихся во всех типах морфологических структур ( $p$  (FDR)  $< 0,05$ ), были гены, кодирующие молекулы внеклеточного матрикса (*COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1* и др.) и фибронектин (*FN1* и *THC2507047*). Практически во всех типах структур были гиперэкспрессированы гены *HMGB3*, *S100A7* и *SFRP4*, являющиеся регуляторами дифференцировки, клеточного цикла, пролиферации и стволовости [77, 254, 325]. Гипоэкспрессирующиеся транскрипты были представлены локусом *LOC102723505*, который кодирует длинную некодирующую РНК ROCR (от англ. Regulator Of Chondrogenesis RNA), геном *C2orf40*, также известным как ECRG4 и описанным как опухолевый супрессор при различных злокачественных новообразованиях [261], включая РМЖ [298], геном *KIT*, кодирующем тирозинкиназу CD117 и вовлеченным в регуляцию различных процессов, таких как клеточная выживаемость, рост, дифференцировка [19, 99], и др. (Таблица 12).

Таблица 12 – Гены, экспрессирующиеся в различных морфологических структурах РМЖ (p (FDR) < 0,05)

Гены	Морфологические структуры				
	Туб	Альв	Сол	Траб	Дискр
<i>THC2507047</i>	9,2	9,2	7,7	9,1	10,1
<i>FN1</i>	7,6	7,3	6,5	7,0	9,1
<i>COL5A2</i>	6,5	6,6	6,4	7,1	9,0
<i>COL10A1</i>	5,7	5,6	4,7	6,7	8,0
<i>COL3A1</i>	5,9	6,2	5,5	6,5	8,0
<i>THC2538174</i>	5,3	5,6	4,4	6,0	7,2
<i>COL12A1</i>	4,3	4,6	3,0	5,3	7,0
<i>VCAN</i>	4,2	4,6	2,6	3,5	6,9
<i>COL1A2</i>	4,7	4,8	3,5	5,1	6,6
<i>COL1A1</i>	5,5	5,3	4,7	5,6	6,6
<i>FAP</i>	3,0	4,5	3,3	5,5	6,5
<i>LUM</i>	4,0	4,3	3,9	4,8	6,4
<i>S100A7</i>	7,7	8,2	9,1	8,4	6,4
<i>COL6A3</i>	4,3	4,4	2,5	4,1	6,3
<i>BGN</i>	4,1	5,4	2,9	4,9	6,1
<i>LMCD1</i>	4,9	6,0	5,4	6,0	6,0
<i>SFRP4</i>	3,8	4,6	3,4	4,9	6,0
<i>INHBA</i>	2,4	2,9	1,7	3,2	5,6
<i>CTHRC1</i>	3,7	4,6	2,3	4,2	5,5
<i>ASPN</i>	4,9	4,9	4,0	4,7	5,4
<i>CIQTNF3</i>	0,3	1,0	1,6	1,4	5,4
<i>EGLN3</i>	5,2	4,8	3,6	2,9	4,9
<i>MMP13</i>	1,3	1,6	0,8	1,6	4,8
<i>CRCT1</i>	0,7	-	0,2	0,4	4,5
<i>HMGB3</i>	5,6	5,6	5,3	4,8	4,4
<i>NAT1</i>	5,0	5,7	6,0	5,7	3,5
<i>RBM6</i>	4,1	4,3	2,4	4,0	2,3
<i>BRI3BP</i>	1,3	4,3	1,1	1,5	1,1
<i>PKDREJ</i>	-	-0,6	-0,3	4,2	-0,3
<i>AK5</i>	-5,4	-5,3	-3,5	-3,2	-2,6
<i>NFIX</i>	-4,7	-7,5	-3,8	-1,9	-2,6
<i>ARHGEF10L</i>	-1,6	-1,4	-0,9	-1,3	-3,2
<i>CYP2U1</i>	-6,0	-3,5	-4,3	-1,0	-3,4
<i>PINLYP</i>	-4,0	-4,1	-3,9	-4,0	-3,4
<i>CYYR1</i>	-6,1	-5,1	-5,6	-5,8	-3,4
<i>FGF2</i>	-4,3	-4,1	-3,7	-4,1	-3,6
<i>EPHB1</i>	-2,6	-3,2	-3,6	-2,5	-3,8
<i>MT1G</i>	-5,2	-4,0	-2,2	-4,8	-3,8
<i>STAC2</i>	-4,0	-4,6	-3,8	-3,6	-3,8
<i>FAM3D</i>	-6,1	-4,9	-6,1	-5,4	-4,2
<i>SLC12A2</i>	-0,6	-1,2	-0,2	-1,6	-4,2
<i>FAM160A1</i>	-3,1	-1,7	-2,2	-3,4	-5,0
<i>NCMAP</i>	-4,4	-4,8	-2,4	-5,2	-5,0
<i>CRLF3</i>	-3,8	-2,2	-1,5	-2,7	-5,3
<i>MRPL10</i>	-1,6	-0,6	-0,5	-0,9	-5,3

<i>SAMD5</i>	-4,6	-5,5	-4,5	-5,0	-5,3
<i>ISM1</i>	-4,5	-5,6	-4,6	-5,7	-5,4
<i>STAT5A</i>	-3,4	-2,5	-1,2	-2,4	-5,5
<i>SFRP1</i>	-5,1	-5,4	-5,2	-5,6	-5,5
<i>lnc-APBA1-2:1</i>	-4,8	-5,7	-4,7	-4,8	-5,6
<i>PACS2</i>	-0,9	-0,7	-1,6	-1,3	-5,7
<i>PI15</i>	-7,1	-4,7	-5,0	-6,3	-5,7
<i>NUDT6</i>	-4,8	-3,3	-5,2	-4,6	-6,1
<i>MTURN</i>	-1,0	-2,2	-1,1	-2,0	-6,2
<i>IRX1</i>	-7,1	-5,2	-4,7	-7,3	-6,3
<i>ENST00000607314</i>	-5,8	-6,7	-5,9	-6,5	-6,6
<i>KIT</i>	-7,7	-6,8	-4,2	-7,6	-6,8
<i>C2orf40</i>	-6,4	-7,2	-5,2	-7,2	-6,9
<i>LOC102723505</i>	-5,4	-7,5	-6,4	-6,3	-7,1
Примечание: красный цвет – $p$ (FDR) < 0,05; серый цвет – $p$ (FDR) > 0,05; “-” – экспрессия не определялась; Туб – тубулярные структуры; Альв – альвеолярные структуры; Сол – солидные структуры; Траб – трабекулярные структуры; Дискр – дискретные группы опухолевых клеток.					

Для трабекулярных и дискретных вариантов опухолевых клеток были характерны транскрипты, отсутствующие в других морфологических структурах (Таблица 13). Ген *PKDREJ*, кодирующий рецептор семейства полицистинов и играющий роль в оплодотворении [59], экспрессировался только в трабекулярных структурах. Функциональная роль *PKDREJ* в опухолевых клетках не известна. Дискретные группы характеризовались большим количеством специфических транскриптов, среди которых ген *MAMDC2*, кодирующий белок внеклеточного матрикса, и ген металлопротеиназы *ADAMTS12* демонстрировали наибольшую экспрессию, а экспрессия гена кинезина *KIF1B* и гена G-белок-связанного рецептора *GPR160* была наименьшей. Известно, что белок *MAMDC2* обладает ингибиторными свойствами в отношении пролиферации клеток РМЖ [177], а *ADAMTS12* демонстрирует проопухолевые функции через различного рода механизмы [220]. *KIF1B* и *GPR160* ингибирует миграцию, инвазию и метастазирование, однако данные были получены на моделях глиомы и рака предстательной железы [126, 130].

Таблица 13 – Гены, экспрессирующиеся только в трабекулярных структурах и дискретных группах опухолевых клеток

Ген	Полное название гена	Регион	Уровень экспрессии*	p (FDR)
Трабекулярные структуры				
<i>PKDREJ</i>	polycystin (PKD) family receptor for egg jelly	22q13.31	4,471	0,002
Дискретные группы опухолевых клеток				
<i>MAMDC2</i>	MAM domain containing 2	9q21.2	5,439	0,016
<i>ADAMTS12</i>	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 12	5q35	4,982	0,012
<i>CD248</i>	CD248 molecule (endosialin)	11q13	4,378	0,016
<i>C1QTNF3</i>	C1q and tumor necrosis factor related protein 3	5p13	4,267	0,012
<i>CRCT1</i>	cysteine rich C-terminal 1	1q21	4,191	0,012
<i>EMCN</i>	endomucin	4q22.1	3,978	0,016
<i>APOBR</i>	apolipoprotein B receptor	16p11.2	3,768	0,040
<i>MMP13</i>	matrix metallopeptidase 13	11q22.3	3,548	0,031
<i>GPR4</i>	G protein-coupled receptor 4	19q13.3	3,335	0,034
<i>CYP46A1</i>	cytochrome P450 family 46 subfamily A member 1	14q32.2	3,049	0,019
<i>SCARNA1</i>	small Cajal body-specific RNA 1	1p35.3	2,824	0,034
<i>CEACAM21</i>	carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 21	19q13.2	2,470	0,043
<i>TIMP2</i>	TIMP metallopeptidase inhibitor 2	17q25	2,112	0,043
<i>CCDC117</i>	coiled-coil domain containing 117	22q12.1	-2,707	0,032
<i>DAZAP1</i>	DAZ associated protein 1	19p13.3	-3,211	0,033
<i>SLC12A2</i>	solute carrier family 12, member 2	5q23.3	-3,273	0,016
<i>RNASEH2B</i>	ribonuclease H2 subunit B	13q14.3	-3,844	0,019
<i>FUT8</i>	fucosyltransferase 8 (alpha (1,6) fucosyltransferase)	14q24.3	-3,881	0,022
<i>SVIP</i>	small VCP/p97-interacting protein	11p14.3	-3,976	0,039
<i>SMIM7</i>	small integral membrane protein 7	19p13.11	-3,999	0,043

<i>HINT3</i>	histidine triad nucleotide binding protein 3	6q22.33	-4,026	0,039
<i>FGD6</i>	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 6	12q23.1	-4,109	0,022
<i>IL20RA</i>	interleukin 20 receptor subunit alpha	6q23.3	-4,218	0,023
<i>RALGAP1</i>	Ral GTPase activating protein catalytic alpha subunit 1	14q13.2	-4,326	0,016
<i>TIPARP</i>	TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase	3q25.31	-4,349	0,016
<i>MRPL10</i>	mitochondrial ribosomal protein L10	17q21.3	-4,388	0,016
<i>PACS2</i>	phosphofurin acidic cluster sorting protein 2	14q32	-4,530	0,012
<i>EHF</i>	ets homologous factor	11p13	-4,605	0,016
<i>MTURN</i>	maturin	7p15.1	-4,649	0,012
<i>GFM2</i>	G elongation factor, mitochondrial 2	5q13	-4,822	0,034
<i>GPR160</i>	G protein-coupled receptor 160	3q26.2-q27	-5,036	0,019
<i>KIF1B</i>	kinesin family member 1B	1p36.22	-5,427	0,016
Примечание: * – логарифм интенсивности флуоресценции (log-fold-change). В таблице представлены уровни экспрессии генов, полученные при сравнении трабекулярных и дискретных групп с другими морфологическими структурами без поправки на нормальный эпителий молочной железы.				

Интересно, что в дискретных группах детектировалась высокая экспрессия гена эндосиалина (*CD248*), которая специфична для клеток мезенхимального происхождения. Однако эндосиалин может также экспрессироваться в опухолевых клетках, главным образом в мезенхимальных опухолях [251, 295, 303]. При колоректальном раке *CD248* является активатором EMT и фактором устойчивости к химиотерапии [251]. Вероятно, что все эти данные могут указывать на наличие выраженных мезенхимальных характеристик в дискретных группах опухолевых клеток.

### 3.4.3 Биологические процессы и сигнальные пути, выраженные в морфологических структурах РМЖ

На основе данных микроматричного экспрессионного профилирования было проведёно функциональное аннотирование транскриптов,



дифференциально экспрессирующихся между морфологическими структурами РМЖ и нормальным эпителием молочной железы. Во-первых, был выполнен анализ выраженности биологических процессов на основе транскриптов, гипер- (n=114) и гипозэкспрессирующихся (n=154) во всех морфологических структурах по сравнению с клетками нормальных протоков молочной железы (Рисунок 18В, Г). Показано, что гиперэкспрессирующиеся гены вовлечены в регуляцию связывания белков и ДНК хроматина и организацию внеклеточного матрикса и цитоскелета клеток (Рисунок 19А). Напротив, гены с низким уровнем экспрессии были ассоциированы с негативной регуляцией клеточного роста (Рисунок 19Б). Данное наблюдение может указывать на то, что для всех типов морфологических структур характерно наличие пролиферации, чем её отсутствие.

Во-вторых, был выполнен анализ выраженности канонических сигнальных путей на основе транскриптов, гипер- и гипозэкспрессирующихся в каждом типе морфологических структур по отношению к нормальному эпителию ( $|\log\text{-fold-change}| \geq \log_2 1,5$  и  $p < 0,05$ ). Одинаковые сигнальные пути были обнаружены в разных структурах; однако статистическая значимость, доля генов, вовлеченных в сигналинг, и другие параметры различались (Таблица 14).

Для тубулярных структур, как и для других морфологических вариантов опухолевых клеток, характерны сигнальный путь острого миелобластного лейкоза, молекулярные механизмы рака, плюрипотентность эмбриональных стволовых клеток человека и др. (Таблица 14).

В альвеолярных структурах обнаружен сигнальный путь, опосредованный через рецептор к эпидермальному фактору роста (ErbB), сигналинги, вовлеченные в ЭМП и ремоделирование актинового цитоскелета, и др. (Таблица 14). Однако, вероятность активации данных сигнальных путей в альвеолярных структурах относительно мала, учитывая большой процент гипозэкспрессирующихся генов.

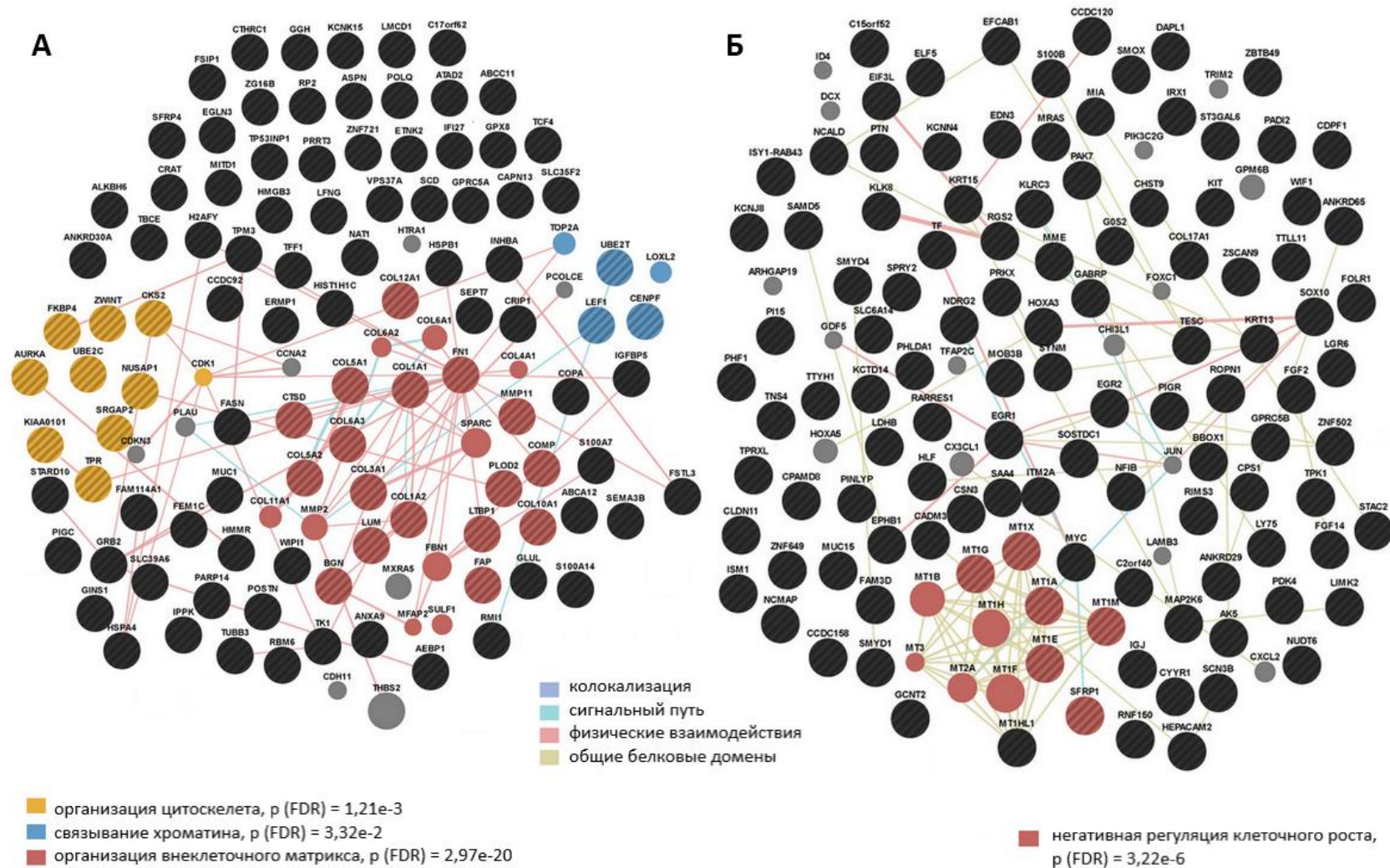


Рисунок 19 – Процессы, выраженные в морфологических структурах РМЖ. Диаграммы построены с помощью ресурса GeneMANIA [324] на основе анализа генов, гипер- (А) и гипозэкспрессирующихся (Б) во всех структурах.

Таблица 14 – ТОП 5 канонических сигнальных путей, выраженных в различных морфологических структурах РМЖ

Сигнальные пути	Log10 p	Соотношение	% Гипо	% Гипер	Выраженность в других структурах (p<0,05)
<b>Тубулярные структуры</b>					
Сигналинг острого миелобластного лейкоза	4,8	0,203	11,4	8,9	все стр-ры
FcγRIIIb сигналинг в В лимфоцитах	3,9	0,244	12,2	12,2	альв, траб, дискр
Роль макрофагов, фибробластов и эндотелиальных клеток в ревматоидном артрите	3,7	0,115	6,4	5,1	все стр-ры
Молекулярные механизмы рака	3,5	0,107	5,8	4,9	все стр-ры
Плюрипотентность эмбриональных стволовых клеток человека	3,4	0,142	9,0	5,2	все стр-ры
<b>Альвеолярные структуры</b>					
Регуляция сигналинга эпителиально-мезенхимального перехода	6,3	0,168	9,8	7,1	все стр-ры
Фиброз печени / Активация звездчатых клеток печени	4,5	0,148	7,7	7,1	все стр-ры
Роль макрофагов, фибробластов и эндотелиальных клеток в ревматоидном артрите	4,3	0,125	6,4	6,1	все стр-ры
ErbB сигналинг	4,1	0,186	11,6	7,0	все стр-ры
Сигналинг актинового цитоскелета	4	0,134	8,3	5,1	туб, сол, траб
<b>Солидные структуры</b>					
Фиброз печени / Активация звездчатых клеток печени	4,8	0,137	6,0	7,7	все стр-ры
Молекулярные механизмы рака	4,1	0,104	4,9	5,5	все стр-ры
Роль макрофагов, фибробластов и эндотелиальных клеток в ревматоидном артрите	3,9	0,108	6,1	4,7	все стр-ры
Клеточный цикл: репарация ДНК на этапе сверочной точки G2/M	3,6	0,204	0,0	20,4	туб, альв
РАК сигналинг	3,6	0,157	12,2	4,9	все стр-ры
<b>Трабекулярные структуры</b>					
Фиброз печени / Активация звездчатых клеток печени	4,8	0,164	7,1	9,3	все стр-ры
FcεRI сигналинг	4,6	0,194	13,0	6,5	туб
Сигналинг острой фазы	4,2	0,16	8,3	7,7	все стр-ры
PDGF сигналинг	4,0	0,208	15,6	5,2	туб, альв
Сигналинг острого	3,9	0,203	13,9	6,3	все стр-ры

миелобластного лейкоза					
Дискретные группы опухолевых клеток					
Фиброз печени / Активация звездчатых клеток печени	7,2	0,202	3,8	16,4	все стр-ры
Сигналинг острого миелобластного лейкоза	5,8	0,253	17,7	7,6	все стр-ры
Онкостатин М сигнальный путь	3,1	0,265	11,8	14,7	траб
Сигналинг рака мочевого пузыря	3,0	0,184	9,2	9,2	сол
Паксиллин сигнальный путь	2,7	0,168	6,9	9,9	туб, сол, траб
Примечание: Гипо – гипохэкспрессирующиеся гены; Гипер – гиперэкспрессирующиеся гены; Туб – тубулярные структуры; Альв – альвеолярные структуры; Сол – солидные структуры; Траб – трабекулярные структуры; Дискр – дискретные группы опухолевых клеток. Стр-ры – структуры; Соотношение – доля генов, вовлечённых в сигнальный путь; Log10p – логарифмированное значение уровня статистической значимости.					

Для солидных структур характерна регуляция молекулярных механизмов рака, репарации ДНК на этапе сверочной точки G2/M клеточного цикла и сигнальный путь через p21-ассоциированные киназы (РАК) (Таблица 14). При этом сигналинг репарации ДНК представлен только гиперэкспрессирующимися генами, что, вероятно, указывает на его активацию. Напротив, РАК сигнальный путь, вовлеченный в ремоделирование актинового цитоскелета, увеличение выживаемости клеток, а также в индукцию ангиогенеза и инвазии и метастазирования [266], содержал в три раза больше гипохэкспрессирующихся, чем гиперэкспрессирующихся генов, что может говорить о малой вероятности его активации в солидных структурах.

В трабекулярных структурах выражен сигнальный путь острой фазы воспаления, сигналинг, опосредованный через рецептор к иммуноглобулину Е (FcεRI), а также сигналинг, активируемый тромбоцитарным фактором роста (PDGF) (Таблица 14). При этом FcεRI- и PDGF-сигналинги, вероятно, супрессированы в трабекулярных структурах, на что указывает преобладание гипохэкспрессирующихся генов. По данным литературы FcεRI вовлечен в контроль активации тучных клеток и базофилов и в иммуноглобулин Е-опосредованную презентацию антигенов, а также в регуляцию других сигнальных путей, ответственных за секрецию различных интерлейкинов и

ростовых факторов [230]. PDGF-сигнальный путь вовлечён в индукцию пролиферации опухолевых клеток, промотирование ангиогенеза и развитие опухоль-ассоциированных фибробластов в строме опухолей [250].

Для дискретных групп опухолевых клеток характерно наличие сигнальных путей, вовлеченных в фиброз печени/активацию звездчатых клеток и острый миелобластный лейкоз (Таблица 14). При этом фиброз-ассоциированный путь, вероятно, активирован в дискретных группах, учитывая преобладание более чем 4 раза гиперэкспрессирующихся генов. Данный сигналинг отвечает за синтез белков внеклеточного матрикса, главным образом, коллагена [63]. Напротив, лейкемический сигналинг, ассоциированный с увеличением клеточной пролиферации [60], представлен в 2 раза большим количеством гипоекспрессирующихся транскриптов и, вероятно, супрессирован в дискретных группах. Кроме того, в дискретных группах были выражены сигнальные пути, опосредованные онкостатином М и паксиллином и вовлеченные в развитие рака мочевого пузыря. Интересно, что только в трабекулярных и дискретных вариантах опухолевых клеток не обнаружен сигнальный путь репарации ДНК на этапе G2/M клеточного цикла.

Таким образом, различные морфологические структуры РМЖ представляют собой транскрипционно-обособленные популяции опухолевых клеток с регуляцией как общих, так и специфических биологических процессов и сигнальных путей. Наиболее близкими по транскрипционному профилю к нормальным клеткам молочной железы являются тубулярные и альвеолярные структуры, наиболее далекими – дискретные группы опухолевых клеток.

### 3.5 Особенности микроокружения морфологических структур РМЖ

Не вызывает сомнений, что опухолевое микроокружение является одним из ключевых компонентов, определяющих рост, инвазию и метастазирование

злокачественных новообразований. Иммунные и стромальные клетки, окружающие опухолевые клетки, выступают в роли факторов, направляющих эволюцию опухоли и способствующих, таким образом, формированию ВОГ [121, 210]. Согласно предыдущему исследованию [6], для различных морфологических структур РМЖ характерны специфические различия в воспалительном инфильтрате. Так инфильтрат более разнообразен вблизи дискретных групп опухолевых клеток и скуден около тубулярных структур [6].

В данном исследовании были оценены особенности распределения двух популяций макрофагов:  $CD68^+RS1^-$  (противопухолевый фенотип, M1) и  $CD68^+RS1^+$  (проопухолевый фенотип, M2) и двух вариантов опухолеассоциированных фибробластов (CAFs) с различной степенью активации ( $\alpha SMA^+FAP^+$  и  $\alpha SMA^-FAP^+$ ) вблизи морфологических структур РМЖ. Дополнительно, на основе результатов микроматричного экспрессионного профилирования, был проведен анализ уровня экспрессии генов, вовлеченных по данным литературы в регуляцию функционального состояния макрофагов и фибробластов, в различных морфологических структурах РМЖ. Выбор макрофагов и фибробластов среди других клеток опухолевого микроокружения был обусловлен их способностью инициировать и поддерживать воспаление в первичной опухоли независимо от наличия/отсутствия специфических антигенов. Акцент на фенотипы  $CD68^+RS1^-$  и  $CD68^+RS1^+$  был связан с предыдущими данными об их ассоциации с различными вариантами паренхиматозно-стромального компонента и лимфогенным метастазированием РМЖ [54, 218].

### 3.5.1 Частота обнаружения макрофагов и фибробластов в микроокружении морфологических структур РМЖ

Макрофаги и фибробласты обнаруживались в микроокружении всех типов морфологических структур. Однако их частота варьировала от структуры к структуре (Таблица 15). Чаще всего данные клетки

детектировались вблизи солидных и дискретных структур, реже – вокруг тубулярных структур.

Таблица 15 – Частота обнаружения макрофагов и фибробластов в микроокружении различных морфологических структур РМЖ

Фенотип макрофагов и фибробластов	Микроокружение структур, % (n/N)				
	Альв (1)	Сол (2)	Траб (3)	Туб (4)	Дискр (5)
CD68 <sup>+</sup> RS1 <sup>-</sup>	91% (30/35)	100% (32/36) p <sub>1</sub> =0,069	87% (26/35) p <sub>1</sub> =0,594 p <sub>2</sub> =0,028	66% (15/20) p <sub>1</sub> =0,024 p <sub>2</sub> =0,000 p <sub>3</sub> =0,069	97% (30/35) p <sub>1</sub> =0,294 p <sub>2</sub> =0,298 p <sub>3</sub> =0,127 p <sub>4</sub> =0,002
CD68 <sup>+</sup> RS1 <sup>+</sup>	77% (27/35)	86% (31/36) p <sub>1</sub> =0,331	51% (18/35) p <sub>1</sub> =0,026 p <sub>2</sub> =0,002	30% (6/20) p <sub>1</sub> =0,001 p <sub>2</sub> =0,000 p <sub>3</sub> =0,136	91% (32/35) p <sub>1</sub> =0,114 p <sub>2</sub> =0,511 p <sub>3</sub> =0,000 p <sub>4</sub> =0,000
aSMA <sup>+</sup> FAP <sup>+</sup>	91% (30/33)	100% (35/35) p <sub>1</sub> =0,074	87% (27/31) p <sub>1</sub> =0,610 p <sub>2</sub> =0,031	66% (12/18) p <sub>1</sub> =0,030 p <sub>2</sub> =0,000 p <sub>3</sub> =0,003	97% (32/33) p <sub>1</sub> =0,308 p <sub>2</sub> =0,305 p <sub>3</sub> =0,142 p <sub>4</sub> =0,003
aSMA <sup>-</sup> FAP <sup>+</sup>	78% (26/33)	94% (33/35) p <sub>1</sub> =0,060	93% (29/31) p <sub>1</sub> =0,095 p <sub>2</sub> =0,869	61% (11/18) p <sub>1</sub> =0,202 p <sub>2</sub> =0,004 p <sub>3</sub> =0,008	100% (33/33) p <sub>1</sub> =0,005 p <sub>2</sub> =0,157 p <sub>3</sub> =0,127 p <sub>4</sub> =0,000

Примечание: статистический анализ с помощью критерия Фишера; p<sub>1-4</sub> – различия между микроокружениями структур; n – количество случаев с наличием макрофагов/фибробластов вокруг структур; N – количество случаев с морфологическими структурами; Туб – тубулярные структуры; Альв – альвеолярные структуры; Сол – солидные структуры; Траб – трабекулярные структуры; Дискр – дискретные группы опухолевых клеток.

### 3.5.2 Количество макрофагов и фибробластов в микроокружении морфологических структур РМЖ

CD68<sup>+</sup>RS1<sup>-</sup> макрофаги преобладали в микроокружении солидных структур по сравнению с другими морфологическими вариантами опухолевых клеток (0,71 против 0,30-0,66; p<0,05; Таблица 16). Макрофаги

другого типа, CD68<sup>+</sup>RS1<sup>+</sup>, преобладали в микроокружении солидных (0,45) и дискретных (0,44) групп по сравнению с другими структурами (0-0,25; p<0,05) и практически отсутствовали вблизи тубулярных структур (Таблица 16).

Таблица 16 – Количество макрофагов и фибробластов в микроокружении различных морфологических структур РМЖ

	Микроокружение структур, Ме (Q1-Q3)					p*
	Альв (1)	Сол (2)	Траб (3)	Туб (4)	Дискр (5)	
CD68 <sup>+</sup> RS1 <sup>-</sup>	0,66 (0,25-1,00) n=35	0,71 (0,26-1,59) n=36 p <sub>1</sub> =0,011	0,33 (0-0,80) n=35 p <sub>1</sub> =0,001 p <sub>2</sub> =0,000	0,38 (0,04-1,28) n=20 p <sub>1</sub> =0,717 p <sub>2</sub> =0,016 p <sub>3</sub> =0,280	0,30 (0,11-0,71) n=35 p <sub>1</sub> =0,004 p <sub>2</sub> =0,000 p <sub>3</sub> =0,407 p <sub>4</sub> =0,647	0,019
CD68 <sup>+</sup> RS1 <sup>+</sup>	0,25 (0,11-0,60) n=35	0,45 (0,12-1,51) n=36 p <sub>1</sub> =0,001	0,10 (0-0,66) n=35 p <sub>1</sub> =0,017 p <sub>2</sub> =0,000	0 (0-0,66) n=20 p <sub>1</sub> =0,280 p <sub>2</sub> =0,006 p <sub>3</sub> =0,139	0,44 (0,22-1,00) n=35 p <sub>1</sub> =0,022 p <sub>2</sub> =0,131 p <sub>3</sub> =0,001 p <sub>4</sub> =0,036	0,000
aSMA <sup>+</sup> FAP <sup>+</sup>	1,00 (0,47-1,50) n=33	1,80 (1,22-2,66) n=35 p <sub>1</sub> =0,000	1,00 (0,40-1,83) n=31 p <sub>1</sub> =0,464 p <sub>2</sub> =0,000	0,45 (0-1,71) n=18 p <sub>1</sub> =0,379 p <sub>2</sub> =0,001 p <sub>3</sub> =0,245	0,40 (0,22-0,95) n=33 p <sub>1</sub> =0,001 p <sub>2</sub> =0,000 p <sub>3</sub> =0,001 p <sub>4</sub> =0,407	0,000
aSMA <sup>-</sup> FAP <sup>+</sup>	0,40 (0,13-0,65) n=33	0,60 (0,36-1,20) n=35 p <sub>1</sub> =0,120	0,50 (0,33-1,00) n=31 p <sub>1</sub> =0,138 p <sub>2</sub> =0,252	0,29 (0-1,12) n=18 p <sub>1</sub> =0,977 p <sub>2</sub> =0,145 p <sub>3</sub> =0,255	0,50 (0,34-0,60) n=32 p <sub>1</sub> =0,965 p <sub>2</sub> =0,058 p <sub>3</sub> =0,151 p <sub>4</sub> =0,925	0,137
Примечание: p <sub>1-4</sub> – различия между микроокружениями структур (тест Вилкоксона); * – тест Фридмана; Ме – медиана; Q1-Q3 – квартили; n – количество случаев; Туб – тубулярные структуры; Альв – альвеолярные структуры; Сол – солидные структуры; Траб – трабекулярные структуры; Дискр – дискретные группы опухолевых клеток.						

Фибробластов с фенотипом aSMA<sup>+</sup>FAP<sup>+</sup> было больше вокруг солидных структур (1,80) и меньше в микроокружении тубулярных и дискретных групп



(0,45 и 0,40;  $p < 0,05$ ). Не было найдено значимых различий в числе  $\alpha\text{SMA}^-$   $\text{FAP}^+$  фибробластов между микроокружениями разных морфологических структур (Таблица 16).

### 3.5.3 Экспрессия генов-регуляторов функционального статуса макрофагов и фибробластов в морфологических структурах РМЖ

На основании литературных данных были выбраны гены, ответственные за рекрутирование моноцитов (*CSF1*, *CCL2*, *CCL5*), поляризацию макрофагов в M1 (*TNF*, *IFNG*, *IL12*, *IL23*) и M2 фенотип (*IL4*, *IL6*, *IL10*, *IL13*, *TGFb1*, *TGFb2*, *TGFb3*), контроль функций макрофагов (*CSF2* и *BSG*) [29, 67, 231, 282] и образование CAFs и регуляцию их пролиферации (*TGFb1*, *TGFb2*, *TGFb3*, *PDGFA*, *PDGFB*, *PDGFC*, *PDGFD*, *FGF2*, *IL6*, *CXCL12*, *IL1a*, *EGF*) [98, 158, 358]. Продукция описанных молекул, вовлеченных в изменение фенотипа макрофагов, характерна в большей степени для Т-лимфоцитов, однако некоторые исследования показали возможность их синтеза опухолевыми клетками [231]. Информацию об уровне экспрессии выбранных генов получали из данных микроматричного экспрессионного профилирования морфологических структур РМЖ.

По сравнению с клетками нормальных протоков молочной железы морфологические структуры характеризовались гипоэкспрессией генов, ассоциированных с рекрутированием моноцитов. Исключением были дискретные группы опухолевых клеток со значительной гиперэкспрессией гена *CCL2* ( $p < 0,05$ ; Таблица 17). Напротив, низкая экспрессия данного гена была обнаружена в трабекулярных структурах ( $p < 0,05$ ; Таблица 17). Уровень мРНК гена *CCL5* был в 3 раза ниже во всех структурах по сравнению с нормальными клетками молочной железы. Однако различия были статистически значимыми только для дискретных групп (Таблица 17).

Таблица 17 – Уровень экспрессии генов рекрутирования моноцитов и регуляции фенотипа макрофагов в различных морфологических структурах РМЖ

	Функции	Альв	Сол	Траб	Туб	Дискр
<i>CSF1</i>	Рекрутирование моноцитов	-1,56	-2,38	-1,03	-2,19	-
<i>CCL2</i>		-0,55	-0,32	-3,35*	0,42	3,54*
<i>CCL5</i>		-3,83*	-3,76*	-3,64*	-3,77*	-2,22
<i>TNF</i>	M1 поляризация	-0,54	-0,45	0,92	-0,27	-0,30
<i>IFNG</i>		-	-	0,46	0,19	-
<i>IL12</i>		-	-	-	-	-
<i>IL23</i>		-	-	-	-	-
<i>IL4</i>	M2 поляризация	-0,41	-0,41	0,35	-	-0,23
<i>IL6</i>		-0,36	-0,91	-	-0,55	-
<i>IL10</i>		-0,59	-0,49	-	-	-
<i>IL13</i>		-	-0,31	-	0,21	-0,32
<i>TGFb1</i>		0,80	0,29	-	1,47	1,20
<i>TGFb2</i>		2,72	2,23	3,23*	2,05	3,28*
<i>TGFb3</i>		1,92	2,27	1,15	2,78	1,13
<i>CSF2</i> ( <i>GM-CSF</i> )	Блокирование продукции фактора роста эндотелия сосудов VEGF, увеличение представления антигенов и индукция противоопухолевого фенотипа в макрофагах	-0,18	0,17	-	0,57	-0,25
<i>BSG</i> ( <i>EMMPRIN</i> )	Индукция экспрессии металлопротеиназы MMP-9 и VEGF и ангиогенеза	0,83	1,29	0,54	2,15*	0,95

Примечание: \* –  $p < 0,05$  в сравнении с нормальными клетками молочной железы (t-критерий Стьюдента). Цвет ячеек пропорционален уровню экспрессии генов: от зелёного (низкий уровень) до красного (высокий уровень). Туб – тубулярные структуры; Альв – альвеолярные структуры; Сол – солидные структуры; Траб – трабекулярные структуры; Дискр – дискретные группы опухолевых клеток.

Гены, вовлеченные M1 и M2 поляризацию, по большей части либо не экспрессировались, либо их экспрессия в структурах была ниже, чем в нормальном эпителии молочной железы (Таблица 17). Исключение составили гены семейства TGFb, которые гиперэкспрессировались

практически во всех структурах. Хотя статистическая значимость различий достигалась только для высокой экспрессии гена *TGFb2* в трабекулярных и дискретных группах ( $p < 0,05$ ). Экспрессия генов *TNF* и *IL4*, а также *IL13*, также была повышенной в трабекулярных и тубулярных структурах; однако различия были статистически не значимыми ( $p > 0,05$ ). Экспрессия гена *CSF2*, связанного с индукцией противоопухолевого фенотипа в макрофагах, также не различалась между структурами и нормальным эпителием. Напротив, ген *BSG*, вовлеченный в формирование ангиогенного фенотипа в макрофагах, значимо выше экспрессировался в тубулярных структурах по сравнению с клетками нормальных протоков молочной железы ( $p < 0,05$ ; Таблица 17).

Экспрессия генов, вовлеченных в индукцию образования CAFs и их дифференцировку, значительно варьировала между разными структурами РМЖ (Таблица 18). Как уже выше отмечалось, гены семейства *TGFb* гиперэкспрессировались почти во всех структурах. Однако различия были статистически значимыми только в случае увеличения экспрессии гена *TGFb2* в трабекулярных и дискретных вариантах опухолевых клеток по сравнению с нормальными клетками молочной железы ( $p < 0,05$ ; Таблица 18). Экспрессия гена *PDGFB* была в два раза выше в дискретных группах; однако различия не были значимыми ( $p = 0,16$ ). Для других генов в основном отмечалась низкая экспрессия в морфологических структурах. Например, гены *FGF2* и *PDGFA* в значительной степени гипоэкспрессировались во всех типах структур ( $p < 0,05$  и  $0,001 < p < 0,1$ ; соответственно; Таблица 18). Экспрессия генов *CXCL12* и *EGF* была значимо ниже только в трабекулярных и альвеолярных структурах, соответственно ( $p < 0,05$ ; Таблица 18).

Таким образом, микроокружение различных морфологических структур РМЖ характеризуется специфическим иммунно-воспалительным составом, что может быть связано с индивидуальными способностями опухолевых клеток в составе структур рекрутировать моноциты и поляризовать их в

сторону M1 или M2 макрофагов, индуцировать образование CAFs и регулировать их фенотип.

Таблица 18 – Уровень экспрессии генов, регулирующих образование CAFs и их дифференцировку, в различных морфологических структурах РМЖ

Гены	Функции	Альв	Сол	Траб	Туб	Дискр
<i>TGFb1</i>	Индукция образования CAFs из нормальных фибробластов	0,80	0,29	-	1,47	1,20
<i>TGFb2</i>		2,72	2,23	3,23*	2,05	3,28*
<i>TGFb3</i>		1,92	2,27	1,15	2,78	1,13
<i>PDGFA</i>	Стимуляция пролиферации CAFs	-2,21	-2,09	-4,58*	-2,97*	-2,29
<i>PDGFB</i>		0,91	-0,96	-	-	2,00
<i>PDGFC</i>		-0,69	-0,49	-1,51	-0,87	0,46
<i>PDGFD</i>		-	-0,43	-	-0,34	-0,34
<i>FGF2</i> (bFGF)	Стимуляция дифференцировки нормальных фибробластов в CAFs и их пролиферации	-4,05*	-3,75*	-4,08*	-4,28*	-3,60*
<i>CXCL12</i> (SDF1)	Активация CAFs	-0,50	-0,72	-2,55*	-1,70	0,29
<i>EGF</i>	Стимуляция дифференцировки нормальных фибробластов в CAFs и их активация	-2,47*	-1,00	-0,58	-0,75	-2,10
<i>IL1a</i>		-	-	-0,49	-0,32	-
<i>IL6</i>	Индукция образования CAFs	-0,36	-0,91	-	-0,56	-
Примечание: * – $p < 0,05$ в сравнении с нормальными клетками молочной железы (t-критерий Стьюдента). Цвет ячеек пропорционален уровню экспрессии генов: от зелёного (низкий уровень) до красного (высокий уровень). Туб – тубулярные структуры; Альв – альвеолярные структуры; Сол – солидные структуры; Траб – трабекулярные структуры; Дискр – дискретные группы опухолевых клеток.						

Макрофаги и фибробласты вне зависимости от фенотипа чаще обнаруживались и преобладали в микроокружении солидных структур и дискретных групп. Однако, только в дискретных группах одновременно наблюдалась значимая гиперэкспрессия гена *CCL2*, вовлеченного в

рекрутирование моноцитов, и гена *TGFb2*, продукт которого является одним из триггеров поляризации макрофагов в M2 фенотип и дифференцировки нормальных фибробластов в CAFs. На основании этих результатов резонно предположить, что дискретные группы по сравнению с многоклеточными структурами обладают более выраженной способностью индуцировать проопухолевые иммунно-воспалительные реакции в микроокружении опухолей молочной железы. В свою очередь, накопление M2 макрофагов и CAFs вблизи дискретных групп опухолевых клеток, вероятно, является фактором, индуцирующим и/или поддерживающим их распространение за пределы опухолевого очага посредством инвазии и интравазации. Данное предположение подтверждается ассоциацией между наличием одиночных опухолевых клеток в ткани опухоли, которые составляют дискретные группы, и высокой вероятностью гематогенного метастазирования РМЖ [302].

### 3.6 Метастатический фенотип морфологических структур РМЖ

Проведенные ранее исследования показали зависимость метастазирования РМЖ от морфологического строения первичной опухоли. Наличие в опухоли альвеолярных структур ассоциировано с высокой частотой лимфогенного метастазирования РМЖ [10], тогда как риск гематогенного метастазирования возрастает при показателе количественного отношения трабекулярных структур к тубулярным (Тр/Туб), равном 2 [18]. Механизмы, обуславливающие вклад ВОМГ в прогрессию РМЖ, в настоящее время не известны. В настоящем исследовании мы предположили, что опухолевые клетки различных морфологических структур различаются между собой в инвазивном потенциале. С использованием данных микроматричного экспрессионного профилирования была проведена оценка уровней экспрессии генов эпителиального и мезенхимального фенотипов в различных морфологических структурах. В заключение, была валидирована

ассоциация ВОМГ с лимфогенным и гематогенным метастазированием РМЖ на большой группе больных РМЖ (n=676).

### 3.6.1 Экспрессия генов эпителиального и мезенхимального фенотипов в морфологических структурах РМЖ

На основе литературных данных [91, 123] были выбраны гены, ответственные за формирование эпителиального и мезенхимального клеточных фенотипов, и проведен анализ уровня их экспрессии в морфологических структурах (таблица 19). Кроме того, в исследование были включены гены, гиперэкспрессия которых характерна для клеток-“пионеров” (от англ. trailblazers), прокладывающих путь при инвазивном росте опухоли и демонстрирующих мезенхимальные черты [326]. И наконец, мы включили в анализ ген металлопротеиназы MMP14, ранее описанный как гиперэкспрессирующийся при ЭМП и ассоциированный с опухолевой инвазией [61, 304]. Функциональная аннотация выбранных генов приведена в Приложении 3 (таблица 1).

Таблица 19 – Экспрессия генов, связанных с эпителиальным и мезенхимальным фенотипами, в различных морфологических структурах

	Гены	Полное название	Туб	Альв	Сол	Траб	Дискр	Ref.
Эпителиальные (E)	<i>CDH1</i>	E-cadherin	0,54	0,36	-	-	-0,38	[123]
	<i>CD24</i>	CD24 molecule	0,42	-	-	-	-0,34	
	<i>EPCAM</i>	Epithelial cell adhesion molecule	0,48	0,47	0,32	-	-0,85	
	<i>KRT5</i>	Keratin 5	-4,56	-4,40	-3,56	-4,12	-1,80	
	<i>LCN2</i>	Lipocalin 2 (NGAL)	-1,41	0,39	0,52	0,39	-1,87	
	<i>TP63</i>	Tumor protein p63	-3,55	-0,73	-2,64	-1,79	-2,69	
	<i>TNFSF10</i>	TNF superfamily member 10 (TRAIL, CD253)	-	0,88	0,82	-	-1,49	
	<i>SLPI</i>	Secretory leukocyte protease inhibitor (antileukoproteina se)	-3,13	-3,16	-1,55	-3,46	-3,97	
	<i>IL1B</i>	Interleukin 1 Beta	-	-	-	-	2,31	
	<i>S100A8</i>	S100 Calcium Bi-	3,18	4,24	4,40	3,56	2,00	

		ing Protein A8						
	<i>JUP</i>	Junction Plakoglobin ( $\gamma$ -catenin)	-	-0,71	-0,23	-0,20	-0,31	[91]
	<i>TJP1</i>	Tight Junction Protein 1	-	-0,33	-0,52	-0,84	-0,56	
	<i>CTNNA3</i>	Catenin Alpha 3	-0,43	-0,38	-0,23	0,28	-	
	<i>CLDN3</i>	Claudin 3	-0,46	-0,43	0,50	-	-1,77	
	<i>OCLN</i>	Occludin	1,03	-	1,05	-0,36	-3,40	
	<i>ABCA6</i>	ATP Binding Cassette Subfamily A Member 6	0,48	-0,37	0,48	0,95	1,15	
	<i>DCN</i>	Decorin	1,38	0,96	0,35	2,52	3,63	
	<i>IL1R1</i>	Interleukin 1 Receptor Type 1	-2,22	-0,81	-2,36	-2,21	-1,02	
	<i>PCOLCE</i>	Procollagen C-Endopeptidase Enhancer	0,98	2,34	-	1,44	2,80	
	<i>WNT5A</i>	Wnt Family Member 5A	-1,00	-	-	-	1,70	
	<i>VIM</i>	Vimentin	-1,01	-0,66	-1,24	-0,69	0,87	
	<i>ZEB2</i>	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2	-2,01	-1,02	-2,50	-2,25	1,12	
	<i>MMP14</i>	Matrix Metalloproteinase 14 (MT1-MMP)	-	-	1,40	2,60	3,85	[61, 304]
Мезенхимальные (М)  Клетки-“пионеры”	<i>DOCK10</i>	Dedicator of Cytokinesis 10	-	-	-	0,8	2,59	[326]
	<i>ITGA11</i>	Integrin Subunit Alpha 11	1,75	0,4	0,3	1,7	2,4	
	<i>DAB2</i>	Clathrin Adaptor Protein	-2,3	-1,39	-1,58	-2,12	0,97	
	<i>PDGFRA</i>	Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha	-4,88	-4,97	-3,43	-3,24	-1,73	
	<i>VASN</i>	Vasorin	-0,51	-0,83	1,29	0,71	-	
	<i>PPAP2B</i>	Phosphatidic Acid Phosphatase Type 2B (PPAP2B)	-1,39	-0,32	-0,85	-1,29	0,97	
	<i>LPAR1</i>	Lysophosphatidic Acid Receptor 1	1,14	1,17	1,05	2,34	2,45	
Примечание: Ref. (от англ. references) – ссылки на литературные источники; Туб – тубулярные структуры; Альв – альвеолярные структуры; Сол – солидные структуры; Траб – трабекулярные структуры; Дискр – дискретные группы опухолевых клеток; “-” – отсутствие экспрессии. Цвет ячеек пропорционален уровню экспрессии генов: от зелёного (низкий уровень) до красного (высокий уровень).								

Гены мезенхимального фенотипа чаще гиперэкспрессировались в дискретных группах опухолевых клеток (80,0% (12/15)) по сравнению с другими структурами (26,6% (4/15) - 53,3% (8/15),  $p=0,007$ ; таблица 19, Рисунок 20). Дискретные группы также характеризовались самой низкой долей эпителиальных генов (13,3% (2/15)); однако различия с другими структурами не были статистически значимыми (таблица 19, Рисунок 20). Для остальных морфологических структур была характерна разная доля гипер- и гипоекспрессирующихся генов эпителиального и мезенхимального фенотипа (Рисунок 20). В целом, процент гиперэкспрессирующихся генов эпителиальности уменьшался в ряду: солидные, тубулярные = альвеолярные, трабекулярные, дискретные группы. Доля мезенхимальных генов возрастала в ряду: альвеолярные, тубулярные, солидные, трабекулярные и дискретные группы (Рисунок 20).

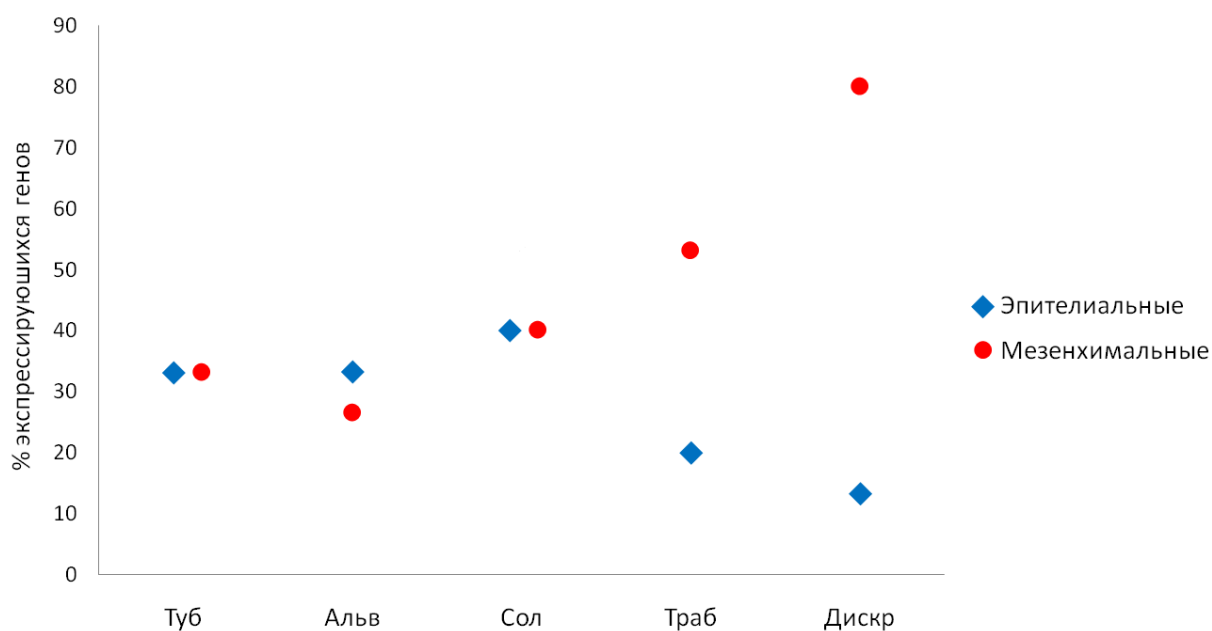


Рисунок 20 – Доля генов эпителиального и мезенхимального фенотипа в разных вариантах морфологических структур РМЖ. Туб – тубулярные; Альв – альвеолярные; Сол – солидные; Траб – трабекулярные; Дискр – дискретные.



Интересно, что *MMP14*, кодирующий трансмембранную металлопротеиназу MT1-MMP, не экспрессировался в тубулярных и альвеолярных структурах и был активен только в солидных, трабекулярных и дискретных группах. Причём в последних структурах его экспрессия была наибольшей (таблица 15). Хорошо известно, что *MMP14* играет ключевую роль в опухолевой инвазии, разрушая многие компоненты внеклеточного матрикса и протеолитически активируя другие металлопротеиназы. Именно поэтому, *MMP14* описывается как “мастер деградации внеклеточного матрикса” [61, 114].

### 3.6.2 Сигнальные пути клеточной миграции и инвазии в морфологических структурах РМЖ

Функциональное аннотирование генов, дифференциально экспрессирующихся между структурами и нормальными клетками молочной железы ( $|\log\text{-fold-change}| \geq \log_2 1,5$  и  $p < 0,05$ ), показало наличие сигнальных путей (Таблица 20), вовлеченных в ЭМП, межклеточные взаимодействия, адгезию клеток с внеклеточным матриксом и регуляцию актинового цитоскелета. Эпителиальные адгезионные (от англ. epithelial adherens), щелевые (от англ. gap) и плотные (от англ. tight) контакты более выражены в многоклеточных (тубулярных, альвеолярных, солидных и трабекулярных) структурах, тогда как сигнальные пути адгезии клеток с внеклеточным матриксом (фокальная и интегриновая адгезия) равномерно представлены во всех морфологических вариантах опухолевых клеток. Напротив, сигналинги регуляции динамики актинового цитоскелета через ГТФазы Rho и Rac в большей степени характерны для солидных и дискретных вариантов опухолевых клеток. Интересно, что регуляция цитоскелета через Cdc42, представителя семейства Rho, отсутствовала в дискретных группах и других структурах и наблюдалась только в солидных компонентах РМЖ.

Таблица 20 – Сигнальные пути инвазии, обнаруженные в морфологических структурах РМЖ

Сигнальные пути		Туб	Альв	Сол	Траб	Дискр	Туб	Альв	Сол	Траб	Дискр
		сравнение структур с нормальным эпителием					сравнение структур друг с другом*				
ЭМП	Регуляция ЭМП пути	2,8	6,3	2,0	2,8	2,7	-				
	TGF-β сигналинг	1,8	2,1	1,4	2,9	1,1	0,3	0,9	0,0	2,3	0,0
Межклеточная адгезия	Эпителиальные адгезионные контакты (adherens junctions)	1,3	1,7	1,6	1,5	0,8	-				
	Щелевые контакты (gap junctions)	1,3	1,7	0,7	1,3	0,4	-				
	Плотные контакты (tight junctions)	1,6	1,2	2,1	0,0	0,8	0,4	0,5	0,0	0,0	1,5
	Паксиллин сигналинг	2,6	1,3	2,1	2,3	2,7	0,5	0,0	0,0	1,5	1,3
Адгезия клеток и ВКМ	ФАК сигналинг	1,5	2,1	0,7	2,1	2,6	0,6	0,5	0,0	1,4	1,2
	Интегриновый сигналинг	1,9	0,8	1,5	1,6	1,5	-				
	ILK сигналинг	1,8	0,9	1,7	0,8	1,1	-				
Регуляция актинового цитоскелета	Cdc42 сигналинг	0,0	0,6	1,8	0,0	0,0	-				
	Актиновый цитоскелет	2,0	4,0	2,9	2,5	1,1	-				
	Rac сигналинг	0,5	1,2	1,3	0,7	1,8	-				
	RhoGDI сигналинг	1,0	0,9	1,3	0,6	2,4	0,0	0,0	0,0	0,0	1,6
	Сигналинг через ГТФазы Rho и Rac	1,2	1,0	1,8	1,8	2,3	-				
	Регуляция подвижности ГТФазами Rho	-					0,3	0,0	0,0	0,0	1,3
Ингибирование матриксных металлопротеиназ		0,7	0,3	0,8	1,2	2,6	0,3	0,0	0,0	0,0	3,9
Инвазивность глиомы		0,9	0,5	0,7	1,3	2,4	0,9	0,5	0,7	1,3	2,4

Примечание: \* – без сравнения с нормальным эпителием; ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход; ВКМ – внеклеточный матрикс; Туб – тубулярные структуры; Альв – альвеолярные структуры; Сол – солидные структуры; Траб – трабекулярные структуры; Дискр – дискретные группы опухолевых клеток. Интенсивность красного цвета пропорциональна величине статистической значимости ( $-\log_{10}(p)$ ).

Эти результаты, вероятно, объясняются различной ролью ГТФаз семейства Rho в организации актиновых филаментов: ГТФаза Rac контролирует формирование клеточных протрузий типа ламеллоподий, тогда как Cdc42 отвечает за образование филоподий [263].

Противоположная ситуация наблюдалась для сигналинга актинового цитоскелета, который значимо выражен только в многоклеточных структурах. Отсутствие статистически значимой выраженности данного сигнального пути в дискретных вариантах опухолевых клеток на первый взгляд противоречит выше представленным результатам о существенной регуляции Rho, Rac и Cdc42 сигналингов в этих морфологических вариантах. Однако детальный анализ молекул, составляющих сигнальный путь актинового цитоскелета, на примере альвеолярных структур показал гипер- и гипоекспрессию других генов (Arp2/3, Myosin, ACTN и т.д.) на фоне отсутствия активности Rho, Rac и Cdc42. Сигнальные пути, вовлеченные в активность матриксных металлопротеиназ и опухолевую инвазию в общем, были значимо выражены в дискретных группах опухолевых клеток и на фоне тенденции – в трабекулярных структурах. Более того, выраженность сигналингов опухолевой инвазии была еще более значимой в дискретных группах опухолевых клеток, когда проводилось функциональное аннотирование дифференциально экспрессирующихся генов, полученных при сравнении структур друг с другом без поправки на нормальный эпителий молочной железы (Таблица 20).

Таким образом, результаты, представленные выше (разделы 3.6.1 и 3.6.2), указывают на значительные различия морфологических структур по выраженности эпителиальных/мезенхимальных характеристик и инвазивного потенциала и дают основание для предположения, что ВОМГ является результатом развертывания программы ЭМП. Предложено, что ЭМП можно условно разделить минимум на три этапа: начальный (эпителиальный), промежуточный (гибридный/частичный) и терминальный (мезенхимальный) [241, 252]. Некоторые исследователи классифицируют промежуточный этап

– на квазиэпителиальный (с преобладанием эпителиальности) и квазимезенхимальный (с преобладанием мезенхимальности) [252]. В случае ВОМГ, затруднительно провести деление морфологических структур по стадиям ЭМП ввиду того, что все они демонстрируют наличие эпителиальных и мезенхимальных черт, однако их доля варьирует от структуры к структуре. Представлялось бы логичным отнесение тубулярных структур к начальной стадии ЭМП, поскольку данный вариант опухолевых клеток ближе всего по морфологии к нормальным протокам молочной железы и является фактором благоприятного прогноза, учитываемым в классификации Блума-Ричардсона (Bloom-Richardson grading system). Тем не менее, в клетках тубулярных структур экспрессия эпителиальных и мезенхимальных генов представлена в равных долях, что может указывать на наличие ЭМП. Это подтверждается также тем, что некоторые тубулярные структуры имеют неклассическую морфологию в виде наличия более чем 2-х слоев опухолевых клеток. Такое утолщение тубулярной структуры может быть началом формирования инвазивных пластов опухолевых клеток (протрузий). Альвеолярные структуры, наиболее близкие по экспрессионному профилю к тубулярным вариантам опухолевых клеток, характеризуются наименьшей выраженностью мезенхимальных характеристик среди всех структур. В солидных структурах отмечено увеличение степени мезенхимальности по сравнению с тубулярными и альвеолярными вариантами клеток, а также наибольшая выраженность сигнальных путей ремоделирования актинового цитоскелета. Преобладание мезенхимальных черт над эпителиальными характерно для трабекулярных структур и в большей степени для дискретных вариантов опухолевых клеток. Наибольшая выраженность сигнальных путей, вовлеченных в активность матриксных металлопротеиназ и опухолевую инвазию, обнаружена также в этих же морфологических структурах. Подытоживая сказанное, можно однозначно сказать, что признаки ЭМП наблюдаются в разных морфологических структурах, однако его глубина, как и инвазивный

фенотип, увеличивается в ряду: солидные, трабекулярные и дискретные группы. Интересно, что дискретные группы сохраняют эпителиальные признаки и, вероятно, не являются финальным “аккордом” или терминальным этапом ЭМП. “Остаточная” эпителиальность дискретных структур может быть обусловлена наличием в их составе групп из 2-5 опухолевых клеток, которые сохраняют адгезивные контакты. Гетерогенность дискретных групп подтверждается экспрессией большого количества специфических и разнообразных по функциям генов (Таблица 13). Учитывая это, представляется логичным классификация дискретных групп на одиночные опухолевые клетки и группы из 2-5 клеток и изучение их молекулярно-генетических характеристик.

3.6.3 Частота лимфогенного и гематогенного метастазирования у больных РМЖ, не получавших НАХТ, в зависимости от ВОМГ

Наличие в опухоли альвеолярных или трабекулярных структур связано с высокой частотой лимфогенного метастазирования РМЖ по сравнению со случаями без данных структур (47,8% против 23,2%,  $p=0,0004$ ; 43,0% против 30,0%,  $p=0,0012$ , соответственно, Рисунок 21А). Выявленная ассоциация подтверждается более ранними исследованиями, проведенными на меньших по размеру группах больных РМЖ [8, 10]. Интересно, что у больных с отсутствием дискретных групп клеток частота гематогенного метастазирования выше, чем у пациенток с наличием данных морфологических структур (16,9% против 8,2%,  $p=0,043$ , Рисунок 21А).

3.6.4 Частота лимфогенного и гематогенного метастазирования у больных РМЖ, получавших НАХТ, в зависимости от ВОМГ

У больных РМЖ с НАХТ наличие в опухоли альвеолярных, трабекулярных или дискретных структур связано с высокой частотой лимфогенного метастазирования по сравнению со случаями без данных

структур (64,2% против 33,0%,  $p < 0,0001$ ; 57,7% против 36,8%,  $p < 0,0001$ ; 59,3% против 41,4%,  $p = 0,0002$ , соответственно, Рисунок 21Б).

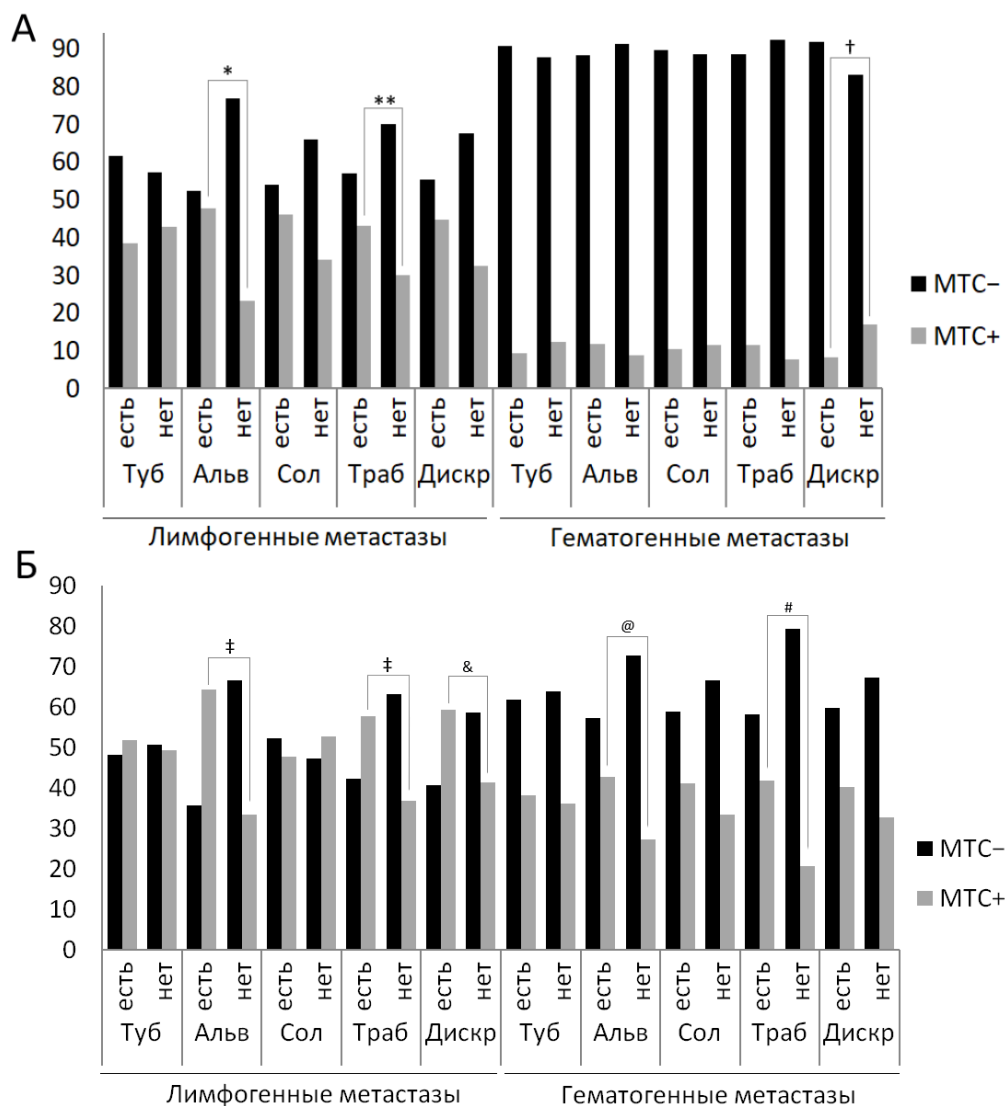


Рисунок 21 – Частота лимфогенного и гематогенного метастазирования у больных РМЖ с наличием различных морфологических структур. А, пациенты без НАХТ; Б, пациенты с НАХТ. \* –  $p = 0,0004$ ; \*\* –  $p = 0,0012$ ; † –  $p = 0,043$ ; ‡ –  $p < 0,0001$ ; & –  $p = 0,0002$ ; @ –  $p = 0,0036$ ; # –  $p = 0,0005$ .

Ассоциация альвеолярных структур с повышением вероятности лимфогенного метастазирования у больных с НАХТ ранее была описана, однако исследуемая группа была меньшего размера, и найденная закономерность прослеживалась только у постменопаузальных пациенток [16]. Связь высокой частоты лимфогенного метастазирования с

альвеолярными или трабекулярными структурами наблюдалась как у больных с отсутствием, так и наличием ответа на НАХТ ( $p=0,0032$  и  $p<0,0001$ ;  $p=0,0004$  и  $p=0,0152$ , Рисунок 22). Напротив, ассоциация дискретных групп опухолевых клеток с лимфогенным метастазированием была характерна только для пациентов с хорошим ответом на НАХТ ( $p=0,0041$ , Рисунок 22).

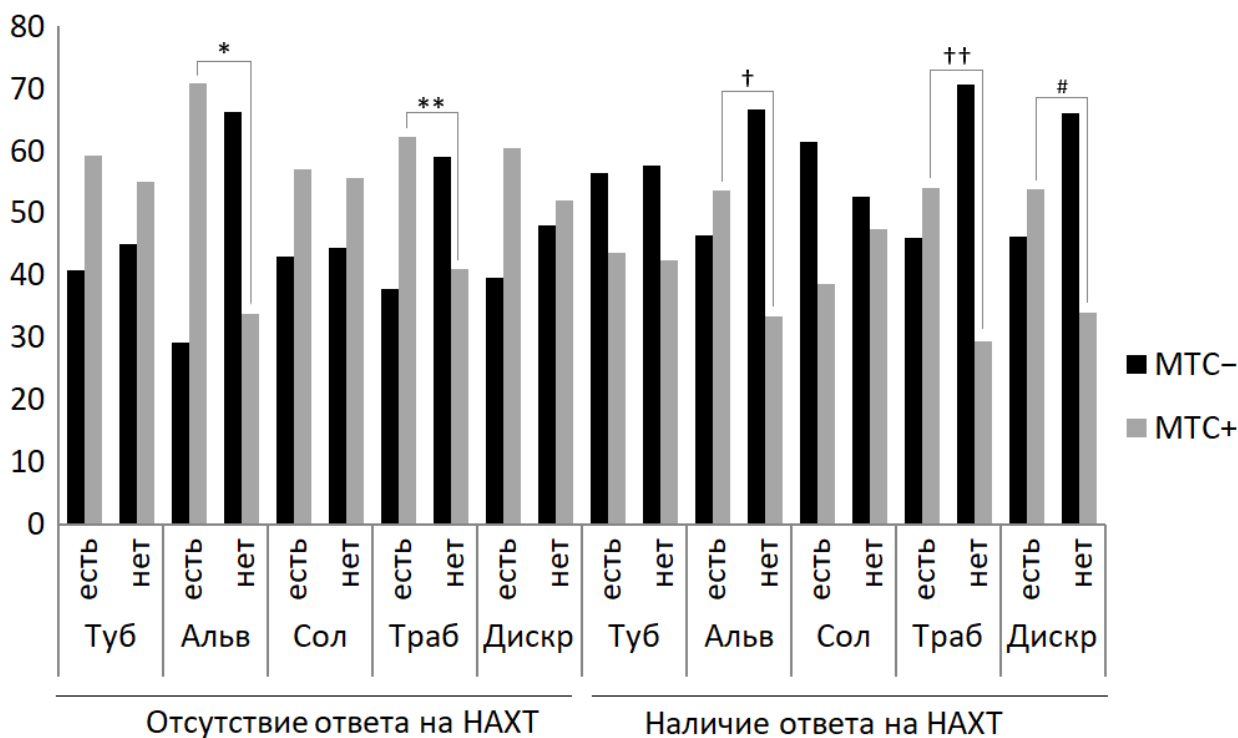


Рисунок 22 – Частота лимфогенного метастазирования у больных РМЖ с наличием разных морфологических структур и различным эффектом НАХТ. Наличие ответа на НАХТ: частичная регрессия. Отсутствие ответа на НАХТ: стабилизация и прогрессия. \* –  $p=0,0032$ ; \*\* –  $p=0,0001$ ; † –  $p=0,0004$ ; ‡ –  $p=0,0152$ ; # –  $p=0,0041$ .

Пациенты с наличием в опухоли альвеолярных и трабекулярных структур, получавшие НАХТ, также характеризовались высокой частотой гематогенного метастазирования по сравнению со случаями без данных структур (42,8% против 27,3%,  $p=0,0036$ ; 41,9% против 20,7%,  $p=0,0005$ , Рисунок 21Б). Более того, для больных с альвеолярными и трабекулярными

структурами была характерна низкая безметастатическая выживаемость в сравнении с пациентками без данных структур (Рисунок 23).

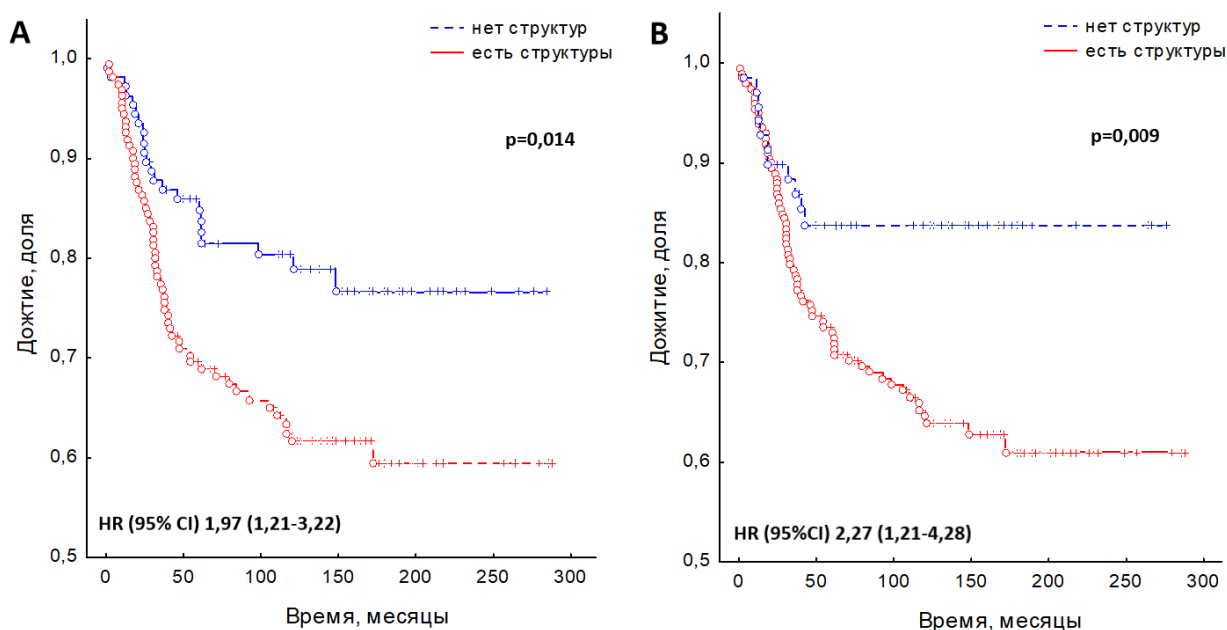


Рисунок 23 – Безметастатическая выживаемость больных РМЖ, получавших НАХТ, с наличием альвеолярных (А) и трабекулярных (Б) структур.

У больных с наличием альвеолярных структур медиана выживаемости составила 110 месяцев против 129 месяцев у пациентов с отсутствием данных структур ( $p=0,014$ ). Отношение рисков (HR (95% CI)) при наличии альвеолярных структур было 1,97 (1,21-3,22) ( $p=0,007$ ; Рисунок 23А).

У больных с трабекулярными структурами медиана выживаемости составила 107 месяцев против 117 месяцев у пациентов с отсутствием данных структур ( $p=0,009$ ). Отношение рисков (HR (95% CI)) при наличии трабекулярных структур было 2,27 (1,21-4,28) ( $p=0,012$ ; Рисунок 23Б).

Интересно, что ассоциация альвеолярных структур с гематогенным метастазированием наблюдалась только у пациенток с отсутствием ответа на НАХТ (58,5% против 28,6%,  $p=0,001$ , Рисунок 24), тогда как трабекулярные структуры были связаны с метастатическим процессом у больных,



чувствительных к химиотерапии (34,3% против 9,3%,  $p=0,002$ , Рисунок 24).

По данным результатам получены патенты RU 2623150 и 2627649 [4, 5].

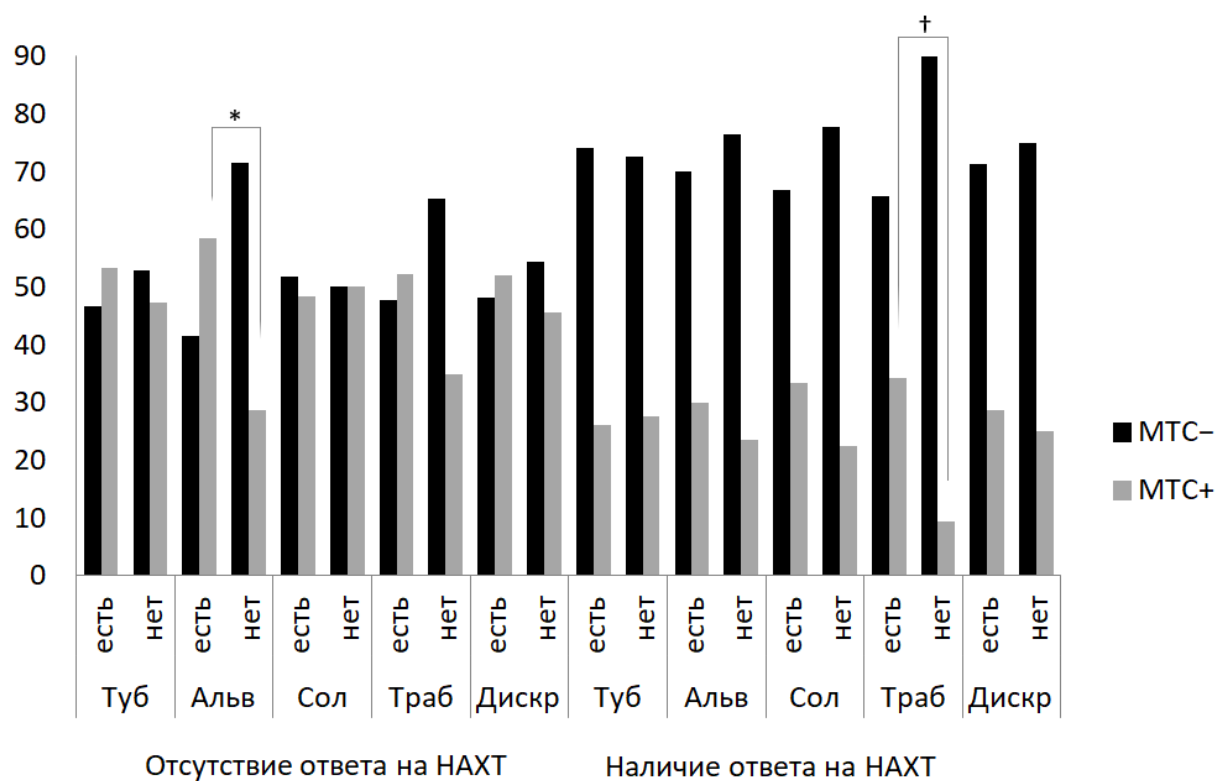


Рисунок 24 – Частота гематогенного метастазирования у больных РМЖ с наличием разных морфологических структур и различным эффектом НАХТ. Отсутствие ответа на НАХТ: стабилизация и прогрессия. Наличие ответа на НАХТ: частичная регрессия. MTC– – нет метастазов; MTC+ – есть метастазы; \* –  $p=0,001$ ; † –  $p=0,002$ .

Кроме того, связь морфологических структур с гематогенным метастазированием зависела от состояния менструальной функции пациенток. У больных с сохраненной репродуктивной функцией гематогенные метастазы выявлялись чаще при наличии альвеолярных и солидных структур, чем у больных без этих структур (48,0% против 26,5%,  $p=0,0059$ ; 50,0% против 33,0%,  $p=0,028$ , соответственно, Рисунок 25). У пациенток в состоянии менопаузы отдаленные метастазы обнаруживались

чаще при наличии трабекулярных структур, чем при их отсутствии (41,4% против 9,7%,  $p=0,0002$ , Рисунок 25).

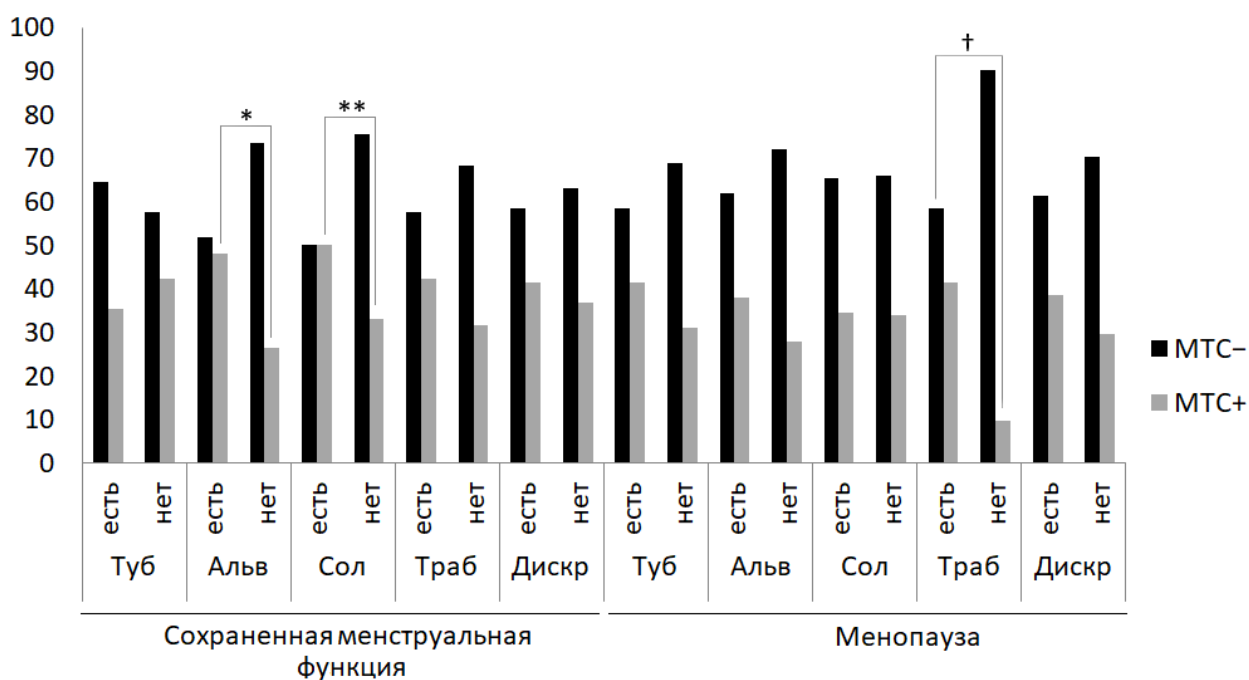


Рисунок 25 – Частота гематогенного метастазирования у больных РМЖ с наличием разных морфологических структур в зависимости состояния менструальной функции. МТС– – нет метастазов; МТС+ – есть метастазы; \* –  $p=0,0059$ ; \*\* –  $p=0,0285$ ; † –  $p=0,0002$ .

В целом, лимфогенные метастазы чаще выявлялись при высокой степени ВОМГ (3-5 типов структур в опухоли), чем при низком морфологическом разнообразии, у больных РМЖ, получавших НАХТ (65,9% против 37,2%,  $p<0,0001$ , Рисунок 26Б) и без неё (46,5% против 24,2%,  $p=0,0019$ , Рисунок 26А). Гематогенные метастазы также чаще обнаруживались у больных с высокой степенью ВОМГ по сравнению с пациентами с низким морфологическим разнообразием (45,5% против 27,2%,  $p=0,0005$ ); однако, данная ассоциация была справедлива только для случаев с НАХТ (Рисунок 26В).

Анализ ассоциации ВОМГ с частотой лимфогенного и гематогенного метастазирования в зависимости от схемы химиотерапии, молекулярного

подтипа РМЖ и размера опухоли не проводился ввиду малого числа случаев в анализируемых подгруппах.

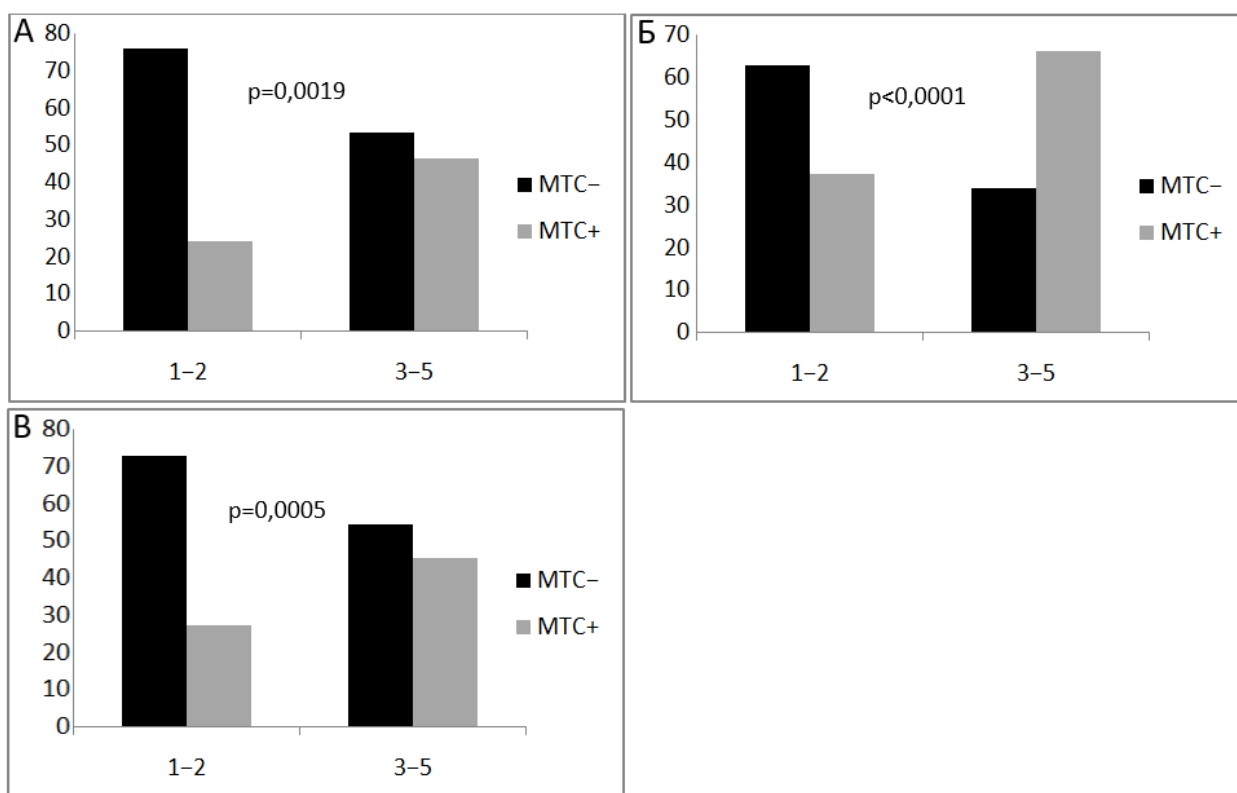


Рисунок 26 – Частота лимфогенного (А, Б) и гематогенного (В) метастазирования у больных РМЖ с низкой (1-2 типов структур) и высокой (3-5 типов структур) степенью ВОМГ. А, без НАХТ; Б и В, с НАХТ

Таким образом, ВОМГ в значительной степени ассоциирована с риском лимфогенного и гематогенного метастазирования РМЖ. В частности, высокая частота лимфогенного метастазирования характерна для пациентов с альвеолярными или трабекулярными структурами. У больных с НАХТ наличие альвеолярных или трабекулярных структур также ассоциировано с высокой вероятностью гематогенного метастазирования и низкой безметастатической выживаемостью. Интересно, что корреляция связь альвеолярных структур и гематогенного метастазирования справедлива только для пациенток, демонстрирующих низкую эффективность НАХТ, тогда как ассоциация трабекулярных характерна для случаев,

чувствительных к химиотерапии. В целом, прогрессия РМЖ чаще наблюдалась у пациентов с высоким морфологическим разнообразием. Неожиданно, что, несмотря на выраженный мезенхимальный фенотип, дискретные группы опухолевых клеток не были ассоциированы с высокой частотой метастазирования РМЖ. Тем не менее, по данным другого исследования наличие одиночных опухолевых клеток, входящих в состав дискретных групп, ассоциировано с высокой вероятностью гематогенного метастазирования РМЖ [302]. Данное наблюдение еще раз подчеркивает гетерогенную природу дискретных групп опухолевых клеток и необходимость их разделения на два самостоятельных типа морфологических структур – группы из 2-5 клеток и одиночные опухолевые клетки.

### 3.7 Химиорезистентный фенотип морфологических структур РМЖ

#### 3.7.1 Экспрессия генов химиорезистентности в морфологических структурах РМЖ

На основе данных микроматричного транскрипционного профилирования морфологических структур РМЖ была получена информация об уровне экспрессии генов, вовлеченных в основные механизмы лекарственной устойчивости: проникновение препаратов в клетку, их выброс из клетки и детоксикация, наличие мишеней, остановка клеточного цикла, апоптоз и репарация ДНК.

В таблице 21 представлены основные гены химиорезистентности, уровень экспрессии которых в значительной степени различался между разными типами морфологических структур, а также лекарственные препараты, к которым данные гены обуславливают резистентность или чувствительность. Экспрессия генов, кодирующих ключевые факторы химиорезистентности, такие как ABCB1, ABCB4, ABCB5, ABCC3, ABCC5 и ABCG2, не была статистически значимой по сравнению с нормальными клетками молочной железы.

Для всех морфологических структур была характерна экспрессия одних и тех же генов, однако её уровень значительно варьировал от структуры к структуре. Все типы структур демонстрировали гиперэкспрессию гена *NAT1*, вовлеченного в детоксикацию ксенобиотиков [271], генов АТФ-зависимых (от англ. ATP-binding cassette, ABC) транспортеров ABCA12 и ABCC11, выбрасывающих ксенобиотики из клеток [351], и гена *Tubb3*, кодирующего бета-тубулин III-го класса, который наряду с другими тубулинами формирует микротрубочки [162].

Таблица 21 – Гены химиорезистентности, дифференциально экспрессирующиеся между различными морфологическими структурами РМЖ

Механизмы резистентности	Гены		Р/ч*	Препараты	Ссылки
	Краткое название	Полное название			
Проникновение препаратов в клетки	<i>SLC1A3</i>	Solute Carrier Family 1 Member 3	Р	цисплатин	[167]
	<i>SLC23A2</i>	Solute Carrier Family 23 Member 2	Р	5-фторурацил	[145, 152]
	<i>SLC25A13</i>	Solute Carrier Family 25 Member 13	Ч	камптотецин	[145]
	<i>SLC29A2</i>	Solute Carrier Family 29 Member 2	Р	гемцитабин, флударабин	[207]
Выброс препаратов из клеток	<i>ABCA12</i>	ATP Binding Cassette Subfamily A Member 12	Р	5-фторурацил, паклитаксел, этопозид,	[351]
	<i>ABCC1</i>	ATP Binding Cassette Subfamily C Member 1	Р	циклофосфамид, доксорубицин, метотрексат	[226, 351]
	<i>ABCC11</i>	ATP Binding Cassette Subfamily C Member 11	Р	5-фторурацил	[80, 351]
	<i>ABCG1</i>	ATP Binding Cassette Subfamily G Member 1	Р	доксорубицин	[351]
Детоксикация препаратов	<i>NAT1</i>	N-Acetyltransferase 1	Р	этопозид	[271]
	<i>ALDH1B1</i>	Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member B1	Р	циклофосфамид	[314]
Наличие мишеней для препаратов	<i>TOP2A</i>	DNA Topoisomerase II Alpha	Ч	антрациклины	[153]
	<i>TYMS</i>	Thymidylate Synthetase	Ч	5-фторурацил	[334]
	<i>Tubb3</i>	Tubulin Beta 3 Class III	Ч	таксаны	[162]
Остановка	<i>CDKN2D</i>	Cyclin Dependent Kinase	Р	цисплатин	[33]

клеточного цикла		Inhibitor 2D			
	<i>CCND1</i>	Cyclin D1	P	тамоксифен	[12, 273]
	<i>PIK3C3</i>	Phosphatidylinositol 3-Kinase Catalytic Subunit Type 3	P	тамоксифен	[37, 73]
	<i>AKT1</i>	AKT Serine/Threonine Kinase 1	P	цисплатин	[191]
	<i>PLK1</i>	Polo Like Kinase 1	P	герцептин, паклитаксел	[275, 290]
	<i>UBE2S</i>	Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 S	Ч	таксаны	[108]
Апоптоз	<i>TXN2</i>	Thioredoxin 2	Ч	тамоксифен	[151]
	<i>XPO1</i>	Exportin 1	P	доксорубицин, этопозид	[170]
	<i>mir-31</i>	MicroRNA 31	P	паклитаксел	[217, 286]
	<i>CASP3</i>	Caspase 3	Ч	цисплатин, доксорубицин, этопозид	[83]
	<i>BRI3BP</i>	BRI3 Binding Protein	P	этопозид	[337]
	<i>USP15</i>	Ubiquitin Specific Peptidase 15	Ч	паклитаксел	[336]
Репарация ДНК	<i>BRCA1</i>	BRCA1, DNA repair associated	Ч P	паклитаксел цисплатин, этопозид	[51]
	<i>USP11</i>	Ubiquitin Specific Peptidase 11	P	паклитаксел, доксорубицин, эпирубицин	[26, 190]

Примечание: P – резистентность к препаратам; Ч – чувствительность препаратам; \* – чувствительность при гиперэкспрессии гена.

Экспрессия генов, вовлеченных в ингибирование апоптоза чаще наблюдалась в альвеолярных и солидных структурах (Рисунок 27). В альвеолярных структурах также чаще гиперэкспрессировались гены клеточного цикла, а в трабекулярных структурах была снижена экспрессия SLC-транспортеров, ответственных за проникновение ксенобиотиков в клетки (Рисунок 27).

В целом, наибольшее число (70,4% (19/27)) генов химиорезистентности экспрессировалось в альвеолярных структурах, из них экспрессия 17 генов была повышена по сравнению с нормальными клетками молочной железы ( $p < 0.05$ ).

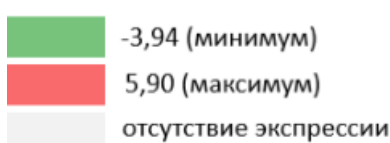
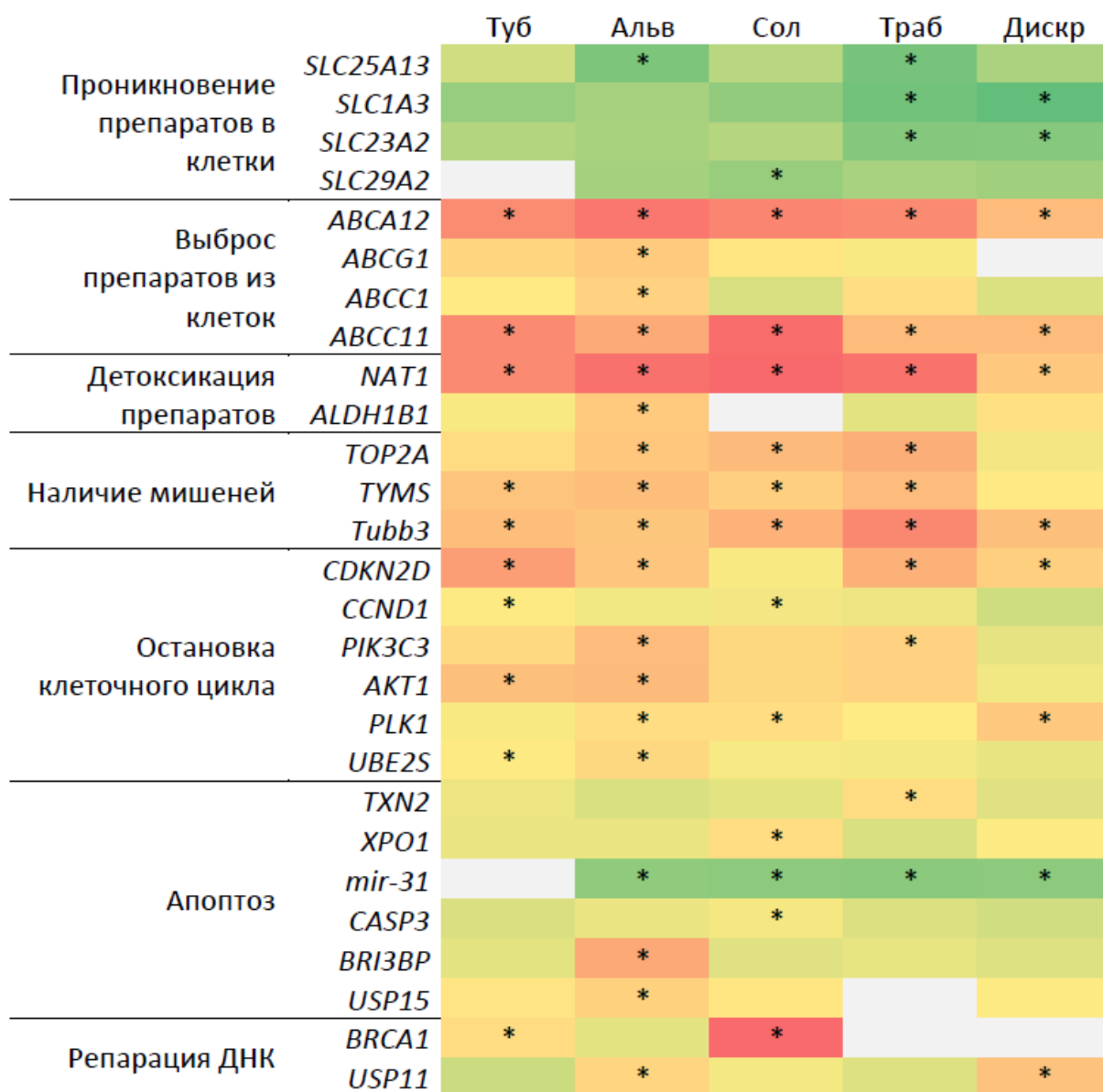


Рисунок 27 – Тепловая карта уровней экспрессии генов, связанных с лекарственной устойчивостью, в морфологических структурах РМЖ. Туб – тубулярные; Альв – альвеолярные; Сол – солидные; Траб – трабекулярные; Дискр – дискретные. \* –  $p < 0,05$  в сравнении с нормальными клетками молочной железы (t-критерий Стьюдента). Цвет ячеек пропорционален уровню экспрессии генов: от зелёного (низкий уровень) до красного (высокий уровень).

Для остальных структур было характерно практически одинаковое количество экспрессирующихся генов. Так, 13/27 (48,1%) генов значимо гипо- и гиперэкспрессировались в солидных и трабекулярных структурах и 10/27 (37,0%) генов – в тубулярных и дискретных вариантах опухолевых клеток (Рисунок 27). Различия в количестве экспрессирующихся генов были статистически значимыми между альвеолярными структурами, с одной стороны, и тубулярными и дискретными группами, с другой стороны ( $p=0,014$ ).

Функциональное аннотирование генов с уровнем экспрессии ( $\log_{2}FC$ )  $> 1,5$  или  $-1,5$  ( $p < 0,05$ ) в различных морфологических структурах также показал более выраженные признаки лекарственной резистентности в альвеолярных структурах. В частности, такие биологические процессы как “лекарственная резистентность клеток” и “химиорезистентность опухолевых линий” были статистически значимо выражены только в альвеолярных структурах ( $-\log_{10}(p) = 3,16$  и  $3,33$ ).

На основе данных, представленных в таблицах 21 и 22, был сформирован профиль лекарственной устойчивости и чувствительности для каждого варианта морфологических структур (Рисунок 27).

Для тубулярных структур была характерна статистически значимая гиперэкспрессия 10 генов, обуславливающих резистентность к 5-фторурацилу, этопозиду, цисплатину, тамоксифену и таксанам (таблица 21, Рисунки 27 и 28). Несмотря на это, данные структуры одновременно демонстрируют потенциальную чувствительность к 5-фторурацилу и таксанам. Помимо этого, тубулярные структуры могут быть чувствительными к антрациклам, циклофосфамиду и др. химиопрепаратам, поскольку значимой экспрессии соответствующих генов резистентности не было обнаружено (Рисунок 28).



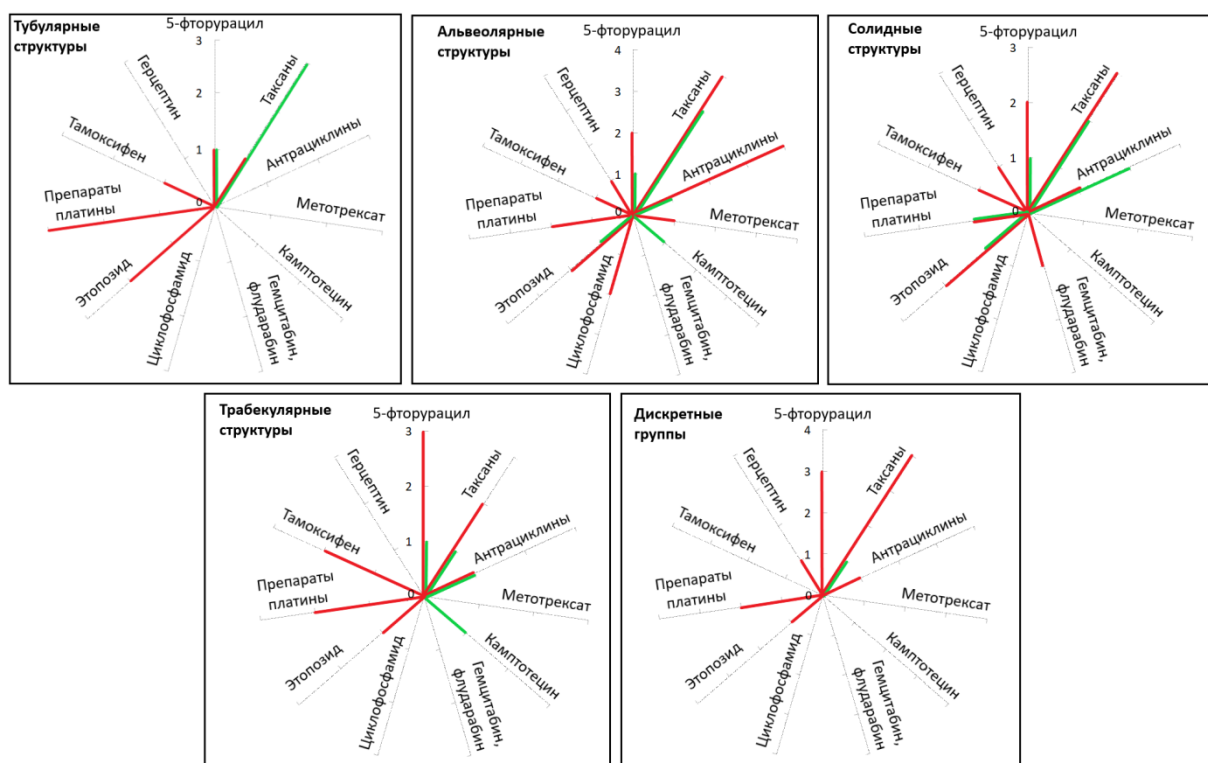


Рисунок 28 – Сравнительная химиорезистентность и химиочувствительность различных морфологических структур РМЖ на основе гипо- и гиперэкспрессирующих генов, указанных в таблице 21 и рисунке 27.

Альвеолярные структуры характеризовались статистически значимой гиперэкспрессией 17 генов и гипоэкспрессией 2 генов, которые ответственны за резистентность практически ко всем химиопрепаратам, используемым при лечении больных РМЖ (таблица 21, Рисунки 27 и 28). Например, гены *ABCC1*, *ABCG1*, *ABCC11* и *ABCA12* гиперэкспрессировались только в альвеолярных структурах. Данные ABC-транспортеры наряду с другими генами, характерными для альвеолярных структур (Рисунок 27), обуславливают резистентность к 5-фторурацилу, таксанам, антрациклинам, метотрексату, циклофосфамиду, этопозиду и препаратам платины (таблица 21, Рисунок 28). Тем не менее, альвеолярные структуры могут быть чувствительны к камптотецину вследствие гипоэкспрессии гена SLC-транспортера *SLC25A13* и, соответственно, невозможности переноса данного препарата в митохондрии с целью его метаболизма (таблица 21, Рисунки 27 и

28). Кроме того, тамоксифен может быть эффективен в плане воздействия на альвеолярные структуры, несмотря на гиперэкспрессию гена *PIK3C3*, кодирующего фосфатидилинозитол-3-киназу 3-го класса. Предыдущие исследования предположили вовлеченность *PIK3C3* в резистентность к тамоксифену и антрациклинам через активацию аутофагии [37, 73], однако дальнейшие работы необходимы для подтверждения данной закономерности. Также альвеолярные структуры могут быть чувствительны к гемцитабину и флударабину ввиду отсутствия соответствующего гена резистентности (*SLC29A2*).

В солидных структурах наблюдалась статистически значимая гиперэкспрессия 11 генов и гипоекспрессия 2 генов, вовлеченных, согласно литературным данным, в эффективность химиотерапии (Рисунки 27 и 28). Отличительной особенностью солидных структур является статистически значимая гиперэкспрессия генов *TYMS*, *Tubb3*, *BRCA1*, *TOP2A* и *CASP3* (Рисунок 27), которые ассоциированы с чувствительностью к широкому кругу химиопрепаратов: препаратам платины, таксанам, этопозиду, антрациклинам и 5-фторурацилу (таблица 21). Тем не менее, ко всем из этих препаратов солидные структуры одновременно демонстрируют устойчивость из-за гиперэкспрессии генов *ABCA12*, *ABCC11*, *NAT1*, *PLK1* и *XPO1* (таблица 21, Рисунки 27 и 28). Потенциально, солидные структуры могут быть чувствительными к циклофосфамиду и метотрексату ввиду отсутствия значимой гиперэкспрессии гена ABC-транспортера *ABCC1* (Рисунок 27), субстратом для которого являются данные препараты, и камптотецину из-за незначительной гипоекспрессии *SLC25A13* [226, 351].

Трабекулярные структуры характеризовались статистически значимой гиперэкспрессией 9 генов и гипоекспрессией 4 генов, ассоциированных с лекарственной устойчивостью (Рисунок 27). В отличие от других структур, трабекулярные варианты опухолевых клеток демонстрировали гипоекспрессию трёх из четырёх генов SLC-транспортеров: *SLC25A13*, *SLC23A2* и *SLC1A3*, которые ответственны за перенос в клетки камптотецина,

5-фторурацила и препаратов платины [145, 152, 167]. Ген тиреодоксина (TXN2), вовлеченный в устойчивость к тамоксифену [151], гиперэкспрессировался только в трабекулярных структурах (Рисунок 27). Кроме того, гены репарации ДНК либо не экспрессировались (например, ген *BRCA1*) в данных структурах, либо их экспрессия (например, ген *USP11*) не была статистически значимой по сравнению с нормальными клетками молочной железы (Рисунок 27). Эти экспрессионные характеристики позволяют заключить, что трабекулярные структуры потенциально устойчивы к широкому спектру химиопрепаратов (Рисунок 28). Однако, трабекулярные структуры могут быть чувствительными к камптотецину из-за гипоэкспрессии *SLC25A13*, а также к антрациклинам вследствие гиперэкспрессии гена топоизомеразы II- $\alpha$  (таблица 21, Рисунки 27 и 28). Тем не менее, резистентность данных структур к антрациклинам может развиваться через гиперэкспрессию гена *PIK3C3* (таблица 21, Рисунки 27 и 28), хотя его роль в формировании устойчивости к данным препаратам, как уже указывалось выше, требует подтверждения в других исследованиях. Помимо этого, трабекулярные структуры могут быть чувствительны к метотрексату, гемцитабину и флударабину, циклофосфамиду и герцептину из-за отсутствия значимой экспрессии соответствующих генов резистентности (Рисунок 28).

В дискретных группах опухолевых клеток обнаружена статистически значимая гиперэкспрессия 7 генов и гипоэкспрессия 3 генов, вовлеченных в эффективность химиотерапии (Рисунок 27). Отличительной особенностью данного типа морфологических структур была низкая экспрессия генов химиочувствительности (Рисунок 27). В частности, в дискретных группах была обнаружена гиперэкспрессия только гена *Tubb3*, являющегося маркером хорошего ответа на таксаны [162]. Тем не менее, резистентность к таксанам может формироваться у данного варианта опухолевых клеток вследствие гиперэкспрессии генов ABC-транспортера ABCA12, киназы PLK1 и убиквитин-специфической пептидазы USP11 (таблица 21, Рисунки 27 и 28).

Помимо этого, как было указано ранее, дискретные варианты опухолевых клеток демонстрируют значительную выраженность сигналинга фиброза тканей и гиперэкспрессию генов ЭМП (таблица 14, рисунок 20), которые согласно литературным данным ассоциированы с химиорезистентностью [63, 252]. Таким образом, выраженный химиорезистентный фенотип характерен для дискретных групп опухолевых клеток. Однако, отсутствие значимой экспрессии генов, связанных с устойчивостью к камптотецину, тамоксифену, циклофосфамиду, гемцитабину, флударабину и метотрексату (Рисунок 28), делает дискретные группы опухолевых клеток потенциально чувствительными к данным препаратам.

Важно отметить, что химиорезистентность и химиочувствительность различных морфологических структур РМЖ, демонстрируемая выше, имеет ряд недостатков. Во-первых, всё вышеуказанное касается только так называемой “первичной лекарственной резистентности”, представленной до воздействия терапии, поскольку пациенты с РМЖ, включенные в данное исследование, не получали НАХТ. Во-вторых, принимались во внимание при обсуждении сравнительной химиорезистентности и химиочувствительности морфологических структур только гены со статистически значимыми ( $p < 0,05$ ) различиями в экспрессии по сравнению с нормальными клетками молочной железы. Тем не менее, другие гены, ассоциированные по данным литературы с лекарственной устойчивостью, также экспрессировались в морфологических структурах, однако различия были незначимыми ( $p > 0,05$ ). И, в-третьих, роль некоторых генов, обсуждаемых выше, в модулировании ответа на химиотерапию спорна и требует проведения дальнейших исследований.

Таким образом, различные типы морфологических структур РМЖ отличаются друг от друга экспрессией генов лекарственной устойчивости и характеризуются индивидуальным профилем резистентности/чувствительности к тем или иным химиопрепаратам.

Наибольшая химиорезистентность характерна для альвеолярных структур, выраженная химиочувствительность – для тубулярных структур.

### 3.7.2 Морфологическое строение химиорезистентных опухолей молочной железы

Анализ опухолевой ткани пациентов с РМЖ, демонстрирующих наличие ответа на НАХТ, в частности, частичную регрессию, или его отсутствие (стабилизация и прогрессия), показал различия в представленности морфологических структур. Альвеолярные и трабекулярные структуры чаще обнаруживались в операционном материале пациенток с низкой эффективностью НАХТ по сравнению с больными, для которых был характерен объективный ответ на химиотерапию (59,6% против 46,1%,  $p=0,012$ ; 71,5% против 53,9%,  $p=0,001$ , соответственно, Рисунок 29). Эти результаты согласуются с исследованием, проведенным ранее на меньшей группе больных РМЖ [8].

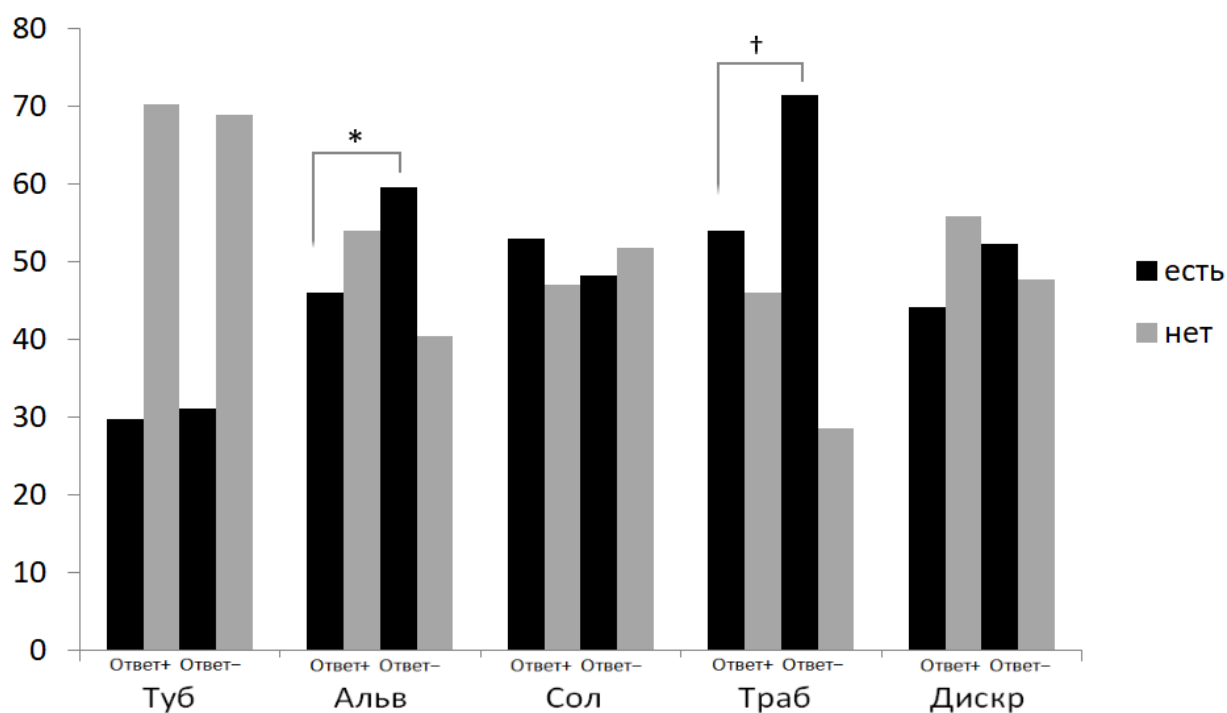


Рисунок 29 – Частота встречаемости различных морфологических структур в опухолевой ткани больных РМЖ с наличием и отсутствием ответа на НАХТ. Ответ+ – частичная регрессия. Ответ– – стабилизация и

прогрессирование заболевания. Есть – наличие структур. Нет – отсутствие структур. \* –  $p=0,012$ ; † –  $p=0,001$ .

Интересно, что частота встречаемости различных морфологических структур у больных РМЖ с наличием и отсутствием ответа на НАХТ зависит от состояния репродуктивной функции (Рисунок 30).

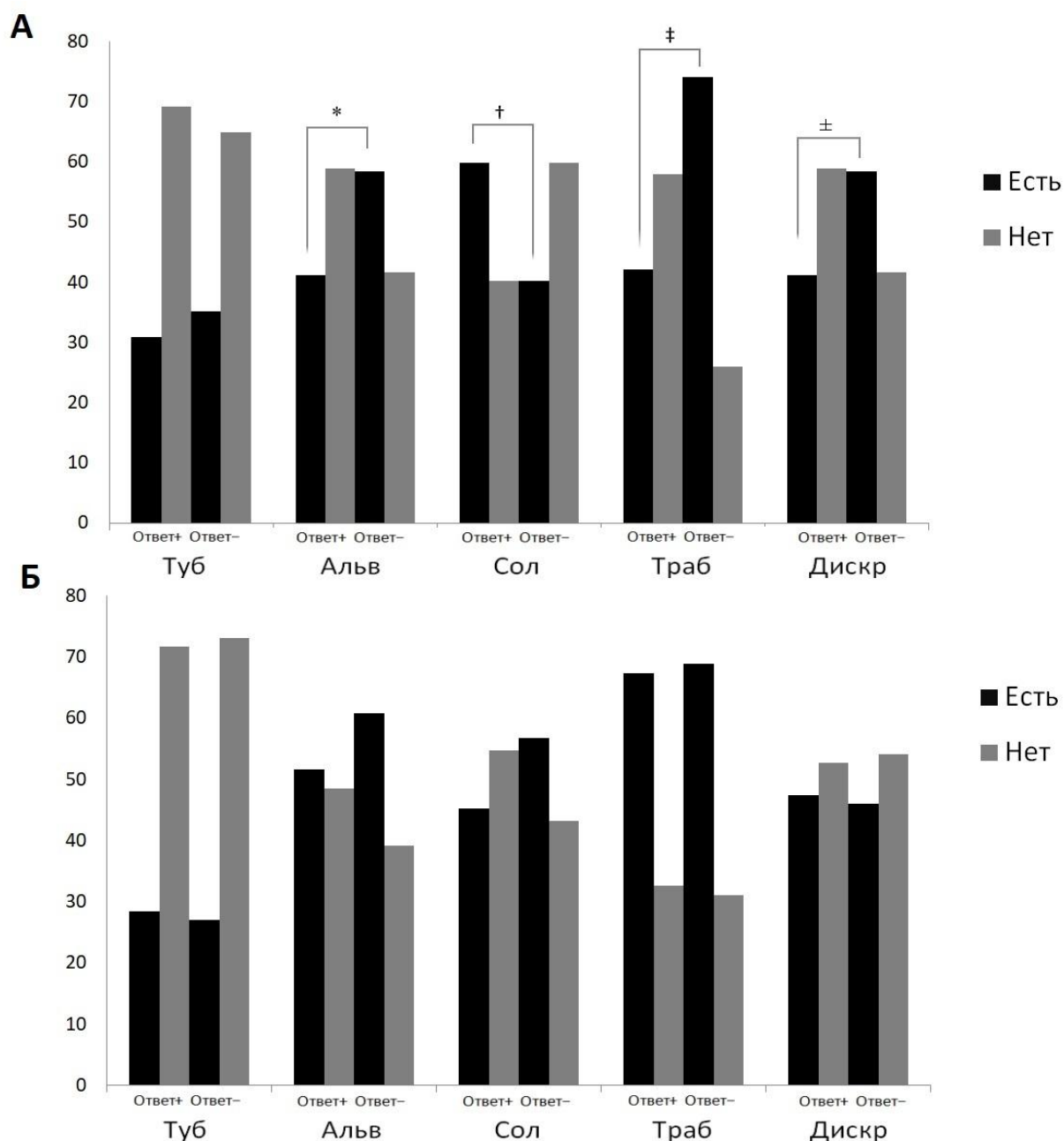


Рисунок 30 – Частота встречаемости различных морфологических структур в опухолевой ткани больных РМЖ с наличием и отсутствием ответа

на НАХТ. А, пациенты с сохраненной менструальной функцией; Б, пациенты в состоянии менопаузы. Ответ+ – частичная регрессия. Ответ– – стабилизация и прогрессирование заболевания. Есть – наличие структур. Нет – отсутствие структур. \* –  $p=0,020$ ; † –  $p=0,009$ ; ‡ –  $p<0,0001$ ; ± –  $p=0,020$ .

Альвеолярные, трабекулярные структуры и дискретные варианты опухолевых клеток встречались чаще при отсутствии ответа на НАХТ только у пременопаузальных пациенток: 58,4% против 41,1%,  $p=0,020$ ; 74,0% против 42,1%,  $p<0,0001$ ; 58,4% против 41,1%,  $p=0,020$ , соответственно (Рисунок 30А). Напротив, частота солидных структур была значимо выше при наличии объективного ответа на НАХТ у пациенток с сохраненной менструальной функцией (59,8% против 40,3%,  $p=0,009$ ; Рисунок 30А).

Анализ выраженности ВОМГ у больных РМЖ с различной эффективностью НАХТ в зависимости от схемы химиотерапии показал большую частоту трабекулярных структур в случаях с отсутствием ответа на НАХТ по схеме FAC ( $p=0,046$ ; таблица 22). Альвеолярные структуры чаще встречались в химиорезистентных случаях, получавших таксаны ( $p=0,016$ ; таблица 23); однако количество пациентов в сравниваемых группах было мало.

Таблица 22 – Частота встречаемости трабекулярных структур в опухолевой ткани больных РМЖ с наличием и отсутствием ответа в зависимости от схемы НАХТ

	Трабекулярные структуры	СМХ/СМФ	САХ	FAC	Таксаны
Ответ+	есть	77,9 (60/77)	37,5 (15/40)	40,3 (27/67)	38,9 (7/18)
	нет	22,1 (17/77)	62,5 (25/40)	59,7 (40/67)	61,1 (11/18)
Ответ–	есть	86,7 (65/75)	40,0 (6/15)	58,9 (30/51)	70,0 (7/10)
	нет	13,3 (10/75)	60,0 (9/15)	41,2 (21/51)	30,0 (3/10)
Уровень p		0,158	1,000	0,046	0,236
Примечание: Ответ+ – частичная регрессия. Ответ– – стабилизация и прогрессирование. СМХ – циклофосфан, метотрексат, капецитабин; СМФ – циклофосфан, метотрексат, 5-фторурацил; FAC – 5-фторурацил, доксорубин, циклофосфан; САХ – циклофосфан, доксорубин, капецитабин					

Таблица 23 – Частота встречаемости трабекулярных структур в опухолевой ткани больных РМЖ с наличием и отсутствием ответа в зависимости от схемы НАХТ

	Альвеолярные структуры	СМХ/СМФ	САХ	FAC	Таксаны
Ответ+	есть	51,9 (40/77)	37,5 (15/40)	46,3 (31/67)	38,9 (7/18)
	нет	48,1 (37/77)	62,5 (25/40)	53,7 (36/67)	61,1 (11/18)
Ответ–	есть	62,7 (47/75)	40,0 (6/15)	54,9 (28/51)	90,0 (9/10)
	нет	37,3 (28/75)	60,0 (9/15)	45,1 (23/51)	10,0 (1/10)
Уровень p		0,182	1,000	0,353	0,016
Примечание: Ответ+ – частичная регрессия. Ответ– – стабилизация и прогрессирование. СМХ – циклофосфан, метотрексат, капецитабин; СМФ – циклофосфан, метотрексат, 5-фторурацил; FAC – 5-фторурацил, доксорубин, циклофосфан; САХ – циклофосфан, доксорубин, капецитабин					

В целом, у больных РМЖ с отсутствием ответа на НАХТ опухолевая ткань содержала больше разных типов морфологических структур, чем у пациентов, чувствительных к химиотерапии ( $p=0,033$ ; Рисунок 31).

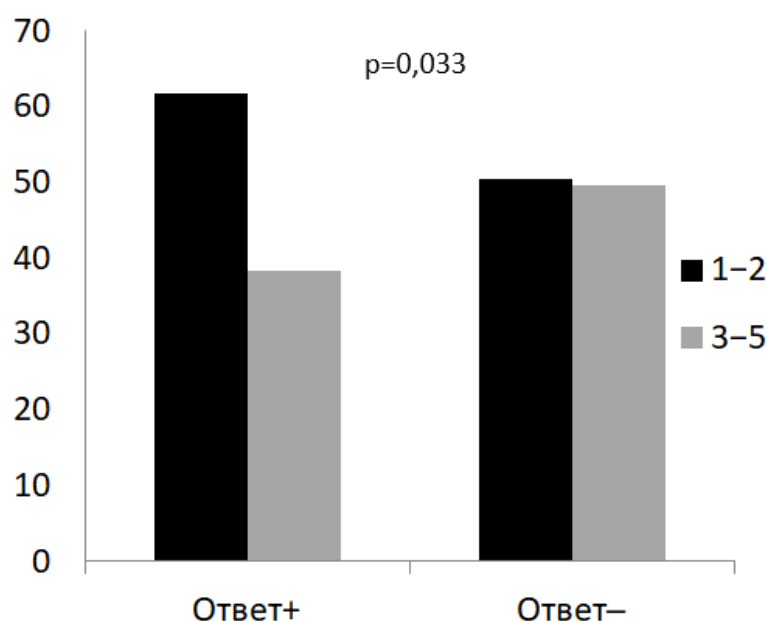


Рисунок 31 – Количество типов морфологических структур у больных РМЖ с наличием и отсутствием ответа на НАХТ. Ответ+ – частичная регрессия. Ответ– – стабилизация и прогрессирование заболевания.



Таким образом, полученные результаты говорят о связи между ВОМГ и химиорезистентностью РМЖ, которая справедлива только для пациенток с сохраненной репродуктивной функцией. Так, при отсутствии ответа на НАХТ в опухолях преобладают альвеолярные, трабекулярные и дискретные варианты формирований опухолевых клеток. Потенциальная связь низкой эффективности НАХТ с наличием этих структур подтверждается данными о наибольшей активности в них генов химиорезистентности (раздел 3.7.1). Ассоциация между лекарственной устойчивостью и более выраженной ВОМГ может объясняться увеличением доли химиорезистентных структур (альвеолярных, трабекулярных и дискретных) в общем объеме морфологических вариантов опухолевых клеток. Напротив, у больных, чувствительных к НАХТ, инфильтративный компонент опухоли преимущественно представлен солидными структурами. Такая химиочувствительность может быть связана с большим количеством в солидных структурах гиперэкспрессирующихся генов, кодирующих мишени для широкого круга химиопрепаратов (гены *TYMS*, *Tubb3*, *BRCA1*, *TOP2A*) и модулирующих лекарственно-индуцированный апоптоз (*CASP3*).

### 3.8 Внутритропухолевая морфологическая гетерогенность как модель для идентификации маркёров метастазирования РМЖ

#### 3.8.1 Поиск маркеров инвазии РМЖ

Отсутствие высокоэффективных маркеров, на основании которых можно было бы определять инвазивный и метастатический потенциал опухолевых клеток, является важнейшей проблемой в современной онкологии. Несмотря на обилие исследований в этой области [110], предложенные маркеры не валидированы и, как следствие, малоэффективны.

В настоящем исследовании мы провели детальный анализ транскриптома солидных и трабекулярных структур, для которых показана значимая выраженность сигнальных путей клеточной миграции и инвазии, с целью отбора генов, вовлеченных в клеточную подвижность. Дискретные

группы опухолевых клеток были исключены из исследования как ввиду их гетерогенной природы. Кроме того, в дискретных группах обнаружен наименьший процент гиперэкспрессирующихся генов комплекса Scar/WAVE, индуцирующего активность Arp2/3 и полимеризацию актина [55]. Вероятно, миграция опухолевых клеток в составе дискретных групп реализуется с помощью других механизмов, которые обсуждались выше (раздел 3.6.2).

Отбор генов, которые могли представлять потенциальный интерес как маркеры инвазии РМЖ, проводился на основании следующих критериев:

1. Дифференциальная экспрессия ( $p < 0,05$ ) генов в солидных и трабекулярных структурах по сравнению с тубулярными и альвеолярными структурами;

2. Связь дифференциально-экспрессирующихся генов с механизмами клеточной подвижности по данным литературы: ЭМП, ремоделирование цитоскелета, изменение клеточной адгезии и продукция матриксных протеаз;

3. Гетерогенная или избирательная экспрессия белков, кодирующихся дифференциально-экспрессирующимися генами, в пределах солидных и/или трабекулярных структур согласно базе данных The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>).

С учётом вышеуказанных критериев было отобрано 8 генов: *HAX1*, *PIP5K1B*, *WASF2*, *EZR*, *KIF14*, *ZMIZ1*, *DSC3* и *SPATA18* (Таблица 24).

*HAX1* взаимодействует с белками клеточной адгезии и актинового цитоскелета, включая кортактин, HS1,  $\alpha 13$  и  $\beta 6$  интегрин [62], и регулирует сборку комплекса Arp2/3 и реорганизацию цитоскелета кортикального актина посредством взаимодействия с KCNC3 и Arp2/3 [353]. *HAX1* участвует в коллективной инвазии и вовлечен в модулирование актомиозиновой сократимости через RhoA и септин-ассоциированный сигналинг [39]. Подавление активности *HAX1* с помощью малых интерферирующих РНК (siRNAs) замедляет  $\alpha \beta 6$ -ассоциированную

миграцию клеток карциномы ротовой полости [264] и злокачественно трансформированных клеток NIH3T3 [262].

Фосфатидилинозитол 4-фосфат 5-киназа 1-го типа (PIP5K1B) является членом семейства изоферментов, продуцирующих фосфатидилинозитол 4, 5-дисфосфат (PIP2). Белки семейства PIP5K1 вовлечены в широкий спектр клеточных процессов, не только как ферменты, ответственные за образование PIP2, который является ключевым регулятором клеточной адгезии, динамики актина и мембранного транспорта, но и как компоненты сигналинга, лежащего в основе сборки цитоскелета, экзо- и эндоцитоза, апоптоза и т.д. [354].

Таблица 24 – Гены, дифференциально-экспрессирующиеся в солидных и трабекулярных структурах, как потенциальные маркеры опухолевой инвазии

Структуры	Уровень экспрессии *	Гены	Роль в клеточной миграции	Белковая экспрессия †
Солидные	1,42	<i>HAX1</i>	Ремоделирование актинового цитоскелета	Гетерогенная в пределах опухолевой ткани
	1,42	<i>WASF2</i> (WAVE2)		
	-1,89	<i>PIP5K1B</i>		Отсутствие экспрессии в солидных структурах, наличие экспрессии на концах трабекулярных структур
Трабекулярные	-2,04	<i>ZMIZ1</i>	Подавление экспрессии <i>ZMIZ1</i> приводит к снижению миграции опухолевых клеток	Гетерогенная в пределах опухолевой ткани
	-4,08	<i>DSC3</i>	Компонент десмосом. Экспрессия <i>DSC3</i> ингибирует миграцию и инвазию опухолевых клеток	Экспрессия на краях протрузий солидных структур
Солидные, трабекулярные	3,87; 3,42	<i>KIF14</i>	Кинезин. Регуляция интегринов на поверхности клеток, адгезии и	

			распластывания клеток (от англ. spreading)	
	-2,71; -3,02	<i>SPATA18</i> (MIEAP)	Регуляция функционального статуса митохондрий в ходе ЭМП	
	1,99; 1,91	<i>EZR</i>	Ремоделирование актинового цитоскелета	Отсутствие экспрессии на краях протрузий солидных структур
Примечание: * – по сравнению с нормальными клетками молочной железы; † – экспрессия оценена по микрофотографиям, представленным в базе данных The Human Protein Atlas ( <a href="https://www.proteinatlas.org/">https://www.proteinatlas.org/</a> )				

Так, например, в процессе миграции белки PIP5K1 аккумулируются в ведущем крае клеток и участвуют в реорганизации актиновых микрофиламентов посредством активации малой ГТФазы Rac1 и белка N-WASP [168, 256].

WASF2 (WAVE2) – член семейства белков WAVE, обеспечивающих нуклеацию и необходимых для формирования ламеллиподий через активацию комплекса Arp2/3 и ветвление актина. Тем самым белки WAVE регулируют клеточную, главным образом направленную миграцию [224]. Коэкспрессия белков WAVE2 и Arp2 в опухолевой ткани ассоциирована с агрессивностью течения инвазивного карциномы молочной железы и низкой выживаемостью больных [148, 265].

Эзрин (EZR) – член семейства белков ERM (от англ. ezrin-radixin-moesin), которые связывают клеточную мембрану с актиновым цитоскелетом. Посредством этого, белки ERM регулируют выживаемость, адгезию, миграцию и инвазию клеток, в т.ч. при опухолевом росте. Во многих исследованиях показано, что высокая экспрессия эзрина способствует миграции, инвазии опухолевых клеток и метастазированию различных злокачественных новообразований [64, 113, 182, 344].

KIF14 является членом суперсемейства кинезинов, вовлеченных во внутриклеточный транспорт [198, 215]. Изначально KIF14 был описан как белок, участвующий в цитокинезе [124]. Последующие работы

охарактеризовали KIF14 как онкоген, показав его гиперэкспрессию в различных злокачественных опухолях и её ассоциацию с неблагоприятным прогнозом [68, 237, 323, 333, 341]. При РМЖ гиперэкспрессия KIF14 связана с высокой степенью злокачественности и плохой общей выживаемостью больных [74, 183]. Делеция гена *KIF14* подавляет миграцию и инвазию клеток РМЖ в условиях *in vitro* [24].

Ген *ZMIZ1* кодирует белок, содержащий в своем составе мотив по типу цинкового пальца, который регулирует активность различных транскрипционных факторов. Роль белка *ZMIZ1* в клеточных процессах охарактеризована слабо. Известно, что *ZMIZ1* участвует в регуляции функционирования андрогеновых рецепторов [284] и индуцирует экспрессию генов Notch-сигналинга, которые вовлечены в стимуляцию пролиферации пре-Т-клеток при нормальном и стрессовом тимопоэзе [321]. Эксперименты *in vitro* и *in vivo* характеризуют *ZMIZ1* как ключевой регулятор пролиферации [116] и миграции опухолевых клетках [212]. Доступные на сегодняшний момент данные свидетельствуют о значительной связи высокой экспрессии *ZMIZ1* с плохой выживаемостью больных различными злокачественными новообразованиями, в т.ч. РМЖ [86].

Ген *DSC3* кодирует белок десмоколлин 3, являющийся компонентом межклеточных контактов – десмосом. Экспрессия *DSC3* приводит к ингибированию пролиферации, остановке клеточного цикла и запуску апоптоза в клетках колоректального рака на модели *in vitro* [76] и ассоциирована лимфогенным метастазированием и общей выживаемостью при РМЖ *in silico* [219].

Ген *SPATA18* кодирует p53-индуцибельный белок MIEAP, который является ключевым регулятором жизнеспособности митохондрий, индуцируя их репарацию или деградацию в ответ на различные повреждения [165]. Повреждение митохондрий может приводить к активации ЭМП в опухолевых клетках и приобретению ими локомоторного и инвазивного фенотипа [127]. Нарушение MIEAP сигналинга и регуляции

функционирования митохондрий связано с плохой безрецидивной выживаемостью, тогда как высокая экспрессия MIEAP ассоциирована с высокими показателями безрецидивной выживаемости при РМЖ [105, 107].

Согласно базе данных The Human Protein Atlas белки HAX1, WAVE2 (WASF2) и ZMIZ1 гетерогенно экспрессируются в пределах опухолевой ткани, для KIF14, PIP5K1B, DSC3 и MIEAP характерна экспрессия на краях протрузий солидных и концах трабекулярных структур, а экспрессия EZR отсутствует в протрузиях солидных структур (Рисунок 32).

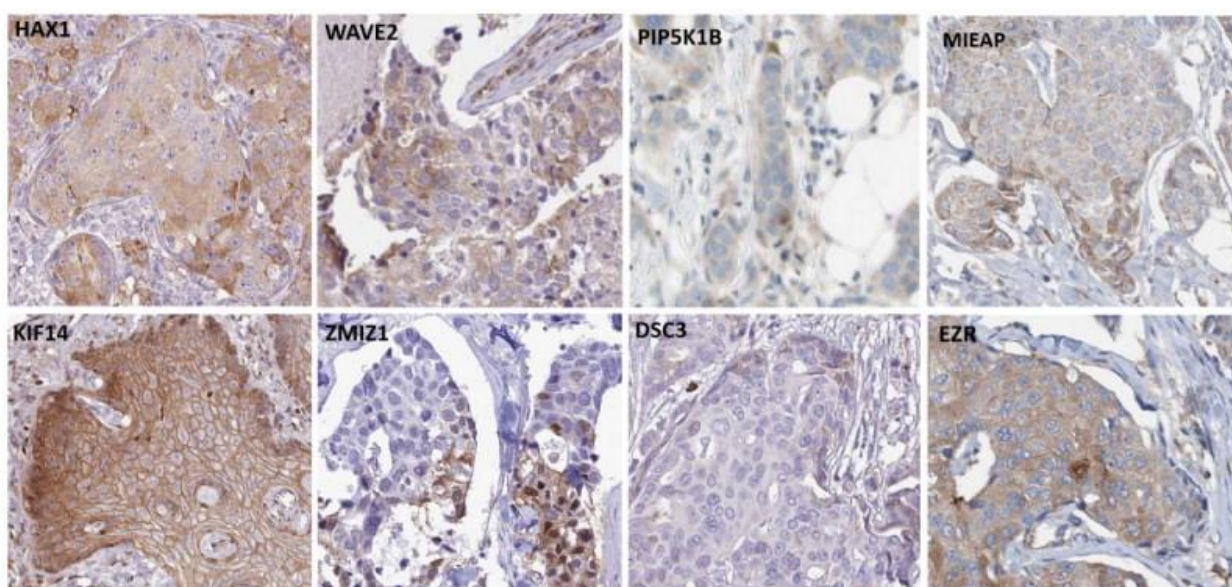


Рисунок 32 – Экспрессия белков HAX1, WAVE2, PIP5K1B, MIEAP, KIF14, ZMIZ1, DSC3 и EZR в инвазивной карциноме молочной железы. Микрофотографии взяты из базы The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>).

### 3.8.2 Ассоциация экспрессии KIF14, MIEAP и EZR с гематогенным метастазированием РМЖ

Для подтверждения вовлеченности белков HAX1, WAVE2, PIP5K1B, EZR, KIF14, ZMIZ1, DSC3 и MIEAP в инвазивный рост и прогрессию РМЖ, была изучена ассоциация их экспрессии с частотой отдаленного метастазирования и безметастатической выживаемостью. Не было

обнаружено ассоциации гематогенного метастазирования РМЖ с экспрессией указанных белков как в опухолевой ткани в целом, так и в морфологических (тубулярных, альвеолярных, солидных, трабекулярных) структурах и дискретных группах опухолевых клеток. Однако замечена гетерогенная экспрессия KIF14, MIEAP и EZR в формированиях опухолевых клеток, напоминающих по форме “торпеды/ракеты”.

Торпедоподобные структуры представляют собой образования вытянутой, преимущественно треугольной формы, состоящие из двух-трех параллельных рядов опухолевых клеток, и имеют широкое основание и заостренную вершину, насчитывающую до трёх клеток (Рисунок 33). По данным настоящего исследования торпедоподобные структуры встречаются в 54,7% опухолей молочной железы. Происхождение данных структур является предметом дальнейших исследований. Вероятно, они образуются от солидных структур с торпедоподобными выростами (протрузиями) и наряду с ними, а также трабекулярными структурами, являются проявлениями коллективной инвазии опухолевых клеток.

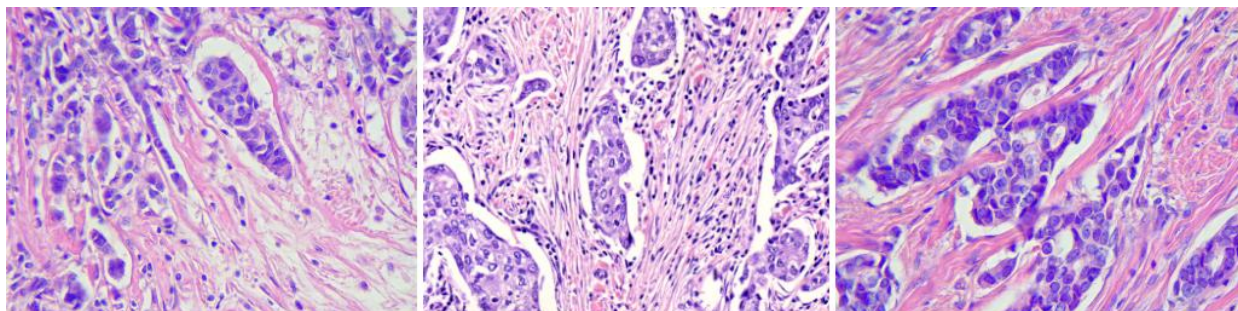


Рисунок 33 – Торпедоподобные структуры опухолевых клеток в инвазивной карциноме молочной железы неспецифического типа. Увеличение 200х.

Оказалось, что у пациентов с позитивной экспрессией KIF14 и MIEAP и негативной экспрессией EZR на концах торпедоподобных структур чаще наблюдались гематогенные метастазы, чем у больных с отсутствием KIF14 и MIEAP и наличием EZR в данных структурах (66,7% против 14,3%,  $p=0,005$ ;

70,0% против 12,5%,  $p=0,001$ ; 73,7% против 13,3%,  $p=0,001$ ; таблица 25). Важно, что само по себе наличие торпедоподобных структур не было связано с гематогенным метастазированием РМЖ. В частности, метастазы обнаруживались в 43,8% (20/46) пациентов с торпедоподобными структурами и 50,0% (19/38) случаев без них ( $p = 0,55$ ). Частота отдаленного метастазирования также не была связана с экспрессией KIF14, MIEAP и EZR в других морфологических структурах: тубулярных, альвеолярных, солидных, трабекулярных и дискретных группах опухолевых клеток. Кроме того, экспрессия данных белков не была ассоциирована с молекулярным подтипом РМЖ, размером опухоли, степенью злокачественности, частотой лимфогенного метастазирования и рецидивирования.

Таблица 25 – Частота гематогенного метастазирования у больных РМЖ с экспрессией белков KIF14, MIEAP и EZR на концах торпедоподобных структур

Метастазы	Ядерная экспрессия KIF14 на концах опухолевых структур по типу “ракет”		Цитоплазматическая экспрессия MIEAP на концах опухолевых структур по типу “ракет”		Цитоплазматическая экспрессия EZR на концах опухолевых структур по типу “ракет”	
	Есть	Нет	Есть	Нет	Есть	Нет
Нет	7 (33,3)	12 (85,7)	6 (30,0)	14 (87,5)	13 (86,6)	5 (26,3)
Есть	14 (66,7)	2 (14,3)*	14 (70,0)†	2 (12,5)	2 (13,3)	14 (73,7)‡
RR (95% CI)	4,667 (1,351-28,053)		5,600 (1,605-33,420)		5,526 (1,616-32,469)	
Примечание: * – $p=0,003$ ; † – $p=0,001$ ; ‡ – $p=0,001$ (критерий Фишера); RR – относительный риск; CI – доверительный интервал.						

Безметастатическая выживаемость была хуже у больных РМЖ с экспрессией на концах торпедоподобных структур белков KIF14 (HR (95% CI) 6,63 (1,50-29,29),  $p=0,013$ ), MIEAP (HR (95% CI) 8,09 (1,83-35,75),



$p=0,006$ ) и потерей EZR (HR (95% CI) 7,65 (1,72-33,93),  $p=0,007$ ) (Рисунок 34).

Таким образом, идентифицировано три белка, KIF14, MIEAP (SPATA18) и EZR, дифференциально экспрессирующихся между солидными и/или трабекулярными структурами и другими морфологическими вариантами опухолевых клеток, гетерогенная экспрессия которых в торпедоподобных структурах ассоциирована с гематогенным метастазированием РМЖ.

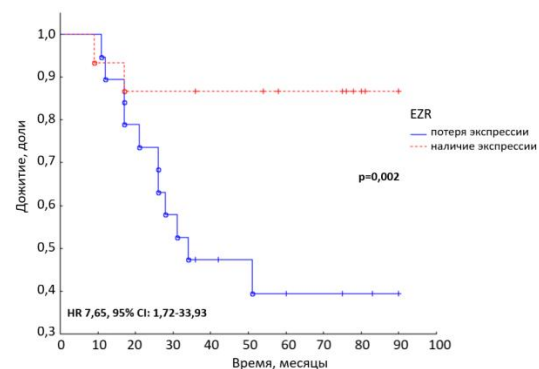
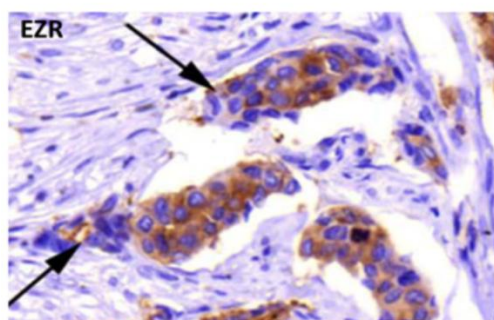
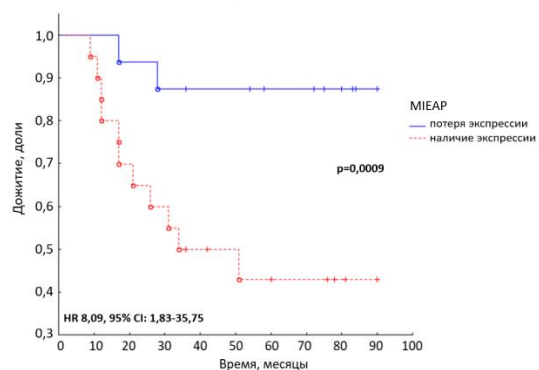
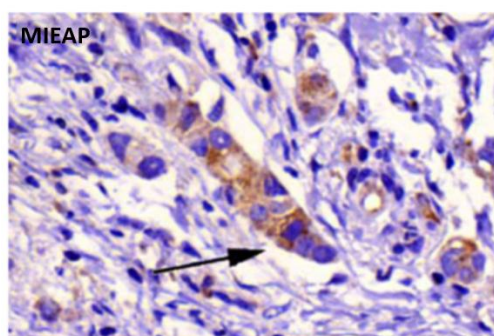
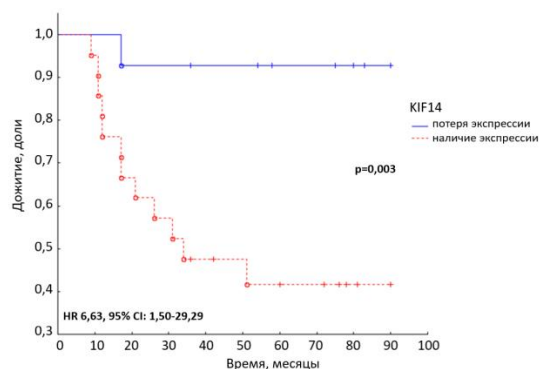
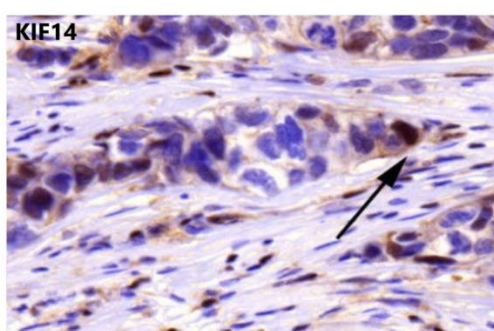


Рисунок 34 – Безметастатическая выживаемость больных РМЖ в зависимости от наличия ядерной экспрессии белка KIF14 и цитоплазматической экспрессии белков MIEAP и потери EZR на концах торпедоподобных структур. Стрелками обозначены концы торпедоподобных структур с наличием KIF14 и MIEAP и потерей EZR. Увеличение 400х.

### 3.8.3 Коэкспрессия KIF14, MIEAP и EZR в торпедоподобных структурах РМЖ

Одновременная экспрессия всех трёх белков в торпедоподобных структурах наблюдалась в более чем половине случаев рака молочной железы с метастазами: 57,9% (11/19) (таблица 26).

Таблица 26 – Сочетание экспрессии KIF14, MIEAP и EZR на концах торпедоподобных структур у больных РМЖ

Пациенты	KIF14	MIEAP	EZR
1	Нет	Нет	Нет
2	Да	Да	Да
3	Да	Да	Да
4	Нет	Да	Да
5	Нет	Нет	Нет
6	Да	Да	Нет
7	Да	Да	Нет данных
8	Да	Да	Да
9	Да	Да	Да
10	Да	Да	Да
11	Да	Да	Да
12	Нет данных	Нет данных	Да
13	Да	Да	Да
14	Да	Да	Да
15	Да	Да	Да
16	Да	Нет данных	Нет данных
17	Да	Да	Да
18	Нет данных	Нет	Да
19	Да	Да	Да

Примечание: зелёный цвет означает одновременную экспрессию всех трёх белков, голубой цвет – любых двух белков.

С использованием многоцветного флюоресцентного окрашивания показано, что экспрессия KIF14 и MIEAP и потеря EZR наблюдается как в одних и тех же, так и в разных клетках торпедоподобных структур (Рисунок 35).

### 3.8.4 Транскрипционные особенности KIF14- и MIEAP-позитивных клеток и EZR-негативных клеток РМЖ

С использованием ИГХ окрашивания, модифицированного с целью сохранения РНК в клетках, лазерной микродиссекции в режиме флюоресценции и массового параллельного секвенирования, были изучены транскрипционные особенности KIF14- и MIEAP-позитивных клеток, а также EZR-негативных клеток, расположенных на концах торпедоподобных структур.

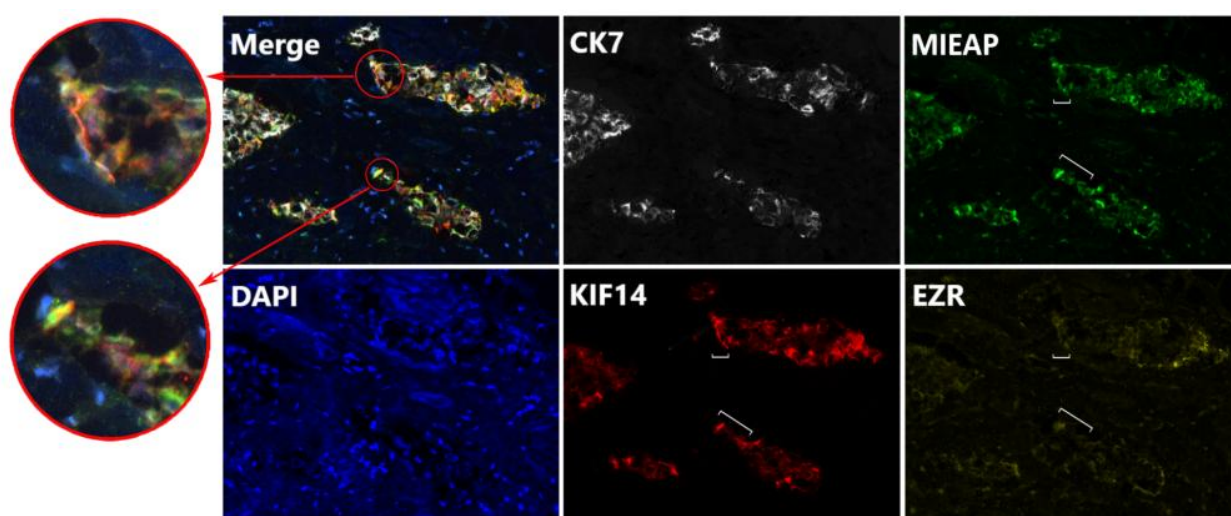


Рисунок 35 – Коэкспрессия белков KIF14 и MIEAP и потеря белка EZR в опухолевых клетках, находящихся на концах торпедоподобных структур. Квадратными скобками обозначены концы структур.

Для KIF14-позитивных клеток была характерна статистически значимая ( $p < 0,05$ ) гиперэкспрессия 105 и гипоекспрессия 155 генов (Рисунок 36; Приложение 4, таблица 1). Среди генов с наибольшим уровнем экспрессии обнаружены *NHS*, *CNOT2-DT* и *THBS4* (Рисунок 37A). NHS (NHS Actin Remodeling Regulator) является регулятором ремоделирования актинового цитоскелета и морфологии клеток. Данный белок локализуется в местах межклеточных контактов, на лидирующем крае ламеллиподий и в области фокальных адгезий и имеет WAVE-подобный домен, который взаимодействует с белками семейства Abi, белком гемопоэза

стволовых/прогениторных клеток HSPC300, а также с белками Nap1 и Sra1. Нокдаун NHS приводит к разрушению актинового цитоскелета [53]. Ген *CNOT2-DT* кодирует длинную некодирующую РНК PRANCR, которая контролирует экспрессию 1135 генов, большая часть из которых, в т.ч. *CDKN1A* (p21), ответственна за клеточный цикл и пролиферацию [58]. Тромбоспондин 4 (THBS4) является адгезивным гликопротеином, который вовлечен во взаимодействие клеток друг с другом и с внеклеточным матриксом и обладает проангиогенной активностью в ответ на экспрессию TGF- $\beta$  [291]. На мышинной модели РМЖ показано, что THBS4 модулирует воспаление и рост опухоли в ответ на гипергликемию и TGF- $\beta$  через увеличение инфильтрации опухоль-ассоциированных макрофагов и продукцию воспалительных факторов [227].

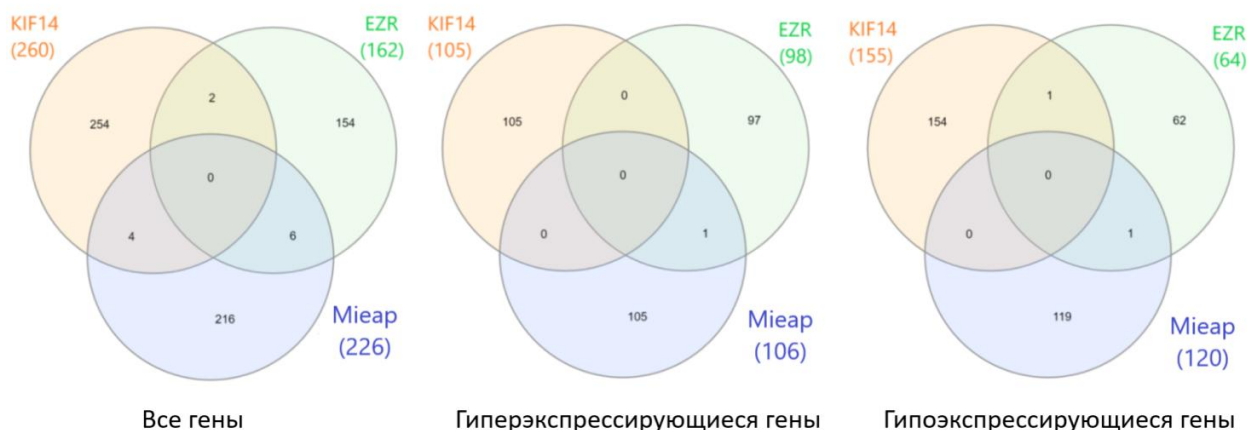


Рисунок 36 – Количество дифференциально-экспрессирующихся генов ( $p < 0,05$ ) в KIF14- и MIEAP-позитивных и EZR-негативных клетках, расположенных на концах торпедоподобных структур. С помощью диаграмм Венна показано количество специфических и общих генов между исследуемыми типами опухолевых клеток.

Среди гипоэкспрессирующихся генов наименьший уровень экспрессии был характерен для гена *SLITRK6*, кодирующего интегральный мембранный белок с высокой степенью родства к нейротрофиновым (Trk) рецепторам (Рисунок 37А). Функциональное аннотирование гиперэкспрессирующихся

генов ( $p < 0,05$ ) показало выраженность метаболизма эфирных липидов (Рисунок 37Б) и организацию коллагеновых волокон (Рисунок 37В), тогда как гипозэкспрессирующиеся транскрипты были в основном ассоциированы с сигнальными путями, опосредованными через рецепторы к конечным продуктам гликирования (AGE/RAGE) и Т-клеточным рецепторам (Рисунок 37Б), а также с регуляцией локализации клеточных белков и различными метаболическими процессами (Рисунок 37В).

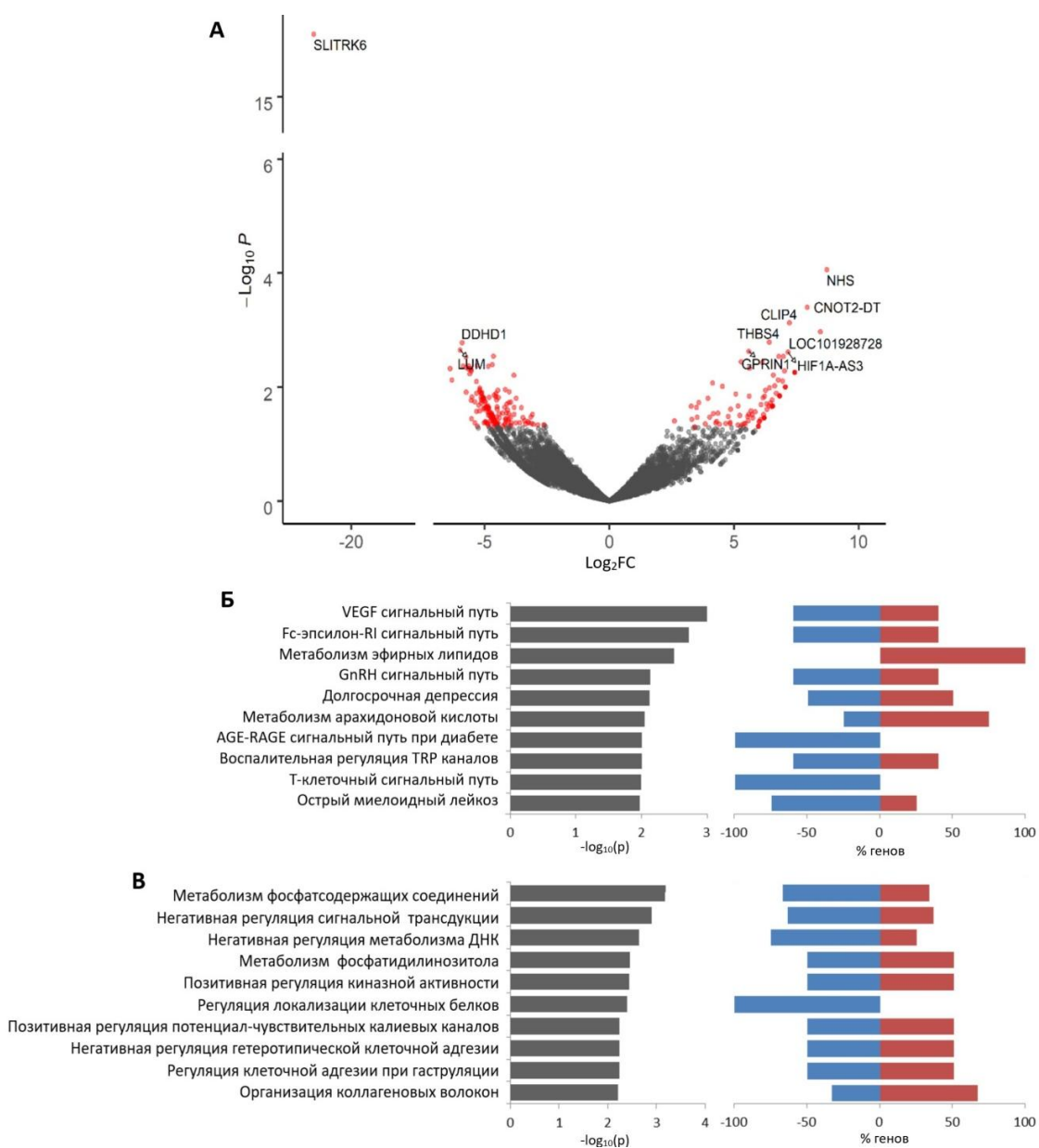


Рисунок 37 – Дифференциально-экспрессирующиеся гены в KIF14-положительных клетках по сравнению с KIF14-негативными клетками, расположенными на концах торпедоподобных структур, и их

принадлежность к сигнальным путям и биологическим процессам. (А) Вулканоплот, демонстрирующий ТОП 10 дифференциально-экспрессирующихся генов. (Б, В) Функциональное аннотирование дифференциально-экспрессирующихся генов ( $p < 0,05$ ). Слева показаны сигнальные пути (Б) и биологические процессы (В) и статистическая значимость их выраженности в KIF14-позитивных клетках, справа – процент гипо- (синий цвет) и гиперэкспрессирующихся (красный цвет) генов, входящих в KEGG пути и GO процессы.

Для MIEAP-позитивных клеток была характерна статистически значимая ( $p < 0,05$ ) гиперэкспрессия 106 и гипозэкспрессия 120 генов по сравнению с MIEAP-негативными клетками (Рисунок 36; Приложение 4, таблица 2). Среди генов с наибольшим уровнем экспрессии можно выделить *CCDC18* (Coiled-Coil Domain Containing 18) и *SAMD9* (Sterile Alpha Motif Domain Containing 9) (Рисунок 38А). Функция белка *CCDC18* не известна, предполагается, что он обладает способностью специфически связываться с ДНК, выступая в качестве транскрипционного фактора. Белок *SAMD9* регулирует пролиферацию как нормальных, так и опухолевых клеток. Его гиперэкспрессия подавляет пролиферацию и инвазию клеток немелкоклеточного рака лёгкого и увеличивает их туморогенность *in vivo* [202]. На модели глиомы низкой степени злокачественности показано, что экспрессия *SAMD9* увеличивает инфильтрацию M2 макрофагов и является независимым прогностическим фактором [203].

Среди гипозэкспрессирующихся генов наименьший уровень экспрессии был характерен для *FOSB* (FosB Proto-Oncogene), *GPR153* (G Protein-Coupled Receptor 153) и *MYH4* (Myosin Heavy Chain 4) (Рисунок 38А). Из них наибольший интерес представляет *FOSB*, который входит в состав мультибелкового комплекса “транскрипционный фактор AP-1”, регулирующего клеточную пролиферацию. Его экспрессия снижается в опухолевых клетках по сравнению с нормальными клетками молочной

железы и коррелирует с высокой степенью злокачественности, негативным эстроген- и прогестерон-рецепторным статусом и повышенной активностью HER2/neu, чувствительностью к доксорубину и инвазивным потенциалом РМЖ [216, 229].

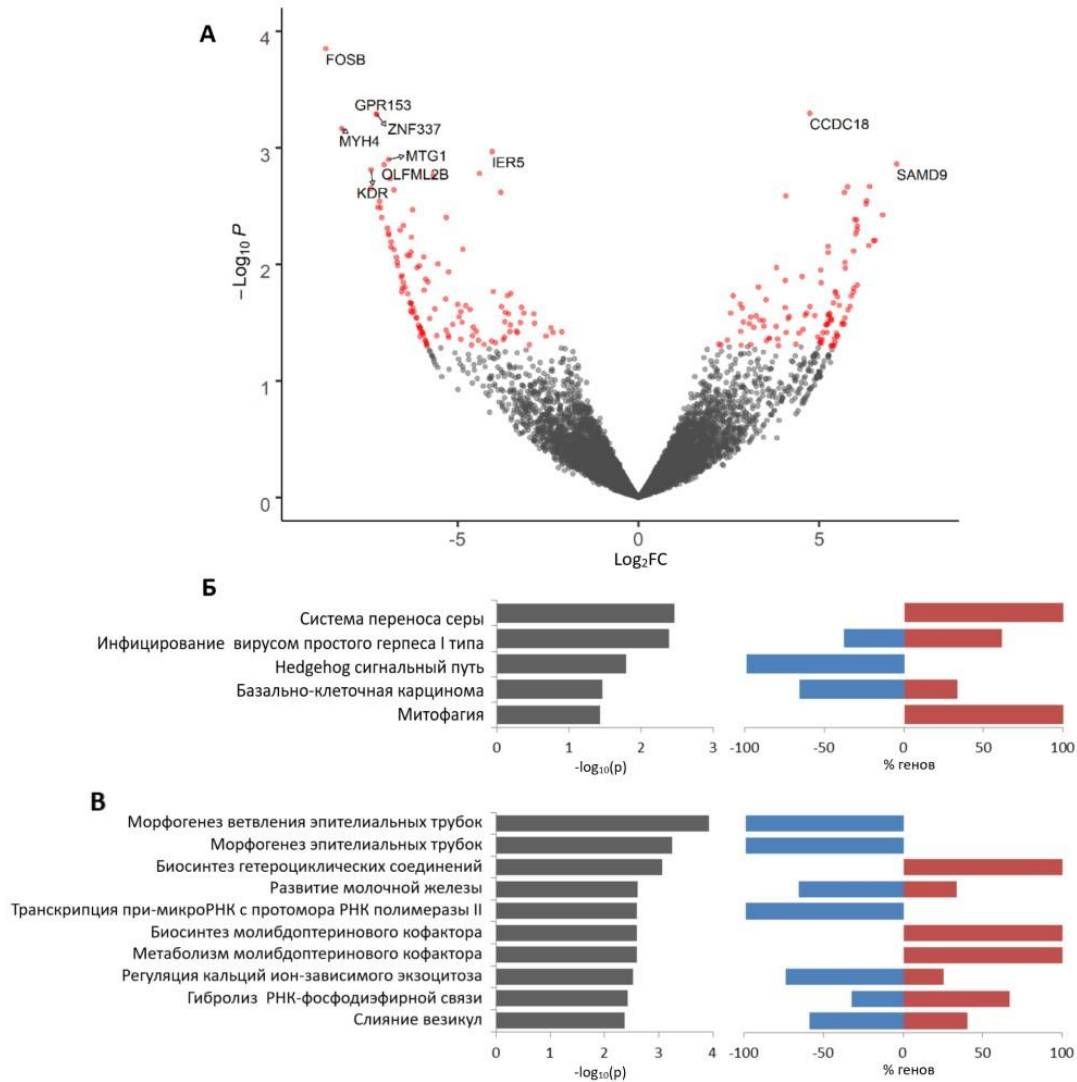


Рисунок 38 – Дифференциально-экспрессирующиеся гены в МІЕАР-положительных клетках по сравнению с МІЕАР-негативными клетками, расположенными на концах торпедоподобных структур, и их принадлежность к сигнальным путям и биологическим процессам. (А) Вулканограмма, демонстрирующая топ-10 дифференциально-экспрессирующихся генов. (Б, В) Функциональное аннотирование дифференциально-экспрессирующихся генов ( $p < 0,05$ ). Слева показаны сигнальные пути (Б) и биологические процессы (В) и статистическая

значимость их выраженности в MIEAP-позитивных клетках, справа – процент гипо- (синий цвет) и гиперэкспрессирующихся (красный цвет) генов, входящих в KEGG пути и GO процессы.

Функциональное аннотирование генов, гиперэкспрессирующихся в MIEAP-позитивных клетках ( $p < 0,05$ ), показало выраженность системы переноса серы (sulfur relay system), митофагии и синтеза гетероциклических соединений, например молибдоптеринового кофактора, тогда как гипозэкспрессирующиеся транскрипты были в основном ассоциированы с Hedgehog сигналингом, морфогенезом эпителиальных трубок и развитием молочной железы (Рисунок 38Б, В).

В EZR-негативных клетках была обнаружена статистически значимая ( $p < 0,05$ ) гиперэкспрессия 98 и гипозэкспрессия 64 генов по сравнению с EZR-позитивными клетками (Рисунок 36; Приложение 4, таблица 3). Среди генов с наибольшим уровнем экспрессии можно выделить *CD109*, *ID4* (Inhibitor Of Differentiation 4), *ST8SIA1* (ST8 Alpha-N-Acetyl-Neuraminide Alpha-2,8-Sialyltransferase 1) и *NR4A1* (Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 1) (Рисунок 39А). Известно, что белки CD109, ID4 и ST8SIA1 вовлечены в поддержание стволовости в клетках РМЖ. Так, гликопротеин CD109 индуцирует пролиферацию стволовых клеток РМЖ *in vitro*, и его экспрессия значительно выше в трижды-негативном подтипе данного заболевания [300]. Белок ID4 является маркером стволовых клеток, содержащихся в базальном слое эпителия молочной железы, поддерживает их стволовость через супрессию ключевых факторов, необходимых для люминальной дифференцировки, и специфически экспрессируется в базальноподобном РМЖ [157]. Помимо этого ID4, продуцируемый клетками РМЖ, индуцирует миграцию макрофагов и запускает в них программу ангиогенеза [89], а также индуцирует устойчивость к доксорубину [352]. Высокая активность ST8SIA1 характерна для трижды-негативного РМЖ и положительно коррелирует с экспрессией генов, ассоциированных со стволовостью:



BCL11A, FOXC1, CXCR4, PDGFR $\beta$ , SOX2. Нокаут ST8SIA1 блокировал рост и метастазирование трижды-негативного РМЖ и повышал его химиочувствительность *in vivo* [239, 318]. Высокая экспрессия ST8SIA1 является фактором неблагоприятного прогноза в плане общей и безрецидивной выживаемости больных РМЖ [159].

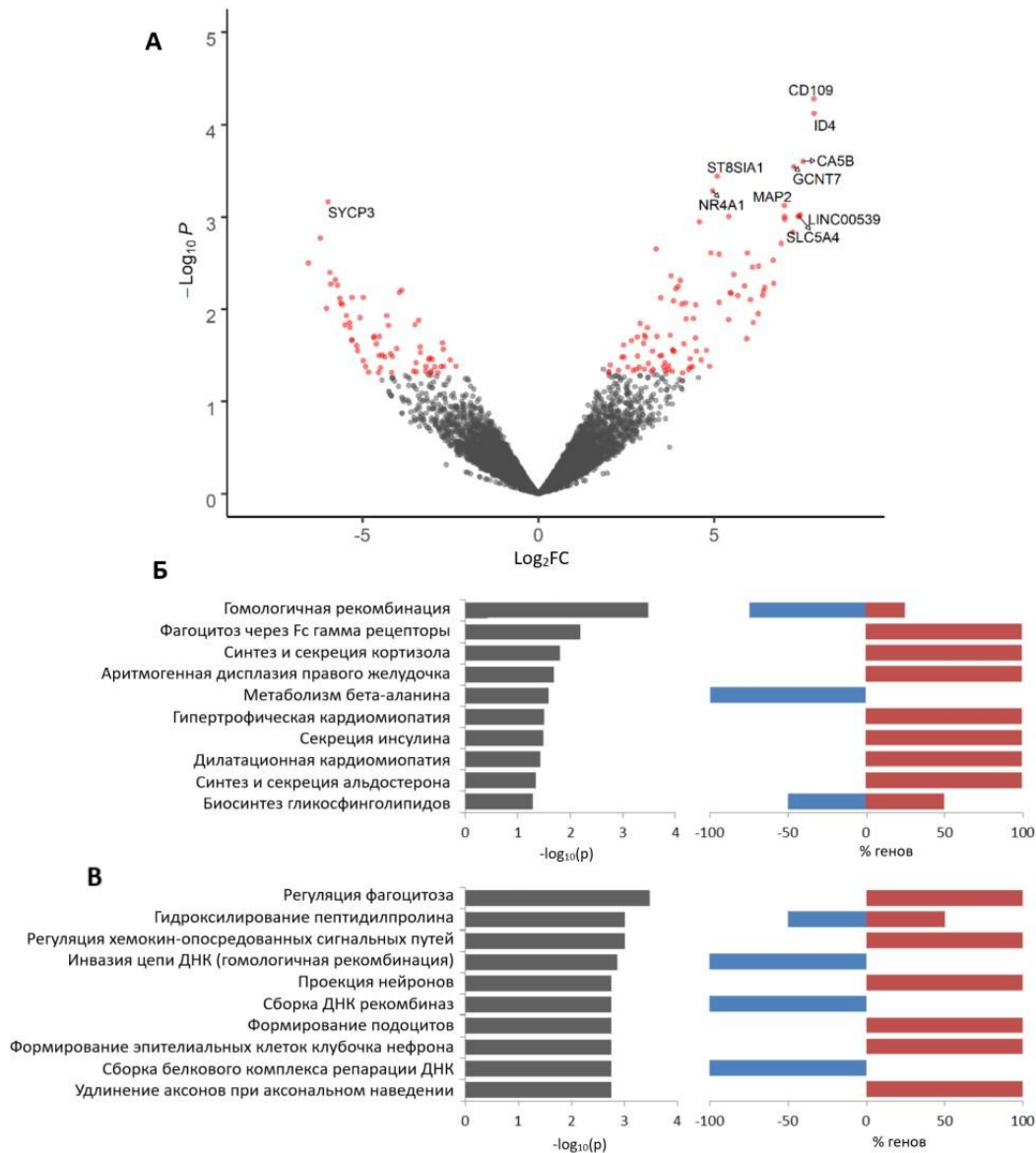


Рисунок 39 – Дифференциально-экспрессирующиеся гены в EZR-негативных клетках по сравнению с EZR-позитивными клетками, расположенными на концах торпедоподобных структур, и их принадлежность к сигнальным путям и биологическим процессам. (А) Вулканограмма, демонстрирующая топ-10 дифференциально-

экспрессирующихся генов. (Б, В) Функциональное аннотирование дифференциально-экспрессирующихся генов ( $p < 0,05$ ). Слева показаны сигнальные пути (Б) и биологические процессы (В) и статистическая значимость их выраженности в EZR-негативных клетках, справа – процент гипо- (синий цвет) и гиперэкспрессирующихся (красный) генов, входящих в KEGG пути и GO процессы.

Белок NR4A1 является транскрипционным фактором, активирующим TGF- $\beta$ -сигнальный путь. При РМЖ данный белок промотирует ЭМП, миграцию, инвазию и метастазирование [355], а делеция приводит к существенной хромосомной нестабильности и потери пролиферации [128].

Среди гипоекспрессирующихся генов наименьший уровень экспрессии был характерен для *SYCP3* (Synaptonemal Complex Protein 3) (Рисунок 39А). Белок SYCP3 кодирует белок синаптонемного комплекса, который ингибирует RAD51-опосредованную гомологичную рекомбинацию, увеличивая чувствительность ДНК к повреждениям и приводя к хромосомной нестабильности. Помимо этого SYCP3 формирует комплекс с белком BRCA2, подавляя его активность в процессе гомологичной рекомбинации [139].

Функциональное аннотирование генов, гиперэкспрессирующихся в EZR-позитивных клетках ( $p < 0,05$ ), показало выраженность регуляции фагоцитоза, хемокин-опосредованного сигнального пути, синтеза и секреции различных гормонов (Рисунок 39Б, В). Гипоекспрессирующиеся транскрипты были ассоциированы главным образом с гомологичной рекомбинацией и метаболизмом бета-аланина (Рисунок 39Б). Среди гиперэкспрессирующихся генов, ассоциированных с фагоцитозом, обнаружен *TLR2*. Известно, что толл-подобный рецептор 2-го типа вовлечен в продукцию воспалительных цитокинов и усиление инвазии и метастазирования различных злокачественных новообразований [85, 223]. Хемокин-опосредованный сигнальный путь представлен генами *SLIT2* и

*SLIT3*, которые оказывают супрессорное воздействие на метастазирование и часто эпигенетически инактивируются в злокачественных опухолях, включая РМЖ [154, 306].

Таким образом, подытоживая вышесказанное, можно предположить, что прометастатическая роль экспрессии KIF14 и MIEAP и потери EZR на концах торпедоподобных структур связана с вовлеченностью данных белков в ключевые механизмы метастатического каскада. Так, сигналинг эфирных липидов, характерный для KIF14-позитивных клеток, коррелирует с агрессивностью РМЖ, рака предстательной железы и меланомы [42, 131]. Для этих клеток также характерна гиперэкспрессия генов *NHS* и *THBS4*, связанных с клеточной миграцией и ангиогенезом [53, 291]. MIEAP-позитивные клетки характеризуются митофагией, которая в значительной степени ассоциирована с опухолевым ростом, миграцией, инвазией и метастазированием различных злокачественных новообразований [248, 313]. В EZR-позитивных клетках обнаружена гиперэкспрессия генов *CD109*, *ID4*, *ST8SIA1* и *NR4A1*, вовлеченных в регуляцию стволовости и ЭМП [157, 239, 300, 355], и генов *TLR2*, *SLIT2* и *SLIT3*, участвующих в регуляции инвазии и метастазирования различных злокачественных опухолей [85, 154, 306]. Другими словами, белки KIF14, MIEAP и EZR могут рассматриваться не столько маркерами инвазии, сколько маркерами метастазирования РМЖ.

Тем не менее, механизмы, лежащие в основе дифференциальной активности белков KIF14, MIEAP и EZR в торпедоподобных структурах, еще предстоит выяснить. Однако, весьма вероятно, что именно негенетические факторы вовлечены в регуляцию экспрессии данных белков, поскольку согласно базе данных TCGA гены *KIF14*, *EZR* и *SPATA18* (MIEAP) очень редко мутируют при РМЖ (частота менее 1%). Остаётся также непонятным момент, взаимодействуют ли KIF14- и MIEAP-позитивные и EZR-негативные клетки друг с другом, и насколько их кооперация необходима для реализации инвазии и метастазирования РМЖ. Согласно предыдущим исследованиям,

клеточная кооперация критически важна для эффективной коллективной инвазии опухолевых клеток [31, 72, 339, 349]. Кроме того, не понятно, являются ли KIF14- и MIEAP-позитивные и EZR-негативные клетки, находящимися на концах торпедоподобных структур, клетками-лидерами, реализующими коллективную инвазию.

### 3.9 Модель формирования ВОМГ: ассоциация с прогрессией РМЖ и эффективностью химиотерапии

Полученные результаты позволяют заключить, что ВОМГ РМЖ является отражением инвазивного роста опухоли и ассоциирована с прогрессированием заболевания и эффективностью химиотерапии. При этом формирование различных морфологических структур, вероятно, является комплексным и пластичным процессом, в основе которого лежит ЭМП и/или стволовость, и который контролируется различными экзо- и эндогенными факторами. Например, такой морфогенез может стимулироваться макрофагами и фибробластами, инфильтрирующими опухоль. Кроме того, эпителиальная экструзия, вызванная эффектом “скупивания” (от англ. crowding) и приводящая к “выдавливанию” клеток из эпителиального пласта в апикальное пространство при нормальном физиологическом состоянии или в базальную сторону в условиях патологии [243, 315], может также вносить вклад в морфогенез. На основании результатов, полученных в настоящем исследовании, и литературных данных была предложена гипотетическая модель формирования ВОМГ при РМЖ (Рисунок 40). Фундаментом для построения данной модели послужили различия морфологических структур в транскриптомном профиле, в частности в количестве экспрессирующихся генов мезенхимального фенотипа, которое увеличивается в ряду: тубулярные = альвеолярные, солидные, трабекулярные структуры и дискретные группы опухолевых клеток.

Первыми появляются тубулярные структуры. Это подтверждается высокой дифференцировкой тубулярных структур, в частности,

проявляющейся в их схожести с нормальными протоками молочной железы, а также самой низкой пролиферативной активностью по сравнению с другими структурами [6]. Кроме того, наличие тубулярных структур в опухоли является прогностически благоприятным признаком [47].

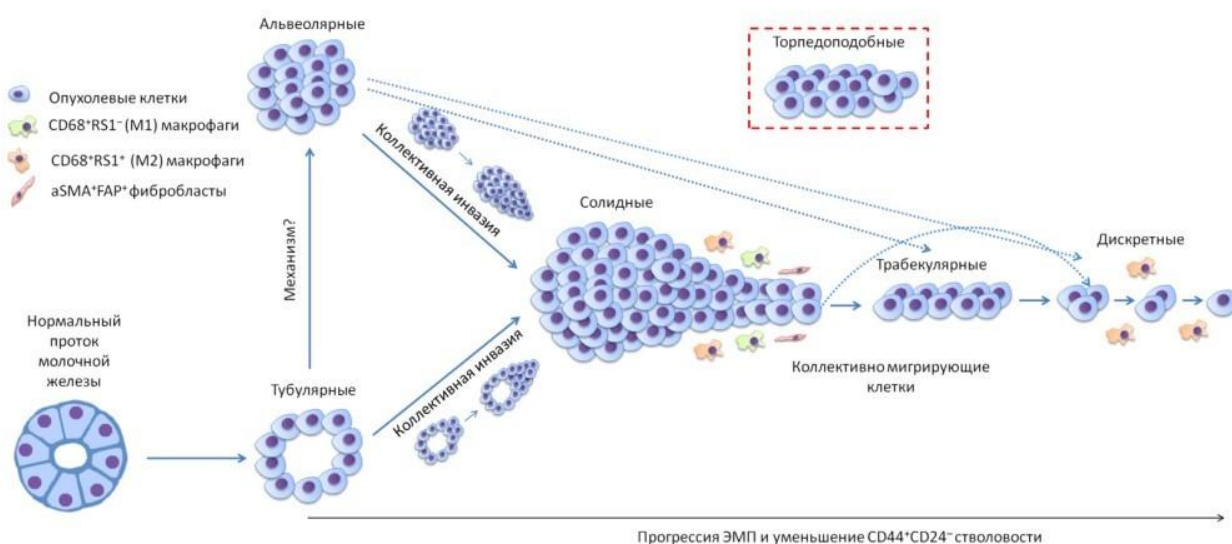


Рисунок 40 – Гипотетическая модель формирования ВОМГ при РМЖ

Однако, несмотря на выраженный эпителиальный фенотип, тубулярные структуры демонстрируют мезенхимальные характеристики, проявляющиеся в экспрессии соответствующих генов. Вероятно, ЭМП инициируется уже на начальной стадии морфогенеза инвазивного компонента РМЖ.

Альвеолярные структуры максимально схожи в транскрипционном профиле с тубулярными структурами и, вероятно, из них и формируются. Механизмом такого морфогенеза может быть базальная экстррузия опухолевых клеток во внеклеточный матрикс и/или экстррузия клеток в полость тубулярных структур с последующей их пролиферацией и ростом. Данное предположение основывается на том, что клетки, отделившиеся в ходе экстррузии от тубулярных структур, не претерпевают значительных изменений, т.е. “сохраняют” первичный экспрессионный профиль, и дают начало альвеолярным структурам. Тем самым, вероятно, объясняется транскрипционная схожесть данных типов структур. Тем не менее, в отличие

от тубулярных и других типов структур, для альвеолярных структур характерно наибольшее количество экспрессирующихся генов химиорезистентности и  $CD44^+CD24^-$  ОСК. В предыдущих исследованиях наибольшая стволовость была показана в опухолевых сфероидах, в т.ч. и небольшого размера, которые схожи по своей форме с альвеолярными структурами. Вероятно, эти особенности объясняют ассоциацию альвеолярных структур с высокой вероятностью гематогенного метастазирования РМЖ и устойчивостью к НАХТ (Рисунок 41).

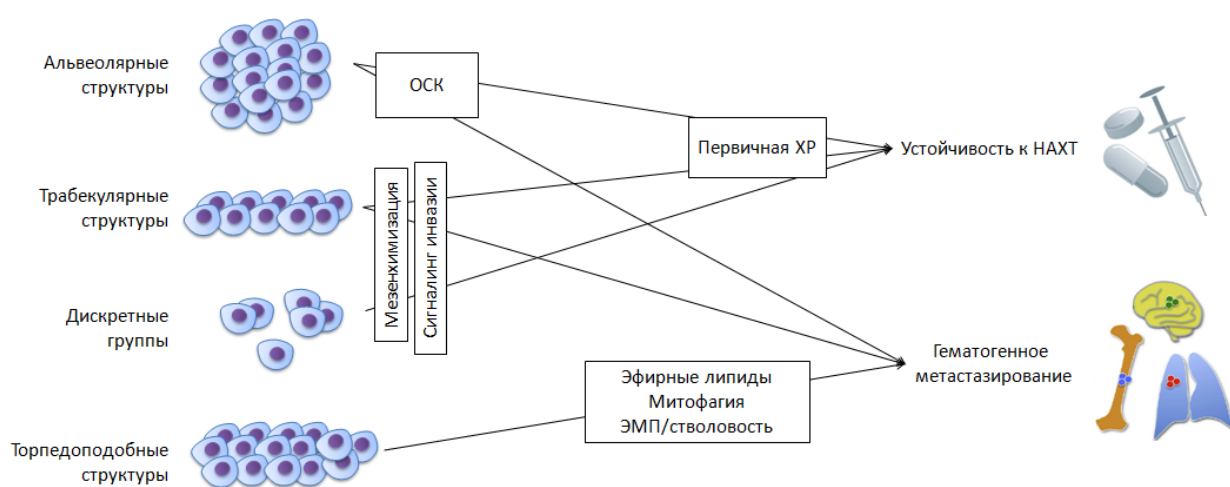


Рисунок 41 – Ассоциация ВОМГ с эффективностью неoadъювантной химиотерапии и гематогенным метастазированием РМЖ. НАХТ – неoadъювантная химиотерапия; ОСК –  $CD44^+CD24^-$  опухолевые стволовые клетки; ХР – химиорезистентность; ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход.

Солидные структуры, вероятно, могут образовываться как из тубулярных, так и из альвеолярных структур через усиление ЭМП и формирование фронта коллективнодвигающихся опухолевых клеток. Данное предположение подтверждается тем, что в отличие от тубулярных и альвеолярных структур, в солидных структурах отмечается высокая экспрессия гена *VASN*, характерного для клеток-пионеров (от англ. *trailblazers*), прокладывающих путь при инвазивном росте опухоли и

демонстрирующих мезенхимальные черты [326]. Кроме того, в солидных структурах начинает экспрессироваться ген металлопротеиназы MMP14, ранее описанный как один из ключевых факторов опухолевой инвазии [61, 304]. Усиление ЭМП и инвазивного потенциала солидных структур, вероятно, контролируется факторами, секретируемыми опухоль-ассоциированными макрофагами и фибробластами (Рисунок 40). Это подтверждается результатами настоящего исследования, что макрофаги с фенотипом CD68<sup>+</sup>RS1<sup>+</sup> (M2) и αSMA<sup>+</sup>FAP<sup>+</sup> фибробласты чаще встречаются в микроокружении солидных структур, и литературными данными о том, что иммунные и стромальные клетки, инфильтрирующие опухоли, способны активировать ЭМП и стимулировать инвазию опухолевых клеток [106, 133, 144, 178, 201, 292, 322, 340, 350]. По мере прогрессии ЭМП и уменьшения межклеточной адгезии инвазивный край солидных структур может отделяться от основной клеточной массы и трансформироваться в трабекулярные структуры.

Как следствие, трабекулярные структуры характеризуются снижением экспрессии “эпителиальных” генов и повышением количества гиперэкспрессирующихся генов мезенхимального фенотипа. Эти результаты могут объяснять значительную выраженность сигнальных путей опухолевой инвазии в трабекулярных структурах. Высокий уровень мезенхимизации может также являться причиной высокой экспрессии генов химиорезистентности в данных структурах, поскольку известно, что транскрипционные факторы, индуцирующие ЭМП, также активируют ABC транспортеры [311]. Всё это, вероятно, является причиной ассоциации трабекулярных структур с высокой вероятностью гематогенного метастазирования РМЖ и низкой эффективностью НАХТ (Рисунок 41).

Прогрессирование ЭМП приводит к разрушению контактов между клетками и образованию небольших групп опухолевых клеток и единичных опухолевых клеток, коллективно именуемых как дискретные группы опухолевых клеток. Данный вариант морфологических структур

характеризуется наибольшим количеством гиперэкспрессирующихся генов, характерных для мезенхимального фенотипа и кодирующих белки внеклеточного матрикса, и, как следствие, значительной ассоциацией с сигналингами опухолевой инвазии. В микроокружении дискретных групп часто обнаруживаются CD68<sup>+</sup>RS1<sup>+</sup> (M2) макрофаги, которые, как в и случае солидных структур, могут оказывать проинвазивный эффект. Напротив, в составе дискретных групп редко обнаруживаются CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> ОСК. Вероятно, что прогрессия ЭМП отражается на изменениях в количестве CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> ОСК в различных морфологических структурах, поскольку сигнальные пути, лежащие в основе эпителиально-мезенхимальной пластичности и стволовости, во многом пересекаются. Так, стволовой фенотип скорее ассоциирован с одновременным наличием в клетке эпителиальных и мезенхимальных характеристик, чем только мезенхимальных [123, 276]. Для дискретных групп характерна наименьшая среди всех структур экспрессия рецепторов к эстрогенам и прогестерону [2] и наибольшая пролиферативная активность, оцененная по маркеру Ki-67 [6]. Снижение экспрессии рецепторов к половым гормонам также указывает на более продвинутый ЭМП в дискретных группах [327].

В предыдущих исследованиях описан феномен “опухолевого почкования” (от англ. tumor budding), который подразумевает наличие в зоне инвазивного фронта одиночных опухолевых клеток и/или небольших кластеров (2-6 клеток) [122, 184, 206, 294]. Tumor buds находятся на этапе промежуточного (гибридного) ЭМП, но демонстрируют преобладание мезенхимальных черт на эпителиальными, и ассоциированы с плохим прогнозом течения онкологических заболеваний, в т.ч. РМЖ [122]. Tumor buds морфологически схожи с дискретными группами опухолевых клеток. Тем не менее, последние обнаруживаются не только в зоне инвазивного роста опухоли (в отличие от tumor buds), но и в толще опухолевой ткани. Однако, как и tumor buds, дискретные группы являются гетерогенной популяцией, среди которой одиночные опухолевые клетки и их небольшие



скопления могут отражать разные варианты эпителиально-мезенхимальной пластичности. Это хорошо прослеживается на уровне чрезвычайно разнообразного экспрессионного профиля дискретных групп. Тем не менее, происхождение части дискретных групп, вероятно, носит клональный характер и может быть связано с дупликацией в гене *PAX6*, как показано в данном исследовании. Таким образом, в последующих исследованиях представляется целесообразным стратификация дискретных групп опухолевых клеток и проведение дальнейших исследований гено- и фенотипических характеристик, а также клинической значимости составляющих их популяций.

Предложенная модель во многом гипотетическая и не рассматривает другие возможные пути эволюции морфологических структур. Например, не понятно, могут ли трабекулярные структуры образовываться из альвеолярных, а дискретные – напрямую из солидных и альвеолярных структур. Хотя, множественные иерархические связи между морфологическими структурами по результатам кластерного анализа данных цитогенетического профилирования (Рисунок 15) демонстрируют возможность трансформации одних структур в другие. Кроме того, ранее было показано, что в опухолях с одним типом структур равновероятно наличие любого морфологического варианта, тогда как в случаях с двумя типами структур в качестве вторых присутствуют трабекулярные структуры [348]. Т.е., это, вероятно, говорит о том, что трабекулярные структуры могут формироваться из любого морфологического варианта опухолевых клеток.

Не понятна также природа торпедоподобных структур и их место в эволюции ВОМГ РМЖ. Вероятно, данные структуры могут образовываться от солидных структур, имеющих торпедоподобные выросты (протрузии). Интересно, что сами по себе торпедоподобные структуры не были связаны с гематогенным метастазированием РМЖ. Только, если на концах данных структур обнаруживалась экспрессия *KIF14* и *MIEAP* и потеря *EZR*, наблюдалась связь с метастазированием и безметастатической

выживаемостью (Рисунок 41). Механизмы регуляции экспрессии KIF14, MIEAP и EZR в торпедоподобных структурах не ясны. Тем не менее, обнаруженная ассоциация с метастазированием, вероятно, связана с активацией проинвазивных и прометастатических программ в KIF14- (высокий уровень эфирных липидов) и MIEAP-позитивных (митофагия) и EZR-негативных (ЭМП/стволовость) клетках.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В течение последнего десятилетия внутриопухолевая гетерогенность (ВОГ) остается одной из наиболее “горячих” тем современной онкологии. Повышенное внимание исследователей к данной теме объясняется значительным вкладом ВОГ в резистентность к противоопухолевой терапии и неблагоприятное течение онкологических заболеваний. Всё это обуславливает необходимость разработки и внедрения методов анализа и снижения степени внутриопухолевого разнообразия в клиническую практику. Хотя внутриопухолевая генетическая гетерогенность является наиболее популярным объектом исследования, значимость морфологической вариабельности опухолевых клеток и её ассоциация с прогнозом течения злокачественных новообразований хорошо известна на протяжении длительного времени [47, 146] и ещё раз подчеркнута в недавних работах [45, 57, 161].

Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность (ВОМГ) наблюдается во многих типах злокачественных новообразований и представлена наличием различных формирований опухолевых клеток, именуемых как морфологические, гистологические или инвазивные/инфильтративные структуры. В зависимости от преобладания того или иного типа морфологических структур, выделяют гистологические подтипы опухолей со специфическим прогнозом и ответом на терапию. Однако различные типы морфологических структур могут находиться в пределах одной опухоли [49, 175, 307]. В таких случаях анализ выраженности определенных типов морфологических структур используется для определения степени злокачественности опухолей, вероятности ответа на терапию и прогноза заболевания [47, 146, 294, 347].

Инвазивная карцинома неспецифического типа (от англ. *invasive carcinoma of no special type, IC NST*), составляющая основную долю РМЖ (до 80% всех случаев), демонстрирует значительную ВОМГ. Пять типов

морфологически-обособленных структур, включающих тубулярные, солидные, трабекулярные, альвеолярные структуры и дискретные группы опухолевых клеток, встречаются в IC NST [10]. Тубулярные структуры образованы клетками, стоящими в один или два ряда, и формирующими подобие трубок. Солидные структуры представлены полями разной величины и формы, включающими сотни клеток. Трабекулярные структуры сформированы рядами клеток, контактирующих со стромой. Альвеолярные структуры – это скопления опухолевых клеток округлой либо неправильной формы. Дискретные группы сформированы как отдельными клетками, так и их скоплениями (до 5 клеток). Количество различных типов морфологических структур варьирует от случая к случаю [10]. В опухолях с одним вариантом структур равновероятно наличие любого их типа, тогда как в опухолевой ткани с двумя типами структур чаще всего в качестве вторых обнаруживаются трабекулярные объединения [348]. Трижды-негативные опухоли молочной железы чаще характеризуются наличием одного (любого) типа морфологических структур, тогда как при люминальном IC NST, в основном, встречаются опухоли с пятью типами структур [348]. ВОМГ ассоциирована с эффективностью неоадьювантой химиотерапии (НАХТ) и вероятностью лимфогенного и гематогенного метастазирования и рецидивирования IC NST [3, 8-10, 17, 18].

Природа ВОМГ, пространственная организация различных морфологических структур, механизмы их формирования и вклада в прогрессию и эффективность лечения IC NST не понятны. В соответствии с этим, **целью данного исследования** было выявление клеточных и молекулярно-генетических факторов, ассоциированных с формированием ВОМГ и её вкладом в эффективность НАХТ и метастазирование IC NST.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Оценить пространственную организацию различных морфологических структур инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа.

2. Изучить связь внутриопухолевой морфологической гетерогенности инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа с хромосомными нарушениями и с наличием опухолевых стволовых клеток.

3. Изучить клеточный состав микроокружения различных морфологических структур инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа и их транскрипционный потенциал регуляции иммуно-воспалительных реакций.

4. Изучить транскрипционный профиль различных морфологических структур инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа.

5. Определить транскрипционный профиль химиорезистентности и инвазивности различных морфологических структур инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа.

6. Изучить ассоциацию различных морфологических структур с эффективностью неoadьювантной химиотерапии и риском метастазирования инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа.

7. Идентифицировать молекулярные факторы, ассоциированные с метастазированием инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа, на основе анализа генетических и транскрипционных особенностей внутриопухолевой морфологической гетерогенности.

Для решения задач была сформирована группа из 700 больных IC NST (возраст от 21 до 90 лет, T<sub>1-4</sub>N<sub>0-3</sub>M<sub>0</sub>), проходивших лечение в отделении общей онкологии НИИ онкологии Томского НИМЦ с 1990 по 2015 гг. Пациенты были разделены на несколько групп в зависимости от выполняемых задач. Первая группа из 676 пациенток (249 без НАХТ и 427 с НАХТ) использовалась для анализа исследования ассоциации тубулярных, альвеолярных, солидных, трабекулярных структур и дискретных групп опухолевых клеток с эффективностью НАХТ и частотой лимфогенного и

гематогенного метастазирования IC NST. Вторая группа из 45 больных (без НАХТ) использовалась для иммунофлюоресцентного исследования представленности CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> ОСК в различных типах морфологических структур и популяций макрофагов (CD68+RS1<sup>-</sup> и CD68+RS1<sup>+</sup>) и aSMA+FAP<sup>+</sup> фибробластов (aSMA<sup>+</sup>FAP<sup>+</sup> и aSMA<sup>-</sup>FAP<sup>+</sup>) в их микроокружении. Третья группа из 80 пациенток (46 без НАХТ и 34 с НАХТ) использовалась для иммуногистохимического исследования ассоциации экспрессии (инвазивных) маркеров, выделенных из числа дифференциально-экспрессирующихся генов между солидными/трабекулярными структурами, с одной стороны, и тубулярными и альвеолярными структурами, с другой стороны, с частотой гематогенного метастазирования IC NST. Четвёртая группа из 12 пациенток (без НАХТ) была включена анализ пространственной организации, молекулярно-генетическое исследование хромосомных aberrаций и транскрипционного профиля различных морфологических структур с помощью микроматриц, отбор на основе полученных данных маркеров опухолевой инвазии и анализ транскриптома клеток с различным инвазивным фенотипом.

Работа выполнена на современном оборудовании с использованием классических и новых высокопроизводительных методов исследования. Анализ 3D организации различных морфологических структур, наличия и количества CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> ОСК в них и макрофагов и фибробластов в их микроокружении, а также колокализацию экспрессии белков KIF14, EZR и MIEAP в торпедоподобных структурах проводили с помощью иммунофлюоресцентного окрашивания на лазерном сканирующем микроскопе LSM 780, оценка микрофотографий – с использованием программы ZEN-2012-SP1 (Carl Zeiss, Германия). Различные типы морфологических структур и опухолевые клетки с экспрессией KIF14, EZR и MIEAP в составе торпедоподобных структур выделяли из опухолевой ткани с помощью лазерного микродиссектора PALM (Carl Zeiss, Германия). Сравнительную геномную гибридизацию на основе микрочипов и

микроматричное транскрипционное профилирование различных морфологических структур выполняли на сканере SureScan Microarray Scanner (Agilent, США), анализ данных – с помощью программного обеспечения CytoGenomics v. 3.0.2.11 (Agilent, США). Валидацию данных микроматричного экспрессионного анализа проводили с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия). Секвенирование РНК опухолевых клеток, положительных и отрицательных по экспрессии KIF14, EZR и MIEAP, выполняли на платформе NextSeq500 (Illumina, США), анализ данных – с помощью программ STAR v. 2.7.3a [87], featureCounts [185] и DESeq2 [197]. Функциональное аннотирование дифференциально-экспрессирующихся генов как между различными типами морфологических структур, и так и между KIF14, EZR и MIEAP-положительными и отрицательными опухолевыми клетками проводили с помощью онлайн-инструмента Enrichr [335].

Конфокальная микроскопия и 3D моделирование подтвердили ранее высказанные предположения о форме различных морфологических структур. Тубулярные структуры представляют собой формирования по типу “трубок” или “колец”, состоящие из одного слоя опухолевых клеток. Альвеолярные структуры имеют округлую (сфероидальную) форму и включают в себя до 30 опухолевых клеток. Солидные структуры представляют группы различного размера и форм, состоящие из десятков и сотен опухолевых клеток. Трабекулярные структуры сформированы 1-2 рядами опухолевых клеток. Дискретные группы опухолевых клеток включают в себя как единичные (одионочные) опухолевые клетки, так и скопления из 2-5 клеток с ярко выраженной эпителиальной морфологией (формой).

CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> ОСК чаще всего обнаруживались в солидных (96,4%) и альвеолярных (91,6%) структурах по сравнению с трабекулярными, тубулярными и дискретными группами (75,0%, 57,9% и 33,3%, соответственно). Количество CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> ОСК было выше в солидных (0,11

(0,09-0,14)) и альвеолярных (0,13 (0,11-0,15)) структурах, в дискретных группах данные клетки практически отсутствовали (0,004 (0,002-0,007;  $p < 0,05$ ).

Хромосомные нарушения выявлялись реже всего в дискретных группах опухолевых клеток (среднее количество – 17,4) и чаще в солидных (24,7) и тубулярных (24,6) структурах. Не было обнаружено сходства морфологических структур одного типа в хромосомных нарушениях. В одних случаях кластеризация структур по принципу наличия одинаковых aberrаций носила хаотичный характер. В других случаях все типы морфологических структур (за исключением солидных) кластеризовались вместе, что может указывать на наличие общего клонального “предка” или независимость клональной эволюции. Исключение составили дискретные группы опухолевых клеток одной опухоли молочной железы, которые были схожи друг с другом и несли одну и ту же дупликацию хромосомного региона 11p13, содержащую ген *PAX6*. По данным литературы, гиперэкспрессия *PAX6* вовлечена в индукцию ЕМТ, миграции, инвазии и метастазирования РМЖ [155, 310].

Микроматричный экспрессионный анализ показал сходство морфологических структур одного и того же типа, полученных из трёх разных опухолей молочной железы, друг с другом. Тубулярные структуры были более близки по профилю экспрессии к альвеолярным структурам, чем к другим морфологическим объединениям опухолевых клеток. Дискретные формирования опухолевых клеток значительно отличались от остальных структур. В частности, различия в уровне транскриптов возрастали в ряду: тубулярные = альвеолярные, солидные, трабекулярные и дискретные группы опухолевых клеток. Во всех типах морфологических структур обнаружена гиперэкспрессия генов ( $p$  (FDR) < 0,05), кодирующих различные молекулы внеклеточного матрикса. Почти для всех структур была характерна гиперэкспрессия генов-регуляторов дифференцировки, клеточного цикла, пролиферации и стволовости. Специфические транскрипты обнаружены



только в трабекулярных (PKDREJ) и дискретных группах опухолевых клеток (MAMDC2, ADAMTS12, KIF1B и др.).

Функциональное аннотирование транскриптов, гипер- и гипозэкспрессирующихся в каждом типе морфологических структур по отношению к нормальному эпителию ( $|\log\text{-fold-change}| \geq \log_2 1,5$  и  $p < 0,05$ ), не показало наличие канонических сигнальных путей, специфических для разных морфологических структур. Обнаруженные сигнальные пути были характерны либо для всех, либо только для части типов структур, но с разной статистической значимостью и количеством гипер/гипозэкспрессирующихся генов. В альвеолярных структурах обнаружена гипорегуляция ErbB-опосредованного сигнального пути и сигналингов, вовлеченных в ЭМП и ремоделирование актинового цитоскелета. Для солидных структур характерна гиперрегуляция репарации ДНК на этапе сверочной точки G2/M клеточного цикла и гипорегуляция сигнального пути через p21-ассоциированные киназы (PAK). В трабекулярных структурах выявлена гипорегуляция сигналинга через рецептор к иммуноглобулину E (FcεRI) и сигналинга, активируемого тромбоцитарным фактором роста (PDGF). Для дискретных формирований опухолевых клеток характерна гиперрегуляция сигнального пути, вовлеченного в фиброз печени/активацию звездчатых клеток и гипорегуляция сигналинга острого миелобластного лейкоза. Только в трабекулярных и дискретных вариантах опухолевых клеток не обнаружен сигнальный путь репарации ДНК на этапе G2/M клеточного цикла.

Морфологические структуры различались между собой в клеточном составе микроокружения, в частности наличии и количестве популяций макрофагов (CD68<sup>+</sup>RS1<sup>-</sup> и CD68<sup>+</sup>RS1<sup>+</sup>) и αSMA<sup>+</sup>FAP<sup>+</sup> фибробластов (αSMA<sup>+</sup>FAP<sup>+</sup> и αSMA<sup>-</sup>FAP<sup>+</sup>). Кроме того, экспрессия генов, ответственных за рекрутирование моноцитов и функциональное состояние макрофагов и фибробластов, была индивидуальной для каждого типа структур. Так, CD68<sup>+</sup>RS1<sup>-</sup> макрофаги (противоопухолевый M1 фенотип) и фибробласты с фенотипом αSMA<sup>+</sup>FAP<sup>+</sup> преобладали в микроокружении солидных структур

по сравнению с другими морфологическими вариантами опухолевых клеток (0,71 против 0,30-0,66;  $p < 0,05$ ) и тубулярными и дискретными группами (1,80 против 0,45 и 0,40;  $p < 0,05$ ), соответственно. Макрофаги другого типа,  $CD68^+RS1^+$  (проопухолевый M2 фенотип), преобладали в микроокружении солидных структур и дискретных групп по сравнению с другими структурами (0,45 и 0,44 против 0-0,25;  $p < 0,05$ ). Только для дискретных групп была характерна одновременная гиперэкспрессия гена *CCL2* ( $\log_{2}FC$  3,54;  $p < 0,05$  в сравнении с нормальными клетками молочной железы), вовлеченного в рекрутирование моноцитов, и гена *TGFb2* ( $\log_{2}FC$  3,28;  $p < 0,05$  в сравнении с нормальными клетками молочной железы), продукт которого является одним из триггеров поляризации макрофагов в M2 фенотип и дифференцировки нормальных фибробластов в CAFs. Статистически значимая гиперэкспрессия *TGFb2* ( $\log_{2}FC$  3,23) также обнаружена в трабекулярных структурах, однако экспрессия гена *CCL2* была в 3 раза ниже ( $\log_{2}FC$  -3,35;  $p < 0,05$ ) по сравнению с нормальными клетками молочной железы. Ген *BSG*, вовлеченный в формирование ангиогенного фенотипа в макрофагах, значимо выше экспрессировался в тубулярных структурах ( $\log_{2}FC$  2,15;  $p < 0,05$ ). Экспрессия генов *FGF2* и *PDGFA*, вовлечённых в стимуляцию дифференцировки нормальных фибробластов в CAFs и их пролиферацию, была ниже во всех типах структур по сравнению с неизменённым эпителием молочной железы ( $p < 0,05$  и  $0,001 < p < 0,1$ ).

Различные типы морфологических структур характеризовались индивидуальным профилем экспрессии генов эпителиального и мезенхимального фенотипов и выраженностью сигнальных путей, вовлечённых в клеточную миграцию и инвазию. Мезенхимальные гены преобладали трабекулярных структурах (53,3% (8/15)) и дискретных группах (80,0% (12/15);  $p = 0,007$  в сравнении с другими структурами). Дискретные группы также характеризовались самой низкой долей эпителиальных генов (13,3% (2/15)); однако различия с другими структурами не были статистически значимыми. Сигналинг регуляции динамики актинового

цитоскелета через ГТФазы Rho и Rac в большей степени был характерен для солидных ( $-\log_{10}(p)=1,8$ ) и трабекулярных структур ( $-\log_{10}(p)=1,8$ ), а также дискретных групп опухолевых клеток ( $-\log_{10}(p)=2,3$ ). Сигнальные пути, вовлеченные в активность матриксных металлопротеиназ и инвазию в общем, значимо выражены в дискретных группах опухолевых клеток ( $-\log_{10}(p)=2,4-2,6$ ) и на фоне тенденции – в трабекулярных структурах ( $-\log_{10}(p)=1,2-1,3$ ).

Индивидуальный профиль признаков CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> стволовости, экспрессии генов мезенхимального фенотипа и различная выраженность сигнальных путей миграции и инвазии, вероятно, обуславливают дифференциальный вклад различных морфологических структур в риск лимфогенного и гематогенного метастазирования. При этом, ассоциация ВОМГ с метастазированием зависит от наличия НАХТ. У больных, как без НАХТ, так и с ней, частота лимфогенных метастазов выше при наличии в альвеолярных (47,8% и 64,2%) и трабекулярных структур (43,0% и 57,7%) по сравнению с пациентами с отсутствием данных морфологических вариантов: 23,2% ( $p=0,0004$ ) и 30,0% ( $p=0,0012$ ) и 33,0% ( $p<0,0001$ ) и 36,8% ( $p<0,0001$ ), соответственно. Однако у больных с НАХТ лимфогенные метастазы также чаще наблюдаются при наличии дискретных структур, чем при их отсутствии (59,3% против 41,4%,  $p=0,0002$ ). У пациентов, получавших НАХТ, наличие альвеолярных и трабекулярных структур также ассоциировано с высокой частотой гематогенного метастазирования (42,8% против 27,3%,  $p=0,0036$ ; 41,9% против 20,7%,  $p=0,0005$ ) и низкими показателями безметастатической выживаемости: HR (95% CI) 1,97 (1,21-3,22),  $p=0,007$  и HR (95% CI) 2,27 (1,21-4,28),  $p=0,012$ , соответственно. Интересно, что ассоциация альвеолярных структур с гематогенным метастазированием наблюдалась только у пациенток с отсутствием ответа на НАХТ ( $p=0,0030$ ), тогда как трабекулярные структуры были связаны с метастатическим процессом у больных, чувствительных к химиотерапии ( $p=0,0011$ ).

Для различных вариантов морфологических структур характерен индивидуальный профиль экспрессии генов химиорезистентности. Наибольшее число (70,4% (19/27)) генов химиорезистентности экспрессировалось в альвеолярных структурах, из них экспрессия 17 генов была повышена по сравнению с нормальными клетками молочной железы ( $p < 0,05$ ). Только в альвеолярных структурах гиперэкспрессировались гены *ABCC1*, *ABCG1*, *ABCC11* и *ABCA1*, кодирующие ABC-транспортеры широкого спектра химиопрепаратов. Биологические процессы “лекарственная резистентность клеток” и “химиорезистентность опухолевых линий”, определённые на основе функционального аннотирования дифференциально-экспрессирующихся генов, статистически значимо выражены только в альвеолярных структурах ( $-\log_{10}(p) = 3,16$  и  $3,33$ ). Для остальных структур было характерно практически одинаковое количество экспрессирующихся генов химиорезистентности. Так, 13/27 (48,1%) генов значимо гипо- и гиперэкспрессировались в солидных и трабекулярных структурах и 10/27 (37,0%) генов – в тубулярных и дискретных формированиях опухолевых клеток по сравнению с нормальными клетками молочной железы ( $p < 0,05$ ). Однако, в отличие от других структур, трабекулярные варианты опухолевых клеток демонстрировали гипоекспрессию трёх из четырёх генов SLC-транспортеров: *SLC25A13*, *SLC23A2* и *SLC1A3*, что может обуславливать устойчивость к камптотецину, 5-фторурацилу и препаратам платины.

Индивидуальный транскрипционный профиль химиорезистентности, вероятно, обуславливает вклад различных морфологических структур в результативность НАХТ. Ассоциация морфологических структур с результативностью химиотерапии может быть также связана с их различиями в количестве  $CD44^+CD24^-$  ОСК и экспрессии генов мезенхимального и инвазивного фенотипа. Так, альвеолярные структуры, для которых было характерно наибольшее количество  $CD44^+CD24^-$  ОСК и экспрессирующихся генов химиорезистентности, и трабекулярные структуры с

транскрипционными характеристиками мезенхимальности и низкой активностью транспортеров, обеспечивающих поступление лекарственных средств в клетки, чаще обнаруживались в операционном материале пациенток с низкой эффективностью НАХТ, чем у больных с ответом на химиотерапию (60,7% против 46,2%,  $p=0,006$  и 72,2% против 53,8%,  $p=0,0004$ , соответственно). Данная закономерность наблюдалась только у пременопаузальных пациенток ( $p=0,013$  для альвеолярных и  $p<0,0001$  для трабекулярных структур). Интересно, что у пациенток с сохраненной менструальной функцией солидные структуры чаще детектировались при наличии ответа на НАХТ, чем при его отсутствии (59,1% против 40,0%,  $p=0,009$ ).

Полученные данные указывают на возможность использования внутриопухолевой морфологической гетерогенности IC NST как модели для изучения механизмов инвазии опухолевых клеток и идентификации маркёров метастазирования, а также мишеней для разработки терапии, направленной на подавление вероятности прогрессирования РМЖ. В данном исследовании в качестве объекта интереса были выбраны солидные и трабекулярные структуры, для которых показана значимая выраженность сигнальных путей клеточной миграции и инвазии. Дискретные группы опухолевых клеток были исключены из данного анализа ввиду их высокой гетерогенности. С помощью сравнения экспрессионного профиля солидных и трабекулярных структур с другими морфологическими вариантами опухолевых клеток выбраны гены, связанные по данным литературы с механизмами клеточной подвижности: ЭМП, ремоделирование цитоскелета, изменение клеточной адгезии и продукция матриксных протеаз, и с гетерогенной экспрессией на белковом уровне в пределах солидных и/или трабекулярных структур согласно базе данных The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>). Итого, 8 генов – *HAX1*, *PIP5K1B*, *WASF2*, *EZR*, *KIF14*, *ZMIZ1*, *DSC3* и *SPATA18* – было выбрано. Только три из них (*KIF14*, *EZR*, *SPATA18*) оказались связанными с частотой гематогенного метастазирования РМЖ.

Ассоциация с частотой метастазов РМЖ была справедлива только для случаев, когда экспрессия KIF14, EZR и SPATA18 наблюдалась в торпедоподобных структурах инвазивного компонента опухоли. У пациентов с позитивной экспрессией белков KIF14 и MIEAP (кодируется геном *SPATA18*) и негативной экспрессией белка EZR на концах торпедоподобных структур чаще наблюдались гематогенные метастазы (66,7%, 70,0% и 73,7%), чем у больных с отсутствием KIF14 и MIEAP и наличием EZR (14,3%, 12,5% и 13,3%;  $0,001 < p < 0,005$ ). Безметастатическая выживаемость была хуже у больных РМЖ с экспрессией на концах торпедоподобных структур KIF14 (HR (95% CI) 6,63 (1,50-29,29),  $p=0,013$ ), MIEAP (HR (95% CI) 8,09 (1,83-35,75),  $p=0,006$ ) и потерей EZR (HR (95% CI) 7,65 (1,72-33,93),  $p=0,007$ ). Торпедоподобные структуры представляют собой образования вытянутой, преимущественно треугольной формы, состоящие из двух-трех параллельных рядов опухолевых клеток, и имеют широкое основание и заостренную вершину, насчитывающую до трёх клеток. По данным настоящего исследования торпедоподобные структуры встречаются в 54,7% опухолей молочной железы. Происхождение и природа данных структур не понятна и является предметом дальнейших исследований.

Для понимания природы KIF14- и MIEAP-позитивных клеток и EZR-негативных клеток торпедоподобных структур и исследования механизмов связи с гематогенным метастазированием РМЖ был проведен анализ их транскриптома с помощью РНК-секвенирования. Гиперэкспрессирующиеся гены в KIF14-позитивных клетках ассоциированы с организацией коллагеновых волокон и метаболизмом эфирных липидов. Известно, что эфирные липиды связаны с агрессивностью РМЖ, рака предстательной железы и меланомы [42, 131]. Среди генов с наибольшим уровнем экспрессии обнаружены *NHS* (регулятор ремоделирования актинового цитоскелета и морфологии клеток [53]), *CNOT2-DT* (длинная некодирующая РНК PRANCR, контролирующая клеточный цикл и пролиферацию [58]), и *THBS4*, вовлеченный во взаимодействие клеток друг с другом и с внеклеточным

матриксом и обладающий проангиогенной активностью [291]. В MIEAP-позитивных клетках гиперэкспрессирующиеся гены связаны преимущественно с митофагией, которая ассоциирована с опухолевым ростом, миграцией, инвазией и метастазированием различных злокачественных новообразований [248, 313]. Среди генов с наибольшим уровнем экспрессии обнаружены *CCDC18*, функция которого не известна, и *SAMD9*, регулирующий пролиферацию клеток. Для EZR-негативных клеток характерна гиперрегуляция фагоцитоза, хемокин-опосредованного сигнального пути, синтеза и секреции различных гормонов и гиперэкспрессия генов *CD109*, *ID4*, *ST8SIA1* и *NR4A1*. Данные гены вовлечены в поддержание стволовости, промотирование ЭМП, миграции, инвазии и метастазирования опухолевых клеток [89, 157, 239, 300, 355]. Таким образом, можно предположить, что прометастатическая роль экспрессии KIF14 и MIEAP и потери EZR на концах торпедоподобных структур связана с вовлеченностью данных белков в ключевые механизмы метастатического каскада.

Полученные результаты позволяют заключить, что ВОМГ РМЖ является отражением инвазивного роста опухоли и ассоциирована с метастазированием заболевания и эффективностью химиотерапии. При этом формирование различных морфологических структур, вероятно, является комплексным и пластичным процессом, в основе которого лежит ЭМП и/или стволовость, и который контролируется различными экзо- и эндогенными факторами. В целом, ВОМГ РМЖ представляет собой эффективную модель для анализа молекулярных особенностей опухолевых клеток в процессе инвазии и поиска маркеров прогрессирования заболевания и мишеней для её предотвращения.

## ВЫВОДЫ

1. Согласно конфокальной микроскопии и трёхмерной реконструкции опухолевой ткани, тубулярные, альвеолярные, солидные, трабекулярные структуры и дискретные группы, формирующие внутриопухолевую морфологическую гетерогенность инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа, являются пространственными формированиями со специфической формой и количеством опухолевых клеток.
2. Тубулярные, альвеолярные, солидные, трабекулярные структуры и дискретные группы представляют собой транскрипционно-обособленные популяции опухолевых клеток, характеризующиеся экспрессией и регуляцией как общих, так и специфических генов и сигнальных путей.
3. В альвеолярных структурах обнаружены значительная выраженность сигнальных путей лекарственной устойчивости ( $-\log_{10}(p) > 3$ ) и наибольшее количество экспрессирующихся генов химиорезистентности (70,4% (19/27)) по сравнению с тубулярными и дискретными группами опухолевых клеток (37,0% (10/27),  $p=0,014$ ). Дискретные группы опухолевых клеток характеризуются наибольшим количеством экспрессирующихся генов мезенхимального фенотипа и значительной выраженностью сигнальных путей, вовлеченных в опухолевую инвазию ( $-\log_{10}(p) > 2$ ) по сравнению с другими морфологическими структурами (80,0% (12/15) против 26,6% (4/15) – 53,3% (8/15),  $p=0,007$ ).
4. Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа не связана с хромосомными aberrациями: морфологические структуры одного типа различаются цитогенетически как в пределах разных участков одной опухоли, так и между различными опухолями молочной железы.
5. Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа связана со стволовостью:  $CD44^+CD24^-$  опухолевые стволовые клетки превалируют в



многоклеточных морфологических структурах, главным образом в альвеолярных структурах (0,13), и практически отсутствуют в дискретных группах опухолевых клеток (0,004,  $p < 0,0000001$ ).

6. Различные морфологические структуры отличаются друг от друга представленностью макрофагов ( $CD68^{+}RS1^{-}$  и  $CD68^{+}RS1^{+}$ ) и  $\alpha SMA^{+}FAP^{+}$  фибробластов в микроокружении и экспрессией генов, вовлечённых в регуляцию иммуно-воспалительных реакций. Макрофаги преобладают в микроокружении солидных структур ( $CD68^{+}RS1^{-}$ : 0,71 и  $CD68^{+}RS1^{+}$ : 0,45) и дискретных групп опухолевых клеток ( $CD68^{+}RS1^{+}$ : 0,44) по сравнению с другими морфологическими структурами ( $CD68^{+}RS1^{-}$ : 0,30-0,66 и  $CD68^{+}RS1^{+}$ : 0-0,25,  $p < 0,05$ ). Больше количество  $\alpha SMA^{+}FAP^{+}$  фибробластов обнаружено в микроокружении солидных структур (1,80) по сравнению с микроокружением тубулярных и дискретных групп (0,45 и 0,40;  $p < 0,05$ ). Экспрессия генов *CCL2* и *TGFb2* значимо выше в дискретных группах опухолевых клеток (*CCL2*: 3,54 и *TGFb2*: 3,28) и трабекулярных структурах (*TGFb2*: 3,23) по сравнению с нормальным эпителием молочной железы ( $p < 0,05$ ).

7. Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность ассоциирована с эффективностью неoadьювантной химиотерапии (НАХТ) больных инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа с сохранённой репродуктивной функцией. Альвеолярные, трабекулярные структуры и дискретные группы опухолевых клеток чаще обнаруживаются в опухолевой ткани при отсутствии ответа на НАХТ, чем при его наличии: 58,4% против 41,1%,  $p = 0,020$ ; 74,0% против 42,1%,  $p < 0,0001$ ; 58,4% против 41,1%,  $p = 0,020$ , соответственно.

8. Выявлена ассоциация между метастазированием инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа и внутриопухолевой морфологической гетерогенностью, зависящая от эффективности НАХТ. У больных с альвеолярными структурами и отсутствием ответа на НАХТ, а также у больных с трабекулярными структурами и ответом на НАХТ чаще

обнаруживаются гематогенные метастазы по сравнению со случаями без данных структур (58,5% против 28,6%,  $p=0,001$  и 34,3% против 9,3%,  $p=0,002$ , соответственно). Более низкие показатели безметастатической выживаемости характерны для больных с альвеолярными (HR 1,97 (1,21-3,22),  $p=0,007$ ) и трабекулярными структурами (HR 2,27 (1,21-4,28),  $p=0,012$ ).

9. Описан новый вариант инфильтративного компонента инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа, представленный торпедоподобными структурами. У пациентов с позитивной экспрессией KIF14 и MIEAP и отсутствием экспрессии EZR на концах торпедоподобных структур чаще наблюдаются гематогенные метастазы, чем у больных с отсутствием KIF14 и MIEAP и наличием EZR в данных структурах (66,7% против 14,3%,  $p=0,005$ ; 70,0% против 12,5%,  $p=0,001$  и 73,7% против 13,3%,  $p=0,001$ ). Безметастатическая выживаемость хуже у больных с экспрессией на концах торпедоподобных структур белков KIF14 (HR 6,63 (1,50-29,29),  $p=0,013$ ), MIEAP (HR 8,09 (1,83-35,75),  $p=0,006$ ) и потерей EZR (HR 7,65 (1,72-33,93),  $p=0,007$ ).

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Анализ ВОМГ может использоваться для предсказания вероятности гематогенного метастазирования у больных РМЖ:

- у больных со стабилизацией и прогрессированием заболевания в ответ на НАХТ наличие альвеолярных структур в опухолевой ткани свидетельствует о высоком риске развития метастазов;
- у пациентов с частичной регрессией в ответ на химиотерапию присутствие трабекулярных структур указывает на высокую вероятность отдалённого метастазирования;
- вне зависимости от назначения НАХТ высокий риск гематогенного метастазирования определяется при наличии позитивной экспрессии белков KIF14 и MIEAP и негативной экспрессии белка EZR на концах торпедоподобных структур опухолевой ткани молочной железы.

## ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ДАННОЙ ТЕМЫ

Полученные результаты открывают перспективу использования внутриопухолевой морфологической гетерогенности рака молочной железы как модели для изучения механизмов пластичности, инвазии и метастазирования опухолевых клеток. В частности, представляются актуальными следующие направления исследований:

- механизмы взаимодействия клеток различных морфологических структур и их микроокружения, возможность реципрокной регуляции;
- стабильность морфологических структур, возможность перехода из одного морфологического состояния в другое;
- анализ гетерогенности стволовых признаков в различных морфологических структурах и их корреляция со степенью мезенхимальности опухолевых клеток;
- роль мутаций по типу однонуклеотидных замен, инсерций и делеций и эпигенетических нарушений в развитии внутриопухолевой морфологической гетерогенности и формировании фенотипа опухолевых клеток, составляющих морфологические структуры;
- значение амплификации miR-650, часто встречающейся в различных морфологических структурах, и амплификации гена PAX6, обнаруженной в дискретных группах опухолевых клеток, для эпителиально-мезенхимальной пластичности, инвазивного и метастатического потенциала опухолевых клеток;
- природа и место торпедоподобных структур в морфологическом континууме рака молочной железы, механизмы регуляции экспрессии метастаз-ассоциированных белков KIF14, MIEAP и EZR, в торпедоподобных структурах;
- роль генов, дифференциально-экспрессирующихся в KIF14-положительных, MIEAP-положительных и EZR-негативных опухолевых клетках торпедоподобных структур, в регуляции клеточной пластичности, инвазии и

метастазирования рака молочной железы и в качестве потенциальных терапевтических мишеней для предотвращения метастатического распространения опухолей.

## СОКРАЩЕНИЯ И УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

ВОГ – внутриопухолевая гетерогенность

ВОМГ – внутриопухолевая морфологическая гетерогенность

ИГХ – иммуногистохимия

НАХТ – неоадьювантная химиотерапия

ОСК – опухолевые стволовые клетки

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РМЖ – рак молочной железы

ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

aCGH (от англ. array comparative genome hybridization) – матричная сравнительная геномная гибридизация

SAFs (от англ. cancer-associated fibroblasts) – опухоль-ассоциированные фибробласты

САХ (от англ. cyclophosphamide, doxorubicin, capecitabine) – режим полихимиотерапии, включающий циклофосфан, доксорубицин и капецитабин

CMF (от англ. cyclophosphamide, methotrexate, 5-fluorouracil) – режим полихимиотерапии, включающий циклофосфан, метотрексат и 5-фторурацил

CMX (от англ. cyclophosphamide, methotrexate, capecitabine) – режим полихимиотерапии, включающий циклофосфан, метотрексат и капецитабин

ER (от англ. estrogen receptors) – рецепторы к эстрогенам

ФАС (от англ. 5-fluorouracil, doxorubicin, cyclophosphamide) – режим полихимиотерапии, включающий 5-фторурацил, доксорубицин и циклофосфан

FFPE (от англ. formalin-fixed paraffin-embedded) – фиксация в формалине с последующей заливкой в парафин

FISH (от англ. fluorescence in situ hybridization) – флюоресцентная гибридизация in situ

IC NST (от англ. invasive carcinoma of no special type) – инвазивная карцинома неспецифического типа

HR (от англ. hazard ratio) – отношение рисков

OR (от англ. odds ratio) – отношение шансов

PR (от англ. progesterone receptors) – рецепторы к прогестерону

RR (от англ. relative risk) – относительный риск

TAMs (от англ. tumor-associated macrophages) – опухоль-ассоциированные макрофаги

TNM (от англ. tumor-node-metastasis) – классификация стадийности рака, основанная на определении размера опухоли, наличия лимфогенного и гематогенного метастазирования

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрова А.Ю. Пластичность механизмов миграции опухолевых клеток: приобретение новых свойств или возврат к "хорошо забытым" старым? // Биохимия. – 2014. – Т. 79. – № 9. – С. 1169-1187.
2. Вторушин С.В. Клинико-морфологические особенности мультицентрического роста и рецидивирования при раке молочной железы // дис. ... докт. мед. наук: 14.00.14. – Томск, 2012. – 363 с.
3. Вторушин С.В., Завьялова М.В., Перельмутер В.М. и др. Морфологические особенности рака молочной железы при возникновении рецидивов заболевания у больных с разным состоянием менструальной функции // Сибирский онкологический журнал. – 2010. – Т. 1. – С. 40-44.
4. Геращенко Т.С., Денисов Е.В., Завьялова М.В. и др. Способ прогнозирования гематогенного метастазирования при инвазивной карциноме неспецифического типа молочной железы у пациенток с хорошим ответом на неоадьювантную химиотерапию // пат. 2627649 Российская Федерация // 2017. Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Томский научно-исследовательский институт онкологии", - № 2016120473; заявл. 25.05.2016; опубл. 09.08.2017 Бюл. № 22.
5. Денисов Е.В., Геращенко Т.С., Завьялова М.В. и др. Способ прогнозирования гематогенного метастазирования при инвазивной карциноме неспецифического типа молочной железы у пациенток с плохим ответом на неоадьювантную химиотерапию // пат. 2623150 Российская Федерация // 2017. Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Томский научно-исследовательский институт онкологии", - № 2016120477; заявл. 25.05.2016; опубл. 22.06.2017 Бюл. № 18.
6. Завьялова М.В. Взаимосвязь морфологического фенотипа опухоли, лимфогенного и гематогенного метастазирования при инфильтрирующем протоковом раке молочной железы: // дис. ... докт. мед. наук: 14.00.14. – Томск, 2009. – 294 с.



7. Завьялова М.В., Крахмаль Н.В., Фесик Е.А. и др. Клинико-морфологическая характеристика билатерального рака молочных желез // Сибирский онкологический журнал. – 2015. – Т. 6. – С. 26-32.
8. Завьялова М.В., Литвяков Н.В., Гарбуков Е.Ю. и др. Взаимосвязь чувствительности опухоли к неoadьювантной химиотерапии с морфологическим строением первичного опухолевого узла при уницентрическом инфильтрирующем протоковом раке молочной железы // Сибирский онкологический журнал. – 2008. – Т. 6. – С. 30-34.
9. Завьялова М.В., Перельмутер В.М., Слонимская Е.М. и др. Зависимость лимфогенного метастазирования от морфологического строения первичного опухолевого узла при уницентрическом инфильтрирующем протоковом раке молочной железы у больных с разным состоянием менструальной функции // Сибирский онкологический журнал. – 2008. – Т. 3. – С. 5-9.
10. Завьялова М.В., Перельмутер В.М., Слонимская Е.М. и др. Сопряженность лимфогенного метастазирования и гистологического строения инфильтративного компонента протокового рака молочной железы // Сибирский онкологический журнал. – 2006. – Т. 1. – С. 32-35.
11. Завьялова М.В., Шведова М.В., Перельмутер В.М. и др. Клинико-морфологические особенности билатерального инвазивного протокового рака молочных желез // Сибирский онкологический журнал. – 2010. – Т. 6. – С. 17-21.
12. Ивлева А.Г., Крамчанинов М.М., Алексахина С.Н. и др. Предиктивная роль амплификаций генов CCND1, FGFR1 и мутаций PIK3CA при гормонотерапии первично-метастатического рака молочной железы // Вопросы онкологии. – 2021. – Т. 67. – № 5. – С. 646-657.
13. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность) – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, – 2019. – илл. – 250 с.

14. Новик А.В., Моисеенко В.М. Теоретические предпосылки адъювантной терапии злокачественных опухолей // Практическая онкология. – 2007. – Т. 8. – № 3. – С. 109-117.
15. Перельмутер В.М., Вторушин С.В., Одинцов Ю.Н. и др. Особенности воспалительной инфильтрации в строме инвазивного протокового рака молочной железы при развитии рецидивов // Сибирский онкологический журнал. – 2010. – Т. 5. – С. 11-16.
16. Перельмутер В.М., Завьялова М.В., Вторушин С.В. и др. Генетические и клиничко-патологические особенности рака молочной железы у больных с сохраненной менструальной функцией и в менопаузе // Успехи геронтологии. – 2008. – Т. 21. – № 4. – С. 643–653.
17. Перельмутер В.М., Завьялова М.В., Вторушин С.В. и др. Взаимосвязь морфологической гетерогенности инфильтрирующего протокового рака молочной железы с различными формами опухолевой прогрессии // Сибирский онкологический журнал. – 2007. – Т. 3. – С. 58-63.
18. Перельмутер В.М., Завьялова М.В., Слонимская Е.М. и др. Особенности гематогенного метастазирования при раке молочной железы в зависимости от гистологического строения опухоли // Сибирский онкологический журнал. – 2006. – Т. 3. – С. 29-33.
19. Рукша Т.Г., Сергеева Е.Ю., Фефелова Ю.А. и др. Значение мутаций гена С-KIT в диагностике и прогнозе течения злокачественных опухолей // Архив патологии. – 2021. – Т. 83. – № 4. – С. 61-68.
20. Скрябин Н.А., Лебедев И.Н., Толмачева Е.Н. и др. Эпигенетика процесса раннего лимфогенного метастазирования при раке молочной железы // Вопросы онкологии. – 2011. – Т. 57. – № 6. – С. 717-721.
21. Скрябин Н.А., Толмачева Е.Н., Лебедев И.Н. и др. Динамика аномалий метилирования функциональных групп генов при развитии рака молочной железы // Молекулярная биология. – 2013. – Т. 47. – № 2. – С. 302-310.

22. Чикина А.С., Александрова А.Ю. Метастазирование: клеточные механизмы и их регуляция // Молекулярная биология. – 2014. – Т. 48. – № 2. – С. 195-213.
23. Aceto N., Bardia A., Miyamoto D.T., et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis // Cell. – 2014. – Vol. 158. – № 5. – P. 1110-1122.
24. Ahmed S.M., Theriault B.L., Uppalapati M., et al. KIF14 negatively regulates Rap1a-Radil signaling during breast cancer progression // J Cell Biol. – 2012. – Vol. 199. – № 6. – P. 951-967.
25. Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A., et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2003. – Vol. 100. – № 7. – P. 3983-3988.
26. Alishekevitz D., Gingis-Velitski S., Kaidar-Person O., et al. Macrophage-Induced Lymphangiogenesis and Metastasis following Paclitaxel Chemotherapy Is Regulated by VEGFR3 // Cell Rep. – 2016. – Vol. 17. – № 5. – P. 1344-1356.
27. Almendro V., Marusyk A., Polyak K. Cellular heterogeneity and molecular evolution in cancer // Annu Rev Pathol. – 2013. – Vol. 8. – P. 277-302.
28. Amado R.G., Wolf M., Peeters M., et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer // J Clin Oncol. – 2008. – Vol. 26. – № 10. – P. 1626-1634.
29. Amit-Cohen B.C., Rahat M.M., Rahat M.A. Tumor cell-macrophage interactions increase angiogenesis through secretion of EMMPRIN // Front Physiol. – 2013. – Vol. 4. – P. 178.
30. Andor N., Graham T.A., Jansen M., et al. Pan-cancer analysis of the extent and consequences of intratumor heterogeneity // Nat Med. – 2015. – Vol. 22. – № 1. – P. 105-113.
31. Aoki T., Nishita M., Sonoda J., et al. Intraflagellar transport 20 promotes collective cancer cell invasion by regulating polarized organization of Golgi-associated microtubules // Cancer Sci. – 2019. – Vol. 110. – № 4. – P. 1306-1316.

32. Aras S., Zaidi M.R. TAMEless traitors: macrophages in cancer progression and metastasis // *Br J Cancer*. – 2017. – Vol. 117. – № 11. – P. 1583-1591.
33. Arora S., Bisanz K.M., Peralta L.A., et al. RNAi screening of the kinome identifies modulators of cisplatin response in ovarian cancer cells // *Gynecol Oncol*. – 2010. – Vol. 118. – № 3. – P. 220-227.
34. Assenov Y., Brocks D., Gerhauser C. Intratumor heterogeneity in epigenetic patterns // *Semin Cancer Biol*. – 2018. – Vol. 51. – P. 12-21.
35. Atashzar M.R., Baharlou R., Karami J., et al. Cancer stem cells: A review from origin to therapeutic implications // *J Cell Physiol*. – 2020. – Vol. 235. – № 2. – P. 790-803.
36. Au S.H., Storey B.D., Moore J.C., et al. Clusters of circulating tumor cells traverse capillary-sized vessels // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2016. – Vol. 113. – № 18. – P. 4947-4952.
37. Backer J.M. The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34 // *Biochem J*. – 2008. – Vol. 410. – № 1. – P. 1-17.
38. Bakir B., Chiarella A.M., Pitarresi J.R., et al. EMT, MET, Plasticity, and Tumor Metastasis // *Trends Cell Biol*. – 2020. – Vol. 30. – № 10. – P. 764-776.
39. Balcerak A., Trebinska-Stryjewska A., Wakula M., et al. HAX1 impact on collective cell migration, cell adhesion, and cell shape is linked to the regulation of actomyosin contractility // *Mol Biol Cell*. – 2019. – Vol. 30. – № 25. – P. 3024-3036.
40. Balkwill F.R., Capasso M., Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance // *J Cell Sci*. – 2012. – Vol. 125. – № Pt 23. – P. 5591-5596.
41. Barranco S.C., Ho D.H., Drewinko B., et al. Differential sensitivities of human melanoma cells grown in vitro to arabinosylcytosine // *Cancer Res*. – 1972. – Vol. 32. – № 12. – P. 2733-2736.
42. Benjamin D.I., Cozzo A., Ji X., et al. Ether lipid generating enzyme AGPS alters the balance of structural and signaling lipids to fuel cancer pathogenicity // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2013. – Vol. 110. – № 37. – P. 14912-14917.

43. Bielas J.H., Loeb K.R., Rubin B.P., et al. Human cancers express a mutator phenotype // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2006. – Vol. 103. – № 48. – P. 18238-18242.
44. Bignold L.P., Coghlan B.L.D., Jersmann H.P.A. Hansemann's ideas of the nature of cancer: description and analysis. David Paul von Hansemann: Contributions to Oncology eds). Birkhäuser Basel:2007, P. 75-90.
45. Binder A., Bockmayr M., Hägele M., et al. Morphological and molecular breast cancer profiling through explainable machine learning // *Nature Machine Intelligence.* – 2021. – Vol. 3. – № 4. – P. 355-366.
46. Biswas A., De S. Drivers of dynamic intratumor heterogeneity and phenotypic plasticity // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2021. – Vol. 320. – № 5. – P. C750-C760.
47. Bloom H.J., Richardson W.W. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years // *Br J Cancer.* – 1957. – Vol. 11. – № 3. – P. 359-377.
48. Bokhorst J.M., Blank A., Lugli A., et al. Assessment of individual tumor buds using keratin immunohistochemistry: moderate interobserver agreement suggests a role for machine learning // *Mod Pathol.* – 2020. – Vol. 33. – № 5. – P. 825-833.
49. Bosman F.T., Carneiro F., Hruban R.H., et al. WHO Classification of Tumours of the Digestive System. IARC Press: Lyon, France, 2010.
50. Bouhrel M.A., Derudas B., Rigamonti E., et al. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties // *Cell Metab.* – 2007. – Vol. 6. – № 2. – P. 137-143.
51. Bracci L., Schiavoni G., Sistigu A., et al. Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer // *Cell Death Differ.* – 2014. – Vol. 21. – № 1. – P. 15-25.
52. Brady S.W., Ma X., Bahrami A., et al. The Clonal Evolution of Metastatic Osteosarcoma as Shaped by Cisplatin Treatment // *Mol Cancer Res.* – 2019. – Vol. 17. – № 4. – P. 895-906.

53. Brooks S.P., Coccia M., Tang H.R., et al. The Nance-Horan syndrome protein encodes a functional WAVE homology domain (WHD) and is important for coordinating actin remodelling and maintaining cell morphology // *Hum Mol Genet.* – 2010. – Vol. 19. – № 12. – P. 2421-2432.
54. Buldakov M., Zavyalova M., Krakhmal N., et al. CD68+, but not stabilin-1+ tumor associated macrophages in gaps of ductal tumor structures negatively correlate with the lymphatic metastasis in human breast cancer // *Immunobiology.* – 2017. – Vol. 222. – № 1. – P. 31-38.
55. Buracco S., Claydon S., Insall R. Control of actin dynamics during cell motility // *F1000Res.* – 2019. – Vol. 8. – P. F1000 Faculty Rev-1977.
56. Burrell R.A., McGranahan N., Bartek J., et al. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution // *Nature.* – 2013. – Vol. 501. – № 7467. – P. 338-345.
57. Bychkov D., Linder N., Tiulpin A., et al. Deep learning identifies morphological features in breast cancer predictive of cancer ERBB2 status and trastuzumab treatment efficacy // *Sci Rep.* – 2021. – Vol. 11. – № 1. – P. 4037.
58. Cai P., Otten A.B.C., Cheng B., et al. A genome-wide long noncoding RNA CRISPRi screen identifies PRANCR as a novel regulator of epidermal homeostasis // *Genome Res.* – 2020. – Vol. 30. – № 1. – P. 22-34.
59. Carlisle J.A., Swanson W.J. Molecular mechanisms and evolution of fertilization proteins // *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* – 2021. – Vol. 336. – № 8. – P. 652-665.
60. Carter J.L., Hege K., Yang J., et al. Targeting multiple signaling pathways: the new approach to acute myeloid leukemia therapy // *Signal Transduct Target Ther.* – 2020. – Vol. 5. – № 1. – P. 288.
61. Castro-Castro A., Marchesin V., Monteiro P., et al. Cellular and Molecular Mechanisms of MT1-MMP-Dependent Cancer Cell Invasion // *Annu Rev Cell Dev Biol.* – 2016. – Vol. 32. – P. 555-576.
62. Cavnar P.J., Berthier E., Beebe D.J., et al. Hax1 regulates neutrophil adhesion and motility through RhoA // *J Cell Biol.* – 2011. – Vol. 193. – № 3. – P. 465-473.

63. Chandler C., Liu T., Buckanovich R., et al. The double edge sword of fibrosis in cancer // *Transl Res.* – 2019. – Vol. 209. – P. 55-67.
64. Chang Y.T., Peng H.Y., Hu C.M., et al. Pancreatic cancer-derived small extracellular vesical Ezrin regulates macrophage polarization and promotes metastasis // *Am J Cancer Res.* – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 12-37.
65. Chapman A., Fernandez del Ama L., Ferguson J., et al. Heterogeneous tumor subpopulations cooperate to drive invasion // *Cell Rep.* – 2014. – Vol. 8. – № 3. – P. 688-695.
66. Chaturvedi S., Hoffman R.M., Bertino J.R. Exploiting methionine restriction for cancer treatment // *Biochem Pharmacol.* – 2018. – Vol. 154. – P. 170-173.
67. Chen Y., Song Y., Du W., et al. Tumor-associated macrophages: an accomplice in solid tumor progression // *J Biomed Sci.* – 2019. – Vol. 26. – № 1. – P. 78.
68. Cheng C., Wu X., Shen Y., et al. KIF14 and KIF23 Promote Cell Proliferation and Chemoresistance in HCC Cells, and Predict Worse Prognosis of Patients with HCC // *Cancer Manag Res.* – 2020. – Vol. 12. – P. 13241-13257.
69. Cheung K.J., Padmanaban V., Silvestri V., et al. Polyclonal breast cancer metastases arise from collective dissemination of keratin 14-expressing tumor cell clusters // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2016. – Vol. 113. – № 7. – P. E854-863.
70. Clark A.G., Vignjevic D.M. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment // *Curr Opin Cell Biol.* – 2015. – Vol. 36. – P. 13-22.
71. Coates A.S., Winer E.P., Goldhirsch A., et al. Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015 // *Ann Oncol.* – 2015. – Vol. 26. – № 8. – P. 1533-1546.
72. Commander R., Wei C., Sharma A., et al. Subpopulation targeting of pyruvate dehydrogenase and GLUT1 decouples metabolic heterogeneity during collective cancer cell invasion // *Nat Commun.* – 2020. – Vol. 11. – № 1. – P. 1533.

73. Cook K.L., Shajahan A.N., Clarke R. Autophagy and endocrine resistance in breast cancer // *Expert Rev Anticancer Ther.* – 2011. – Vol. 11. – № 8. – P. 1283-1294.
74. Corson T.W., Gallie B.L. KIF14 mRNA expression is a predictor of grade and outcome in breast cancer // *Int J Cancer.* – 2006. – Vol. 119. – № 5. – P. 1088-1094.
75. Costa A., Kieffer Y., Scholer-Dahirel A., et al. Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer // *Cancer Cell.* – 2018. – Vol. 33. – № 3. – P. 463-479.
76. Cui T., Yang L., Ma Y., et al. Desmocollin 3 has a tumor suppressive activity through inhibition of AKT pathway in colorectal cancer // *Exp Cell Res.* – 2019. – Vol. 378. – № 2. – P. 124-130.
77. D'Amico F., Skarmoutsou E., Libra M. The S100A7 nuclear interactors in autoimmune diseases: a coevolutionary study in mammals // *Immunogenetics.* – 2022. – Vol. 74. – № 3. – P. 271-284.
78. Dagogo-Jack I., Shaw A.T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies // *Nat Rev Clin Oncol.* – 2018. – Vol. 15. – № 2. – P. 81-94.
79. De S. Somatic mosaicism in healthy human tissues // *Trends Genet.* – 2011. – Vol. 27. – № 6. – P. 217-223.
80. Delhorme J.B., Bersuder E., Terziolo C., et al. CDX2 controls genes involved in the metabolism of 5-fluorouracil and is associated with reduced efficacy of chemotherapy in colorectal cancer // *Biomed Pharmacother.* – 2022. – Vol. 147. – P. 112630.
81. DeNardo D.G., Barreto J.B., Andreu P., et al. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages // *Cancer Cell.* – 2009. – Vol. 16. – № 2. – P. 91-102.
82. D'Entropio S.C., Leshchiner I., Haase K., et al. Characterizing genetic intra-tumor heterogeneity across 2,658 human cancer genomes // *Cell.* – 2021. – Vol. 184. – № 8. – P. 2239-2254 e2239.



83. Devarajan E., Sahin A.A., Chen J.S., et al. Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance // *Oncogene*. – 2002. – Vol. 21. – № 57. – P. 8843-8851.
84. Dexter D.L., Kowalski H.M., Blazar B.A., et al. Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor // *Cancer Res*. – 1978. – Vol. 38. – № 10. – P. 3174-3181.
85. Di Lorenzo A., Bolli E., Tarone L., et al. Toll-Like Receptor 2 at the Crossroad between Cancer Cells, the Immune System, and the Microbiota // *Int J Mol Sci*. – 2020. – Vol. 21. – № 24. – P. 9418.
86. Dimitrios M., Lim M., Ha P., et al. Use of the ZMIZ1 marker in directing treatment and predicting survival in cancer. United States Patent 10174384, 2019.
87. Dobin A., Davis C.A., Schlesinger F., et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner // *Bioinformatics*. – 2013. – Vol. 29. – № 1. – P. 15-21.
88. Dontu G., Al-Hajj M., Abdallah W.M., et al. Stem cells in normal breast development and breast cancer // *Cell Prolif*. – 2003. – Vol. 36 Suppl 1. – P. 59-72.
89. Donzelli S., Milano E., Pruszko M., et al. Expression of ID4 protein in breast cancer cells induces reprogramming of tumour-associated macrophages // *Breast Cancer Res*. – 2018. – Vol. 20. – № 1. – P. 59.
90. Drapkin B.J., Minna J.D. Studying Lineage Plasticity One Cell at a Time // *Cancer Cell*. – 2020. – Vol. 38. – № 2. – P. 150-152.
91. Drasin D.J., Robin T.P., Ford H.L. Breast cancer epithelial-to-mesenchymal transition: examining the functional consequences of plasticity // *Breast Cancer Res*. – 2011. – Vol. 13. – № 6. – P. 226.
92. Duda D.G., Duyverman A.M., Kohno M., et al. Malignant cells facilitate lung metastasis by bringing their own soil // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2010. – Vol. 107. – № 50. – P. 21677-21682.
93. Durgan J., Florey O. Cancer cell cannibalism: Multiple triggers emerge for entosis // *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. – 2018. – Vol. 1865. – № 6. – P. 831-841.

94. Dyba T., Randi G., Bray F., et al. The European cancer burden in 2020: Incidence and mortality estimates for 40 countries and 25 major cancers // *Eur J Cancer*. – 2021. – Vol. 157. – P. 308-347.
95. Ellsworth R.E., Blackburn H.L., Shriver C.D., et al. Molecular heterogeneity in breast cancer: State of the science and implications for patient care // *Semin Cell Dev Biol*. – 2017. – Vol. 64. – P. 65-72.
96. Fais S., Overholtzer M. Cell-in-cell phenomena, cannibalism, and autophagy: is there a relationship? // *Cell Death Dis*. – 2018. – Vol. 9. – № 2. – P. 95.
97. Field M.G., Durante M.A., Anbunathan H., et al. Punctuated evolution of canonical genomic aberrations in uveal melanoma // *Nat Commun*. – 2018. – Vol. 9. – № 1. – P. 116.
98. Fiori M.E., Di Franco S., Villanova L., et al. Cancer-associated fibroblasts as abettors of tumor progression at the crossroads of EMT and therapy resistance // *Mol Cancer*. – 2019. – Vol. 18. – № 1. – P. 70.
99. Foster B.M., Zaidi D., Young T.R., et al. CD117/c-kit in Cancer Stem Cell-Mediated Progression and Therapeutic Resistance // *Biomedicines*. – 2018. – Vol. 6. – № 1. – P. 31.
100. Freed D., Stevens E.L., Pevsner J. Somatic mosaicism in the human genome // *Genes (Basel)*. – 2014. – Vol. 5. – № 4. – P. 1064-1094.
101. Friedl P., Alexander S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity // *Cell*. – 2011. – Vol. 147. – № 5. – P. 992-1009.
102. Friedl P., Locker J., Sahai E., et al. Classifying collective cancer cell invasion // *Nat Cell Biol*. – 2012. – Vol. 14. – № 8. – P. 777-783.
103. Friedl P., Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms // *Nat Rev Cancer*. – 2003. – Vol. 3. – № 5. – P. 362-374.
104. Friedman G., Levi-Galibov O., David E., et al. Cancer-associated fibroblast compositions change with breast cancer progression linking the ratio of S100A4(+) and PDPN(+) CAFs to clinical outcome // *Nat Cancer*. – 2020. – Vol. 1. – № 7. – P. 692-708.

105. Futamura M., Tokumaru Y., Takabe K., et al. MIEAP, a p53-downstream gene, is associated with suppression of breast cancer cell proliferation and better survival // *Am J Cancer Res.* – 2021. – Vol. 11. – № 12. – P. 6060-6073.
106. Gao L., Zhang W., Zhong W.Q., et al. Tumor associated macrophages induce epithelial to mesenchymal transition via the EGFR/ERK1/2 pathway in head and neck squamous cell carcinoma // *Oncol Rep.* – 2018. – Vol. 40. – № 5. – P. 2558-2572.
107. Gaowa S., Futamura M., Tsuneki M., et al. Possible role of p53/Mieap-regulated mitochondrial quality control as a tumor suppressor in human breast cancer // *Cancer Sci.* – 2018. – Vol. 109. – № 12. – P. 3910-3920.
108. Garnett M.J., Mansfeld J., Godwin C., et al. UBE2S elongates ubiquitin chains on APC/C substrates to promote mitotic exit // *Nat Cell Biol.* – 2009. – Vol. 11. – № 11. – P. 1363-1369.
109. Gentleman R.C., Carey V.J., Bates D.M., et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics // *Genome Biol.* – 2004. – Vol. 5. – № 10. – P. R80.
110. Gerashchenko T.S., Novikov N.M., Krakhmal N.V., et al. Markers of Cancer Cell Invasion: Are They Good Enough? // *J Clin Med.* – 2019. – Vol. 8. – № 8. – P. 1092.
111. Gerlinger M., Rowan A.J., Horswell S., et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing // *N Engl J Med.* – 2012. – Vol. 366. – № 10. – P. 883-892.
112. Geyer F.C., Weigelt B., Natrajan R., et al. Molecular analysis reveals a genetic basis for the phenotypic diversity of metaplastic breast carcinomas // *J Pathol.* – 2010. – Vol. 220. – № 5. – P. 562-573.
113. Ghaffari A., Hoskin V., Turashvili G., et al. Intravital imaging reveals systemic ezrin inhibition impedes cancer cell migration and lymph node metastasis in breast cancer // *Breast Cancer Res.* – 2019. – Vol. 21. – № 1. – P. 12.

114. Gifford V., Itoh Y. MT1-MMP-dependent cell migration: proteolytic and non-proteolytic mechanisms // *Biochem Soc Trans.* – 2019. – Vol. 47. – № 3. – P. 811-826.
115. Glentis A., Oertle P., Mariani P., et al. Cancer-associated fibroblasts induce metalloprotease-independent cancer cell invasion of the basement membrane // *Nat Commun.* – 2017. – Vol. 8. – № 1. – P. 924.
116. Godicelj A., Blake R., Giorgi F.M., et al. ZMIZ1 – A novel Estrogen Receptor co-activator that enhances the growth of ER+ breast cancer // *bioRxiv.* – 2019. – doi: 10.1101/789610.
117. Gomez C., Hartung N. Stochastic and Deterministic Models for the Metastatic Emission Process: Formalisms and Crosslinks // *Methods Mol Biol.* – 2018. – Vol. 1711. – P. 193-224.
118. Gomez K., Miura S., Huuki L.A., et al. Somatic evolutionary timings of driver mutations // *BMC Cancer.* – 2018. – Vol. 18. – № 1. – P. 85.
119. Graham K., Unger E. Overcoming tumor hypoxia as a barrier to radiotherapy, chemotherapy and immunotherapy in cancer treatment // *Int J Nanomedicine.* – 2018. – Vol. 13. – P. 6049-6058.
120. Graziani V., Rodriguez-Hernandez I., Maiques O., et al. The amoeboid state as part of the epithelial-to-mesenchymal transition programme // *Trends Cell Biol.* – 2022. – Vol. 32. – № 3. – P. 228-242.
121. Greaves M., Maley C.C. Clonal evolution in cancer // *Nature.* – 2012. – Vol. 481. – № 7381. – P. 306-313.
122. Grigore A.D., Jolly M.K., Jia D., et al. Tumor Budding: The Name is EMT. Partial EMT // *J Clin Med.* – 2016. – Vol. 5. – № 5. – P. 51.
123. Grosse-Wilde A., Fouquier d'Herouel A., McIntosh E., et al. Stemness of the hybrid Epithelial/Mesenchymal State in Breast Cancer and Its Association with Poor Survival // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10. – № 5. – P. e0126522.
124. Gruneberg U., Neef R., Li X., et al. KIF14 and citron kinase act together to promote efficient cytokinesis // *J Cell Biol.* – 2006. – Vol. 172. – № 3. – P. 363-372.

125. Grzywa T.M., Paskal W., Wlodarski P.K. Intratumor and Intertumor Heterogeneity in Melanoma // *Transl Oncol.* – 2017. – Vol. 10. – № 6. – P. 956-975.
126. Guan Y., Yang W., Zhang F., et al. CircPOSTN competes with KIF1B for miR-185-5p binding sites to promote the tumorigenesis of glioma // *Brain Res Bull.* – 2022. – Vol. 180. – P. 86-96.
127. Guha M., Srinivasan S., Ruthel G., et al. Mitochondrial retrograde signaling induces epithelial-mesenchymal transition and generates breast cancer stem cells // *Oncogene.* – 2014. – Vol. 33. – № 45. – P. 5238-5250.
128. Guo H., Golczer G., Wittner B.S., et al. NR4A1 regulates expression of immediate early genes, suppressing replication stress in cancer // *Mol Cell.* – 2021. – Vol. 81. – № 19. – P. 4041-4058 e4015.
129. Guo M., Peng Y., Gao A., et al. Epigenetic heterogeneity in cancer // *Biomark Res.* – 2019. – Vol. 7. – P. 23.
130. Guo W., Zhang J., Zhou Y., et al. GPR160 is a potential biomarker associated with prostate cancer // *Signal Transduct Target Ther.* – 2021. – Vol. 6. – № 1. – P. 241.
131. Hahnefeld L., Gruber L., Schomel N., et al. Ether lipid and sphingolipid expression patterns are estrogen receptor-dependently altered in breast cancer cells // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2020. – Vol. 127. – P. 105834.
132. Hakansson L., Trope C. On the presence within tumours of clones that differ in sensitivity to cytostatic drugs // *Acta Pathol Microbiol Scand A.* – 1974. – Vol. 82. – № 1. – P. 35-40.
133. Han Y., Guo W., Ren T., et al. Tumor-associated macrophages promote lung metastasis and induce epithelial-mesenchymal transition in osteosarcoma by activating the COX-2/STAT3 axis // *Cancer Lett.* – 2019. – Vol. 440-441. – P. 116-125.
134. Haupt B., Ro J.Y., Schwartz M.R. Basal-like breast carcinoma: a phenotypically distinct entity // *Arch Pathol Lab Med.* – 2010. – Vol. 134. – № 1. – P. 130-133.

135. Heng Y.J., Lester S.C., Tse G.M., et al. The molecular basis of breast cancer pathological phenotypes // *J Pathol.* – 2017. – Vol. 241. – № 3. – P. 375-391.
136. Heusinkveld M., van der Burg S.H. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers // *J Transl Med.* – 2011. – Vol. 9. – P. 216.
137. Hoadley K.A., Siegel M.B., Kanchi K.L., et al. Tumor Evolution in Two Patients with Basal-like Breast Cancer: A Retrospective Genomics Study of Multiple Metastases // *PLoS Med.* – 2016. – Vol. 13. – № 12. – P. e1002174.
138. Honeth G., Bendahl P.O., Ringner M., et al. The CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> phenotype is enriched in basal-like breast tumors // *Breast Cancer Res.* – 2008. – Vol. 10. – № 3. – P. R53.
139. Hosoya N., Miyagawa K. Synaptonemal complex proteins modulate the level of genome integrity in cancers // *Cancer Sci.* – 2021. – Vol. 112. – № 3. – P. 989-996.
140. Hou J.M., Krebs M.G., Lancashire L., et al. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer // *J Clin Oncol.* – 2012. – Vol. 30. – № 5. – P. 525-532.
141. Hu Z., Curtis C. Looking backward in time to define the chronology of metastasis // *Nat Commun.* – 2020. – Vol. 11. – № 1. – P. 3213.
142. Hu Z., Ding J., Ma Z., et al. Quantitative evidence for early metastatic seeding in colorectal cancer // *Nat Genet.* – 2019. – Vol. 51. – № 7. – P. 1113-1122.
143. Hu Z., Li Z., Ma Z., et al. Multi-cancer analysis of clonality and the timing of systemic spread in paired primary tumors and metastases // *Nat Genet.* – 2020. – Vol. 52. – № 7. – P. 701-708.
144. Huang M., Fu M., Wang J., et al. TGF-beta1-activated cancer-associated fibroblasts promote breast cancer invasion, metastasis and epithelial-mesenchymal transition by autophagy or overexpression of FAP-alpha // *Biochem Pharmacol.* – 2021. – Vol. 188. – P. 114527.

145. Huang Y., Anderle P., Bussey K.J., et al. Membrane transporters and channels: role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance // *Cancer Res.* – 2004. – Vol. 64. – № 12. – P. 4294-4301.
146. Humphrey P.A. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate // *Mod Pathol.* – 2004. – Vol. 17. – № 3. – P. 292-306.
147. Itoh G., Chida S., Yanagihara K., et al. Cancer-associated fibroblasts induce cancer cell apoptosis that regulates invasion mode of tumours // *Oncogene.* – 2017. – Vol. 36. – № 31. – P. 4434-4444.
148. Iwaya K., Norio K., Mukai K. Coexpression of Arp2 and WAVE2 predicts poor outcome in invasive breast carcinoma // *Mod Pathol.* – 2007. – Vol. 20. – № 3. – P. 339-343.
149. Jahanban-Esfahlan R., de la Guardia M., Ahmadi D., et al. Modulating tumor hypoxia by nanomedicine for effective cancer therapy // *J Cell Physiol.* – 2018. – Vol. 233. – № 3. – P. 2019-2031.
150. Janiszewska M. The microcosmos of intratumor heterogeneity: the space-time of cancer evolution // *Oncogene.* – 2020. – Vol. 39. – № 10. – P. 2031-2039.
151. Jansen M.P., Foekens J.A., van Staveren I.L., et al. Molecular classification of tamoxifen-resistant breast carcinomas by gene expression profiling // *J Clin Oncol.* – 2005. – Vol. 23. – № 4. – P. 732-740.
152. Januchowski R., Zawierucha P., Rucinski M., et al. Drug transporter expression profiling in chemoresistant variants of the A2780 ovarian cancer cell line // *Biomed Pharmacother.* – 2014. – Vol. 68. – № 4. – P. 447-453.
153. Jasra S., Anampa J. Anthracycline Use for Early Stage Breast Cancer in the Modern Era: a Review // *Curr Treat Options Oncol.* – 2018. – Vol. 19. – № 6. – P. 30.
154. Jiang Z., Liang G., Xiao Y., et al. Targeting the SLIT/ROBO pathway in tumor progression: molecular mechanisms and therapeutic perspectives // *Ther Adv Med Oncol.* – 2019. – Vol. 11. – P. 1758835919855238.

155. Jin M., Gao D., Wang R., et al. Possible involvement of TGF-beta-SMAD-mediated epithelial-mesenchymal transition in prometastatic property of PAX6 // *Oncol Rep.* – 2020. – Vol. 44. – № 2. – P. 555-564.
156. Jonasch E., Donskov F., Iliopoulos O., et al. Belzutifan for Renal Cell Carcinoma in von Hippel-Lindau Disease // *N Engl J Med.* – 2021. – Vol. 385. – № 22. – P. 2036-2046.
157. Junankar S., Baker L.A., Roden D.L., et al. ID4 controls mammary stem cells and marks breast cancers with a stem cell-like phenotype // *Nat Commun.* – 2015. – Vol. 6. – P. 6548.
158. Jung Y.Y., Kim H.M., Koo J.S. The role of cancer-associated fibroblasts in breast cancer pathobiology // *Histol Histopathol.* – 2015. – Vol. 55. – № 7-9. – P. 11700.
159. Kan J.Y., Moi S.H., Hung W.C., et al. Comprehensive Transcriptomic Analysis Identifies ST8SIA1 as a Survival-Related Sialyltransferase Gene in Breast Cancer // *Genes (Basel).* – 2020. – Vol. 11. – № 12. – P. 1436.
160. Karagiannis G.S., Poutahidis T., Erdman S.E., et al. Cancer-associated fibroblasts drive the progression of metastasis through both paracrine and mechanical pressure on cancer tissue // *Mol Cancer Res.* – 2012. – Vol. 10. – № 11. – P. 1403-1418.
161. Kather J.N., Heij L.R., Grabsch H.I., et al. Pan-cancer image-based detection of clinically actionable genetic alterations // *Nat Cancer.* – 2020. – Vol. 1. – № 8. – P. 789-799.
162. Kavallaris M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents // *Nat Rev Cancer.* – 2010. – Vol. 10. – № 3. – P. 194-204.
163. Keats J.J., Chesi M., Egan J.B., et al. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma // *Blood.* – 2012. – Vol. 120. – № 5. – P. 1067-1076.
164. Kinsel L.B., Szabo E., Greene G.L., et al. Immunocytochemical analysis of estrogen receptors as a predictor of prognosis in breast cancer patients: comparison



with quantitative biochemical methods // *Cancer Res.* – 1989. – Vol. 49. – № 4. – P. 1052-1056.

165. Kitamura N., Nakamura Y., Miyamoto Y., et al. Miep, a p53-inducible protein, controls mitochondrial quality by repairing or eliminating unhealthy mitochondria // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6. – № 1. – P. e16060.

166. Kittaneh M., Montero A.J., Gluck S. Molecular profiling for breast cancer: a comprehensive review // *Biomark Cancer.* – 2013. – Vol. 5. – P. 61-70.

167. Konkimalla V.B., Kaina B., Efferth T. Role of transporter genes in cisplatin resistance // *In Vivo.* – 2008. – Vol. 22. – № 3. – P. 279-283.

168. Krahn M.P. Phospholipids of the Plasma Membrane - Regulators or Consequence of Cell Polarity? // *Front Cell Dev Biol.* – 2020. – Vol. 8. – P. 277.

169. Kreso A., O'Brien C.A., van Galen P., et al. Variable Clonal Repopulation Dynamics Influence Chemotherapy Response in Colorectal Cancer // *Science.* – 2012. – Vol. 339. – № 6119. – P. 543-548.

170. Kroemer G., Galluzzi L., Kepp O., et al. Immunogenic cell death in cancer therapy // *Annu Rev Immunol.* – 2013. – Vol. 31. – P. 51-72.

171. Kumar N., Cramer G.M., Dahaj S.A.Z., et al. Stochastic modeling of phenotypic switching and chemoresistance in cancer cell populations // *Sci Rep.* – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 10845.

172. Kumar S., Warrell J., Li S., et al. Passenger Mutations in More Than 2,500 Cancer Genomes: Overall Molecular Functional Impact and Consequences // *Cell.* – 2020. – Vol. 180. – № 5. – P. 915-927.e916.

173. Kzhyshkowska J., Mamidi S., Gratchev A., et al. Novel stabilin-1 interacting chitinase-like protein (SI-CLP) is up-regulated in alternatively activated macrophages and secreted via lysosomal pathway // *Blood.* – 2006. – Vol. 107. – № 8. – P. 3221-3228.

174. Laedrach C., Salhia B., Cihoric N., et al. Immunophenotypic profile of tumor buds in breast cancer // *Pathol Res Pract.* – 2018. – Vol. 214. – № 1. – P. 25-29.

175. Lakhani S.R., Ellis I.O., Schnitt S.J., et al. World Health Organization (WHO) classification of tumours of the breast. IARC Press: Lyon, France, 2012.

176. Larkin J., Ascierto P.A., Dreno B., et al. Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma // *N Engl J Med.* – 2014. – Vol. 371. – № 20. – P. 1867-1876.
177. Lee H., Park B.C., Soon Kang J., et al. MAM domain containing 2 is a potential breast cancer biomarker that exhibits tumour-suppressive activity // *Cell Prolif.* – 2020. – Vol. 53. – № 9. – P. e12883.
178. Lee S., Lee E., Ko E., et al. Tumor-associated macrophages secrete CCL2 and induce the invasive phenotype of human breast epithelial cells through upregulation of ERO1-alpha and MMP-9 // *Cancer Lett.* – 2018. – Vol. 437. – P. 25-34.
179. Lehmann S., Te Boekhorst V., Odenthal J., et al. Hypoxia Induces a HIF-1-Dependent Transition from Collective-to-Amoeboid Dissemination in Epithelial Cancer Cells // *Curr Biol.* – 2017. – Vol. 27. – № 3. – P. 392-400.
180. Leung M.L., Davis A., Gao R., et al. Single-cell DNA sequencing reveals a late-dissemination model in metastatic colorectal cancer // *Genome Res.* – 2017. – Vol. 27. – № 8. – P. 1287-1299.
181. Li B., Brady S.W., Ma X., et al. Therapy-induced mutations drive the genomic landscape of relapsed acute lymphoblastic leukemia // *Blood.* – 2020. – Vol. 135. – № 1. – P. 41-55.
182. Li N., Kong J., Lin Z., et al. Ezrin promotes breast cancer progression by modulating AKT signals // *Br J Cancer.* – 2019. – Vol. 120. – № 7. – P. 703-713.
183. Li T.F., Zeng H.J., Shan Z., et al. Overexpression of kinesin superfamily members as prognostic biomarkers of breast cancer // *Cancer Cell Int.* – 2020. – Vol. 20. – P. 123.
184. Liang F., Cao W., Wang Y., et al. The prognostic value of tumor budding in invasive breast cancer // *Pathol Res Pract.* – 2013. – Vol. 209. – № 5. – P. 269-275.
185. Liao Y., Smyth G.K., Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features // *Bioinformatics.* – 2014. – Vol. 30. – № 7. – P. 923-930.

186. Lichtenstein A.V. Genetic Mosaicism and Cancer: Cause and Effect // *Cancer Res.* – 2018. – Vol. 78. – № 6. – P. 1375-1378.
187. Lievre A., Bachet J.B., Boige V., et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab // *J Clin Oncol.* – 2008. – Vol. 26. – № 3. – P. 374-379.
188. Lim S.M., Syn N.L., Cho B.C., et al. Acquired resistance to EGFR targeted therapy in non-small cell lung cancer: Mechanisms and therapeutic strategies // *Cancer Treat Rev.* – 2018. – Vol. 65. – P. 1-10.
189. Linde N., Casanova-Acebes M., Sosa M.S., et al. Macrophages orchestrate breast cancer early dissemination and metastasis // *Nat Commun.* – 2018. – Vol. 9. – № 1. – P. 21.
190. Liu H., Liu M., He B., et al. Inhibition of USP11 sensitizes gastric cancer to chemotherapy via suppressing RhoA and Ras-mediated signaling pathways // *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* – 2022. – Vol. 46. – № 1. – P. 101779.
191. Liu L.Z., Zhou X.D., Qian G., et al. AKT1 amplification regulates cisplatin resistance in human lung cancer cells through the mammalian target of rapamycin/p70S6K1 pathway // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67. – № 13. – P. 6325-6332.
192. Liu S., Cong Y., Wang D., et al. Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts // *Stem Cell Reports.* – 2014. – Vol. 2. – № 1. – P. 78-91.
193. Liu Y., Li Y., Ou Q., et al. Acquired EGFR L718V mutation mediates resistance to osimertinib in non-small cell lung cancer but retains sensitivity to afatinib // *Lung Cancer.* – 2018. – Vol. 118. – P. 1-5.
194. Loeb L.A., Springgate C.F., Battula N. Errors in DNA replication as a basis of malignant changes // *Cancer Res.* – 1974. – Vol. 34. – № 9. – P. 2311-2321.
195. Lopez-Huerta E., Fuentes-Panana E.M. A Bioinformatic Pipeline Places STAT5A as a miR-650 Target in Poorly Differentiated Aggressive Breast Cancer // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21. – № 20. – P. 7720.

196. Losic B., Craig A.J., Villacorta-Martin C., et al. Intratumoral heterogeneity and clonal evolution in liver cancer // *Nat Commun.* – 2020. – Vol. 11. – № 1. – P. 291.
197. Love M.I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 // *Genome Biol.* – 2014. – Vol. 15. – № 12. – P. 550.
198. Lucanus A.J., Yip G.W. Kinesin superfamily: roles in breast cancer, patient prognosis and therapeutics // *Oncogene.* – 2018. – Vol. 37. – № 7. – P. 833-838.
199. Luo H., Tu G., Liu Z., et al. Cancer-associated fibroblasts: A multifaceted driver of breast cancer progression // *Cancer Lett.* – 2015. – Vol. 361. – № 2. – P. 155-163.
200. Luond F., Tiede S., Christofori G. Breast cancer as an example of tumour heterogeneity and tumour cell plasticity during malignant progression // *Br J Cancer.* – 2021. – Vol. 125. – № 2. – P. 164-175.
201. Ma J., Shayiti F., Ma J., et al. Tumor-associated macrophage-derived CCL5 promotes chemotherapy resistance and metastasis in prostatic cancer // *Cell Biol Int.* – 2021. – Vol. 45. – № 10. – P. 2054-2062.
202. Ma Q., Yu T., Ren Y.Y., et al. Overexpression of SAMD9 suppresses tumorigenesis and progression during non small cell lung cancer // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2014. – Vol. 454. – № 1. – P. 157-161.
203. Ma W., Zhang K., Bao Z., et al. SAMD9 Is Relating With M2 Macrophage and Remarkable Malignancy Characters in Low-Grade Glioma // *Front Immunol.* – 2021. – Vol. 12. – P. 659659.
204. Madan E., Peixoto M.L., Dimitrion P., et al. Cell Competition Boosts Clonal Evolution and Hypoxic Selection in Cancer // *Trends Cell Biol.* – 2020. – Vol. 30. – № 12. – P. 967-978.
205. Magnussen A.L., Mills I.G. Vascular normalisation as the stepping stone into tumour microenvironment transformation // *Br J Cancer.* – 2021. – Vol. 125. – № 3. – P. 324-336.

206. Man Y.G. Tumor cell budding from focally disrupted tumor capsules: a common pathway for all breast cancer subtype derived invasion? // *J Cancer*. – 2010. – Vol. 1. – P. 32-37.
207. Marin J.J., Briz O., Monte M.J., et al. Genetic variants in genes involved in mechanisms of chemoresistance to anticancer drugs // *Curr Cancer Drug Targets*. – 2012. – Vol. 12. – № 4. – P. 402-438.
208. Martincorena I., Fowler J.C., Wabik A., et al. Somatic mutant clones colonize the human esophagus with age // *Science*. – 2018. – Vol. 362. – № 6417. – P. 911-917.
209. Marusyk A., Almendro V., Polyak K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? // *Nat Rev Cancer*. – 2012. – Vol. 12. – № 5. – P. 323-334.
210. Marusyk A., Polyak K. Tumor heterogeneity: causes and consequences // *Biochim Biophys Acta*. – 2010. – Vol. 1805. – № 1. – P. 105-117.
211. Masoodi T., Siraj S., Siraj A.K., et al. Genetic heterogeneity and evolutionary history of high-grade ovarian carcinoma and matched distant metastases // *Br J Cancer*. – 2020. – Vol. 122. – № 8. – P. 1219-1230.
212. Mathios D., Hwang T., Xia Y., et al. Genome-wide investigation of intragenic DNA methylation identifies ZMIZ1 gene as a prognostic marker in glioblastoma and multiple cancer types // *Int J Cancer*. – 2019. – Vol. 145. – № 12. – P. 3425-3435.
213. Meyer A.S., Heiser L.M. Systems biology approaches to measure and model phenotypic heterogeneity in cancer // *Curr Opin Syst Biol*. – 2019. – Vol. 17. – P. 35-40.
214. Michor F., Polyak K. The origins and implications of intratumor heterogeneity // *Cancer Prev Res (Phila)*. – 2010. – Vol. 3. – № 11. – P. 1361-1364.
215. Miki H., Okada Y., Hirokawa N. Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function // *Trends Cell Biol*. – 2005. – Vol. 15. – № 9. – P. 467-476.

216. Milde-Langosch K., Kappes H., Riethdorf S., et al. FosB is highly expressed in normal mammary epithelia, but down-regulated in poorly differentiated breast carcinomas // *Breast Cancer Res Treat.* – 2003. – Vol. 77. – № 3. – P. 265-275.
217. Mitamura T., Watari H., Wang L., et al. Downregulation of miRNA-31 induces taxane resistance in ovarian cancer cells through increase of receptor tyrosine kinase MET // *Oncogenesis.* – 2013. – Vol. 2. – P. e40.
218. Mitrofanova I., Zavyalova M., Telegina N., et al. Tumor-associated macrophages in human breast cancer parenchyma negatively correlate with lymphatic metastasis after neoadjuvant chemotherapy // *Immunobiology.* – 2017. – Vol. 222. – № 1. – P. 101-109.
219. Modi A., Purohit P., Gadwal A., et al. In-Silico Analysis of Differentially Expressed Genes and Their Regulating microRNA Involved in Lymph Node Metastasis in Invasive Breast Carcinoma // *Cancer Invest.* – 2022. – Vol. 40. – № 1. – P. 55-72.
220. Mohamedi Y., Fontanil T., Cal S., et al. ADAMTS-12: Functions and Challenges for a Complex Metalloprotease // *Front Mol Biosci.* – 2021. – Vol. 8. – P. 686763.
221. Mok T.S., Wu Y.L., Ahn M.J., et al. Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer // *N Engl J Med.* – 2017. – Vol. 376. – № 7. – P. 629-640.
222. Mok T.S., Wu Y.L., Thongprasert S., et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma // *N Engl J Med.* – 2009. – Vol. 361. – № 10. – P. 947-957.
223. Mokhtari Y., Pourbagheri-Sigaroodi A., Zafari P., et al. Toll-like receptors (TLRs): An old family of immune receptors with a new face in cancer pathogenesis // *J Cell Mol Med.* – 2021. – Vol. 25. – № 2. – P. 639-651.
224. Molinie N., Gautreau A. The Arp2/3 Regulatory System and Its Deregulation in Cancer // *Physiol Rev.* – 2018. – Vol. 98. – № 1. – P. 215-238.

225. Mullighan C.G., Phillips L.A., Su X., et al. Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia // *Science*. – 2008. – Vol. 322. – № 5906. – P. 1377-1380.
226. Munoz M., Henderson M., Haber M., et al. Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer // *IUBMB Life*. – 2007. – Vol. 59. – № 12. – P. 752-757.
227. Muppala S., Xiao R., Gajeton J., et al. Thrombospondin-4 mediates hyperglycemia- and TGF-beta-induced inflammation in breast cancer // *International Journal of Cancer*. – 2021. – Vol. 148. – № 8. – P. 2010-2022.
228. Murciano-Goroff Y.R., Warner A.B., Wolchok J.D. The future of cancer immunotherapy: microenvironment-targeting combinations // *Cell Res*. – 2020. – Vol. 30. – № 6. – P. 507-519.
229. Na H.H., Ryu J.M., Kim K.C. Knockout of FosB gene changes drug sensitivity and invasion activity via the regulation of Bcl-2, E-cadherin, beta-catenin, and vimentin expression // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2021. – Vol. 567. – P. 131-137.
230. Nagata Y., Suzuki R. FcepsilonRI: A Master Regulator of Mast Cell Functions // *Cells*. – 2022. – Vol. 11. – № 4. – P. 622.
231. Najafi M., Hashemi Goradel N., Farhood B., et al. Macrophage polarity in cancer: A review // *J Cell Biochem*. – 2019. – Vol. 120. – № 3. – P. 2756-2765.
232. Nassar H., Wallis T., Andea A., et al. Clinicopathologic analysis of invasive micropapillary differentiation in breast carcinoma // *Mod Pathol*. – 2001. – Vol. 14. – № 9. – P. 836-841.
233. Natali F., Rancati G. The Mutator Phenotype: Adapting Microbial Evolution to Cancer Biology // *Front Genet*. – 2019. – Vol. 10. – P. 713.
234. Navin Nicholas E. Tumor Evolution in Response to Chemotherapy: Phenotype versus Genotype // *Cell Rep*. – 2014. – Vol. 6. – № 3. – P. 417-419.
235. Navin N.E., Hicks J. Tracing the tumor lineage // *Mol Oncol*. – 2010. – Vol. 4. – № 3. – P. 267-283.

236. Neophytou C.M., Panagi M., Stylianopoulos T., et al. The Role of Tumor Microenvironment in Cancer Metastasis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities // *Cancers (Basel)*. – 2021. – Vol. 13. – № 9. – P. 2053.
237. Neska-Dlugosz I., Buchholz K., Durslewicz J., et al. Prognostic Impact and Functional Annotations of KIF11 and KIF14 Expression in Patients with Colorectal Cancer // *Int J Mol Sci*. – 2021. – Vol. 22. – № 18. – P. 9732.
238. Netea-Maier R.T., Smit J.W.A., Netea M.G. Metabolic changes in tumor cells and tumor-associated macrophages: A mutual relationship // *Cancer Lett*. – 2018. – Vol. 413. – P. 102-109.
239. Nguyen K., Yan Y., Yuan B., et al. ST8SIA1 Regulates Tumor Growth and Metastasis in TNBC by Activating the FAK-AKT-mTOR Signaling Pathway // *Mol Cancer Ther*. – 2018. – Vol. 17. – № 12. – P. 2689-2701.
240. Niehr F., Eder T., Pilz T., et al. Multilayered Omics-Based Analysis of a Head and Neck Cancer Model of Cisplatin Resistance Reveals Intratumoral Heterogeneity and Treatment-Induced Clonal Selection // *Clin Cancer Res*. – 2018. – Vol. 24. – № 1. – P. 158-168.
241. Nieto M.A., Huang R.Y., Jackson R.A., et al. Emt: 2016 // *Cell*. – 2016. – Vol. 166. – № 1. – P. 21-45.
242. Nowell P.C. The clonal evolution of tumor cell populations // *Science*. – 1976. – Vol. 194. – № 4260. – P. 23-28.
243. Ohsawa S., Vaughen J., Igaki T. Cell Extrusion: A Stress-Responsive Force for Good or Evil in Epithelial Homeostasis // *Dev Cell*. – 2018. – Vol. 44. – № 3. – P. 284-296.
244. Orzan F., De Bacco F., Crisafulli G., et al. Genetic Evolution of Glioblastoma Stem-Like Cells From Primary to Recurrent Tumor // *Stem Cells*. – 2017. – Vol. 35. – № 11. – P. 2218-2228.
245. Paczkowski M., Kretschmar W.W., Markelc B., et al. Reciprocal interactions between tumour cell populations enhance growth and reduce radiation sensitivity in prostate cancer // *Commun Biol*. – 2021. – Vol. 4. – № 1. – P. 6.



246. Pandis N., Idvall I., Bardi G., et al. Correlation between karyotypic pattern and clinicopathologic features in 125 breast cancer cases // *Int J Cancer*. – 1996. – Vol. 66. – № 2. – P. 191-196.
247. Pandya P., Orgaz J.L., Sanz-Moreno V. Modes of invasion during tumour dissemination // *Mol Oncol*. – 2017. – Vol. 11. – № 1. – P. 5-27.
248. Panigrahi D.P., Praharaj P.P., Bhol C.S., et al. The emerging, multifaceted role of mitophagy in cancer and cancer therapeutics // *Semin Cancer Biol*. – 2020. – Vol. 66. – P. 45-58.
249. Pankova K., Rosel D., Novotny M., et al. The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells // *Cell Mol Life Sci*. – 2010. – Vol. 67. – № 1. – P. 63-71.
250. Papadopoulos N., Lennartsson J. The PDGF/PDGFR pathway as a drug target // *Mol Aspects Med*. – 2018. – Vol. 62. – P. 75-88.
251. Park G.B., Jeong J.Y., Kim D. Modified TLR-mediated downregulation of miR-125b-5p enhances CD248 (endosialin)-induced metastasis and drug resistance in colorectal cancer cells // *Mol Carcinog*. – 2020. – Vol. 59. – № 2. – P. 154-167.
252. Pastushenko I., Brisebarre A., Sifrim A., et al. Identification of the tumour transition states occurring during EMT // *Nature*. – 2018. – Vol. 556. – № 7702. – P. 463-468.
253. Patani N., Barbashina V., Lambros M.B., et al. Direct evidence for concurrent morphological and genetic heterogeneity in an invasive ductal carcinoma of triple-negative phenotype // *J Clin Pathol*. – 2011. – Vol. 64. – № 9. – P. 822-828.
254. Pawar N.M., Rao P. Secreted frizzled related protein 4 (sFRP4) update: A brief review // *Cell Signal*. – 2018. – Vol. 45. – P. 63-70.
255. Pelham C.J., Nagane M., Madan E. Cell competition in tumor evolution and heterogeneity: Merging past and present // *Semin Cancer Biol*. – 2020. – Vol. 63. – P. 11-18.
256. Peng J.M., Lin S.H., Yu M.C., et al. CLIC1 recruits PIP5K1A/C to induce cell-matrix adhesions for tumor metastasis // *J Clin Invest*. – 2021. – Vol. 131. – № 1. – P. e133525.

257. Perrin L., Belova E., Bayarmagnai B., et al. Invadopodia enable cooperative invasion and metastasis of breast cancer cells // *bioRxiv*. – 2022. – doi: 10.1101/2021.02.13.431047.
258. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – Vol. 29. – № 9. – P. e45.
259. Prager B.C., Xie Q., Bao S., et al. Cancer Stem Cells: The Architects of the Tumor Ecosystem // *Cell Stem Cell*. – 2019. – Vol. 24. – № 1. – P. 41-53.
260. Qian B.Z., Pollard J.W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis // *Cell*. – 2010. – Vol. 141. – № 1. – P. 39-51.
261. Qin X., Zhang P. ECRG4: a new potential target in precision medicine // *Front Med.* – 2019. – Vol. 13. – № 5. – P. 540-546.
262. Radhika V., Onesime D., Ha J.H., et al. Galpha13 stimulates cell migration through cortactin-interacting protein Hax-1 // *J Biol Chem.* – 2004. – Vol. 279. – № 47. – P. 49406-49413.
263. Raman R., Pinto C.S., Sonawane M. Polarized Organization of the Cytoskeleton: Regulation by Cell Polarity Proteins // *J Mol Biol.* – 2018. – Vol. 430. – № 19. – P. 3565-3584.
264. Ramsay A.G., Keppler M.D., Jazayeri M., et al. HS1-associated protein X-1 regulates carcinoma cell migration and invasion via clathrin-mediated endocytosis of integrin alphavbeta6 // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67. – № 11. – P. 5275-5284.
265. Rana P.S., Alkrekshi A., Wang W., et al. The Role of WAVE2 Signaling in Cancer // *Biomedicines*. – 2021. – Vol. 9. – № 9. – P. 1217.
266. Rane C.K., Minden A. P21 activated kinase signaling in cancer // *Semin Cancer Biol.* – 2019. – Vol. 54. – P. 40-49.
267. Reiter J.G., Baretta M., Gerold J.M., et al. An analysis of genetic heterogeneity in untreated cancers // *Nat Rev Cancer.* – 2019. – Vol. 19. – № 11. – P. 639-650.
268. Ren X., Kang B., Zhang Z. Understanding tumor ecosystems by single-cell sequencing: promises and limitations // *Genome Biol.* – 2018. – Vol. 19. – № 1. – P. 211.

269. Richtig K.M., Cox B.L., Salick M.R., et al. 3D collagen alignment limits protrusions to enhance breast cancer cell persistence // *Biophys J.* – 2014. – Vol. 107. – № 11. – P. 2546-2558.
270. Ritchie M.E., Phipson B., Wu D., et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – Vol. 43. – № 7. – P. e47.
271. Rodrigues-Lima F., Dairou J., Busi F., et al. Human arylamine N-acetyltransferase 1: a drug-metabolizing enzyme and a drug target? // *Curr Drug Targets.* – 2010. – Vol. 11. – № 6. – P. 759-766.
272. Rodriguez D.A., Yang J., Durante M.A., et al. Multiregional genetic evolution of metastatic uveal melanoma // *NPJ Genom Med.* – 2021. – Vol. 6. – № 1. – P. 70.
273. Roy P.G., Thompson A.M. Cyclin D1 and breast cancer // *Breast.* – 2006. – Vol. 15. – № 6. – P. 718-727.
274. Russnes H.G., Navin N., Hicks J., et al. Insight into the heterogeneity of breast cancer through next-generation sequencing // *J Clin Invest.* – 2011. – Vol. 121. – № 10. – P. 3810-3818.
275. Saatci O., Borgoni S., Akbulut O., et al. Targeting PLK1 overcomes T-DM1 resistance via CDK1-dependent phosphorylation and inactivation of Bcl-2/xL in HER2-positive breast cancer // *Oncogene.* – 2018. – Vol. 37. – № 17. – P. 2251-2269.
276. Sahoo S., Ashraf B., Duddu A.S., et al. Interconnected high-dimensional landscapes of epithelial-mesenchymal plasticity and stemness in cancer // *Clin Exp Metastasis.* – 2022. – Vol. 39. – № 2. – P. 279-290.
277. Sakamoto H., Attiyeh M.A., Gerold J.M., et al. The Evolutionary Origins of Recurrent Pancreatic Cancer // *Cancer Discov.* – 2020. – Vol. 10. – № 6. – P. 792-805.
278. Saunders N.A., Simpson F., Thompson E.W., et al. Role of intratumoural heterogeneity in cancer drug resistance: molecular and clinical perspectives // *EMBO Mol Med.* – 2012. – Vol. 4. – № 8. – P. 675-684.

279. Sebastiao A.P.M., Pareja F., Kumar R., et al. Genomic analysis of recurrences and high-grade forms of polymorphous adenocarcinoma // *Histopathology*. – 2019. – Vol. 75. – № 2. – P. 193-201.
280. Servetto A., Napolitano F., De Angelis C., et al. A review of the use of next generation sequencing methodologies to identify biomarkers of resistance to CDK4/6 inhibitors in ER+/HER2- breast cancer // *Crit Rev Oncol Hematol*. – 2021. – Vol. 157. – P. 103191.
281. Shah S.P., Morin R.D., Khattra J., et al. Mutational evolution in a lobular breast tumour profiled at single nucleotide resolution // *Nature*. – 2009. – Vol. 461. – № 7265. – P. 809-813.
282. Shapouri-Moghaddam A., Mohammadian S., Vazini H., et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease // *J Cell Physiol*. – 2018. – Vol. 233. – № 9. – P. 6425-6440.
283. Sharma G.G., Mota I., Mologni L., et al. Tumor Resistance against ALK Targeted Therapy-Where It Comes From and Where It Goes // *Cancers (Basel)*. – 2018. – Vol. 10. – № 3. – P. 62.
284. Sharma M., Li X., Wang Y., et al. hZimp10 is an androgen receptor co-activator and forms a complex with SUMO-1 at replication foci // *EMBO J*. – 2003. – Vol. 22. – № 22. – P. 6101-6114.
285. Shaw A.T., Friboulet L., Leshchiner I., et al. Resensitization to Crizotinib by the Lorlatinib ALK Resistance Mutation L1198F // *N Engl J Med*. – 2016. – Vol. 374. – № 1. – P. 54-61.
286. Shen X., Lei J., Du L. miR-31-5p may enhance the efficacy of chemotherapy with Taxol and cisplatin in TNBC // *Exp Ther Med*. – 2020. – Vol. 19. – № 1. – P. 375-383.
287. Shin Y., Han S., Chung E., et al. Intratumoral phenotypic heterogeneity as an encourager of cancer invasion // *Integr Biol (Camb)*. – 2014. – Vol. 6. – № 7. – P. 654-661.
288. Smyth G.K. *limma: Linear Models for Microarray Data*. Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor (R. Gentleman, V. J.

- Carey, W. Huber, R. A. Irizarry and S. Dudoit eds). Springer New York: New York, NY, 2005, P. 397-420.
289. Soltis A.R., Dalgard C.L., Pollard H.B., et al. MutEnricher: a flexible toolset for somatic mutation enrichment analysis of tumor whole genomes // *BMC Bioinformatics*. – 2020. – Vol. 21. – № 1. – P. 338.
290. Spankuch B., Kurunci-Csacsco E., Kaufmann M., et al. Rational combinations of siRNAs targeting Plk1 with breast cancer drugs // *Oncogene*. – 2007. – Vol. 26. – № 39. – P. 5793-5807.
291. Stenina-Adognravi O., Plow E.F. Thrombospondin-4 in tissue remodeling // *Matrix Biol*. – 2019. – Vol. 75-76. – P. 300-313.
292. Su S., Liu Q., Chen J., et al. A positive feedback loop between mesenchymal-like cancer cells and macrophages is essential to breast cancer metastasis // *Cancer Cell*. – 2014. – Vol. 25. – № 5. – P. 605-620.
293. Su Y., Zheng Q., Zhu L., et al. Functions and underlying mechanisms of miR-650 in human cancers // *Cancer Cell Int*. – 2022. – Vol. 22. – № 1. – P. 132.
294. Sun Y., Liang F., Cao W., et al. Prognostic value of poorly differentiated clusters in invasive breast cancer // *World J Surg Oncol*. – 2014. – Vol. 12. – P. 310.
295. Suresh Babu S., Valdez Y., Xu A., et al. TGFbeta-mediated suppression of CD248 in non-cancer cells via canonical Smad-dependent signaling pathways is uncoupled in cancer cells // *BMC Cancer*. – 2014. – Vol. 14. – P. 113.
296. Tabassum D.P., Polyak K. Tumorigenesis: it takes a village // *Nat Rev Cancer*. – 2015. – Vol. 15. – № 8. – P. 473-483.
297. Taira T., Ishii G., Nagai K., et al. Characterization of the immunophenotype of the tumor budding and its prognostic implications in squamous cell carcinoma of the lung // *Lung Cancer*. – 2012. – Vol. 76. – № 3. – P. 423-430.
298. Tang G.Y., Tang G.J., Yin L., et al. ECRG4 acts as a tumor suppressor gene frequently hypermethylated in human breast cancer // *Biosci Rep*. – 2019. – Vol. 39. – № 5. – P. BSR20190087.

299. Tang Y.J., Huang J., Tsushima H., et al. Tracing Tumor Evolution in Sarcoma Reveals Clonal Origin of Advanced Metastasis // *Cell Rep.* – 2019. – Vol. 28. – № 11. – P. 2837-2850.
300. Tao J., Li H., Li Q., et al. CD109 is a potential target for triple-negative breast cancer // *Tumour Biol.* – 2014. – Vol. 35. – № 12. – P. 12083-12090.
301. Tao Y., Ruan J., Yeh S.H., et al. Rapid growth of a hepatocellular carcinoma and the driving mutations revealed by cell-population genetic analysis of whole-genome data // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2011. – Vol. 108. – № 29. – P. 12042-12047.
302. Tashireva L.A., Zavyalova M.V., Savelieva O.E., et al. Single Tumor Cells With Epithelial-Like Morphology Are Associated With Breast Cancer Metastasis // *Front Oncol.* – 2020. – Vol. 10. – P. 50.
303. Teicher B.A. CD248: A therapeutic target in cancer and fibrotic diseases // *Oncotarget.* – 2019. – Vol. 10. – № 9. – P. 993-1009.
304. Thomson S., Petti F., Sujka-Kwok I., et al. A systems view of epithelial-mesenchymal transition signaling states // *Clin Exp Metastasis.* – 2011. – Vol. 28. – № 2. – P. 137-155.
305. Tomasello C., Baldessari C., Napolitano M., et al. Resistance to EGFR inhibitors in non-small cell lung cancer: Clinical management and future perspectives // *Crit Rev Oncol Hematol.* – 2018. – Vol. 123. – P. 149-161.
306. Tong M., Jun T., Nie Y., et al. The Role of the Slit/Robo Signaling Pathway // *J Cancer.* – 2019. – Vol. 10. – № 12. – P. 2694-2705.
307. Travis W.D., Brambilla E., Burke A.P., et al. WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. IARC Press: Lyon, France, 2015.
308. Turajlic S., Sottoriva A., Graham T., et al. Resolving genetic heterogeneity in cancer // *Nat Rev Genet.* – 2019. – Vol. 20. – № 7. – P. 404-416.
309. Turajlic S., Xu H., Litchfield K., et al. Tracking Cancer Evolution Reveals Constrained Routes to Metastases: TRACERx Renal // *Cell.* – 2018. – Vol. 173. – № 3. – P. 581-594.

310. Urrutia G., Laurito S., Campoy E., et al. PAX6 Promoter Methylation Correlates with MDA-MB-231 Cell Migration, and Expression of MMP2 and MMP9 // *Asian Pac J Cancer Prev.* – 2018. – Vol. 19. – № 10. – P. 2859-2866.
311. van Staalduinen J., Baker D., Ten Dijke P., et al. Epithelial-mesenchymal-transition-inducing transcription factors: new targets for tackling chemoresistance in cancer? // *Oncogene.* – 2018. – Vol. 37. – № 48. – P. 6195-6211.
312. van Vlodrop I.J., Niessen H.E., Derks S., et al. Analysis of promoter CpG island hypermethylation in cancer: location, location, location! // *Clin Cancer Res.* – 2011. – Vol. 17. – № 13. – P. 4225-4231.
313. Vara-Perez M., Felipe-Abrio B., Agostinis P. Mitophagy in Cancer: A Tale of Adaptation // *Cells.* – 2019. – Vol. 8. – № 5. – P. 493.
314. Vassalli G. Aldehyde Dehydrogenases: Not Just Markers, but Functional Regulators of Stem Cells // *Stem Cells Int.* – 2019. – Vol. 2019. – P. 3904645.
315. Villars A., Levayer R. Collective effects in epithelial cell death and cell extrusion // *Curr Opin Genet Dev.* – 2022. – Vol. 72. – P. 8-14.
316. Voutsadakis I.A. Prognostic role of tumor budding in breast cancer // *World J Exp Med.* – 2018. – Vol. 8. – № 2. – P. 12-17.
317. Waddington C.H. *The strategy of the genes: a discussion of some aspects of theoretical biology.* London: Allen & Unwin, 1957.
318. Wan H., Li Z., Wang H., et al. ST8SIA1 inhibition sensitizes triple negative breast cancer to chemotherapy via suppressing Wnt/beta-catenin and FAK/Akt/mTOR // *Clin Transl Oncol.* – 2021. – Vol. 23. – № 4. – P. 902-910.
319. Wang C., Pecot T., Zynger D.L., et al. Identifying survival associated morphological features of triple negative breast cancer using multiple datasets // *J Am Med Inform Assoc.* – 2013. – Vol. 20. – № 4. – P. 680-687.
320. Wang M., Cheng B., Yang Y., et al. Microchannel Stiffness and Confinement Jointly Induce the Mesenchymal-Amoeboid Transition of Cancer Cell Migration // *Nano Lett.* – 2019. – Vol. 19. – № 9. – P. 5949-5958.

321. Wang Q., Yan R., Pinnell N., et al. Stage-specific roles for Zmiz1 in Notch-dependent steps of early T-cell development // *Blood*. – 2018. – Vol. 132. – № 12. – P. 1279-1292.
322. Wang R., Sun Y., Yu W., et al. Downregulation of miRNA-214 in cancer-associated fibroblasts contributes to migration and invasion of gastric cancer cells through targeting FGF9 and inducing EMT // *J Exp Clin Cancer Res*. – 2019. – Vol. 38. – № 1. – P. 20.
323. Wang Z.Z., Yang J., Jiang B.H., et al. KIF14 promotes cell proliferation via activation of Akt and is directly targeted by miR-200c in colorectal cancer // *Int J Oncol*. – 2018. – Vol. 53. – № 5. – P. 1939-1952.
324. Warde-Farley D., Donaldson S.L., Comes O., et al. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function // *Nucleic Acids Res*. – 2010. – Vol. 38. – P. W214-220.
325. Wen B., Wei Y.T., Zhao K. The role of high mobility group protein B3 (HMGB3) in tumor proliferation and drug resistance // *Mol Cell Biochem*. – 2021. – Vol. 476. – № 4. – P. 1729-1739.
326. Westcott J.M., Prechtel A.M., Maine E.A., et al. An epigenetically distinct breast cancer cell subpopulation promotes collective invasion // *J Clin Invest*. – 2015. – Vol. 125. – № 5. – P. 1927-1943.
327. Willipinski-Stapelfeldt B., Riethdorf S., Assmann V., et al. Changes in cytoskeletal protein composition indicative of an epithelial-mesenchymal transition in human micrometastatic and primary breast carcinoma cells // *Clin Cancer Res*. – 2005. – Vol. 11. – № 22. – P. 8006-8014.
328. Wolf K., Mazo I., Leung H., et al. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis // *J Cell Biol*. – 2003. – Vol. 160. – № 2. – P. 267-277.
329. Wolf U. Theodor Boveri and His Book "On the Problem of the Origin of Malignant Tumors". *Chromosomes and Cancer* (J. German eds). Wiley: New York, 1974, P. 3–20.



330. Woodcock D.J., Riabchenko E., Taavitsainen S., et al. Prostate cancer evolution from multilineage primary to single lineage metastases with implications for liquid biopsy // *Nat Commun.* – 2020. – Vol. 11. – № 1. – P. 5070.
331. Wu J.S., Jiang J., Chen B.J., et al. Plasticity of cancer cell invasion: Patterns and mechanisms // *Transl Oncol.* – 2021. – Vol. 14. – № 1. – P. 100899.
332. Wu M., Wang G., Hu W., et al. Emerging roles and therapeutic value of exosomes in cancer metastasis // *Mol Cancer.* – 2019. – Vol. 18. – № 1. – P. 53.
333. Xiao L., Zhang S., Zheng Q., et al. Dysregulation of KIF14 regulates the cell cycle and predicts poor prognosis in cervical cancer: a study based on integrated approaches // *Braz J Med Biol Res.* – 2021. – Vol. 54. – № 11. – P. e11363.
334. Xie P., Mo J.L., Liu J.H., et al. Pharmacogenomics of 5-fluorouracil in colorectal cancer: review and update // *Cell Oncol (Dordr).* – 2020. – Vol. 43. – № 6. – P. 989-1001.
335. Xie Z., Bailey A., Kuleshov M.V., et al. Gene Set Knowledge Discovery with Enrichr // *Curr Protoc.* – 2021. – Vol. 1. – № 3. – P. e90.
336. Xu M., Takanashi M., Oikawa K., et al. USP15 plays an essential role for caspase-3 activation during Paclitaxel-induced apoptosis // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2009. – Vol. 388. – № 2. – P. 366-371.
337. Yamazaki T., Sasaki N., Nishi M., et al. Augmentation of drug-induced cell death by ER protein BRI3BP // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2007. – Vol. 362. – № 4. – P. 971-975.
338. Yan T., Cui H., Zhou Y., et al. Multi-region sequencing unveils novel actionable targets and spatial heterogeneity in esophageal squamous cell carcinoma // *Nat Commun.* – 2019. – Vol. 10. – № 1. – P. 1670.
339. Yang C., Cao M., Liu Y., et al. Inducible formation of leader cells driven by CD44 switching gives rise to collective invasion and metastases in luminal breast carcinomas // *Oncogene.* – 2019. – Vol. 38. – № 46. – P. 7113-7132.
340. Yang F., Yan Y., Yang Y., et al. MiR-210 in exosomes derived from CAFs promotes non-small cell lung cancer migration and invasion through PTEN/PI3K/AKT pathway // *Cell Signal.* – 2020. – Vol. 73. – P. 109675.

341. Yang Z., Li C., Yan C., et al. KIF14 promotes tumor progression and metastasis and is an independent predictor of poor prognosis in human gastric cancer // *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* – 2019. – Vol. 1865. – № 1. – P. 181-192.
342. Yap T.A., Gerlinger M., Futreal P.A., et al. Intratumor heterogeneity: seeing the wood for the trees // *Sci Transl Med.* – 2012. – Vol. 4. – № 127. – P. 127ps110.
343. Yates L.R., Knappskog S., Wedge D., et al. Genomic Evolution of Breast Cancer Metastasis and Relapse // *Cancer Cell.* – 2017. – Vol. 32. – № 2. – P. 169-184.
344. Yin L.M., Schnoor M. Modulation of membrane-cytoskeleton interactions: ezrin as key player // *Trends Cell Biol.* – 2022. – Vol. 32. – № 2. – P. 94-97.
345. Yizhak K., Aguet F., Kim J., et al. RNA sequence analysis reveals macroscopic somatic clonal expansion across normal tissues // *Science.* – 2019. – Vol. 364. – № 6444. – P. eaaw0726.
346. Yu J., Xie T., Wang Z., et al. DNA methyltransferases: emerging targets for the discovery of inhibitors as potent anticancer drugs // *Drug Discov Today.* – 2019. – Vol. 24. – № 12. – P. 2323-2331.
347. Zakowski M.F., Hussain S., Pao W., et al. Morphologic features of adenocarcinoma of the lung predictive of response to the epidermal growth factor receptor kinase inhibitors erlotinib and gefitinib // *Arch Pathol Lab Med.* – 2009. – Vol. 133. – № 3. – P. 470-477.
348. Zavyalova M.V., Denisov E.V., Tashireva L.A., et al. Phenotypic drift as a cause for intratumoral morphological heterogeneity of invasive ductal breast carcinoma not otherwise specified // *BioResearch Open Access.* – 2013. – Vol. 2. – № 2. – P. 148-154.
349. Zhang J., Goliwas K.F., Wang W., et al. Energetic regulation of coordinated leader-follower dynamics during collective invasion of breast cancer cells // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2019. – Vol. 116. – № 16. – P. 7867-7872.

350. Zhang J., Yao H., Song G., et al. Regulation of epithelial-mesenchymal transition by tumor-associated macrophages in cancer // *Am J Transl Res.* – 2015. – Vol. 7. – № 10. – P. 1699-1711.
351. Zhang J.T. Use of arrays to investigate the contribution of ATP-binding cassette transporters to drug resistance in cancer chemotherapy and prediction of chemosensitivity // *Cell Res.* – 2007. – Vol. 17. – № 4. – P. 311-323.
352. Zhang X., Gu G., Song L., et al. ID4 Promotes Breast Cancer Chemotherapy Resistance via CBF1-MRP1 Pathway // *J Cancer.* – 2020. – Vol. 11. – № 13. – P. 3846-3857.
353. Zhang Y., Zhang X.F., Fleming M.R., et al. Kv3.3 Channels Bind Hax-1 and Arp2/3 to Assemble a Stable Local Actin Network that Regulates Channel Gating // *Cell.* – 2016. – Vol. 165. – № 2. – P. 434-448.
354. Zhao X., Cui P., Hu G., et al. PIP5k1 $\beta$  controls bone homeostasis through modulating both osteoclast and osteoblast differentiation // *Journal of Molecular Cell Biology.* – 2020. – Vol. 12. – № 1. – P. 55-70.
355. Zhou F., Drabsch Y., Dekker T.J., et al. Nuclear receptor NR4A1 promotes breast cancer invasion and metastasis by activating TGF-beta signalling // *Nat Commun.* – 2014. – Vol. 5. – P. 3388.
356. Zhou S.L., Zhou Z.J., Hu Z.Q., et al. Tumor-Associated Neutrophils Recruit Macrophages and T-Regulatory Cells to Promote Progression of Hepatocellular Carcinoma and Resistance to Sorafenib // *Gastroenterology.* – 2016. – Vol. 150. – № 7. – P. 1646-1658.
357. Zhou Y., Han M., Gao J. Prognosis and targeting of pre-metastatic niche // *J Control Release.* – 2020. – Vol. 325. – P. 223-234.
358. Ziani L., Chouaib S., Thiery J. Alteration of the Antitumor Immune Response by Cancer-Associated Fibroblasts // *Front Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 414.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

### ПРИЛОЖЕНИЕ 1.

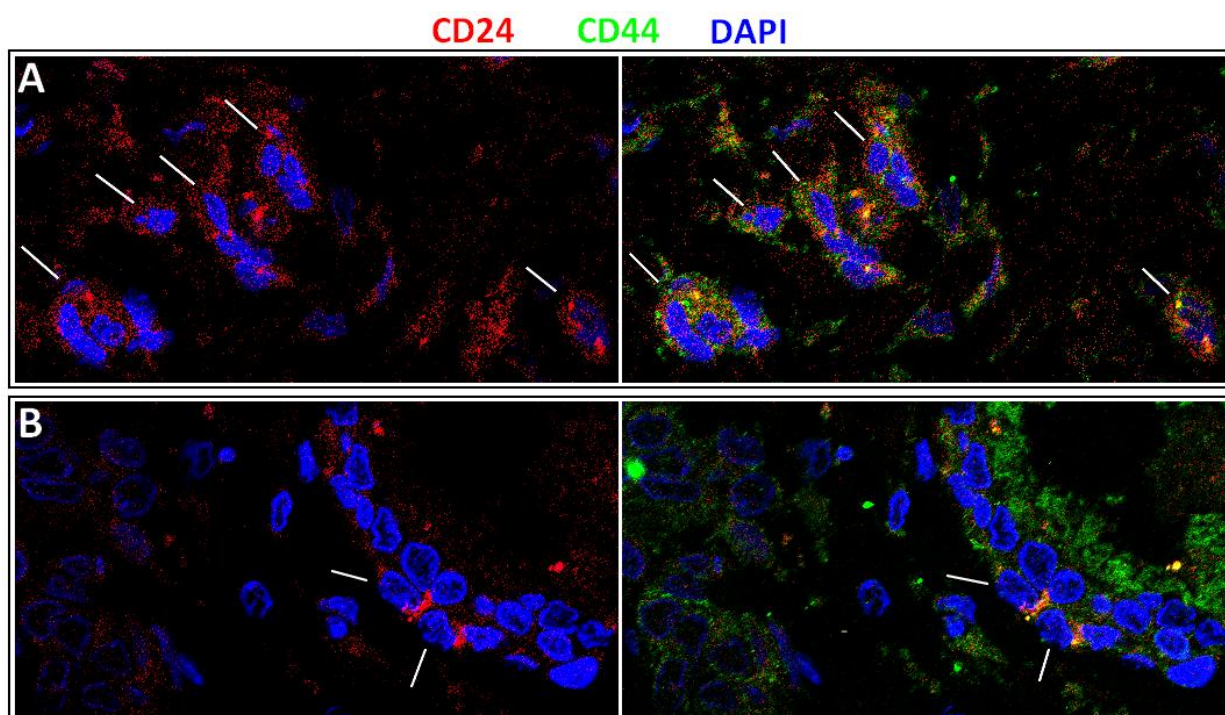


Рисунок 1 – Экспрессия белка CD24 в двух различных опухолях молочной железы (А, В). CD24-позитивные клетки отмечены линиями.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2.

Таблица 1. Хромосомные aberrации, обнаруженные в различных морфологических структурах РМЖ (опухоль 1)

№	Хр	Координаты		Туб			Альв			Сол			Траб			Дискр		
				1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	1	833608	120285368	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0
2	1	16208386	119423908	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	1	58593812	112214645	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	1	144157692	212426786	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1
5	1	144157692	247179291	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
6	1	144157692	238007053	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
7	1	217853520	247179291	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0
8	1	221225854	236230275	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	1	221244384	247179291	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0
10	2	95009243	176697741	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	2	104445487	172675468	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
12	2	172675468	242607198	-1	-1	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	-1	-1
13	2	205078826	242607198	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0
14	3	68949	42799164	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	3	42799164	84801582	-1	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	3	6827279	33047387	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0
17	3	68949	90387390	0	-1	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0
18	3	42660591	90387390	0	0	0	-1	0	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	0	-1
19	3	95057975	199321446	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
20	3	114235859	199321446	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
21	3	132836054	199321446	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	3	139779896	185624319	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
23	4	175366	48607771	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	4	13795425	25113995	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	4	34396499	34509954	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1
26	4	52482005	191133668	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	4	111882066	191133668	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	5	153416	46008753	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
29	5	23109155	27692279	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0
30	5	49619946	75455412	-1	0	-1	-1	0	-1	0	0	-1	-1	0	0	0	0	0
31	5	75455412	113630488	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	5	85586657	171417944	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	5	149754201	171417944	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	5	153726522	171417944	-1	0	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	-1	-1
35	5	171417944	180184328	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
36	5	175537148	176599372	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	5	174307736	174635063	0	0	-1	0	-1	0	-1	-1	0	-1	0	0	0	0	0
38	6	108083	57754769	-1	0	0	-1	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0
39	6	62029851	170712719	-1	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	7	149268	42773951	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0
41	7	5441966	42773951	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1

42	7	17761914	42773951	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43	7	42773892	56043300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0
44	7	49562358	50620831	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45	7	61469275	64137439	-1	0	0	0	0	0	0	-1	-1	0	0	0	0	0	0
46	7	61469275	72592542	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0
47	7	73103767	97211429	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0
48	7	76727304	82574048	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
49	7	101364301	127758289	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
50	7	101364301	158816892	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
51	7	128760154	158816892	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
52	7	129735170	155364901	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
53	7	143063765	151110549	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
54	8	301957	43512897	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
55	8	47693177	146245639	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
56	8	106777682	137579719	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
57	8	116730483	116743045	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0
58	9	194193	38449534	-1	0	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
59	9	70259583	140126287	-1	0	0	-1	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0
60	9	70259583	124830597	0	0	-1	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
61	9	83691835	90062846	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0
62	9	117713114	140126287	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
63	9	132378415	133141488	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
64	10	2766912	8156690	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1
65	10	42210670	135195764	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0
66	10	56738838	97220884	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1
67	10	66455837	87728287	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
68	10	87728287	88003126	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
69	10	91191981	97185408	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
70	10	91191981	96724549	-1	0	-1	-1	0	0	-1	-1	-1	-1	0	-1	0	0	0
71	11	200300	48621131	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
72	11	2138963	3134530	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
73	11	2138963	5370121	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
74	11	9372800	48187279	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
75	11	31769235	48187279	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
76	11	62417274	76195347	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
77	11	67132287	76340701	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0
78	11	67132287	73063044	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
79	11	76560414	78280892	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
80	11	78280892	84679733	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
81	11	82616520	83601001	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
82	11	85360836	128506943	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0
83	11	87701283	134373617	0	-1	0	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1			0	-1
84	11	91765006	134373617	-1	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0

85	11	109223384	129478475	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
86	12	881953	34061393	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
87	12	12664201	34061393	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
88	12	50100373	78233620	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
89	13	19305295	46724890	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1
90	13	19305295	54331193	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	0	0	-1	0	0	0	0
91	13	19305295	57212952	-1	0	-1	0	-1	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0
92	13	19305295	114085143	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
93	13	57212952	114085143	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0
94	14	23973049	106358550	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
95	14	54339210	59985994	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
96	14	105476748	106358550	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
97	15	20384563	22755764	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
98	15	22754362	100200996	-1	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
99	15	32096281	46287251	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0
100	15	34452737	47047260	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
101	16	46271	35005504	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
102	16	6790873	35005504	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
103	16	14259483	29799999	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
104	16	16102020	35005504	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
105	16	20545896	29874651	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
106	16	35004950	35005504	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1
107	16	45193386	55119969	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
108	16	48784554	55119969	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
109	16	54921836	88675894	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	-1	0	0	0
110	16	59850186	88675894	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	-1	0	-1
111	16	68342192	88675894	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0
112	17	29169	21136199	-1	-1	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	-1	-1
113	17	3108940	17613218	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0
114	17	22622230	25582197	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
115	17	23246275	55527541	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
116	17	24217976	42735807	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0
117	17	24846667	50592172	0	-1	-1	-1	0	0	0	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0
118	17	26617118	50592172	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0
119	17	26617118	47081617	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	-1	0	0	0
120	17	29652674	38164206	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
121	17	29652674	42735807	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0
122	17	29652674	50503128	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1
123	17	53366996	78653717	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
124	18	30343169	70774609	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
125	19	210395	19664589	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
126	19	210395	24169159	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0
127	19	40289636	55008683	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

128	20	18580	25626253	-1	0	-1	-1	0	-1	0	0	-1	0	0	0	0	0
129	20	2126080	25626253	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0
130	20	2670357	7802387	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
131	20	4340930	25626253	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0
132	20	28186969	62379118	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0
133	20	35388950	62379118	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0
134	20	51325327	60837804	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
135	20	57050416	58590762	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1
136	21	24648751	37555128	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	-1	0	0	0
137	21	36259912	36298549	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
138	21	45329824	46914745	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
139	22	15777498	21386561	0	0	0	-1	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0
140	22	15777498	19084421	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0
141	22	15777498	21386561	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1
142	22	19084422	21386561	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
143	22	21386562	21538022	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
144	22	21588229	49525130	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	-1
145	X	272696	29046076	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
146	X	17544131	51113109	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
147	X	30233114	30234096	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1
148	X	31999956	33032035	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
149	X	61915481	154728505	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
150	X	70110726	154728505	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
151	X	76926972	77258964	0	-1	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
152	X	128510981	154728505	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

Примечание: Хр – хромосома; Туб – тубулярные; Альв – альвеолярные; Сол – солидные; Траб – трабекулярные; Дискр – дискретные.



Таблица 2. Хромосомные aberrации, обнаруженные в различных морфологических структурах РМЖ (опухоль 2)

№	Хр	Координаты		Туб			Альв			Сол			Граб			Дискр		
				1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	1	921347	120256143	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
2	1	64435197	113347485	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0
3	1	74324621	93381178	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0
4	1	147499046	247179291	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0
5	1	147499046	235038899	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
6	1	164400485	247179291	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	2	13938	88748395	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	-1	0
8	2	13938	91625746	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
9	2	13938	10461636	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1
10	2	45040873	52881096	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	2	94999687	103509598	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1
12	2	94999687	169189458	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0
13	2	162189939	176686402	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	2	172662439	172672911	-1	0	-1	0	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	2	176686402	176708110	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
16	2	202960992	203800018	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	2	206399954	242169452	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0
18	2	222790785	222799600	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	3	68949	90113421	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0
20	3	46594636	46594882	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	3	95057975	199251188	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
22	3	123574492	199251188	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
23	4	81744	23312573	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	4	81744	48612976	0	0	0	0	-1	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
25	4	4913574	48612976	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	-1	0
26	4	52383858	191027875	0	0	0	0	-1	0	-1	0	0	0	-1	0	0	-1	0
27	4	63676717	191027875	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0
28	4	77076663	89205620	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0
29	4	97315937	101735010	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	5	110640	46150843	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0
31	5	17685501	37574217	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
32	5	36816672	37574217	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
33	5	49774457	180598584	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0
34	5	72373547	110469787	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
35	6	108083	57754769	-1	-1	-1		-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	-1	-1
36	6	62029851	170737958	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	-1	0
37	6	62029851	151089605	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0
38	6	123403113	170737958	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1
39	7	149268	56142382	0	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	-1	0	0
40	7	6316715	56142382	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0
41	7	61169275	158821317	0	-1	-1	0	-1	0	-1	-1	-1	0	0	0	0	-1	0

42	7	65781363	158821317	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	-1	0	0
43	7	73771209	158821317	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44	7	122091902	145666730	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1
45	8	181530	27362173	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
46	8	181530	43647122	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
47	8	26230655	38436519	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1
48	8	30618279	30895576	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0
49	8	48150498	146250824	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
50	8	116745893	137501751	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
51	9	244654	34694403	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
52	9	244654	13342703	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
53	9	5689927	34694403	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
54	9	11267711	38350299	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
55	9	70331295	125519955	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0
56	10	152490	14676961	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
57	10	152490	38233182	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
58	10	42676492	135047474	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
59	10	127131464	135047474	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0
60	11	192958	2910141	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
61	11	192958	48187279	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
62	11	31009421	48187279	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
63	11	32365939	32374746	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
64	12	87047353	132274021	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0
65	13	19329280	113346574	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0
66	13	66913254	71825814	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
67	14	19692037	106349815	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
68	14	27373892	61959052	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
69	14	47694439	102178391	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0
70	14	105476748	106349815	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
71	15	20403834	99910607	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0
72	15	21481630	21481953	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
73	15	21482446	23148069	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
74	16	36766	35006440	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
75	16	36766	3800209	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
76	16	45058242	88675894	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	0	0	-1	0	-1	0
77	16	59554957	88675894	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
78	16	79538057	88675894	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0
79	17	87009	17370901	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
80	17	26617118	78623230	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0
81	17	67629693	67632012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
82	18	145478	13929361	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
83	18	16796072	76031853	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0

84	19	226925	24170094	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
85	19	36912833	59641054	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
86	19	38851647	63787230	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
87	20	8747	25620884	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0
88	20	29421897	62379118	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0
89	20	36341866	62379118	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
90	20	59483462	62379118	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
91	21	14442992	46897430	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	-1	0	1	0
92	21	35353153	45553879	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0
93	22	15777498	21386562	0	0	-1	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	-1	0
94	22	21386562	21538022	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0
95	22	15777498	46079978	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
96	22	15777498	48627216	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
97	X	109796	58098195	0	-1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	-1	0	0	0
98	X	109796	2886217	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
99	X	13691368	53476571	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
100	X	13691368	56293036	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
101	X	28807348	31468341	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
102	X	47045392	48221098	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
103	X	48209131	48703243	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
104	X	53476571	53477167	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
105	X	61848414	154886101	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0
106	X	61848414	100489453	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0
107	X	61848414	149556032	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
108	X	100489454	100490059	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Примечание: Хр – хромосома; Туб – тубулярные; Альв – альвеолярные; Сол – солидные; Траб – трабекулярные; Дискр – дискретные.

Таблица 3. Хромосомные aberrации, обнаруженные в различных морфологических структурах РМЖ (опухоль 3)

№	Хр	Координаты		Туб			Альв			Сол			Траб			Дискр		
				1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	1	1013851	14461463	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
2	1	16229095	30863860	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
3	1	16229095	80160610	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0
4	1	68261996	78789312	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
5	1	80105055	116445682	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
6	1	116445682	120321801	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
7	1	144126547	247179291	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	2	172660426	172660630	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
9	2	172672403	172672554	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0
10	2	239051092	242169511	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	3	68949	2974804	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
12	3	2358925	2955777	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
13	3	68949	90152981	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
14	3	95057975	198044318	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
15	4	175366	48771249	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	4	87849012	88290512	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
17	4	95113368	100170769	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	5	16048391	29796679	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
19	6	87334656	87488787	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
20	6	90763767	131213744	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	7	149268	56142382	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
22	7	61469275	158818225	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
23	8	181530	43661143	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
24	8	12680358	12852938	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
25	8	47631690	146234823	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
26	8	116745893	146234823	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
27	9	204367	38731437	0	-1	0	0	0	-1	0	0	-1	0	0	0	0	0	0
28	9	70259583	139792376	0	-1	0	0	0	-1	0	0	-1	0	0	0	0	0	0
29	10	360819	38448615	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
30	10	8156209	38448615	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	10	42150759	135195764	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
32	10	71165519	73286826	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
33	11	293829	1985406	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	11	2424992	2738247	-1	0	-1	-1	-1	0	0	-1	0	-1	0	-1	0	0	0
35	11	2424992	11051354	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	11	5080165	5974386	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	11	10950518	11051354	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	11	11051354	13153370	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0

39	11	11051354	38519273	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
40	11	13099160	15541791	0	0	-1	-1	0	0	0	-1	0	0	0	-1	0	0	0
41	11	22115497	38519273	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
42	11	28777242	38519273	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43	11	31758960	32415756	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
44	11	38519214	42118459	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45	11	38519214	45118204	0	0	0	0	-1	0	0	-1	0	0	0	-1	0	0	0
46	11	45118204	46505044	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
47	11	45118204	48621131	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	11	54877880	55142252	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
49	11	59726819	61881203	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
50	11	62222705	63275595	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
51	11	62222705	68972488	0	-1	-1	0	0	0	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0
52	11	65706277	68972488	0	0	0	-1	-1	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0
53	11	68972488	90841768	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
54	11	74382719	75240331	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
55	11	86029797	90841768	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
56	11	90706760	92171856	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0
57	11	90706760	94095050	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
58	11	90706760	98798341	-1	0	0	-1	0	0	0	-1	0	-1	0	0	0	0	0
59	11	90706760	101884356	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	11	101884357	104467542	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
61	11	104574136	121377542	-1	-1	-1	0	0	0	-1	-1	0	-1	0	-1	0	0	0
62	11	121430998	132560370	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
63	11	132606436	134321530	-1	0	-1	-1	0	0	-1	-1	0	-1	0	-1	0	0	0
64	12	173299	28323709	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
65	12	173299	33955201	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
66	12	37184046	132317366	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
67	12	48347971	51363363	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
68	13	19309535	114110750	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
69	14	19678056	106358550	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
70	14	53487367	76690525	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
71	14	105354886	106358550	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
72	15	52962499	79190804	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
73	16	37133	31782341	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
74	16	37133	35006440	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0
75	16	3836702	35006440	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
76	16	16862863	16994651	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
77	16	45109692	48441421	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
78	16	46448065	88645786	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0
79	16	48441421	88645786	-1	0	-1	-1	-1	0	-1	-1	0	-1	-1	-1	0	0	0
80	16	51573730	88645786	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

81	17	29169	22078701	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	0	-1	
82	17	22485675	34563051	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
83	17	22485675	78653717	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	
84	17	34563052	37702838	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
85	17	39178341	44464946	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	
86	17	44986594	78653717	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
87	18	138963	14071887	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
88	18	16796072	76113817	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
89	18	30019709	59989486	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
90	19	258717	24170094	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
91	19	33058646	62440065	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
92	20	116393	25541296	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
93	20	28075705	62379118	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
94	20	31089565	46498658	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
95	20	33241682	44839514	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
96	21	34093159	46795132	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
97	22	16828141	39660298	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
98	22	21386562	21538022	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
99	22	28421002	35803017	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	X	387379	397711	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0
101	X	100489246	100489956	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
Примечание: Хр – хромосома; Туб – тубулярные; Альв – альвеолярные; Сол – солидные; Траб – трабекулярные; Дискр – дискретные.																			

ПРИЛОЖЕНИЕ 3.

Таблица 1. Функциональная характеристика генов, использованных для анализа эпителиальных и мезенхимальных характеристик различных морфологических структур РМЖ

	Название гена	Полное название / синонимы	Функции белков
Эпителиальные	<i>CDH1</i>	Кадгерин 1 / E-кадгерин	Межклеточная адгезия
	<i>CD24</i>	CD24	Муциноподобный поверхностный белок, участвующий в лейкоцитарном сигналинге, регуляции В-клеточного апоптоза, адгезии лейкоцитов, поддержании опухолевого роста, пролиферации и выживаемости
	<i>EPCAM</i>	Молекула адгезии эпителиальных клеток	Кальций-независимый белок, функциональный антагонист классических кадгерин-опосредованных межклеточных взаимодействий, играющий морфорегуляторную роль в нормальной эпителии и стволовых клетках и стимулирующий опухолевую прогрессию
	<i>KRT5</i>	Кератин 5	Компонент промежуточных филаментов цитоскелета базальных эпителиальных клеток
	<i>LCN2</i>	Липокалин 2/ Нейтрофильный желатиназа-ассоциированный липокалин (NGAL)	Транспортёр железа, вовлеченный во врожденный иммунный ответ
	<i>TP63</i>	Опухолевый белок p63	Транскрипционный фактор, играющий роль в различных процессах, таких как морфогенез кожи, регуляция стволовости, апоптоз, развитие сердца, преждевременное старение и т.д.
	<i>TNFSF10</i>	Белок 10 суперсемейства факторов некроза опухолей (TNF) / TNF-связанный лиганд, индуцирующий апоптоз (TRAIL), CD253	Лиганд, индуцирующий апоптоз в трансформированных и опухолевых клетках
	<i>SLPI</i>	Секреторный ингибитор протеиназы лейкоцитов (SLPI)/ Антилейкопротеиназа	Секреторный ингибитор, защищающий эпителиальные ткани от сериновых протеаз
	<i>IL1B</i>	Интерлейкин 1 бета	Цитокин, вызывающий

			воспалительный ответ и вовлеченный в регуляцию клеточной пролиферации, дифференцировки и апоптоза
	<i>S100A8</i>	Кальций-связывающий белок S100A8	Кальций- и цинк-связывающий белок А, регулирующий воспаление и иммунный ответ
	<i>JUP</i>	Адгезионный плакоглобин / $\gamma$ -катенин	Цитоплазматический компонент десмосом и структур адгезивных контактов
	<i>TJP1</i>	Белок плотных контактов 1	Компонент межклеточных плотных контактов
	<i>CTNNA3</i>	Катенин альфа 3	Член семейства винкулинов / альфа-катенинов, участвующий в клеточной адгезии
	<i>CLDN3</i>	Клаудин 3	Компоненты плотных контактов
	<i>OCLN</i>	Окклюдин	
Мезенхимальные	<i>ABCA6</i>	Белок 6 суперсемейства АТФ-связывающих переносчиков	Перенос ксенобиотиков
	<i>DCN</i>	Декорин	Лейцин-богатый протеогликан, структурный компонент коллагеновых фибрил
	<i>IL1R1</i>	Рецептор типа 1 к интерлейкину 1	Цитокиновый рецептор, медиатор различных цитокин-индуцированных иммунных и воспалительных процессов
	<i>PCOLCE</i>	Энхансер проколлаген С-эндопептидазы	Гликопротеин, вовлеченный в ферментативное расщепление проколлагена 1-го типа и усиливающий С-протеиназную активность
	<i>WNT5A</i>	Белок 5А семейства Wnt	Вовлечен в канцерогенез, регуляцию клеточной дифференцировки и морфогенеза в эмбриональном развитии
	<i>VIM</i>	Виментин	Промежуточный филамент класса III различных неэпителиальных тканей, главным образом мезенхимальных клеток
	<i>ZEB2</i>	Е-бокс-связывающий гомеобоксный белок с цинковым пальцем	Транскрипционный фактор, регулирующий ранние стадии эмбриогенеза и развития



Мезенхимальные Клетки-“пионеры” (trailblazer cells)		Матриксная металлопептидаза 14 / Матриксная металлопротеиназа мембранного типа 1 (MT1-MMP)	Металлопротеиназа, вовлеченная в ремоделирование внеклеточного матрикса, ремоделирования актинового цитоскелета, клеточный рост и миграцию	
		<i>DOCK10</i>	Дедикатор цитокинеза 10	Регуляция цитокинеза
		<i>ITGA11</i>	Интегрин альфа 11	Рецептор клеток к коллагену
		<i>DAB2</i>	Клатрин адапторный белок	Митоген-индуцированный фосфопротеин, участвующий в сигнальных путях (например, TGFβ-сигналинге) и регулирующий позиционирование клеток в эмбриогенезе, адгезию макрофагов, транспорт белков, гомеостаз эпителиальной дифференцировки и др. процессы
		<i>PDGFRA</i>	Рецептор к тромбоцитарному ростовому фактору типа альфа	Митоген для клеток мезенхимального происхождения, вовлеченный в развитие органов, ранозаживление и опухолевую прогрессию
		<i>VASN</i>	Вазорин	Негативная регуляция TGFβ-сигналинга и защита клеток от апоптоза, индуцированного TNFα- и гипоксией
		<i>PLPP3</i>	Фосфолипид-фосфатаза 3	Гидролиз внеклеточной лизофосфатидной кислоты (LPA) и короткой цепи фосфатидной кислоты, регуляция развития сердечно-сосудистой системы через ингибирование LPA
		<i>LPAR1</i>	Рецептор 1-го типа к лизофосфатидной кислоте	Регуляция пролиферации, агрегации тромбоцитов, сокращения гладкой мускулатуры, дифференцировки клеток нейробластомы, хемотаксиса, и опухолевой инвазии
<p>Примечание: Названия генов представлены согласно номенклатуре HUGO (<a href="http://www.genenames.org">http://www.genenames.org</a>), информация о функциях белков получена из баз данных GeneCards (<a href="http://www.genecards.org/">http://www.genecards.org/</a>), OMIM (<a href="http://omim.org">http://omim.org</a>), Gene Wiki (<a href="https://en.wikipedia.org/wiki/Portal:Gene_Wiki">https://en.wikipedia.org/wiki/Portal:Gene_Wiki</a>) и статей Prunier and Howe, J Biol Chem 2005, Smith et al., Cancer Res 2006, Krautzberger et al., Gene Expr Patterns 2012, и Schnell et al., Biochim Biophys Acta 2013.</p>				

ПРИЛОЖЕНИЕ 4.

Таблица 1. Гены, дифференциально экспрессирующиеся между KIF14-  
 позитивными и KIF14-негативными клетками торпедоподобных структур  
 РМЖ ( $p < 0,05$ )

№	Ген	P-value	LogFC
1	<i>SLITRK6</i>	0,000	-22,277
2	<i>NHS</i>	0,000	8,725
3	<i>CNOT2-DT</i>	0,000	7,941
4	<i>CLIP4</i>	0,001	7,223
5	<i>LOC101928728</i>	0,001	8,473
6	<i>THBS4</i>	0,002	6,420
7	<i>DDHD1</i>	0,002	-5,906
8	<i>LUM</i>	0,002	-5,989
9	<i>GPRIN1</i>	0,002	5,594
10	<i>HIF1A-AS3</i>	0,002	7,172
11	<i>PIK3CB</i>	0,003	-4,657
12	<i>UGT8</i>	0,003	6,986
13	<i>ARL13A</i>	0,003	6,792
14	<i>ATPAF2</i>	0,003	-5,752
15	<i>LRRC26</i>	0,004	5,290
16	<i>GPR87</i>	0,004	6,137
17	<i>RBM12B</i>	0,004	-4,698
18	<i>PRICKLE2</i>	0,004	-5,305
19	<i>DENND5B</i>	0,004	-5,869
20	<i>CROT</i>	0,004	-5,644
21	<i>ZNF761</i>	0,004	-4,858
22	<i>TMEM175</i>	0,005	-5,734
23	<i>DCHS2</i>	0,005	5,624
24	<i>GTF2E1</i>	0,005	-5,567
25	<i>EYA1</i>	0,005	-6,392
26	<i>KIF21A</i>	0,005	-5,652
27	<i>RALB</i>	0,005	-5,550
28	<i>NEURL1</i>	0,005	7,024
29	<i>ARPC5L</i>	0,005	-5,536
30	<i>C2orf66</i>	0,006	7,442
31	<i>ADGRG7</i>	0,006	7,442
32	<i>EPHB1</i>	0,006	7,442
33	<i>CPN1</i>	0,006	7,442
34	<i>MYADM</i>	0,006	-5,601
35	<i>PLA2G7</i>	0,006	6,576
36	<i>CALD1</i>	0,006	-3,831
37	<i>DPT</i>	0,008	6,774
38	<i>PLCL1</i>	0,008	-6,319
39	<i>PSAPL1</i>	0,008	6,957

40	<i>TRIM38</i>	0,008	-5,336
41	<i>PLA2G4F</i>	0,008	4,146
42	<i>LOC105369779</i>	0,010	6,630
43	<i>FAM102B</i>	0,010	4,540
44	<i>XKR5</i>	0,010	7,064
45	<i>PITRM1-AS1</i>	0,010	7,064
46	<i>BCL2A1</i>	0,010	7,064
47	<i>MAMDC2-AS1</i>	0,010	6,423
48	<i>PLCB4</i>	0,010	-5,201
49	<i>ZNF460</i>	0,011	-4,177
50	<i>NAPB</i>	0,011	-5,202
51	<i>MSANTD1</i>	0,011	6,262
52	<i>LEPROT</i>	0,011	-4,477
53	<i>METTL6</i>	0,012	-5,210
54	<i>THBS2</i>	0,012	-4,013
55	<i>CYP4F8</i>	0,012	-5,747
56	<i>C17orf58</i>	0,013	-5,114
57	<i>ADAMTS7</i>	0,013	6,692
58	<i>DTNA</i>	0,013	-5,138
59	<i>RBM48</i>	0,013	-5,334
60	<i>DDX20</i>	0,013	-5,159
61	<i>INPP5J</i>	0,013	-4,556
62	<i>DLC1</i>	0,013	5,076
63	<i>USP46</i>	0,014	-4,618
64	<i>LINC00635</i>	0,014	6,831
65	<i>TRPC7</i>	0,014	6,831
66	<i>LTA</i>	0,014	6,831
67	<i>KRTAP13-4</i>	0,014	6,831
68	<i>EPHB6</i>	0,014	5,616
69	<i>C1orf105</i>	0,015	6,228
70	<i>BMP2K</i>	0,015	-4,558
71	<i>POT1</i>	0,015	-5,083
72	<i>QDPR</i>	0,015	-5,517
73	<i>VPS29</i>	0,015	-4,826
74	<i>SNAPC1</i>	0,015	-5,149
75	<i>PGAM5</i>	0,015	-5,070
76	<i>SAP30L</i>	0,015	-4,447
77	<i>IL1RN</i>	0,015	6,171
78	<i>CXorf56</i>	0,016	-5,047
79	<i>DGATI</i>	0,016	3,952
80	<i>ANTKMT</i>	0,016	-5,028
81	<i>LIMD1</i>	0,016	-3,737
82	<i>SEC61A2</i>	0,016	-5,088
83	<i>ERCC4</i>	0,017	-5,131
84	<i>TLL2</i>	0,017	6,538
85	<i>FCGBP</i>	0,017	-4,525
86	<i>PVT1</i>	0,017	-5,537
87	<i>SLC26A2</i>	243 0,017	-5,081

88	<i>CINP</i>	0,018	-4,998
89	<i>ASTN2</i>	0,018	-5,407
90	<i>ST7L</i>	0,018	-4,985
91	<i>LAP3</i>	0,018	-3,951
92	<i>AIP</i>	0,019	3,591
93	<i>ZNF273</i>	0,019	-4,026
94	<i>CDH6</i>	0,019	6,472
95	<i>ZNF726</i>	0,019	-5,149
96	<i>CYP2U1</i>	0,020	6,307
97	<i>KIAA0930</i>	0,020	-4,112
98	<i>B4GALT6</i>	0,020	6,091
99	<i>AKR7A3</i>	0,021	-5,242
100	<i>NFATC1</i>	0,021	-4,878
101	<i>CAMP</i>	0,021	6,402
102	<i>EDN2</i>	0,021	6,555
103	<i>IVL</i>	0,021	6,555
104	<i>GAL3ST4</i>	0,021	6,555
105	<i>AGAP4</i>	0,021	6,555
106	<i>CCDC196</i>	0,021	6,555
107	<i>ADGRG3</i>	0,021	6,555
108	<i>B4GAT1</i>	0,022	5,163
109	<i>CDANI</i>	0,022	3,286
110	<i>MIR3136</i>	0,022	6,519
111	<i>RAD51B</i>	0,022	-4,903
112	<i>SLC49A3</i>	0,022	-4,943
113	<i>CSGALNACT1</i>	0,022	-4,510
114	<i>ASCC2</i>	0,023	-4,195
115	<i>HMGN4</i>	0,023	-4,903
116	<i>SNHG3</i>	0,023	-4,976
117	<i>N4BP3</i>	0,023	3,499
118	<i>ATP6AP1L</i>	0,023	-3,818
119	<i>MGAT5</i>	0,023	-3,534
120	<i>STAM</i>	0,023	-4,845
121	<i>CRY1</i>	0,023	-4,861
122	<i>EEF1A2</i>	0,024	-5,047
123	<i>CCDC61</i>	0,024	-4,833
124	<i>MAB21L2</i>	0,024	-4,899
125	<i>ATF3</i>	0,024	-4,911
126	<i>TBC1D8B</i>	0,024	-5,028
127	<i>NOS1AP</i>	0,024	-4,506
128	<i>TMEM169</i>	0,024	4,867
129	<i>KIF1A</i>	0,025	6,318
130	<i>RGPI</i>	0,025	-4,088
131	<i>NAPRT</i>	0,026	5,682
132	<i>NEDD1</i>	0,027	-5,206
133	<i>MMP13</i>	0,027	-5,336
134	<i>ALDH1A1</i>	0,027	5,857
135	<i>ZNF519</i>	0,028	-4,868

136	<i>LCPI</i>	0,028	-4,780
137	<i>SLC15A2</i>	0,028	-4,819
138	<i>PARP12</i>	0,029	-4,126
139	<i>EIF2B3</i>	0,029	-4,728
140	<i>CREBL2</i>	0,029	-4,290
141	<i>TMEM170B</i>	0,029	4,354
142	<i>GLI4</i>	0,029	4,170
143	<i>EIF4ENIF1</i>	0,029	-4,416
144	<i>BET1</i>	0,030	-4,024
145	<i>TMEM41B</i>	0,030	-3,824
146	<i>TSBP1</i>	0,030	5,596
147	<i>RAB18</i>	0,030	-3,087
148	<i>ASB7</i>	0,031	-4,715
149	<i>CLCA2</i>	0,031	6,189
150	<i>ACYP2</i>	0,031	5,729
151	<i>ZFHX4</i>	0,031	-4,859
152	<i>NDUFAF1</i>	0,031	-4,700
153	<i>SDHAF1</i>	0,031	-4,702
154	<i>NAA10</i>	0,031	5,233
155	<i>RPL22L1</i>	0,032	-4,795
156	<i>ZSCAN9</i>	0,032	-4,680
157	<i>TLE6</i>	0,033	4,771
158	<i>VCX</i>	0,033	5,545
159	<i>ZRANB3</i>	0,033	-4,768
160	<i>ENC1</i>	0,033	-3,147
161	<i>VPS9D1</i>	0,034	4,028
162	<i>FGFR1</i>	0,034	3,521
163	<i>ZNF571-AS1</i>	0,034	-4,529
164	<i>VRK1</i>	0,034	-4,665
165	<i>GMPS</i>	0,034	-3,475
166	<i>TUBGCP5</i>	0,034	-3,967
167	<i>SCNMI</i>	0,035	-4,745
168	<i>CRIP1</i>	0,035	-4,412
169	<i>LY6G5B</i>	0,035	5,756
170	<i>CLDN19</i>	0,035	6,216
171	<i>PRR9</i>	0,035	6,216
172	<i>OTOL1</i>	0,035	6,216
173	<i>LINC02015</i>	0,035	6,216
174	<i>PDE6A</i>	0,035	6,216
175	<i>RS1</i>	0,035	6,216
176	<i>MROH5</i>	0,035	6,216
177	<i>SH2D4B</i>	0,035	6,216
178	<i>SLC10A2</i>	0,035	6,216
179	<i>KCNH5</i>	0,035	6,216
180	<i>GCNT3</i>	0,035	6,216
181	<i>LINC01255</i>	0,035	6,216
182	<i>PLA2G4C</i>	0,035	6,216
183	<i>TGIF2LY</i>	0,035	6,216

184	<i>TOP3B</i>	0,035	6,216
185	<i>ZSCAN22</i>	0,035	-4,682
186	<i>B3GALT2</i>	0,035	-4,650
187	<i>DFFA</i>	0,036	-4,141
188	<i>IFT27</i>	0,036	-4,658
189	<i>EDARADD</i>	0,036	-5,528
190	<i>LINS1</i>	0,037	-4,166
191	<i>SIRPA</i>	0,037	-4,636
192	<i>IPMK</i>	0,037	-4,631
193	<i>USP45</i>	0,037	-4,046
194	<i>PLEKHG6</i>	0,037	3,310
195	<i>LINC01608</i>	0,037	6,069
196	<i>FAM86DP</i>	0,039	-4,769
197	<i>RAB11FIP5</i>	0,039	-4,597
198	<i>COL2A1</i>	0,039	5,579
199	<i>ARVCF</i>	0,039	-3,402
200	<i>SSH2</i>	0,039	-4,155
201	<i>UNKL</i>	0,039	2,608
202	<i>LOC100129484</i>	0,039	-4,687
203	<i>RGS1</i>	0,040	-4,659
204	<i>FAM200A</i>	0,040	-4,575
205	<i>NETO2</i>	0,040	6,023
206	<i>CAMK1D</i>	0,040	4,303
207	<i>CYP20A1</i>	0,041	-3,263
208	<i>BBS5</i>	0,041	-4,579
209	<i>KCNK5</i>	0,041	6,011
210	<i>ANXA3</i>	0,041	-4,977
211	<i>PPA1</i>	0,041	-4,042
212	<i>SCUBE3</i>	0,041	-4,977
213	<i>PROS1</i>	0,042	4,855
214	<i>CTTNBP2</i>	0,042	-4,909
215	<i>PPRC1</i>	0,042	-3,940
216	<i>CSRNP2</i>	0,042	-3,233
217	<i>SOCS6</i>	0,042	-3,746
218	<i>GET1</i>	0,042	4,264
219	<i>KLK14</i>	0,043	-5,400
220	<i>SLC9A2</i>	0,043	-5,031
221	<i>NRAS</i>	0,043	-3,599
222	<i>GALNT3</i>	0,043	-4,461
223	<i>CSF1R</i>	0,043	-4,652
224	<i>YPEL5</i>	0,043	-3,124
225	<i>ZBTB26</i>	0,043	-4,509
226	<i>ASNS</i>	0,044	4,668
227	<i>PDE5A</i>	0,044	-4,546
228	<i>RNVU1-7</i>	0,044	5,410
229	<i>S1PR3</i>	0,044	-4,874
230	<i>FAM71F2</i>	0,044	4,839
231	<i>KIAA0319</i>	0,044	5,468

232	<i>EEF1E1</i>	0,044	3,848
233	<i>PCNP</i>	0,044	-3,357
234	<i>PDZD11</i>	0,044	-4,201
235	<i>ZNF639</i>	0,044	-4,543
236	<i>FBLIM1</i>	0,045	-4,511
237	<i>TXNDC15</i>	0,045	-4,554
238	<i>ZNF876P</i>	0,045	4,421
239	<i>MAPK14</i>	0,045	-3,050
240	<i>QTRT1</i>	0,046	-4,499
241	<i>PKDREJ</i>	0,046	5,320
242	<i>TRIM44</i>	0,046	-2,630
243	<i>PPA2</i>	0,046	-2,867
244	<i>DNAJC14</i>	0,046	-4,575
245	<i>DNAJC22</i>	0,047	-4,868
246	<i>PCSK1</i>	0,047	5,155
247	<i>KANK1</i>	0,047	-4,188
248	<i>ZFR</i>	0,047	-2,608
249	<i>PSMG3</i>	0,048	-4,489
250	<i>PTPRC</i>	0,048	-4,515
251	<i>ARVI</i>	0,048	-3,930
252	<i>DYNLT3</i>	0,048	-3,983
253	<i>TBX3</i>	0,048	-5,302
254	<i>ZNF438</i>	0,048	-4,617
255	<i>GSTCD-AS1</i>	0,049	5,983
256	<i>CCDC87</i>	0,049	5,983
257	<i>C12orf71</i>	0,049	5,983
258	<i>ZNF136</i>	0,049	-4,276
259	<i>TBP</i>	0,049	-4,831
260	<i>POLR1E</i>	0,049	3,419

Таблица 2. Гены, дифференциально экспрессирующиеся между МІЕАР-положительными и МІЕАР-негативными клетками торпедоподобных структур РМЖ ( $p < 0,05$ )

№	Ген	P-value	LogFC
1	<i>FOSB</i>	0,000	-8,642
2	<i>CCDC18</i>	0,001	4,732
3	<i>GPR153</i>	0,001	-7,251
4	<i>ZNF337</i>	0,001	-7,229
5	<i>MYH4</i>	0,001	-8,198
6	<i>IER5</i>	0,001	-4,042
7	<i>MTG1</i>	0,001	-6,903
8	<i>SAMD9</i>	0,001	7,136
9	<i>OLFML2B</i>	0,001	-7,023
10	<i>KDR</i>	0,002	-7,390
11	<i>COL4A1</i>	0,002	-4,392
12	<i>MYH3</i>	0,002	-5,666

13	<i>SLIT2</i>	0,002	-6,863
14	<i>RRAS2</i>	0,002	6,386
15	<i>FOPNL</i>	0,002	5,779
16	<i>DGKI</i>	0,002	-7,395
17	<i>MED10</i>	0,002	-6,759
18	<i>TACCI</i>	0,002	-3,804
19	<i>KLHL7</i>	0,002	5,690
20	<i>KDM4C</i>	0,003	4,068
21	<i>LIAS</i>	0,003	6,305
22	<i>B4GALT6</i>	0,003	-7,148
23	<i>MFSD8</i>	0,003	6,289
24	<i>NOTCH4</i>	0,003	-7,197
25	<i>BIN2</i>	0,003	-7,121
26	<i>TCF4</i>	0,003	-6,239
27	<i>PRPF18</i>	0,004	6,746
28	<i>ACTG2</i>	0,004	-7,096
29	<i>RASD1</i>	0,004	-5,307
30	<i>DHFR2</i>	0,004	5,975
31	<i>TOE1</i>	0,004	6,024
32	<i>FAM110B</i>	0,005	-6,496
33	<i>RMI2</i>	0,005	6,043
34	<i>LTB4R2</i>	0,005	-6,939
35	<i>RSAD1</i>	0,005	6,041
36	<i>MXRA7</i>	0,005	-6,586
37	<i>STK32B</i>	0,005	-6,910
38	<i>LACTB2</i>	0,005	6,003
39	<i>CAPN9</i>	0,006	-6,896
40	<i>NPR2</i>	0,006	-6,273
41	<i>MBIP</i>	0,006	6,541
42	<i>C17orf58</i>	0,006	6,491
43	<i>CDO1</i>	0,006	-6,833
44	<i>SLC2A13</i>	0,007	6,359
45	<i>BICDL1</i>	0,007	5,241
46	<i>MMP11</i>	0,007	-6,834
47	<i>KIF26B</i>	0,007	-4,854
48	<i>ADAMTS6</i>	0,007	-6,756
49	<i>CENPL</i>	0,008	5,946
50	<i>THY1</i>	0,008	-6,283
51	<i>APEX2</i>	0,008	5,242
52	<i>PLEK2</i>	0,008	-6,383
53	<i>SYNPO2</i>	0,008	-6,323
54	<i>DUSP22</i>	0,009	-5,930
55	<i>SLC26A8</i>	0,009	-6,691
56	<i>TEKT2</i>	0,010	-6,663
57	<i>H3C7</i>	0,010	5,700
58	<i>ACTA1</i>	0,010	-5,537
59	<i>SUSD4</i>	0,010	-6,651
60	<i>PDCD1LG2</i>	0,010	-6,053



61	<i>MRVII</i>	0,011	-6,120
62	<i>ISOC1</i>	0,011	3,816
63	<i>ZNF17</i>	0,011	5,715
64	<i>RNF181</i>	0,011	5,035
65	<i>ZNF423</i>	0,012	-5,243
66	<i>FSCN2</i>	0,012	-6,534
67	<i>KXD1</i>	0,013	4,521
68	<i>SYT11</i>	0,013	-6,548
69	<i>ZNF470</i>	0,013	-5,880
70	<i>BCYRN1</i>	0,014	4,066
71	<i>BOC</i>	0,014	-5,814
72	<i>VAV1</i>	0,014	-6,492
73	<i>H2BC11</i>	0,014	5,046
74	<i>SCAMP5</i>	0,015	6,045
75	<i>PHF11</i>	0,016	3,318
76	<i>SLC10A5</i>	0,016	-6,449
77	<i>MIAP</i>	0,016	-6,523
78	<i>C19orf18</i>	0,016	5,950
79	<i>H1-6</i>	0,017	-5,919
80	<i>MED7</i>	0,017	5,438
81	<i>PKNOX1</i>	0,017	-4,008
82	<i>SDAD1P1</i>	0,017	5,940
83	<i>GLI2</i>	0,017	-6,544
84	<i>WRAP73</i>	0,018	5,444
85	<i>ZNF624</i>	0,018	-3,533
86	<i>ATP8A2</i>	0,018	-6,378
87	<i>ZEB2</i>	0,018	-3,619
88	<i>PALB2</i>	0,019	2,613
89	<i>PGAM5</i>	0,019	5,881
90	<i>MRPL23</i>	0,019	5,500
91	<i>LOC441666</i>	0,020	-5,324
92	<i>CSGALNACT1</i>	0,020	3,520
93	<i>RPH3A</i>	0,021	-6,315
94	<i>PCGF1</i>	0,021	5,384
95	<i>DOK4</i>	0,021	-6,280
96	<i>P3H3</i>	0,022	-6,288
97	<i>CSTF1</i>	0,022	2,818
98	<i>C9orf43</i>	0,022	-4,995
99	<i>LINC00536</i>	0,022	5,554
100	<i>CTSC</i>	0,023	-4,773
101	<i>DBP</i>	0,023	5,847
102	<i>USP49</i>	0,023	4,744
103	<i>SPARCL1</i>	0,023	-3,782
104	<i>C3</i>	0,023	-3,234
105	<i>EIF6</i>	0,023	4,055
106	<i>ACTR10</i>	0,024	2,868
107	<i>CCDC192</i>	0,024	-6,232
108	<i>SPAG6</i>	0,024	-5,620

109	<i>NCSI</i>	0,024	-4,655
110	<i>ZSWIM5</i>	0,025	5,783
111	<i>SCN3A</i>	0,025	-6,288
112	<i>HTRA1</i>	0,025	-4,905
113	<i>MRPL22</i>	0,026	-6,204
114	<i>A2M</i>	0,026	-3,680
115	<i>IL15RA</i>	0,026	-6,258
116	<i>IFIT1</i>	0,026	4,646
117	<i>PIP4K2A</i>	0,026	-3,162
118	<i>LSM5</i>	0,026	2,546
119	<i>ZNF256</i>	0,026	5,286
120	<i>SUFU</i>	0,027	-2,885
121	<i>CRLF3</i>	0,027	-3,588
122	<i>SLC7A6</i>	0,027	5,255
123	<i>FBXL6</i>	0,027	4,603
124	<i>ZNF837</i>	0,027	5,248
125	<i>TMEM75</i>	0,027	4,870
126	<i>DPM1</i>	0,028	3,254
127	<i>PRKAB1</i>	0,028	4,163
128	<i>EIF4A1</i>	0,028	-4,955
129	<i>RTCB</i>	0,028	3,101
130	<i>STPG3-AS1</i>	0,029	-6,143
131	<i>SGO1-AS1</i>	0,029	5,304
132	<i>NEURL1B</i>	0,029	5,706
133	<i>CPXM2</i>	0,029	-6,129
134	<i>ADCY10</i>	0,029	-5,768
135	<i>DNAJC4</i>	0,029	4,135
136	<i>WNT4</i>	0,029	5,319
137	<i>MPZL3</i>	0,030	3,347
138	<i>ZNF573</i>	0,030	3,455
139	<i>C11orf1</i>	0,030	5,331
140	<i>MAG11-AS1</i>	0,031	5,248
141	<i>FNDC1</i>	0,031	-3,688
142	<i>MRPS15</i>	0,031	2,897
143	<i>TRAF3IP3</i>	0,031	-4,871
144	<i>POMK</i>	0,032	-3,259
145	<i>AXDND1</i>	0,032	5,638
146	<i>MAP2K6</i>	0,032	-2,863
147	<i>BMPRIA</i>	0,032	3,064
148	<i>RNF225</i>	0,033	5,685
149	<i>GNRHR</i>	0,033	5,618
150	<i>TCEANC</i>	0,033	5,218
151	<i>CPVL</i>	0,033	-5,128
152	<i>TRIM59</i>	0,033	5,201
153	<i>HSPA13</i>	0,033	5,184
154	<i>SLC39A14</i>	0,033	-3,540
155	<i>MMD</i>	0,033	-6,072
156	<i>FH</i>	0,034	3,467

157	<i>MOCS3</i>	0,034	3,806
158	<i>STK16</i>	0,035	-4,559
159	<i>CD248</i>	0,035	-6,029
160	<i>CDK8</i>	0,035	3,180
161	<i>PDE12</i>	0,035	-2,416
162	<i>KBTD8</i>	0,035	-6,059
163	<i>ZMYM4-AS1</i>	0,035	-6,022
164	<i>URM1</i>	0,036	4,547
165	<i>RBP5</i>	0,037	-5,315
166	<i>MPZL2</i>	0,037	-3,372
167	<i>JMJD4</i>	0,037	-4,479
168	<i>CTDNEP1</i>	0,038	2,824
169	<i>CX3CL1</i>	0,038	-3,549
170	<i>NMD3</i>	0,038	-2,116
171	<i>DIPK1B</i>	0,038	-5,972
172	<i>FLJ37453</i>	0,038	-5,985
173	<i>CPAMD8</i>	0,038	-2,362
174	<i>CDKN2AIPNL</i>	0,038	5,207
175	<i>EDDM13</i>	0,038	4,080
176	<i>ZNF763</i>	0,038	5,095
177	<i>IER2</i>	0,039	-3,345
178	<i>C8orf58</i>	0,039	4,436
179	<i>KRT81</i>	0,039	-5,969
180	<i>TAP1</i>	0,039	5,467
181	<i>SPI1</i>	0,040	-5,940
182	<i>TMEM44</i>	0,040	-5,253
183	<i>MALRD1</i>	0,041	5,496
184	<i>ILK</i>	0,041	-5,576
185	<i>PKD2</i>	0,041	-4,585
186	<i>DENND4B</i>	0,041	-2,554
187	<i>HABP4</i>	0,041	-6,034
188	<i>LOC102724788</i>	0,042	5,494
189	<i>USP18</i>	0,042	4,959
190	<i>NOC4L</i>	0,042	-3,707
191	<i>ZNF284</i>	0,042	-5,239
192	<i>COX10</i>	0,043	5,417
193	<i>ZNF200</i>	0,043	3,615
194	<i>EXOSC2</i>	0,043	3,617
195	<i>MX2</i>	0,044	3,849
196	<i>ETS1</i>	0,044	-4,910
197	<i>SLC29A4</i>	0,044	5,070
198	<i>RPL39</i>	0,044	-3,729
199	<i>RBAK</i>	0,044	2,460
200	<i>PRC1-AS1</i>	0,045	5,022
201	<i>TMEM70</i>	0,045	-4,425
202	<i>HEIH</i>	0,045	-5,893
203	<i>CARD9</i>	0,045	3,534
204	<i>LINC01811</i>	0,045	-5,877

205	<i>HMCN1</i>	0,046	-4,058
206	<i>MAP3K21</i>	0,046	5,433
207	<i>ZC2HC1C</i>	0,046	5,017
208	<i>ST7</i>	0,047	-3,950
209	<i>COA3</i>	0,047	5,019
210	<i>NINJ2-AS1</i>	0,047	5,057
211	<i>ADAMTS16</i>	0,048	-5,848
212	<i>CAVIN3</i>	0,048	-5,855
213	<i>PROSER1</i>	0,048	2,218
214	<i>TMEM69</i>	0,048	4,343
215	<i>EOGT</i>	0,049	-4,266
216	<i>CCDC122</i>	0,049	3,098
217	<i>COL4A2</i>	0,049	-3,012
218	<i>BNIP3</i>	0,049	2,278
219	<i>KIAA1671-AS1</i>	0,049	-4,611
220	<i>ZNF517</i>	0,049	5,382
221	<i>BCL7B</i>	0,049	2,836
222	<i>TFPI2</i>	0,049	3,871
223	<i>H2AC16</i>	0,049	5,319
224	<i>BTN2A3P</i>	0,049	5,401
225	<i>TIGD7</i>	0,049	5,320
226	<i>SYT14</i>	0,049	-5,841

Таблица 3. Гены, дифференциально экспрессирующиеся между EZR-негативными и EZR-позитивными клетками торпедоподобных структур РМЖ ( $p < 0,05$ )

№	Ген	P-value	LogFC
1	<i>CD109</i>	0,000	7,836
2	<i>ID4</i>	0,000	7,848
3	<i>CA5B</i>	0,000	7,536
4	<i>GCNT7</i>	0,000	7,273
5	<i>ST8SIA1</i>	0,000	5,093
6	<i>NR4A1</i>	0,001	4,957
7	<i>SYCP3</i>	0,001	-5,976
8	<i>MAP2</i>	0,001	6,998
9	<i>LINC00539</i>	0,001	7,450
10	<i>SLC5A4</i>	0,001	7,426
11	<i>ZNF416</i>	0,001	7,004
12	<i>CGRRF1</i>	0,001	5,424
13	<i>ADAMTS6</i>	0,001	7,398
14	<i>TMEM72-AS1</i>	0,001	7,008
15	<i>ZBTB42</i>	0,001	4,585
16	<i>DCAF8L1</i>	0,001	7,244
17	<i>FAM174C</i>	0,002	-6,202
18	<i>TECTA</i>	0,002	6,910
19	<i>TCHH</i>	0,002	3,354

20	<i>DKK2</i>	0,002	4,907
21	<i>FCGR2B</i>	0,002	5,947
22	<i>SHCBP1</i>	0,003	5,146
23	<i>ERG</i>	0,003	6,681
24	<i>EHHADH</i>	0,003	-6,538
25	<i>NR4A3</i>	0,003	6,266
26	<i>SPTB</i>	0,004	6,095
27	<i>SCNN1D</i>	0,004	-5,931
28	<i>FBXO44</i>	0,004	5,561
29	<i>JAG1</i>	0,004	3,777
30	<i>ZNF48</i>	0,005	-5,777
31	<i>MYH11</i>	0,005	4,037
32	<i>ADAMTS10</i>	0,005	6,698
33	<i>ALMS1P1</i>	0,005	-5,905
34	<i>MFSD13A</i>	0,006	-5,718
35	<i>SLC26A8</i>	0,006	5,865
36	<i>EME1</i>	0,006	3,973
37	<i>C12orf57</i>	0,006	6,438
38	<i>ACOX2</i>	0,006	3,914
39	<i>RAD51B</i>	0,006	-3,888
40	<i>P3H2</i>	0,006	6,412
41	<i>SLC34A2</i>	0,007	5,464
42	<i>PRELID1</i>	0,007	-3,957
43	<i>MIR4697HG</i>	0,007	5,486
44	<i>SLFN1</i>	0,007	6,381
45	<i>VCPKMT</i>	0,007	5,681
46	<i>CARNS1</i>	0,007	-5,299
47	<i>RAD51D</i>	0,007	-4,984
48	<i>ITGA5</i>	0,008	3,486
49	<i>IMP3</i>	0,008	-5,644
50	<i>GUCY1B1</i>	0,008	6,040
51	<i>SYNC</i>	0,008	3,844
52	<i>TLR2</i>	0,008	5,146
53	<i>MUC3A</i>	0,009	4,191
54	<i>CFAP61</i>	0,009	-5,627
55	<i>NUDT15</i>	0,009	4,080
56	<i>LOC105371485</i>	0,009	-5,580
57	<i>KCNN3</i>	0,009	4,484
58	<i>NUP37</i>	0,010	-6,027
59	<i>UBL7-AS1</i>	0,011	6,257
60	<i>FAM184A</i>	0,012	-4,310
61	<i>EIF4A1</i>	0,012	-5,455
62	<i>ADAM20</i>	0,012	-5,073
63	<i>STX18-AS1</i>	0,013	4,411
64	<i>ITGA4</i>	0,013	4,204
65	<i>LOC105374580</i>	0,013	5,416
66	<i>SLC19A1</i>	0,013	-3,405
67	<i>OVCH2</i>	0,014	6,113

68	<i>LINC00847</i>	0,014	-5,371
69	<i>MRPS23</i>	0,014	2,894
70	<i>RAPGEF3</i>	0,015	-3,509
71	<i>CHCHD5</i>	0,015	-5,500
72	<i>LRGUK</i>	0,015	-4,259
73	<i>NAV3</i>	0,016	3,105
74	<i>AMN1</i>	0,016	-5,358
75	<i>FIGNL1</i>	0,019	3,754
76	<i>FAM98B</i>	0,019	3,018
77	<i>TRIM65</i>	0,020	-4,667
78	<i>DBF4B</i>	0,020	3,371
79	<i>LINC01535</i>	0,020	-4,520
80	<i>FANCC</i>	0,020	2,817
81	<i>SPARCL1</i>	0,020	3,049
82	<i>ARL6IP6</i>	0,020	-4,673
83	<i>ASIC3</i>	0,020	4,473
84	<i>CREB5</i>	0,021	5,930
85	<i>ETNK2</i>	0,022	-5,302
86	<i>CD302</i>	0,022	-5,304
87	<i>TUBG1</i>	0,022	2,652
88	<i>EGLN2</i>	0,023	-2,727
89	<i>CYCS</i>	0,023	3,001
90	<i>MAD2L1</i>	0,024	4,139
91	<i>PAXIP1-AS1</i>	0,024	-4,606
92	<i>ALG8</i>	0,024	2,422
93	<i>LRRC75B</i>	0,025	-5,165
94	<i>NFS1</i>	0,025	-3,365
95	<i>ASB8</i>	0,027	-4,029
96	<i>TRMT44</i>	0,027	-2,701
97	<i>SLIT3</i>	0,028	3,826
98	<i>TGFB111</i>	0,028	3,824
99	<i>FAM3B</i>	0,028	4,786
100	<i>DNAAF4</i>	0,028	-5,141
101	<i>BICD1</i>	0,028	3,248
102	<i>ILDR2</i>	0,029	4,499
103	<i>SNAPIN</i>	0,029	3,865
104	<i>DNAJC9</i>	0,029	-3,352
105	<i>ANGPTL2</i>	0,030	-4,200
106	<i>ZNF79</i>	0,031	-4,439
107	<i>LOC101927787</i>	0,032	-4,530
108	<i>RYR2</i>	0,032	3,510
109	<i>ALKBH2</i>	0,032	3,463
110	<i>CDK8</i>	0,032	2,825
111	<i>CA5BP1</i>	0,033	-4,149
112	<i>NMNAT3</i>	0,033	-4,367
113	<i>PLCG2</i>	0,033	2,432
114	<i>TTC31</i>	0,033	2,377
115	<i>ZNF324</i>	0,034	-3,089

116	<i>MARK1</i>	0,034	4,325
117	<i>SLC25A11</i>	0,035	-3,017
118	<i>ANO9</i>	0,035	-3,112
119	<i>MAGI2</i>	0,035	4,634
120	<i>ZNF75D</i>	0,035	-2,504
121	<i>TRIM17</i>	0,036	-4,980
122	<i>TFCP2L1</i>	0,038	3,603
123	<i>SYT8</i>	0,038	-3,476
124	<i>CYSTM1</i>	0,039	3,133
125	<i>WDR75</i>	0,040	2,052
126	<i>HCK</i>	0,041	3,710
127	<i>AIF1</i>	0,042	4,875
128	<i>TG</i>	0,042	-2,689
129	<i>LMF2</i>	0,042	-3,196
130	<i>TP73-AS1</i>	0,042	-2,345
131	<i>MIR9-3HG</i>	0,042	-4,915
132	<i>INTS7</i>	0,042	-2,765
133	<i>PTPRB</i>	0,042	3,566
134	<i>GET4</i>	0,042	-2,946
135	<i>KCNK3</i>	0,042	4,386
136	<i>TMEM220</i>	0,042	4,324
137	<i>DOCK2</i>	0,042	2,552
138	<i>AKAP12</i>	0,043	2,878
139	<i>FAM221B</i>	0,043	-4,488
140	<i>VTCN1</i>	0,045	3,018
141	<i>MORC3</i>	0,045	1,853
142	<i>RGS1</i>	0,045	2,784
143	<i>ALKBH4</i>	0,045	4,282
144	<i>PINK1-AS</i>	0,045	3,708
145	<i>WWTR1</i>	0,045	3,267
146	<i>DNAH17</i>	0,046	3,619
147	<i>ZHX2</i>	0,046	2,280
148	<i>IFI6</i>	0,046	2,704
149	<i>GID4</i>	0,047	-3,549
150	<i>ZNF580</i>	0,047	-3,036
151	<i>COL7A1</i>	0,047	-3,204
152	<i>SLIT2</i>	0,047	3,219
153	<i>HMCN2</i>	0,047	3,813
154	<i>TOPORS</i>	0,048	2,009
155	<i>ALG1</i>	0,048	-3,476
156	<i>FUT1</i>	0,048	-4,827
157	<i>PPP5D1</i>	0,048	-4,171
158	<i>ST20</i>	0,049	-4,546
159	<i>SLPI</i>	0,049	-2,857
160	<i>ZRSR2</i>	0,049	2,013
161	<i>LRP3</i>	0,049	-3,068
162	<i>LINC00216</i>	0,049	4,110

## Благодарность

Автор выражает искреннюю благодарность научным консультантам доктору биологических наук, профессору, чл.-корр. РАН Чердынцевой Надежде Викторовне и доктору медицинских наук, профессору, заслуженному деятелю науки РФ Перельмутеру Владимиру Михайловичу за всестороннюю помощь в проведении диссертационного исследования.

Автор выражает глубокую признательность:

- профессору Завьяловой М.В. (НИИ онкологии Томского НИМЦ) за помощь в проведении морфологического исследования и анализе результатов иммуногистохимического окрашивания.

- профессору РАН Лебедеву И.Н. и кандидату медицинских наук Скрябину Н.А. (НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ) за помощь в проведении сравнительной микроматричной гибридизации и биоинформатического анализа данных.

- докторам Johan Wilhelm и Susanna Ziegler (German Center for Lung Research) за помощь в постановке эксперимента с микроматричным экспрессионным профилированием.

- к.м.н. Геращенко Т.С. (НИИ онкологии Томского НИМЦ) и к.м.н. Слепцову А.А. (НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ) за помощь в проведении микроматричного экспрессионного профилирования и биоинформатического анализа данных.

- к.м.н. Таширевой Л.А. (НИИ онкологии Томского НИМЦ) за помощь в проведении иммуногистохимического/иммунофлюоресцентного окрашивания и анализе полученных данных.

- к.б.н. Киселёву А.М., Золотаревой С.Ю. и Новикову Н.М. за помощь в биоинформатическом анализе данных РНК-секвенирования.