

На правах рукописи

ИБРАГИМОВА МАРИНА КОНСТАНТИНОВНА

**ИЗМЕНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ЛАНДШАФТА ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В
ПРОЦЕССЕ НЕОАДЪЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ: СВЯЗЬ С МЕТАСТАЗИРОВАНИЕМ**

14.01.12 – онкология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Томск – 2021

Работа выполнена в Научно-исследовательском институте онкологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «ТОМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

Научный руководитель:

доктор биологических наук
Литвяков Николай Васильевич

Официальные оппоненты:

Рукша Татьяна Геннадьевна

доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого" Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующая кафедрой патологической физиологии им. проф. В.В. Иванова

Жуков Николай Владимирович

доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, руководитель отдела междисциплинарной онкологии

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России)

Защита состоится «__» _____ 2021 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.052.01 на базе федерального государственного бюджетного учреждения "Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова" Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 197758, Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, дом 68

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России по адресу 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68, на сайте <http://www.nioncologii.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2021 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Филатова Лариса Валентиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Известно, что основной причиной смерти онкологических больных является развитие метастатической болезни. Не исключением является и рак молочной железы (РМЖ). При этом, в зависимости от локализации и стадии опухолевого процесса, процент больных, у которых в различные сроки после удаления первичной опухоли молочной железы развиваются метастазы, колеблется от 15 до 75% [Sopik V., Narod S.A. 2018, Yu K.-D. et al 2015]. В настоящее время определены многие клинко-морфологические факторы, позволяющие прогнозировать исход при РМЖ. К ним относят размер опухоли, молекулярный подтип, менструальный статус, лимфогенное метастазирование [Fung F. et al 2017]. Для оценки риска метастазирования и назначения адъювантной химиотерапии у больных ранним раком молочной железы допускается применение следующих систем: OncotypeDX, PAM50, Breast Cancer Index, урокиназного активатора плазминогена и ингибитора активатора плазминогена I типа [Harris L.N. et al 2016]. Считается, что только у 30% пациентов известные прогностические факторы могут с высокой долей вероятности прогнозировать развитие метастазов или благоприятный исход, у подавляющего же большинства пациентов (70%) прогноз исхода заболевания остается неопределенным [Weigelt B. et al 2010].

Механизмы метастазирования до конца не выяснены, нет четкого ответа на спорные вопросы о критических точках этого процесса, воздействие на которые привели бы к предотвращению метастазирования. Все известные прогностические факторы только отчасти затрагивают механизм метастазирования или какие-то побочные проявления метастатической болезни. До сих пор непонятно, почему, при одной и той же локализации опухоли, у одних пациентов развиваются метастазы, а у других пациентов нет, как происходит инициация метастазирования. При раке молочной железы было показано, что если пациентам проводить только оперативное лечение, то от 20 до 60% больных, в зависимости от размера опухоли, переживали 5-летний период наблюдения [Fisher B. et al 1969, Алферова М. 1977]. Все это свидетельствует в пользу того, что проблема, касающаяся механизмов развития и инициации метастазирования, а также основанных на их знании прогностических факторов, до настоящего времени остается нерешенной. Именно поэтому, изучение механизмов метастазирования является одним из основных направлений исследований в современной онкологии.

Химиотерапия, в том числе и неоадъювантная, является системным компонентом лечения рака молочной железы. По современным данным, химиотерапия, как минимум в 20% случаев может стимулировать появление мутаций, которые приводят к метастазированию и прогрессии заболевания [Kreso A. et al 2013, Landau D.A. et al 2015, Oshima K. et al 2016, Shah S.P. et al 2012]. Неоадъювантная химиотерапия (НХТ), в некоторых случаях, вызывает метастазирование рака молочной железы через ТМЕМ (tumor microenvironment of metastasis)-опосредованный механизм и усиливает метастатическое распространение опухоли [Karagiannis G.S. et al 2017]. У некоторых пациентов и в эксперименте было показано, что химиотерапия может способствовать этапам процесса метастазирования: стимулировать ЭМП в опухолевых клетках, инвазию, интравазацию и воспаление [Sato R. et al 2016]. У 40% больных раком пищевода под действием НХТ происходило увеличение количества мутаций, что было сопряжено с плохим ответом на химиотерапию и негативным исходом [Murugaesu N. et al 2015]. Резистентные опухоли показывали драйверные мутации и амплификации генов de novo в даже ответ на на кратковременное предоперационное лечение [Findlay J.M. et al 2016]. Т.о., можно констатировать, что распространение метастазов имеет высокую степень связанности с клональной эволюцией опухоли, в том числе и с клональной эволюцией в процессе лечения. Очевидно, что рецидив или прогрессирование после ранее достигнутого эффекта обусловлены наличием резистентного клона, который существовал на момент начала терапии и после химиотерапии или возник в процессе проведения химиотерапии. В последнем случае, появившиеся новые клоны, обладают высоким метастатическим потенциалом и оценка их генетического ландшафта в сравнении с опухолью до лечения, покажет, какие изменения

генетического ландшафта действительно ассоциированы с метастазированием. Проведение химиотерапии больным без клонов способных к метастазированию, сопряжено с опасностью того, что химиопрепараты могут стимулировать клональную эволюцию опухоли и это вызовет появление метастатических клонов. Прогноз возникновения способности к метастазированию в процессе предоперационной терапии представляет значительный интерес.

В этом и состоит основная идея диссертационной работы. Предполагалось исследовать изменения CNA (Copy Number Aberrations – CNA) – генетического ландшафта опухоли молочной железы в процессе предоперационной химиотерапии, чтобы выявить появления новых CNA под действием химиотерапии и их сопряженность с метастазированием. Если таковая подтверждается, то после этого аннотировать гены, локализованные в хромосомных регионах, найти общую систему, которая может участвовать в механизмах метастазирования и подтвердить ее роль в механизмах метастазирования.

Степень разработанности темы исследования

Известно, что наличие aberrаций числа копий амплификаций и делеций является составляющей генетического ландшафта опухолевых клеток [McGranahan N.et al 2012, Suvà M.L.et al 2014]. В свою очередь, делеции или амплификации хромосомных регионов могут влиять на экспрессию генов, как правило, при делециях экспрессии генов, локализованных в делетированном регионе, снижена, при амплификациях – повышена. Более того, при наличии амплификации, увеличивается ответ на стимуляцию экспрессии со стороны внешних и внутренних факторов (микроРНК, цитокины, другие факторы микроокружения) [Huang N.et al 2012, Xu Y.et al 2012].

На сегодняшний день существует множество исследований CNA при РМЖ в различных контекстах, в том числе и в процессе лечения, однако практически нет работ, которые связывали появление *de novo* CNA под действием терапии с метастазированием. Например, в работе Н. Wang и коллег, был проанализирован CNA-профиль 765 опухолей молочной железы. Были проведены только описательные исследования и идентифицированы амплификации длинного плеча 1 и 8 хромосом, как наиболее часто встречаемые при РМЖ [Wang H.et al 2017]. В 2019 году опубликована работа Gómez-Miragaya J. с коллегами, где исследован CNA-ландшафт клеточной модели метастатического трижды негативного РМЖ и опять описаны только наличие наиболее часто встречаемых амплификаций в локусах 1q, 8q и 10p [Gómez-Miragaya J.et al 2019]. Секвенирование опухолей 851 больного РМЖ показали 8 различных частых амплификаций генов (TOP2A 34,9%; ERBB2 30,6%; ZNF703 30,1%; TP53 21,9%; PIK3CA 24,1%; CCND1 17,7%; PAK1 14,9%; FGFR 12,6%) [Loibl S.et al 2019]. Даже проект TCGA (The Cancer Genome Atlas) с 1077 больными РМЖ приводит только описание CNA генов, но не их появление в процессе лечения и связь с метастазированием (cBioPortal for Cancer Genomics).

Активно ведутся исследования по изучению клонального состава в паре опухоль/метастаз. Charlotte K.Y. Ng, et al. (2017), в работе представлено 9 случаев исследования CNA-генетического ландшафта первичных опухолей и их метастазов. Наблюдается значительная гетерогенность между первичной опухолью и метастазами, что связывают с независимой эволюцией метастазов [Ng C.K.et al 2017]. В 2015 году Brastianos P.K. и соавторы провели секвенирование опухолевой, нормальной ткани и метастазов для 86 пациентов с РМЖ. Были выявлены изменения, прогнозирующие чувствительность к ингибиторам PI3K/АКТ/mTOR, CDK и HER2/EGFR, и у 53% пациентов клинически информативные мутации не были обнаружены в первичных опухолях [Brastianos P.K.et al 2015]. Есть и экспериментальные исследования на эту тему [Sprouffske K.et al 2020], однако, все эти исследования скорее покажут пути развития метастазов, но не причину их появления и инициации, они не помогут ответить на вопрос, почему у одних пациентов метастазы развиваются, а у других нет и, соответственно, не помогут разработать точные прогностические критерии, которые послужат для персонализации лечения пациентов.

Метастазирование – это комплексный каскад, включающий в себя серию последовательных стадий: инвазия, интравазация, циркуляция опухолевых клеток в крови, экстравазация, выживание во

вторичных органах и образование метастазов [Yang J. et al 2020]. Согласно иерархической модели развития опухоли считается, что только опухолевые стволовые клетки (ОСК) способны к образованию новых опухолей и, соответственно, образованию метастазов [Beck B. and Blanpain C. 2013]. ОСК молочных желез существуют в виде очень небольшой доли клеток в молочной железе, они недифференцированы и могут продуцировать новые ОСК посредством самообновления. Их асимметричные деления приводят к появлению прогениторных клеток, которые при нескольких симметричных делениях дают большое количество дифференцированных опухолевых клеток, неспособных к делению [Aragona M. et al 2017, Lloyd-Lewis B. et al 2017, Soteriou D. and Fuchs Y. 2018]. Учитывая, что ОСК это очень небольшая группа клеток, это существенно снижает вероятность их метастазирования и наоборот, высокая частота дифференцированных и прогениторных опухолевых клеток [Litviakov N.V. et al 2020] делает их прекрасными кандидатами для диссеминации, тем более, что именно эти клетки наиболее часто мутируют под действием терапии, а ОСК наоборот крайне химиорезистентны [Lloyd-Lewis B., Harris O.B. 2017].

Еще в 2011 году была показана стволовая пластичность дифференцированных опухолевых клеток и приобретение стволового фенотипа дифференцированными опухолевыми клетками [Gupta P.B. et al 2011]. Двумя годами позже Chaffer C. с коллегами опубликовала данные о том, что разные опухоли существенно различаются по способности к стволовой пластичности (nonCSC to-CSC plasticity) или стволовому переходу и этим будет определяться их злокачественный потенциал и способность к прогрессии. Chaffer C. было высказано предположение, что способность к стволовому переходу, индукции стволовости, а также активность стволо-подобных опухолевых клеток определяет злокачественность опухоли и, главное, ее способность к метастазированию [Chaffer C.L. et al 2013]. Доказательство стволовой пластичности представили американские ученые, хотя и не высказывали такого предположения. Они показали, что селективная абляция Lgr5⁺ стволовых опухолевых клеток ограничивает рост первичной опухоли, но не приводит к регрессии опухоли. Вместо этого опухоли поддерживаются пролиферативными Lgr5⁻ клетками, которые непрерывно пытаются пополнить пул стволовых клеток, что приводит к быстрому повторному инициированию роста опухоли после прекращения лечения. Примечательно, что этот процесс имеет решающее значение для формирования и роста метастазов колоректального рака в печени [e Melo F.d.S. et al 2017]. Китайские ученые показали, что эктопическая коэкспрессия Oct4/Nanog наделила дифференцированные клетки немелкоклеточного рака легкого свойствами ОСК, включая самообновление, лекарственную устойчивость, ЭМП и высокую опухоль-иницирующую активность [Liu L. et al 2020]. Дедифференцированные стволоподобные клетки могут осуществлять коллективную инвазию [Quan Q. et al 2020].

Мы так же, как и С. Chaffer полагаем, что способность к стволовой пластичности, индукции стволового фенотипа у дифференцированных опухолевых клеток, определяет злокачественность опухоли и, главное, способность к метастазированию, которая может появиться *de novo* под действием химиотерапии. Отсутствием способности к стволовой пластичности и индукции полноценного стволового фенотипа объясняется неспособность некоторых опухолей к метастазированию. Необходимо выявить, какие генетические изменения, под действием лечения, происходят в опухоли и играют ли они роль в стволовой пластичности.

Цель исследования

Исследование механизмов связи изменений CNA-генетического ландшафта опухоли молочной железы в процессе неoadьювантной химиотерапии с метастазированием.

Задачи исследования

1. Описать CNA-ландшафт опухоли молочной железы люминального В HER2-негативного подтипа в зависимости от ответа на НХТ и основных клинико-морфологических параметров

2. Оценить изменения CNA-генетического ландшафта опухоли молочной железы в процессе неoadьювантной химиотерапии и связь этих изменений с метастазированием
3. Провести аналитическую работу по данным проекта TCGA: связь амплификаций 3q, 5p, 6p, 7q, 8q, 9p, 10p, 10q, 12p, 13q, 16p, 18q, 19p со смертностью при различных локализациях
4. Аннотировать гены, находящиеся в хромосомных регионах локализации амплификаций, возникающих под действием неoadьювантной химиотерапии
5. Оценить уровень экспрессии генов стволовости, находящихся в регионах локализации амплификаций, возникающих под действием неoadьювантной химиотерапии
6. Исследовать транскриптом опухоли больных с люминальным В HER2-негативным РМЖ в зависимости от наличия/отсутствия гематогенного метастазирования до и после проведения предоперационной химиотерапии
7. Оценить значение амплификаций генов стволовости для способности к стволовой пластичности дифференцированных опухолевых клеток.

Научная новизна

Впервые при исследовании изменения CNA-генетического ландшафта первичной опухоли до лечения и после неoadьювантной химиотерапии (НХТ) было установлено, что под действием НХТ в остаточной резидуальной опухоли могут элиминироваться опухолевые клоны и появляться новые клоны, несущие CNA, и для гематогенного метастазирования ключевое значение, имеют амплификации. Появление амплификаций ассоциировано со 100% гематогенным метастазированием, а элиминация клонов с амплификациями приводит к благоприятному исходу. Впервые установлены хромосомные регионы, которые появлялись в процессе НХТ и были связаны с развитием метастазов: 3q(26.31-27.1), 5p(15.33-15.2), 6p(25.2-24.2; 21.2-12.2), 7q(11.1-36.3), 8q(11.21-24.3), 9p(24.2-21.2), 10p(15.3-11.1), 10q(21.3-22.2; 25.1-25.2), 12p(13.33-11.22) 13q(12.3-34), 16p(13.3-11.2), 18q(11.1-23) 19p(13.3-12). Показано, что у всех пациентов с метастазами в резидуальной опухоли наблюдается минимум 2 амплификации из обозначенных регионов. При 1 амплификации или их отсутствии (в том числе и за счет элиминации под действием НХТ) опухоли не метастазировали.

Впервые проведен анализ связи частоты 2-х и более амплификаций 3q(26.31-27.1), 5p(15.33-15.2), 6p(25.2-24.2; 21.2-12.2), 7q(11.1-36.3), 8q(11.21-24.3), 9p(24.2-21.2), 10p(15.3-11.1), 10q(21.3-22.2; 25.1-25.2), 12p(13.33-11.22) 13q(12.3-34), 16p(13.3-11.2), 18q(11.1-23) 19p(13.3-12) 8356 больных базы данных TCGA (The Cancer Genome Atlas) со смертностью (по данным ВОЗ) при различных локализациях, который показал исключительно высокий уровень корреляции ($R = 0.842$, $p\text{-level}=0.000011$), что свидетельствует об универсальности наличия/отсутствия 2-х и более амплификаций идентифицированных регионов как маркера исхода заболевания.

Впервые было проведено аннотирование генов, находящихся в регионах локализации амплификаций, возникающих под действием неoadьювантной химиотерапии: 3q(26.31-27.1), 5p(15.33-15.2), 6p(25.2-24.2; 21.2-12.2), 7q(11.1-36.3), 8q(11.21-24.3), 9p(24.2-21.2), 10p(15.3-11.1), 10q(21.3-22.2; 25.1-25.2), 12p(13.33-11.22) 13q(12.3-34), 16p(13.3-11.2), 18q(11.1-23) 19p(13.3-12). Было показано, что единственной системой, гены которой представлены во всех этих регионах являются гены системы индукции и поддержания стволового фенотипа клеток и самообновления или гены стволовости, всего в этих регионах локализовано 48 генов стволовости.

Впервые была изучена экспрессия генов стволовости опухоли до лечения и после НХТ. Было показано, что до лечения у больных без метастазов гиперэкспрессированы только 3/13 генов стволовости, при этом у больных с возникшим впоследствии гематогенным метастазированием гиперэкспрессированы 7 генов стволовости. После проведения НХТ у больных без метастазов гиперэкспрессированы 6 генов стволовости, в группе с метастазами гиперэкспрессированы 11 из 13 генов стволовости.

Впервые проведено исследование влияние амплификации длинного плеча 8 хромосомы на опухолевый транскриптом, независимо от других молекулярно-генетических признаков. Показано, что амплификация 8q с участием региона 8q24 локализации гена стволовости MYC приводит к значительному сдвигу уровня транскрипции большого количества генов именно после воздействия химиотерапии.

Впервые был проведен эксперимент по индукции стволовой пластичности в популяции нестволовых опухолевых клеток *in vitro* и оценка значения наличия амплификаций 3q, 5p, 6p, 7q, 8q, 9chr, 10p, 10q22.1, 12p, 13q, 16p, 18chr, 19p для ее индукции. На клеточных культурах опухоли молочной железы SK-BR-3, MCF-7 и BT-549 было показано, что отсортированные дифференцированные опухолевые клетки CD44-CD24- культур SK-BR-3 и MCF-7, содержащие амплификации генов стволовости были способны к дедифференцировке под действием ИЛ6 до опухолевых стволовых клеток с образованием маммосфер. Дифференцированные (CD44-CD24-) опухолевые клетки культуры BT-549, которые не имели амплификаций генов стволовости и под действием ИЛ6 не образовывали ОСК и маммосфер. Эти результаты показали, что способность дифференцированных опухолевых клеток к стволовой пластичности и потенциальной возможности формирования метастатических колоний, определяется наличием в их геноме амплификаций локусов генов стволовости.

Теоретическая и практическая значимость

На основе полученных результатов была сформулирована гипотеза и получены ее доказательства о способности опухоли к метастазированию. Приобретение способности к метастазированию происходит при эктопической экспрессии генов стволовости (MYC, SOX2, KLF4, OCT4, NODAL, NOTCH1, NANOG и др.) за счет амплификаций их локусов в разных хромосомах опухолевых клеток. Согласно нашей аннотации плечи хромосом, где локализованы гены стволовости это: 3q(26.33; 34), 5p(15.33; 13.1), 6p(24.3; 22.3; 21.33; 21.32), 7q(11.23; 21.13; 31.2; 32.1), 8q(11.21; 24), 9p(21.2), 9q(34.3; 21.13; 31.2, 22.33), 10p(15.2; 13; 12.2; 11.22), 10q22.1, 12p(13.31) 13q(34; 32.3; 22.1; 13.3; 12.2), 16p(11.2; 13.3), 18q(21.1; 21.2) 19p(13.3; 13.2; 13.12). Было показано, что при 2-х и более амплификациях разных хромосом в остаточной резидуальной опухоли резко увеличивается частота метастазирования. Элиминация в процессе предоперационной химиотерапии имеющихся амплификаций приводила к 100% выживаемости. Прямой эксперимент с индукцией стволовой пластичности на первичных культурах опухолевых клеток показал, что дедифференцировка происходит только, если в опухолевых клетках есть 2-е и более амплификации генов стволовости. Полученные нами приоритетные данные о феномене стволовой пластичности опухолевых клеток, его клиническом значении для метастазирования и механизмах его осуществления, дает нам возможность приступить к изучению эффективности ингибирования эктопической экспрессии генов стволовости для подавления способности опухолевых клеток к стволовой пластичности и метастазированию. Тем самым будет обоснован выбор генов стволовости в качестве мишеней для их ингибирования и профилактики метастазирования.

Амплификации генов стволовости показали высокую прогностическую значимость, как маркеров для оценки способности опухоли к метастазированию и могут быть использованы для определения целесообразности назначения предоперационной химиотерапии и оценки ее эффективности, что позволяет персонализировать назначение предоперационной химиотерапии больным раком молочной железы. Эти принципы назначения НХТ могут быть экстраполированы и на другие молекулярные подтипы рака молочной железы и другие локализации опухолей и станут новым направлением персонализированной терапии онкологических больных.

Методология и методы исследования

С использованием технологии микроматричного анализа в методологию исследования было включено описание CNA-ландшафта опухоли молочной железы люминального В HER2-негативного подтипа в зависимости от ответа на НХТ и основных клинико-морфологических параметров. Также

проведено сравнение CNA-генетического ландшафта опухоли молочной железы до и после неoadъювантной химиотерапии, и оценена связь этих изменений с метастазированием. При помощи биоинформатического анализа в методологию исследования была включена аналитическая работа по данным проекта TCGA – оценили связь амплификаций 3q, 5p, 6p, 7q, 8q, 9p, 10p, 10q, 12p, 13q, 16p, 18q, 19p со смертностью при различных локализациях, и включено аннотирование генов, находящиеся в хромосомных регионах локализации амплификаций, возникающих под действием неoadъювантной химиотерапии. Посредством метода PCR Real-Time оценен уровень экспрессии генов стволовости, находящихся в регионах локализации амплификаций, возникающих под действием неoadъювантной химиотерапии, при этом исследование транскриптома опухоли больных с люминальным В HER2-негативным РМЖ в зависимости от наличия/отсутствия гематогенного метастазирования до и после проведения предоперационной химиотерапии проводили с использованием технологии экспрессионного микроматричного анализа. С использованием клеточных технологий на заключительном этапе проведено оценка значения амплификаций генов стволовости для способности к стволовой пластичности дифференцированных опухолевых клеток.

Положения, выносимые на защиту

1. Индукция *de novo* под действием НХТ амплификаций хромосомных локусов в опухоли молочной железы сопряжена со 100 % метастазированием. Элиминация под действием НХТ амплификаций локусов 3q(26.33; 34), 5p(15.33; 13.1), 6p(24.3; 22.3; 21.33; 21.32), 7q(11.23; 21.13; 31.2; 32.1), 8q(11.21; 24), 9p(21.2), 9q(34.3; 21.13; 31.2, 22.33), 10p(15.2; 13; 12.2; 11.22), 10q22.1, 12p(13.31) 13q(34; 32.3; 22.1; 13.3; 12.2), 16p(11.2; 13.3), 18q(21.1; 21.2) 19p(13.3; 13.2; 13.12) сопряжена с отсутствием метастазирования

2. Амплификации 2-х и более разных хромосомных регионов 3q(26.33; 34), 5p(15.33; 13.1), 6p(24.3; 22.3; 21.33; 21.32), 7q(11.23; 21.13; 31.2; 32.1), 8q(11.21; 24), 9p(21.2), 9q(34.3; 21.13; 31.2, 22.33), 10p(15.2; 13; 12.2; 11.22), 10q22.1, 12p(13.31) 13q(34; 32.3; 22.1; 13.3; 12.2), 16p(11.2; 13.3), 18q(21.1; 21.2) 19p(13.3; 13.2; 13.12) приводит к эктопической экспрессии ключевых генов стволовости в первичной и резидуальной после НХТ опухоли молочной железы, что сочетается с очень высокой частотой гематогенного метастазирования.

3. Только при наличии в опухоли амплификаций 2-х и более разных хромосомных регионов 3q(26.33; 34), 5p(15.33; 13.1), 6p(24.3; 22.3; 21.33; 21.32), 7q(11.23; 21.13; 31.2; 32.1), 8q(11.21; 24), 9p(21.2), 9q(34.3; 21.13; 31.2, 22.33), 10p(15.2; 13; 12.2; 11.22), 10q22.1, 12p(13.31) 13q(34; 32.3; 22.1; 13.3; 12.2), 16p(11.2; 13.3), 18q(21.1; 21.2) 19p(13.3; 13.2; 13.12) дифференцированные опухолевые клетки становятся способными к стволовой пластичности и дедифференцируются до опухолевых стволовых клеток.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов исследования подтверждается достаточным клиническим материалом исследования, высоким методологическим и методическим уровнем с использованием современных информативных и полногеномных методов исследования: микроматричных, биоинформатических, молекулярно-генетических, экспериментальных моделей *in vitro*. Обоснованность полученных результатов подтверждается корректной статистической обработкой материала. Результаты представленной работы представлены и обсуждены на следующих конференциях: Всероссийская конференция «Молекулярная онкология: итоги и перспективы», Москва (2015-2019 гг.); Всероссийская конференция молодых ученых-онкологов, посвященная памяти академика РАМН Н.В. Васильева, Томск (2015-2020 гг.); Международный форум «Белые ночи», Санкт-Петербург (2015, 2018, 2020 гг.); Международная конференция «Перспективы развития фундаментальных наук», Томск (2015, 2019, 2020 гг.); Международная конференция OpenBio, г. Кольцово Новосибирской области (2016 г.); International conference “Physics of cancer: interdisciplinary problems and clinical Applications», Tomsk, Russia (2016,

2017 г.); Российский онкологический конгресс, Москва (2017, 2018 г.); Съезд онкологов и радиологов стран СНГ И Евразии, г. Сочи (2018 г.); Всероссийская конференция с международным участием «Опухолевые маркеры: молекулярно-генетические и клинические аспекты» г. Горно-Алтайск (2018, 2019 г.); Всероссийская конференция «Новые технологии диагностики наследственных болезней», Москва (2018 г.); Международная конференция “Постгеном’2018”, г. Казань (2018 г.); II Объединенный научный форум «Белки и пептиды», Сочи (2019 г.); Всероссийская конференция «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии», г. Ростов-на-Дону (2020 г.); Научно-практическая конференция РОМГ, г. Москва (2020 г.).

Внедрение результатов исследования

Основные положения работы внедрены в учебный план автономной магистерской программы «Трансляционные химические и биомедицинские технологии» Томского государственного университета по курсу «Молекулярная онкология». По материалам диссертации зарегистрированы 2 патента RU № 2682879 и RU №2594251 и 8 баз данных (RU 2020620652, RU 2020620411, RU 2019620995, RU 2019620731, RU 2019620470, RU 2019620414, RU 2019620413, RU 2018620706).

Личный вклад автора

Личный вклад соискателя состоит в изучении и анализе литературы по теме диссертационного исследования. Соискатель самостоятельно проводил комплекс исследований по изучению изменения генетического ландшафта опухоли молочной железы в процессе неoadьювантной химиотерапии, включающие выделение ДНК и РНК, капиллярный электрофорез, количественную ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени, биоинформатическую обработку данных. Соискатель непосредственно участвовал в проведении микроматричного анализа на ДНК-, РНК- чипах и проведении эксперимента по индукции стволовой пластичности в популяции нестволовых опухолевых клеток *in vitro* на базе ИХБФМ СО РАН. Разработка дизайна исследования, определение методологии исследования, анализ, создание электронных баз данных, а также подготовка научных публикаций проводилась вместе с руководителем. Статистическая обработка материала, обобщение полученных данных и интерпретация результатов, оформление диссертации проводилась соискателем самостоятельно.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Согласно паспорту научной специальности 14.01.12 Онкология (биологические науки) диссертационное исследование соответствует п. 2 «Исследования по изучению этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, и др.)»

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов, списка литературы и приложений. Работа изложена на 196 страницах, включает 37 рисунков и 15 таблиц. Список литературы содержит 477 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование включены 60 больных РМЖ T₁₋₄N₀₋₃M₀ (IIA–IIIB стадии) люминального В HER2-негативного подтипа, с морфологически верифицированным диагнозом (средний возраст 46,2±0,4 лет), получавшие лечение в клинике НИИ онкологии Томского НИМЦ. Исследование проходило в соответствии с Хельсинкской Декларацией 1964 г. (исправленной в 1975 и 1983 гг.) и с разрешения локального этического комитета института (протокол №1, от 14 января 2013 года), все пациенты подписали информированное согласие на исследование. Для стадирования РМЖ использована TNM-

классификация AJCC (8-е издание, 2017 г.). В качестве исследуемого материала, были использованы биопсийные опухолевые образцы (~10 мм³), взятые до лечения под контролем УЗИ, а также операционный материал (~60–70 мм³) после НХТ. Больные имели ПА – ПШВ стадии и в соответствии с «Consensus Conference on Neoadjuvant Chemotherapy in Carcinoma of the Breast, April 26 – 28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania» [Schwartz G.F. and Hortobagyi G.N. 2004] в неoadъювантном режиме получали 4-8 курсов химиотерапии по схемам FAC (фторурацил, доксорубин, циклофосфан), AC (доксорубин, циклофосфан), CAH (циклофосфан, доксорубин, кселода), CP (циклофосфан, цисплатин) и монотерапию таксотером, АСТ (доксорубин, циклофосфан, таксотер) и АТ (доксорубин, таксотер). Через 3-5 недель после НХТ проводилась операция в объеме радикальной или подкожной мастэктомии, радикальной резекции, секторальной резекции с аксиллярной лимфаденэктомией или другого вида органосохранной операции, далее больным проводилась лучевая терапия и/или гормональное лечение назначались по показаниям. Эффективность предоперационной химиотерапии оценивали по критериям ВОЗ и Международного противоракового союза (International Union Against Cancer) [Hayward J.et al 1977] с помощью УЗИ и/или маммографии, которые проводили до лечения, после 2 курсов НХТ и перед операцией. 8356 пациентов со злокачественными новообразованиями различных локализаций включены для проведения аналитической работы по данным проекта TCGA [cBioPortal for Cancer Genomics](http://cBioPortal.org).

На Рис. 1 представлен дизайн исследования, согласно этапам которого, проведено выполнение всех запланированных задач представленной работы.

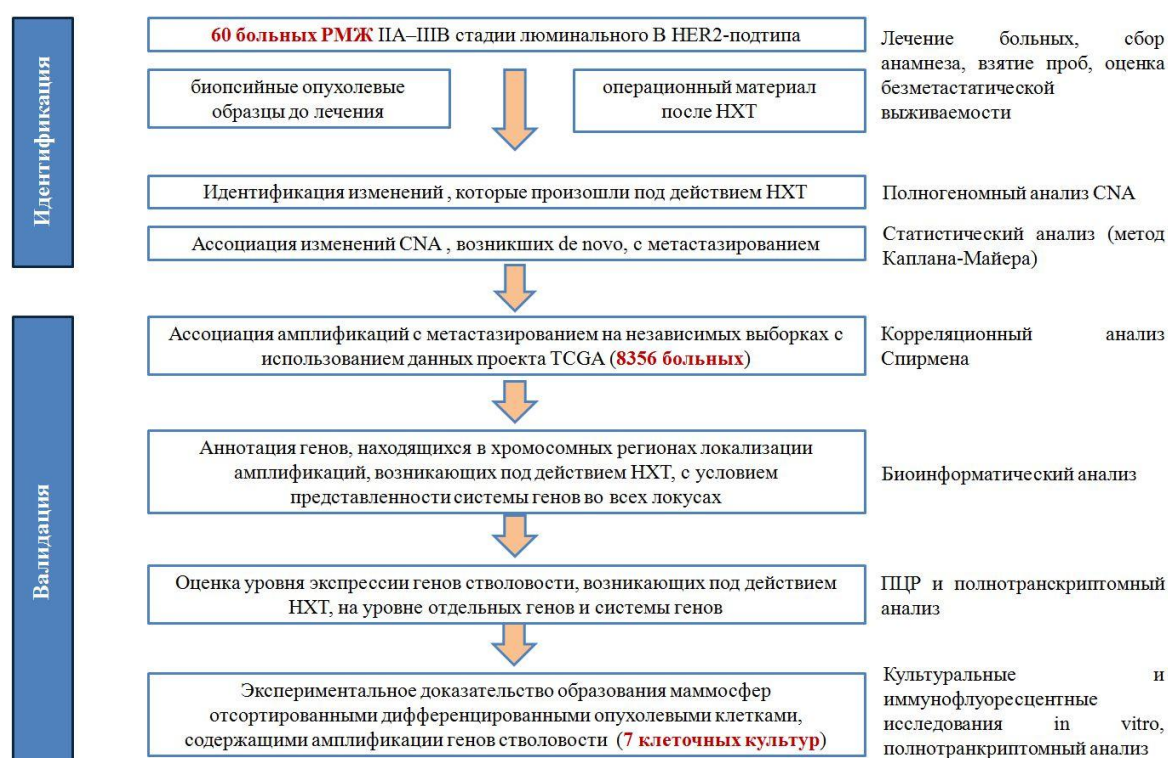


Рис. 1. Дизайн исследования

Тотальная РНК была выделена из 60 парных образцов до лечения и после НХТ от каждого пациента. РНК выделяли с помощью набора RNeasy Plus mini Kit (Qiagen, Germany, #74134), в соответствии с инструкцией производителя. Далее на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, USA) оценивали концентрацию и чистоту выделения РНК. Концентрация РНК составила от 15 до 150 нг/мкл, $A_{260}/A_{280} = 1,65-1,95$; $A_{260}/A_{230} = 1,80-1,95$. Целостность РНК оценивалась при помощи капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, USA) и набора R6K ScreenTape (Agilent Technologies, USA #5067-5367). RIN составил 5,8 – 9,0. Капиллярный электрофорез

выполнен на приборе TapeStation (Agilent Technologies, USA). Показатель целостности РНК - RIN (RNA Integrity Number) составил 8.3.

ДНК выделяли из 60 парных образцов опухоли молочной до лечения и после НХТ от каждого пациента при помощи набора QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Germany # 51304) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию и чистоту выделения ДНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, USA). Концентрация составила от 50 до 290 нг/мкл, $A_{260}/A_{280} = 2,01-2,26$; $A_{260}/A_{230} = 2,09-2,33$. Целостность ДНК оценивалась при помощи капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, USA) с использованием набора Agilent Genomic DNA ScreenTape System Quick Guide (Agilent Technologies, USA # 5067-5365).

Уровень экспрессии генов *TERT* (5p15.33); *OCT3* (6p21.33); *SMO* (7q32.1); *SNAI2* (8q11.21); *MYC* (8q24.21); *TGFBR1* (9q22.33); *KLF4* (9q31.2); *BM11* (10p12.2); *VIM* (10p13); *FLT3* (13q12.2); *SMAD2* (18q21.1); *KLF1* (19p13.13) оценивали при помощи обратнo-транскриптазной количественной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR) с оригинальными праймерами и зондами по технологии TaqMan. Для получения кДНК на матрице РНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора RevertAid™ (Thermo Fisher Scientific, USA) со случайными гексануклеотидными праймерами в соответствии с инструкцией к набору. В качестве гена-рефери использовали два гена рефери: GAPDH (glyceraldehydes-3-phosphatedehydrogenase) и ACTB (actin beta).

Микроматричный анализ проводили на микроматрицах (ДНК-чипах) высокой плотности фирмы Affymetrix (USA) CytoScan™ HD Array. Процедуры пробоподготовки, гибридизации и сканирования проводили в соответствии с протоколом производителя на системе Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix, USA). Для обработки результатов использовали программу «Chromosome Analysis Suite 4.0» (Affymetrix, USA). Полнотранскриптомный микроматричный анализ проводился на микрочипах Clariom™ S Assay, human (ThermoFisher Scientific, USA) для определения ДЭГ. Процедуры пробоподготовки, гибридизации и сканирования проводили в соответствии с протоколом производителя на системе Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix, USA). Анализ данных микрочипа осуществлялся при помощи программы Transcriptome Analysis Console (TAC) software 4.0.

В исследовании были использованы следующие культуры клеток опухоли молочной железы: BT-474, BT-549, MDA-MB-231, MDA-MD-468, MCF7, SK-BR-3 и T47D. Клетки MCF-7 культивировали в среде IMDM, клетки SK-BR-3 культивировали в среде DMEM:F12, клетки BT-549 культивировали в среде DMEM, клетки MDA-MB-231 культивировали в среде L15 содержащей 10% эмбриональную фетальную сыворотку коровы (FBS), раствор 2 мМ L-глутамин в присутствии 10% FBS, 2 мМ L-глутамин, раствор антибиотиков-антимикотиков (100 ед/мл пенициллин, 0.1 мг/мл стрептомицин и 0.25 мкг/мл амфотерицин).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «STATISTICA 8.0» (StatSoft Inc., США). Критерий Шапиро-Уилка использовался для проверки нормальности. Для проверки гипотезы о значимости различий между исследуемыми группами использовали критерий Стьюдента/непараметрический критерий Вилкоксона-Манна-Уитни. Для оценки корреляции использовали коэффициент корреляции Спирмена. Для анализа общей и безметастатической выживаемости использовали метод Каплана-Майера [Kaplan E.L. and Meier P. 1958]. Сравнение достоверности различий между группами производилось с помощью log-rank теста. Сравнение частот по качественным данным анализировали при помощи двухстороннего критерия Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Описание CNA-ландшафта опухоли молочной железы люминального В подтипа до лечения

В ходе выполнения задачи был изучен CNA-ландшафт (делеции и амплификации всех хромосом) 60 больных люминального В HER2-негативного подтипа. В первую очередь было проведено описание CNA-ландшафта опухоли до лечения с представлением частоты встречаемости сегментных CNA по

каждой хромосоме. Также проанализирована как ассоциация клинико-морфологических параметров (лимфогенное метастазирование, возрастной критерий, менструальный статус) больных с частотой встречаемости CNA, так и ассоциация ответа на НХТ с частотой встречаемости ХА до лечения.

Было показано, что объективный ответ на НХТ (частичная и полная регрессия) наблюдался при наличии амплификаций в опухоли молочной железы люминального В HER2-негативного молекулярного подтипа до лечения в 9p22.1 и 9p21.3 хромосомных регионах у 42,8% (15/35) и 40,0% (14/35) больных, при отсутствии амплификаций в этих регионах у пациенток со стабилизацией и прогрессированием ($p=0,007$ и $p=0,008$ по критерию Фишера). Выявлено, что с основными клинико-морфологическими параметрами CNA-генетический ландшафт опухоли до лечения показал слабую ассоциацию.

Изменение CNA-генетического ландшафта опухоли молочной железы в процессе НХТ и метастазирование

Далее было проведено сравнение частот встречаемости амплификаций и делеций у больных до и после предоперационной химиотерапии. На Рис.1 представлена общая частота встречаемости CNA в группе пациенток с люминальным В РМЖ до и после проведения НХТ.

Было показано, что максимальная частота встречаемости амплификаций до лечения (76,0% и более) отмечена в 1q32.1-1q32.3, 1q41, 1q42.12, 1q42.13, 1q42.2 локусах. При этом, в данных локусах частота встречаемости делеций не превышала 4,0%. Максимальная частота встречаемости делеций до проведения НХТ (66,0% и более) показана в 8p21.1, 17p13.3, 17p13.1 локусах, при этом, в данных локусах не обнаружено наличие делетированных участков. После проведения НХТ частота встречаемости амплификаций снижается, так максимальное количество (50,0% и более) амплификаций отмечено в 1q32.1 и 1q32.2 локусах, тогда как частота встречаемости делеций в данных регионах не превышала 4,76%. Также снижается и частота встречаемости делеций после проведения НХТ. Было показано, что максимальное количество делетированных участков (45,24% и более) обнаружено в 16q21 и 16q22.1 локусах, при этом, частота встречаемости амплификаций в данных локусах не превышала 7,14%. При этом, максимальное количество амплификаций (66,0%) при отсутствии делетированных участков в опухоли до лечения было отмечено в 8q23.1,-8q23.3, 8q24.21 локусах. Однако, после проведения предоперационной терапии максимальное количество амплификаций (45,24%) при отсутствии делетированных участков в опухоли до лечения было отмечено в 1q21.3 и 1q22 локусах.

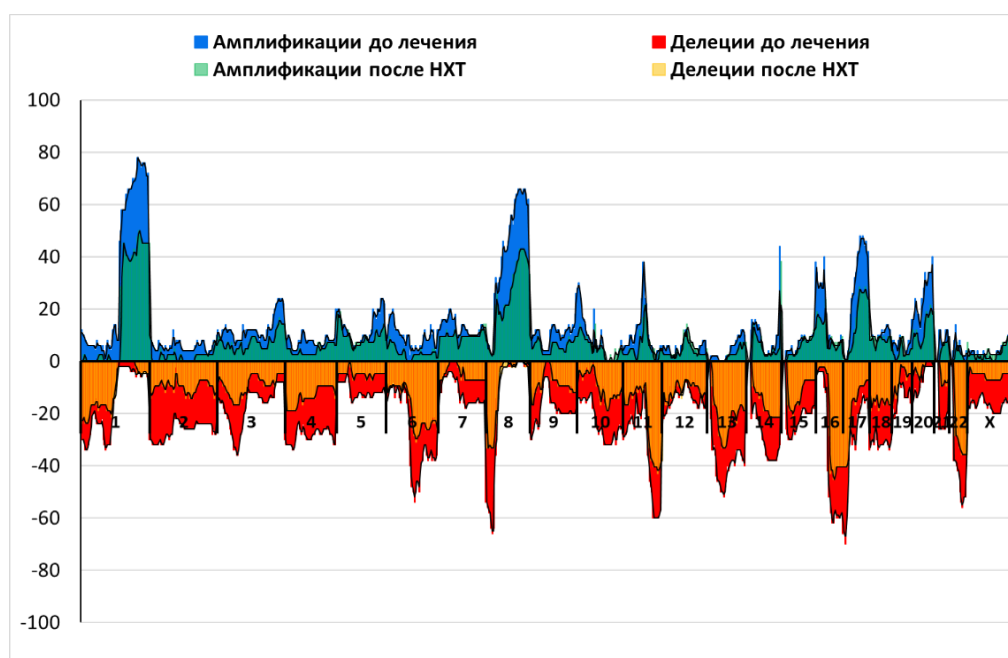


Рис. 1. Частота встречаемости CNA в группе пациенток с люминальным В РМЖ до и после проведения НХТ

Аналогичный анализ был проведен для подсчета количества делеций в опухоли до и после проведения НХТ. Было показано, что максимальное количество делеций (70,0%) при отсутствии амплифицированных участков в опухоли до лечения было отмечено в 17p13.1 локусе. Максимальное количество делеций (42,86%) при отсутствии амплифицированных участков в опухоли до лечения было отмечено в 11q23.3 локусе. Абсолютное отсутствие амплификаций и делеций в данной группе пациенток и до, и после проведения НХТ отмечено в 13p13, 13p12, 13p11.2, 13p11.1, 14p13, 14p12, 14p11.2, 14p11.1, 14q11.1, 15p13, 15p12, 15p11.2, 15p11.1, 15q11.1, 21p13, 21p12, 21p11.2, 21p11.1, 21q11.1, 22p13, 22p12, 22p11.2 локусах. Таким образом, показано статистически значимое снижение частоты встречаемости амплификаций ($p=0,00028$, $RR=0,4$ (0,24-0,68)) и делеций после проведения предоперационной химиотерапии ($p=0,0003$, $RR=0,33$ (0,18-0,61)).

Следующим этапом работы был анализ связи изменения частоты CNA в опухоли в ответ на проводимую предоперационную терапию с безметастатической выживаемостью. В целом, можно выделить 3 качественных изменения частоты CNA опухоли в процессе НХТ, и в зависимости от этого больные были поделены на 3 группы. В первую группу отнесли пациенток, у которых CNA-ландшафт опухоли при проведении НХТ не подвергался значимому изменению (частота CNA менялась не более чем на 5%). Вторую группу пациенток составили больные с уменьшением частоты CNA более чем на 5% и третью группы составили больные с увеличением частоты CNA в опухоли после проведения НХТ. Было показано, что безметастатическая выживаемость статистически значимо зависела от изменения частоты CNA в процессе лечения. При анализе по методу Каплана-Майера у всех трех групп пятилетняя безметастатическая выживаемость статистически значимо различается ($p=0,00002$) и у больных с уменьшением частоты CNA (элиминируются опухолевые клетки с генетическими нарушениями) в процессе предоперационного лечения, она составила 94% (у 2/35 пациентов развились метастазы), у пациенток с отсутствием изменений CNA-ландшафта показаны промежуточные показатели выживаемости и пятилетняя безметастатическая выживаемость составила 67% (у 4/12 пациентов в последствии развились метастазы). Самый неблагоприятный исход имеет группа пациенток с увеличением частоты CNA в процессе НХТ. У этих больных в опухоли *de novo* под действием химиотерапии происходит возникновение новых CNA, и пятилетняя безметастатическая выживаемость этих пациенток составила всего 30% (у 9/13 пациентов развились метастазы).

Анализ безметастатической выживаемости пациенток в зависимости от изменения частоты амплификаций показал значительное увеличение уровня статистической значимости по сравнению с ассоциацией безметастатической выживаемости с CNA ($p=0,00000$). Безметастатическая выживаемость у больных с уменьшением частоты амплификаций в процессе предоперационного лечения составляет 100% (у 0/33 пациентов развились метастазы). У пациенток с отсутствием изменений частоты амплификаций показаны промежуточные показатели выживаемости 79% (у 3/14 пациентов развились метастазы). Группа пациенток с увеличением частоты амплификаций в процессе НХТ безметастатическая выживаемость составила всего 8% (у 12/13 пациентов развились метастазы). Таким образом, именно амплификации в большей степени ассоциированы с метастазированием. По-видимому, они имеют прямое отношение к механизмам метастазирования.

Показано, что амплификации возникают *de novo* под действием НХТ в следующих хромосомных регионах: 3q(26.31-27.1), 5p(15.33-15.2), 6p(25.2-24.2; 21.2-12.2), 7q(11.1-36.3), 8q(11.21-24.3), 9p(24.2-21.2), 10p(15.3-11.1), 10q(21.3-22.2; 25.1-25.2), 12p(13.33-11.22) 13q(12.3-34), 16p(13.3-11.2), 18q(11.1-23) 19p(13.3-12). У всех этих пациентов не зависимо от эффекта НХТ отмечалось возникновение гематогенного метастазирования, причем у 8/12 больных опухоль метастазировала в срок до 30 месяцев и только 2 больных пережили 5 летний период.

Далее у всех пациентов в резидуальной опухоли было прослежено количество амплификаций 3q(26.31-27.1), 5p(15.33-15.2), 6p(25.2-24.2; 21.2-12.2), 7q(11.1-36.3), 8q(11.21-24.3), 9p(24.2-21.2), 10p(15.3-11.1), 10q(21.3-22.2; 25.1-25.2), 12p(13.33-11.22) 13q(12.3-34), 16p(13.3-11.2), 18q(11.1-23)

19p(13.3-12) регионов. Установлено, что метастазы развились у 15 пациентов и у всех пациентов в резидуальной опухоли были амплификации не менее 2 хромосомных регионов из представленного выше списка. Если в резидуальной опухоли была 1 амплификация или не было амплификаций, то у пациентов не развивались метастазы (Таблица 1).

Таблица 1. Состав клонов с амплификациями из списка в опухоли до лечения и после НХТ и метастазирование пациентов

Пациент #	Амплифицированные регионы из списка		Изменение в процесс НХТ	Наличие метастазов	БМ выживаемость, мес
	До лечения	После НХТ			
A126/3	3q8q16p	Нет	Элиминация	Нет	24
B386/2	5p6p8q16p	Нет	Элиминация	Нет	
G265/5	3q10p13q	Нет	Элиминация	Нет	35
I133/4	8q10p	Нет	Элиминация	Нет	35
Ya134/1	6p13q18q	Нет	Элиминация	Нет	
K467/2	8q16p19p	Нет	Элиминация	Нет	
Sh244/4	6p16p	Нет	Элиминация	Нет	
B394/2	7q9p10p19p	Нет	Элиминация	Нет	31
M483/1	7q8q	Нет	Элиминация	Нет	22
V396/2	8q10p16p	Нет	Элиминация	Нет	24
S577/2	3q8q9q10p16p	Нет	Элиминация	Нет	
S702/2	8q10p	Нет	Элиминация	Нет	32
K345/2	16p	Нет	Элиминация	Нет	18
M366/2	6p16p	Нет	Элиминация	Нет	
L355/3	8q10p	Нет	Элиминация	Нет	52
Sh198/2	5p6p8q9q10p16p	Нет	Элиминация	Нет	66
L234/2	3q6p	3q	Элиминация	Нет	37
S454/3	7q16p	16p	Элиминация	Нет	113
K677/2	5p8q9q10p16p	8q	Элиминация	Нет	22
D390/2	3q7q8q10p	8q	Элиминация	Нет	43
S156/1	3q5p6p8q10p13q	3q	Элиминация	Нет	97
V567/2	3q6p8q	3q8q	Элиминация	Нет	48
G232/3	5p8q10p	5p8q	Элиминация	Нет	24
H3332	5p8q9p9q10p16p	5p8q	Элиминация	Нет	56
J245/4	3q6p8q	3q6p8q	Элиминация	Нет	
O324/2	8q13q16p18	3q8q16p	Элиминация	Нет	30
	3q5p7q9p10p10q18q19p19q	3q7q18q19q	Элиминация	Нет	89
K187/1	Нет	Нет	Нет изменений	Нет	
M187/2	Нет	Нет	Нет изменений	Нет	98
S667/1	Нет	Нет	Нет изменений	Нет	26
D121/1	Нет	Нет	Нет изменений	Нет	130
Sh332/1	Нет	Нет	Нет изменений	Нет	32
V134/4	Нет	Нет	Нет изменений	Нет	71
J134/2	Нет	Нет	Нет изменений	Нет	73
Ch341/1	Нет	Нет	Нет изменений	Нет	38
D256/2	5p	5p	Нет изменений	Нет	98
P167/3	8q10p	8q10p	Нет изменений	Нет	96
N111/2	5p8q16p	5p8q16p	Нет изменений	Нет	115
B278/1	5p8q16p19p	5p8q16p19p	Нет изменений	Да	21
M289/3	5p8q9q10q	5p8q9q10q	Нет изменений	Да	19
K544/1	6p7q8q9p	6p7q8q9p	Нет изменений	Нет	63
G373/2	8q16p19p	8q16p19p	Нет изменений	Нет	26
J259/4	5p7q16p18q19p	5p7q16p18q19p	Нет изменений	Да	24
Ch233/3	5p7q8q10p16p	5p7q8q10p16p	Нет изменений	Нет	41

G178/3	6p7q8q10p10q16p	6p7q8q10p10q16p	Нет изменений	Нет	32
P244/3	16p	5p16p	Индукция	Да	25
B156/5	Нет	7q8q	Индукция	Да	22
Yu176/4	8q	5p8q10	Индукция	Да	10
K743/3	3q8q	3q5p8q	Индукция	Да	62
L188/4	8q16p	5p8q16p	Индукция	Да	85
K299/2	8q18q	6p8q18q	Индукция	Нет	31
R198/4	6p8q	6p8q13q	Индукция	Да	43
S232/2	8q	3q16p18q	Индукция	Да	47
Ch145/1	7q9p10p	5p7q9p10p	Индукция	Да	12
E106/2	8q9q13q	3q6p8q9q13q	Индукция	Да	12
S300/3	6p9p10p	6p7q8q9p10p	Индукция	Да	20
E148/1	8q	5p7q10q8q16p	Индукция	Да	23
S133/1	8q	5p6p7q8q13q19p	Индукция	Да	17

Таким образом, можно полагать, что опухолевые клоны, несущие амплификации минимум в двух хромосомных регионах из списка: 3q(26.31-27.1), 5p(15.33-15.2), 6p(25.2-24.2; 21.2-12.2), 7q(11.1-36.3), 8q(11.21-24.3), 9p(24.2-21.2), 10p(15.3-11.1), 10q(21.3-22.2; 25.1-25.2), 12p(13.33-11.22) 13q(12.3-34), 16p(13.3-11.2), 18q(11.1-23) 19p(13.3-12) являются потенциальными метастатическими клонами («семенами»), которые могут выходить в кровеносное русло и, при наличии «благоприятных» условий в органах-мишенях («почве»), с очень высокой вероятностью формируют очаги вторичного опухолевого роста. Определено, что необходимым условием формирования метастатического клона является наличие 2 и более амплификаций из обозначенного выше списка, в то время как 1 амплификация не достаточна для осуществления метастазирования. Элиминация обозначенных амплификаций под действием НХТ приводит к 100% безметастатической выживаемости, напротив, индукция новых амплификаций сочетается почти со 100% метастазированием.

Ассоциация амплификаций 3q, 5p, 6p, 7q, 8q, 9p, 10p, 10q, 12p, 13q, 16p, 18q, 19p со смертностью при различных локализациях

В настоящем разделе работы была проведена аналитическая работа по данным проекта TCGA. Изучена связь смертности при различных локализациях и частоты 2-х и более фокальных амплификаций регионов 3q(26.31-27.1), 5p(15.33-15.2), 6p(25.2-24.2; 21.2-12.2), 7q(11.1-36.3), 8q(11.21-24.3), 9p(24.2-21.2), 10p(15.3-11.1), 10q(21.3-22.2; 25.1-25.2), 12p(13.33-11.22) 13q(12.3-34), 16p(13.3-11.2), 18q(11.1-23) 19p(13.3-12), которые были идентифицированы в предыдущем разделе и появление амплификаций в этих областях при проведении НХТ, приводит к почти 100% метастазированию. Наибольшая частота больных с 2-мя и более амплификациями идентифицированных регионов наблюдается при плоскоклеточной раке легкого – 72% и при этой локализации отмечается один из самых высоких уровней смертности 89%. Наименьшая частота – при раке щитовидной железы и смертность при этой локализации составила 11%. Отмечается высокий уровень корреляции ($R=0,842$ при высоком уровне статистической значимости $p=0,000011$) между частотой 2-х и более амплификаций идентифицированных регионов в опухоли и смертностью при различных локализациях.

Эти данные свидетельствуют о том, что наличие в опухоли 2-х и более амплификаций идентифицированных регионов является универсальным прогностическим маркером неблагоприятного исхода заболевания при всех локализациях.

При этом, важно отметить, что при некоторых локализациях частота 2-х и более амплификаций идентифицированных регионов в опухоли ниже смертности. Это отмечается для рака легкого, желудка, пищевода, толстой кишки, опухолей головы и шеи, рака предстательной железы и некоторых других (Рис. 2).

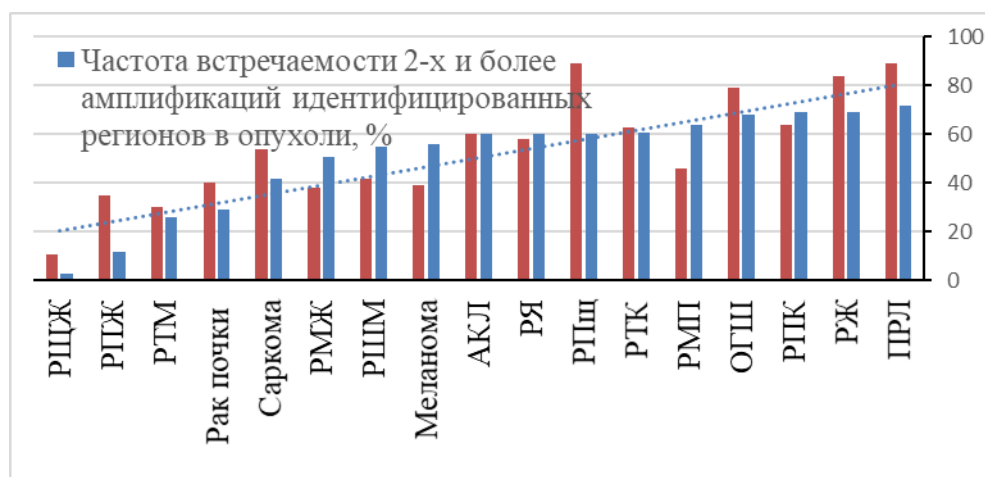


Рис. 2. Корреляция частоты встречаемости 2-х и более амплификаций идентифицированных регионов в опухоли и смертности, с линией тренда (по данным базы TCGA и ВОЗ в опухолях 17 различных локализаций 8456 больных)

Это означает, что в процессе лечения происходит стимуляция образования амплификаций, больше чем их элиминация под действием лечения. При других локализациях, таких как рак молочной железы, меланома, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, частота 2-х и более амплификаций идентифицированных регионов в первичных опухолях значительно выше частоты смертности. Это свидетельствует о том, что в процессе лечения этих локализаций в большей степени происходит элиминация клонов с амплификациями, чем их появление *de novo*.

Анализ связи частоты 2-х и более амплификаций 3q(26.31-27.1), 5p(15.33-15.2), 6p(25.2-24.2; 21.2-12.2), 7q(11.1-36.3), 8q(11.21-24.3), 9p(24.2-21.2), 10p(15.3-11.1), 10q(21.3-22.2; 25.1-25.2), 12p(13.33-11.22) 13q(12.3-34), 16p(13.3-11.2), 18q(11.1-23) 19p(13.3-12) со смертностью при различных локализациях показал исключительно высокий уровень корреляции, что свидетельствует об универсальности определения наличия/отсутствия 2-х и более амплификаций идентифицированных регионов как маркера исхода заболевания.

Аннотация генов хромосомных регионов 3q, 5p, 6p, 7q, 8q, 9p, 10p, 10q, 12p, 13q, 16p, 18q, 19p

Следующим этапом работы было аннотирование генов, находящихся в регионах локализации амплификаций, возникающих под действием неoadъювантной химиотерапии: 3q(26.31-27.1), 5p(15.33-15.2), 6p(25.2-24.2; 21.2-12.2), 7q(11.1-36.3), 8q(11.21-24.3), 9p(24.2-21.2), 10p(15.3-11.1), 10q(21.3-22.2; 25.1-25.2), 12p(13.33-11.22) 13q(12.3-34), 16p(13.3-11.2), 18q(11.1-23) 19p(13.3-12).

Аннотирование генов, находящихся в представленных регионах, показало, что часто встречающимися генами в данных локусах являются гены трех функциональных систем. Первую группу составили гены системы адгезии. Во вторую группу генов составили гены регуляции клеточного цикла. И третью группу генов составили гены иммунной системы. Однако, единственной системой, гены которой представлены во всех этих регионах являются гены системы индукции и поддержания стволового фенотипа клеток и самообновления или гены стволовости. Были выявлены 48 генов стволовости, расположенные в регионах локализации новых амплификаций: *SOX2* (3q26.33), *DPPA2* (3q13.13), *DPPA4* (3q13.13), *GSK3B* (3q13.33), *TERT* (5p15.33), *BMP6* (6p24.3), *OCT4 (POU5F1)* (6p21.33), *SOX4* (6p22.3), *NOTCH4* (6p21.32), *PIM1* (6p21.2), *FZD9* (7q11.23), *FZD1* (7q21.13), *WNT2* (7q31.2), *SMO* (7q32.1), *CDK6* (7q21.2), *EPHA1* (7q34-q35), *SHH* (7q36.3), *SNAI2* (8q11.21), *MYC* (8q24.21), *ALDH1A1* (9q21.13), *TGFBR1* (9q22.33), *KLF4* (9q31.2), *NOTCH1* (9q34.3), *VIM* (10p13), *BMII* (10p12.2), *ITGB1* (10p11.22), *ZEB1* (10p11.22), *GATA3* (10p14), *NODAL* (10q22.1), *NANOG* (12p13.31), *DPPA3* (12p13.31), *CCND2* (12p13.32), *SOX1* (13q34), *ZIC2* (13q32.3), *KLF5* (13q21.3), *FLT3* (13q12.2), *CCNA1* (13q13.3),

SOX8 (16p13.3), CCNF (16p13.3), ZSCAN10 (16p13.3), SMAD4 (18q21.2), SMAD2 (18q21.1), SALL3 (18q23), KLF1 (19p13.13), KLF2 (19p13.11), INSR (19p13.2), TGFB1 (19q13.2). Все аннотированные гены, помимо участия в индукции стволового фенотипа и роли в самообновлении стволовых клеток, имеют прямое отношение к канцерогенезу и прогрессии опухолей, причем важно то, что up-регуляция всех этих генов приводит к усилению метастазирования опухолей, при клинических исследованиях, в системах *in vivo* и к усилению туморогенности и маммосферообразования в системах *in vitro*.

Исследование экспрессии генов стволовости в опухоли молочной железы

Для выполнения данной задачи были выбраны 13 генов – *TERT* (5p15.33); *OCT3* (6p21.33); *SMO* (7q32.1); *SNAI2* (8q11.21); *MYC* (8q24.21); *TGFBR1* (9q22.33); *KLF4* (9q31.2); *BMI1* (10p12.2); *VIM* (10p13); *FLT3* (13q12.2); *SMAD2* (18q21.1); *KLF1* (19p13.13), *TGFB1* (19q13.2). В Таблице 2 представлены сводные данные по статистически значимым различиям экспрессии изученных генов с различными клинико-морфологическими показателями заболевания.

Таблица 2. Статистически значимые различия уровня экспрессии генов стволовости в зависимости от различных клинико-морфологических показателей.

Показатель	Гены	<45 лет (N=24)	>45 лет (N=36)	p value
Возраст	FLT3 до лечения	4,062±1,105	2,329±0,751	0,047
	TGFB1 до лечения	0,739±0,181	1,303±0,194	0,034
Лимфогенное метастазирование		N0 (N=29)	N1-3 (N=31)	
	OCT3 до лечения	9,310±6,950	1,238±0,582	0,008
	TERT после НХТ	0,243±0,063	1,027±0,349	0,050
Эстрогеновый рецептор ER		ER+ (N=47)	ER- (N=13)	
	SMO до лечения	0,838±0,272	1,946±0,740	0,028
	SMAD2 до лечения	0,297±0,051	0,000±0,000	0,054
	KLF1 до лечения	0,713±0,406	0,000±0,000	0,035
	TERT до лечения	1,141±0,532	0,000±0,000	0,023
Прогестероновый рецептор PR		PR+ (N= 49)	PR- (N=11)	
	SMAD2 до лечения	0,235±0,045	0,663±0,079	0,016
Гистологическая форма		Уни-центрическая (N= 41)	Мульти-центрическая (N=19)	
	KLF4 после НХТ	1,510±0,352	4,021±1,171	0,036
Менструальный статус		Pre (N= 33)	Post (N= 27)	
	VIM до лечения	0,259±0,047	0,454±0,076	0,035
	TGFBR1 после НХТ	0,968±0,182	2,810±1,104	0,029
Ответ на НХТ		CR+PR (N=42)	SD+P (N=18)	
	KLF1 после НХТ	0,853±0,489	0,126±0,073	0,045
	TERT после НХТ	0,519±0,271	1,125±0,300	0,016
Примечание: T1-2 размер опухоли до 2 см, T3-4 размер опухоли 2-7 см; N0 - отсутствие лимфогенных метастазов, N1-3 - наличие лимфогенных метастазов; CR+PR – полная и частичная регрессия в процессе НХТ, SD+P – стабилизация и прогрессирование; ER+ по данным ИГХ более 1% опухолевых клеток экспрессируют рецептор эстрогена. ER- по данным ИГХ менее 1% опухолевых клеток экспрессируют рецептор эстрогена; PR+ по данным ИГХ более 1% опухолевых клеток экспрессируют рецептор эстрогена. PR- по данным ИГХ менее 1% опухолевых клеток экспрессируют рецептор эстрогена; Pre – пременопауза, Post – постменопауза.				

Было проведено сравнение уровней экспрессии генов стволовости до лечения и после НХТ. Установлено, что НХТ статистически значимо повышает экспрессию 4/12 генов стволовости: *SNAI2*; *KLF4*; *VIM*; и *SMAD2*.

Далее была оценена связь уровня экспрессии генов стволовости с безметастатической выживаемостью больных. В группе больных РМЖ из 60 обследованных пациенток отдаленные

метастазы развились у 14 (23,3%) больных в среднем за $34 \pm 0,21$ месяца от момента постановки диагноза. Общий срок наблюдения составил 19-131 (в среднем $73 \pm 0,8$ мес.) месяцев. Были получены результаты анализа о гипо-, и гиперэкспрессии изученных генов в 2 точках – до и после проведения предоперационной терапии в группах больных с наличием и отсутствием гематогенного метастазирования.

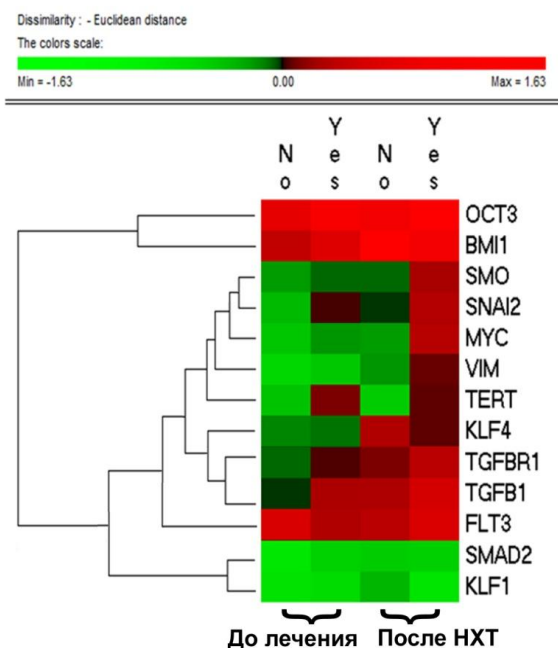


Рис. 3. Экспрессия генов стволовости в опухоли молочной железы до лечения и после НХТ у больных с гематогенными метастазами (Yes) и без метастазов (No).

Было показано, что до лечения у больных без метастазов гиперэкспрессированы 3 гена стволовости - *OCT3*, *BMI1* и *FLT3*, при этом у больных с развившимися впоследствии гематогенным метастазированием гиперэкспрессированы 7 генов стволовости – *OCT3*, *BMI1*, *SNAI2*, *TERT*, *TGFBR1*, *TGFB1* и *FLT3*. После проведения НХТ у больных без метастазов гиперэкспрессированы 6 генов стволовости - *OCT3*, *BMI1*, *KLF4*, *TGFBR1*, *TGFB1* и *FLT3*, в группе больных с развившимися впоследствии гематогенными метастазами гиперэкспрессированы 11 из 13 генов стволовости – кроме *SMAD2* и *KLF1* (Рис. 3).

Таким образом, как в опухоли до лечения, так и особенно в остаточной резидуальной опухоли после НХТ больных с развившимися впоследствии гематогенными метастазами отмечается гиперэкспрессия почти всех исследованных генов стволовости.

Полнотранскриптомный анализ опухоли молочной железы в процессе НХТ

Проведено сравнение экспрессионного профиля пациенток в зависимости от наличия/отсутствия гематогенного метастазирования до и после проведения предоперационной химиотерапии. Было показано, что количество ДЭГ (дифференциально экспрессированных генов) в опухоли до лечения у больных с наличием и без гематогенного метастазирования составило 24 гена (19 Up-regulated, 5 Down-regulated). После проведения НХТ резидуальные опухоли больных с наличием и без гематогенного метастазирования различались более существенно, по 154 ДЭГ (36 Up-regulated, 118 Down-regulated) (Рис. 4а,б).

Построение диаграммы Венна показало, что ДЭГ у пациентов с наличием/отсутствием гематогенного метастазирования до лечения и после НХТ пересекаются всего по 1 гену - *EHD2* (19q13.33). Согласно базе www.progenetix.org по частоте встречаемости при опухолях всех локализаций (177 типов опухолей) амплификация длинного плеча 8 хромосомы, в частности 8q24, оказалась наиболее

распространенной aberrацией числа копий и встречалась более чем в 30% всех образцов [Cai H., Kumar N. 2012]. При этом, наиболее значимым геном в этом локусе по данным COSMIC является протоонкоген *MYC*, который участвует во многих сигнальных путях [Jönsson G., Staaf J. 2010].

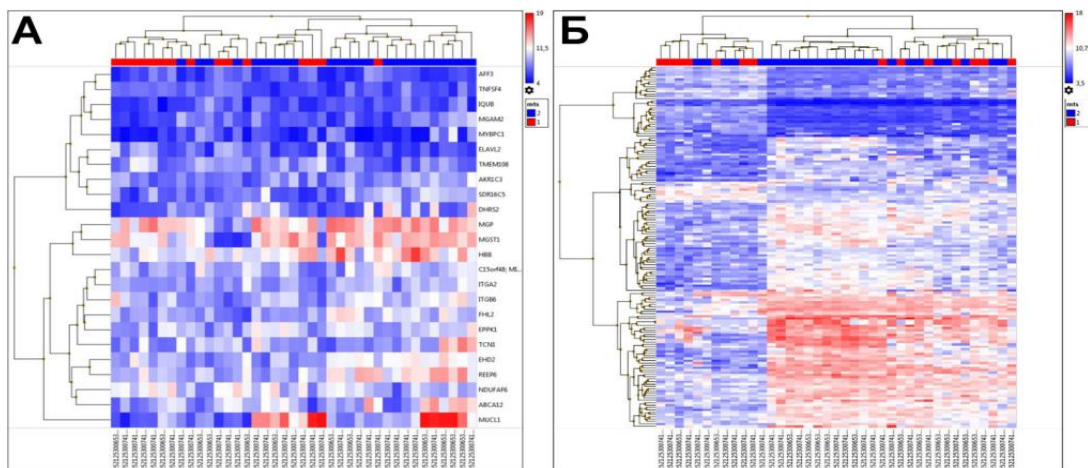


Рис. 4. Тепловая карта ДЭГ в опухоли больных РМЖ: а - до лечения с наличием гематогенного метастазирования (есть - 1) и гематогенного метастазирования (нет - 2), б - после НХТ с наличием гематогенного метастазирования (есть - 1) и гематогенного метастазирования (нет - 2)

В данной работе частота амплификации 8q с регионом 8q24 в опухоли больных до лечения составила 62% (37/60 случаев). Из 37 больных амплификация 8q в резидуальной опухоли после проведения НХТ сохранилась у 24/37 пациентов (65%), кроме этого еще у 3 пациентов амплификации 8q в опухоли возникли *de novo* под действием предоперационной терапии, что показывает относительную химиорезистентность опухолевых клонов с амплификацией 8q.

Количество ДЭГ в опухоли до лечения у больных с наличием амплификации 8q и без амплификации составило 105 генов (41 Up-regulated, 64 Down-regulated). После проведения НХТ резидуальные опухоли больных с амплификацией 8q и без амплификации по 2137 ДЭГ (1394 Up-regulated, 780 Down-regulated) (Рис. 5а,б). Выделены топ-10 сигнальных путей ДЭГ в опухоли больных РМЖ до лечения и после НХТ. Общими сигнальными путями для больных до лечения и после НХТ стали: *MAPK Signaling Pathway* и *Circadian rhythm related genes*.

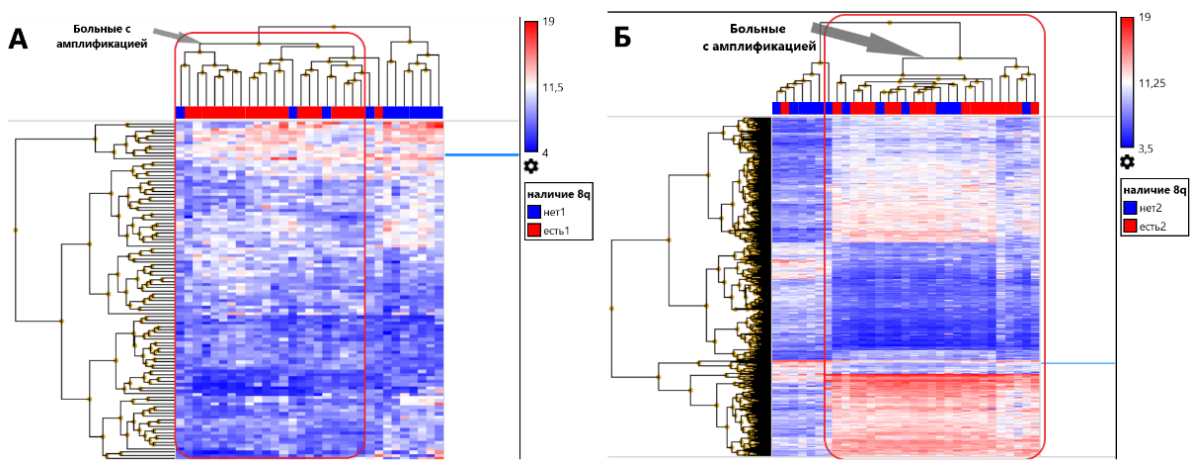


Рис. 5. Тепловая карта ДЭГ в опухоли больных РМЖ: а - до лечения с наличием амплификации 8q (есть1) и без амплификации (нет1), б - после НХТ с наличием амплификации 8q (есть2) и без амплификации (нет2)

Построение диаграммы Венна показало, что ДЭГ пациентов с различным статусом амплификации 8q (с регионом 8q24) до лечения и после НХТ пересекаются всего по 8 генам: *NBPF4* (1p13.3), *PI4KB* (1q21.3), *UGT2B11* (4q13.2), *UGT2B28* (4q13.2), *PLAT* (8p11.21), *MYBPC1* (12q23.2), *SETBP1* (18q12.3), *ZNF223* (19q13.31). Далее было показано, что при частичной регрессии количество ДЭГ в резидуальной опухоли после НХТ с наличием/отсутствием амплификации 8q составило 879 (601 Up-regulated, 278 Down-regulated). На фоне стабилизации количество ДЭГ в резидуальной опухоли больных после НХТ с наличием/отсутствием амплификации 8q составило 1321 (652 Up-regulated, 669 Down-regulated) (Рис. 6а,б). При стабилизации усиливается гетерогенность транскриптома между опухолями с наличием и отсутствием амплификации 8q.

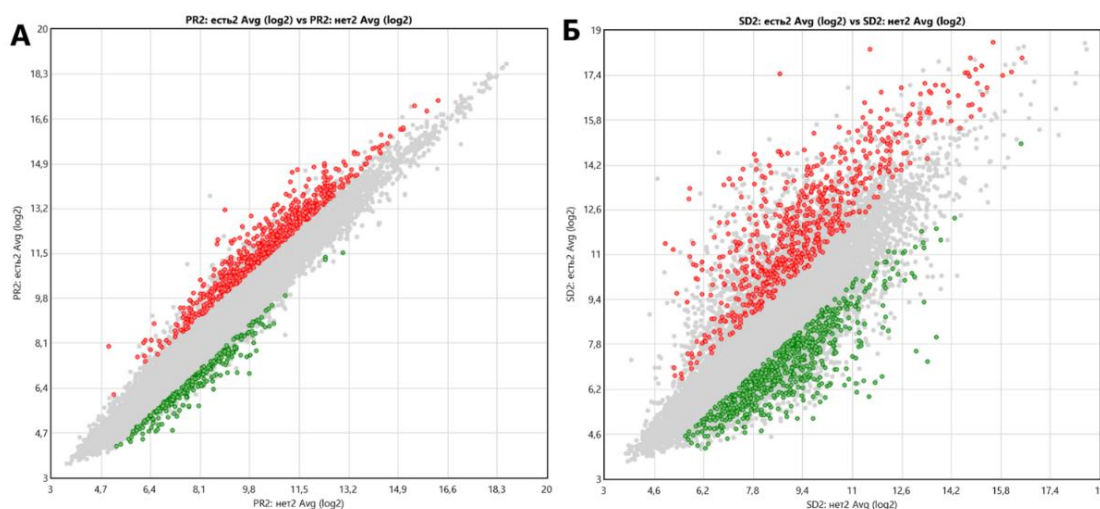


Рис. 6. Количество ДЭГ в резидуальной опухоли после НХТ с наличием/отсутствием амплификации 8q: а - на фоне частичной регрессией, б - на фоне стабилизации.

Построение диаграммы Венна показало, что ДЭГ у пациентов с наличием и отсутствием амплификации 8q после НХТ на фоне частичной регрессии и стабилизации пересекаются по 145 генам. Ранее нами было показано, что гены, функции которых связаны с индукцией и поддержанием стволового состояния клеток – гены стволовости, имеют значимую роль в механизмах метастазирования опухоли молочной железы. По базам данных было отобрано 48 таких генов, в число которых вошел и ген *MYC*, локализованный в 8q24. В настоящем исследовании, по данным диаграммы Венна, было установлено пересечение 8/48 генов стволовости (*GSK3B*, *TERT*, *BMP6*, *MYC*, *GATA3*, *NANOG*, *SMAD4*, *SMAD2*) и ДЭГ у пациентов с наличием/отсутствием амплификации 8q после НХТ. При этом, у больных с амплификацией 8q экспрессия *GSK3B*, *MYC*, *GATA3*, *SMAD4*, *SMAD2* повышена в 2.1-3.8 раза, а экспрессия *TERT*, *BMP6*, *NANOG* снижена в 2,1-2.3 раза. Таким образом, амплификация региона локализации гена *MYC* в резидуальной опухоли приводит в повышенной экспрессии комплекса генов, которые также принимают участие в WNT- и TGFb-сингналинге.

Значение амплификаций генов стволовости для стволового перехода опухолевых клеток in vitro

Проведен эксперимент по индукции стволового перехода в популяции нестволовых опухолевых клеток in vitro и оценка значения наличия амплификаций *3q*, *5p*, *6p*, *7q*, *8q*, *9chr*, *10p*, *10q22.1*, *12p*, *13q*, *16p*, *18chr*, *19p* для его индукции. Это прямой эксперимент, призванный подтвердить или опровергнуть основное положение рабочей гипотезы о том, что наличие 2-х и более амплификаций генов стволовости дает опухолевым клеткам способность к стволовому переходу, а наличие только одной амплификации или отсутствие амплификаций генов стволовости приводит к неспособности нестволовых опухолевых клеток к дедифференцировке в стволовые опухолевые клетки.

В работу были включены следующие культуры клеток опухоли молочной железы: **BT-474, BT-549, MDA-MB-231, MDA-MD-468, MCF7, SK-BR-3** и **T47D**. На первом этапе работы проводили культивирование представленных клеточных линий и изучили CNA-генетический ландшафт опухоли. Во всех клеточных культурах определяли наличие амплификаций генов стволовости. Был изучен CNA-генетический ландшафт выбранных опухолевых линий и определен состав амплификаций генов стволовости, которые были определены в клеточных линиях (Таблица 3).

Таблица 3. Амплификации генов стволовости в клеточных линиях рака молочной железы

Название клеточной линии	Амплификации генов стволовости
BT-474	3q5p7q8q9q18q19p (<i>SOX2, TERT, LIFR, FZD9, FZD1, WNT2, SMO, MYC, KLF4, NOTCH1, SMAD2, SMAD4, KLF1</i>)
BT-549	13q (<i>KLF5</i>)
MDA-MB-231	6p8q (<i>PIM1, MYC</i>)
MDA-MD-468	5p6p13q19p (<i>TERT, BMP6, SOX4, OCT3, NOTCH4, PIM1, ZIC2, SOX1, KLF1, KLF2, TGFB1</i>)
MCF7	7q8q9q16p (<i>FZD1, MYC, PTCH1, TGFB1, KLF4, NOTCH1, KLF6, SOX8</i>)
SK-BR-3	5p6p7q8q10q22.1 (<i>TERT, LIFR, BMP6, SOX4, FZD9, FZD1, WNT2, MYC, NODAL</i>)
T47D	3q5p7q8q9q10p (<i>SOX2, TERT, FZD9, SNAI2, MYC, KLF4, NOTCH1, KLF6, VIM</i>)

В результате исследования показано, что все клеточные культуры, кроме BT-549, содержат 2-е и более амплификации генов стволовости. BT-549, согласно нашей гипотезе, не обладает способностью к дедифференцировке, остальные культуры имеют 2-е и более амплификации разных хромосомных локусов генов стволовости и поэтому должны быть способны к стволовому переходу.

Далее определяли содержание стволовых опухолевых клеток в интактных культурах молочной железы. С помощью метода проточной цитометрии с использованием моноклональных антител к специфическим поверхностным белкам был проведен анализ маркеров CD44 и CD24 в клетках культур молочной железы. Это необходимо для выбора культур для проведения эксперимента. Культура должна иметь достаточное количество дифференцированных или прогениторных опухолевых клеток, для возможности их сортировки и постановки эксперимента. Согласно нашему предположению, дифференцированные ($CD44^{-low}/CD24^{-low}$) клетки будут дедифференцироваться под действием ИЛ-6 с образованием сфероидов, для дальнейших исследований были выбраны именно эти популяции. Чтобы определить влияние ИЛ-6 на дедифференцировку клеток с помощью клеточной сортировки на основе экспрессии CD44 и CD24 были выделены специфические клеточные популяции $CD44^{-}/CD24^{-}$ для линии клеток BT-549 и SK-BR-3, а также популяция $CD44^{-}/CD24^{+}$ для линии клеток MCF-7 (Рис. 7).

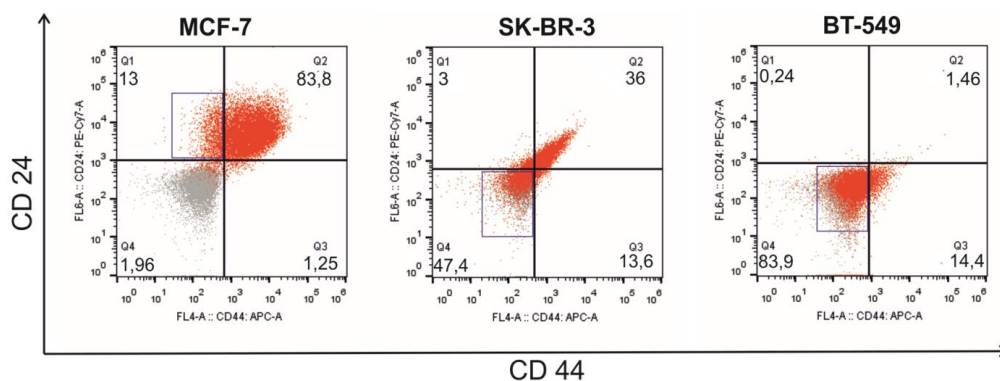


Рис. 7. Содержание клеток с маркерами ОСК CD44 и CD24 в клеточных линиях молочной железы. Примечание: гейтирование проводили таким образом, чтобы $CD44^{-}/CD24^{-}$ – негативная популяция клеток находилась в нижнем левом квадрате. Клетки из правого верхнего квадрата были учтены как двойная положительная $CD44^{+}/CD24^{+}$ популяция. Неокрашенный контроль изображен серым цветом. Сортированная популяция клеток $CD44^{-}/CD24^{-}$ выделена, синим гейтом.

Сортировка популяции клеток CD44⁺/24⁻ и клеток дикого типа проводилась в лунку (10² клеток на лунку) 24-луночного культурального планшета, содержащего 500 мкл питательной среды. Для оценки влияния ИЛ-6 на формирования маммосфер клеточные популяции CD44⁺/CD24⁻ культивировали в среде DMEM:F12 в присутствии 20 нг/мл EGF, 20 нг/мл bFGF, 5 мкг/мл инсулина, 2% B27, 0.4% BSA в стандартных условиях с добавлением с добавлением 50 нг/мл ИЛ-6 сразу после проведения сортировки и через 24 часа. В качестве контроля клетки MCF-7 (Рис. 8а) культивировали в среде IMDM, клетки SK-BR-3 (Рис. 8б) культивировали в среде DMEM:F12, клетки BT-549 (Рис. 8в) культивировали в среде DMEM в присутствии 10% FBS, 2 mM L-глутамин, раствор антибиотиков-антимикотиков (100 ед/мл пенициллин, 0.1 мг/мл стрептомицин и 0.25 мкг/мл амфотерицин) с добавлением 50 нг/мл ИЛ-6 сразу после проведения сортировки и через 24 часа.

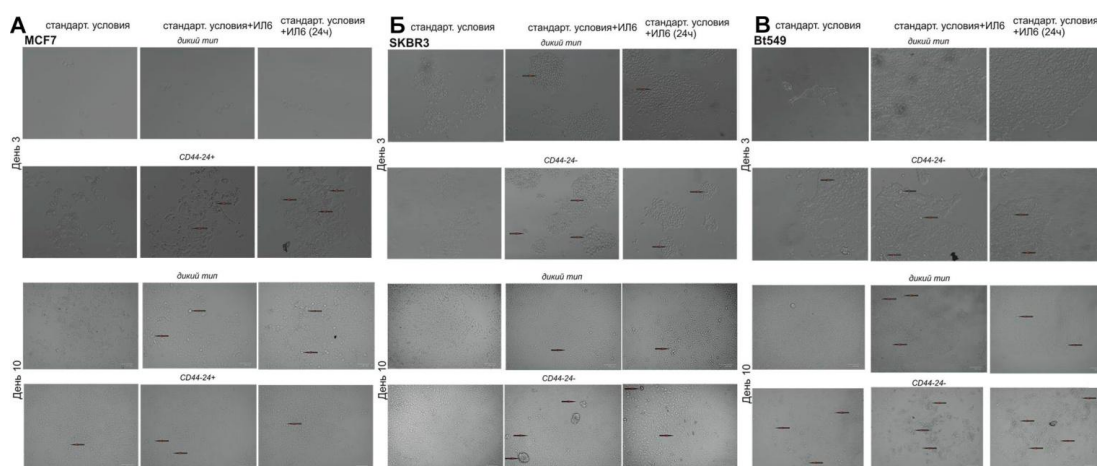


Рис. 8. Влияние ИЛ-6 на формирование маммосфер в культуре клеток молочной железы MCF-7 (а), SK-BR-3 (б) и BT-549 (в). Стрелкой отмечено формирование сфероидов в стандартных условиях культивирования. Фазово-контрастная микроскопия на 3 и 10 день инкубации с ИЛ-6.

Примечание: ИЛ-6 (50 нг/мл) добавляли сразу и через 24 ч после клеточной сортировки.

Было показано, что дифференцированные клетки культуры BT-549 под действием ИЛ6 на 3 сутки формируют максимум 2-3 сфероидов в лунке, которые растут, увеличиваясь в диаметре до 10 суток и новые сфероиды не образуются. Можно полагать, что в культуре BT-549 сфероиды образуют оставшиеся после сортировки ОСК CD44⁺CD24⁻ этой культуры, а множество сортированных дифференцированных CD44⁻CD24⁻ клеток не дедифференцируются. В культурах SK-BR-3 и MCF-7 ситуация другая. Уже на 3 сутки после сортировки и воздействия ИЛ6 клетки этих культур формируют множество мелких сфероидов. Множество мелких сфероидов культур SK-BR-3 и MCF-7 как раз свидетельствуют о том, что дифференцированные клетки этих культур прошли дедифференцировку и образовали множество ОСК, которые дали начало маммосферам. Следует также отметить также формирование мелких округлых клеток в культурах культур SK-BR-3 и MCF-7 с фенотипом CD44⁺/24⁻ на 3 день культивирования в стандартных условиях с добавлением ИЛ-6 и отсутствие мелких клеток, тогда как которые характерны для дифференцированных CD44⁻CD24⁻ клеток этих культур без добавления ИЛ6. Даже на 10 сутки клетки дикого типа (без сортировки) и клетки с фенотипом CD44⁻CD24⁻ культур SK-BR-3 и MCF-7 без добавления ИЛ6 практически не дают сфероидов. При добавлении ИЛ6 на 10 сутки количество сфероидов и их размер в культурах с фенотипом CD44⁻CD24⁻ даже больше, чем в культурах дикого типа. Таким образом, на клеточных культурах опухоли молочной железы SK-BR-3, MCF-7 и BT-549 было показано, что отсортированные дифференцированные опухолевые клетки CD44⁻CD24⁻ культур SK-BR-3 и MCF-7, содержащие амплификации генов стволовости были способны к дедифференцировке под действием ИЛ6 до опухолевых стволовых клеток с образованием маммосфер. Дифференцированные (CD44⁻CD24⁻) опухолевые клетки культуры BT-549, которые не имели амплификаций генов стволовости

и под действием ИЛ6 не образовывали ОСК и маммосфер. Эти результаты показали, что способность дифференцированных опухолевых клеток к стволовой пластичности и потенциальной возможности формирования метастатических колоний, определяется наличием в их геноме амплификаций локусов генов стволовости

Далее был изучен транскриптом опухолевых клеток двух пациентов: St, которая имела 2 и более амплификации генов стволовости и пациентки Тi, в опухолевых клетках которой не было амплификаций генов стволовости. Для проведения транскриптомного микроматричного анализа, были выделены строго опухолевые ЕрСам+ клетки, без примеси клеток стромы, при помощи 6-ти кратной магнитной иммуносепарации. Часть нативных опухолевых клеток забирали для проведения полнотранскриптомного микроматричного анализа. Остальные клетки, культивировали 3 суток с добавлением ИЛ6, после чего клетки также забирали для транскриптомного анализа. Таким образом, на каждую пациентку были две точки: до и после добавления ИЛ6.

Было установлено, что под действием ИЛ6 у пациентки St с амплификациями генов стволовости более чем в 2 раза (Change Fold >2) меняется экспрессия 11887 генов, причем экспрессия 9294 генов повышается (максимально в 70 раз), а экспрессия 2593 генов снижается максимум в 12 тыс раз (Рис. 9а). У пациентки Тi без амплификаций генов стволовости под действием ИЛ6 более чем в 2 раза меняется экспрессия 11587 генов, повышается (максимум в 239 раз) экспрессия 7179 генов, снижается (максимум в 17 тыс. раз) экспрессия 4397 генов (Рис. 9б).

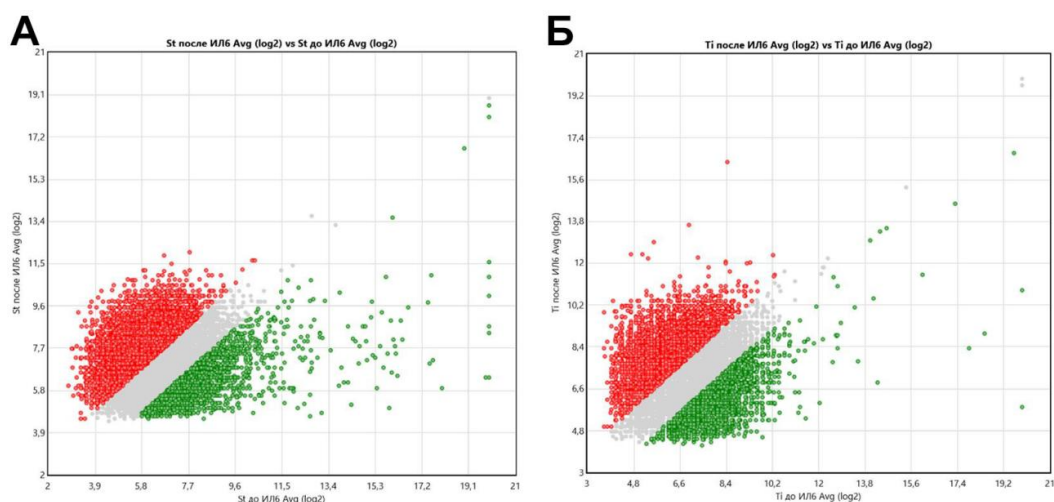


Рис. 9. Scatter-plot дифференциально экспрессируемых генов в ЕрСам+ опухолевых клетках больных St (а) и Тi (б) до и после воздействия ИЛ6.

Примечание: красным обозначены гены, экспрессия которых после воздействия ИЛ6 повышается, зеленым цветом гены, экспрессия которых после воздействия ИЛ6 снижается в 2 и более раза.

Следует отметить, что Топ-10 сигнальных у обеих пациенток практически одинаков, что свидетельствует о схожем общем эффекте ИЛ6 на опухолевые клетки этих больных, тем не менее, есть и существенные отличия. Согласно диаграмме Венна, изменение экспрессии в опухолевых клетках этих больных пересекаются по 6424 ДЭГ, а изменение экспрессии 5463 для St и 5152 для Тi генов является уникальным. Что касается генов стволовости, то у больной St с амплификациями, повышается более чем в 2 раза экспрессия 25 генов стволовости, а снижается экспрессия 6 генов стволовости. У больной Тi без амплификаций, повышается экспрессия 19 генов стволовости и снижается экспрессия 9 генов стволовости (Рис. 10).

Общее пересечение по генам стволовости - 18 генов (*DPPA3, ZSCAN10, DPPA4, ZEB1, NOTCH1, SNAI2, BMP6, CCND2, DPPA2, POU5F1, FZD9, FZD1, CDK6, WNT2, BMI1, CDX2, SOX8, TGFB1*). При этом, характер экспрессии даже у этих генов различается. Экспрессия *DPPA3, ZSCAN10* снижается у St и повышается у Тi, экспрессия *DPPA4, ZEB1, NOTCH1, SNAI2, BMP6* повышается у St и снижается у Тi.

Изменение экспрессии остальных генов одно направлена у пациентов. Кроме этого, у больной St дифференциально изменяется экспрессия 13 генов стволовости (*GSK3B*, *TERT*, *SOX4*, *SHH*, *MYC*, *KLF4*, *GATA3*, *ITGB1*, *KLF5*, *SOX1*, *SMAD9*, *SALL3*, *INSR*) и они не меняются у больной Ti. В тоже время у больной Ti дифференциально изменяется экспрессия 10 генов стволовости (*LIFR*, *SMO*, *TGFBRI*, *ALDH1A1*, *VIM*, *VIM*, *NODAL*, *CCNF*, *SMAD4*, *KLF2*), которых нет у больной St.

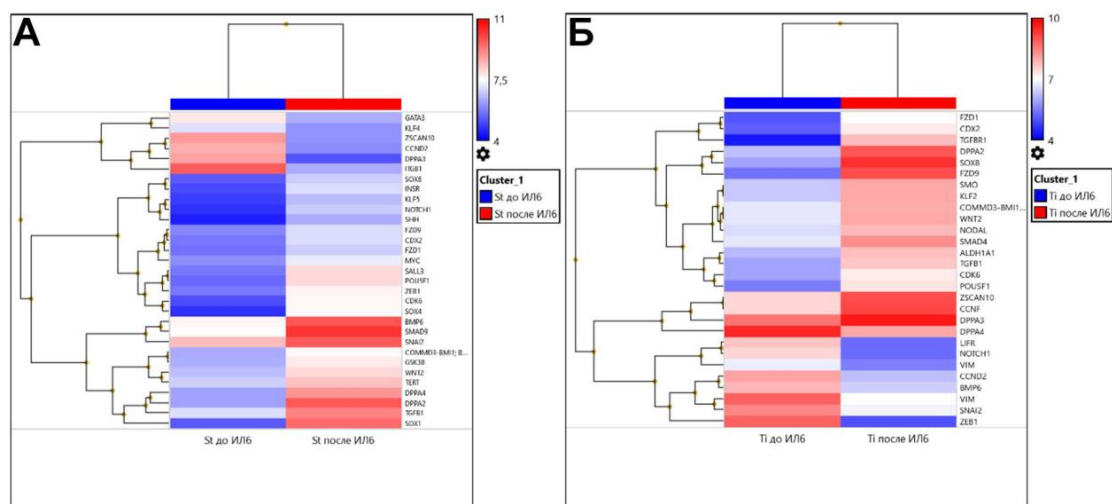


Рис. 10. Тепловая карта экспрессии генов стволовости в ErCam+ опухолевых клетках больных St (а) и Ti (б) до и после воздействия ИЛ6

Таким образом, в зависимости от наличия амплификаций генов стволовости опухолевые клетки разных пациентов сильно различаются по спектру ДЭГ. Также у этих пациентов, значительно различается спектр дифференциально экспрессируемых генов стволовости. Это свидетельствует о существенном влиянии CNA-генетического ландшафта опухоли и, в частности, амплификаций генов стволовости, на реакцию транскриптома клеток на ИЛ6, который как мы показали, индуцирует дедифференцировку клеток с амплификациями генов стволовости.

ВЫВОДЫ

1. Объективный ответ на НХТ (частичная и полная регрессия) наблюдался при наличии амплификаций в опухоли молочной железы люминального В HER2-негативного молекулярного подтипа до лечения в 9p22.1 и 9p21.3 хромосомных регионах у 42,8% (15/35) и 40,0% (14/35) больных, при отсутствии амплификаций в этих регионах у пациенток со стабилизацией и прогрессированием ($p=0,007$ и $p=0,008$ по критерию Фишера). С основными клинико-морфологическими параметрами CNA-генетический ландшафт опухоли до лечения показал слабую ассоциацию.

2. Показано статистически значимое снижение частоты встречаемости амплификаций ($p=0,00028$) и делеций после проведения предоперационной химиотерапии ($p=0,0003$). Выявлено 3 качественных изменения CNA опухоли в процессе НХТ: уменьшение количества делеций и/или амплификаций (вплоть до полной элиминации), отсутствие изменений числа CNA и появление de novo делеций и/или амплификаций. Безметастатическая выживаемость у больных с уменьшением частоты амплификаций в процессе предоперационного лечения составила 100% (у 0/33 пациентов развились метастазы). У пациенток с отсутствием изменений частоты амплификаций показаны промежуточные показатели выживаемости 79% (у 3/14 пациентов развились метастазы). Группа пациенток с увеличением частоты амплификаций в процессе НХТ безметастатическая выживаемость составила 8% (у 12/13 пациентов развились метастазы) ($p=0,00000$).

3. Установлены хромосомные регионы, в которых появлялись de novo ампликации под действием НХТ: 3q(26.31-27.1), 5p(15.33-15.2), 6p(25.2-24.2; 21.2-12.2), 7q(11.1-36.3), 8q(11.21-24.3),

9p(24.2-21.2), 10p(15.3-11.1), 10q(21.3-22.2; 25.1-25.2), 12p(13.33-11.22) 13q(12.3-34), 16p(13.3-11.2), 18q(11.1-23) 19p(13.3-12). У всех пациентов с метастазами в резидуальной опухоли наблюдалось минимум 2 амплификации из обозначенных хромосомных регионов. В то время как 1 амплификация или их отсутствие не приводила к метастазированию.

4. По результатам анализа корреляции частоты больных с 2-мя и более амплификациями 3q(26.31-27.1), 5p(15.33-15.2), 6p(25.2-24.2; 21.2-12.2), 7q(11.1-36.3), 8q(11.21-24.3), 9p(24.2-21.2), 10p(15.3-11.1), 10q(21.3-22.2; 25.1-25.2), 12p(13.33-11.22) 13q(12.3-34), 16p(13.3-11.2), 18q(11.1-23) 19p(13.3-12) в опухолях 17 различных локализаций 8456 больных из базы данных TCGA со смертностью при данных локализациях (по ВОЗ) установлен высокий уровень корреляции ($R=0,842$ при $p=0,000011$), свидетельствующий об универсальности наличия в опухоли 2-х и более амплификаций этих регионов как прогностического маркера неблагоприятного исхода.

5. Аннотирование генов, локализованных в амплифицированных регионах показало, что единственной системой, гены которой представлены во всех регионах амплификации являются гены системы индукции и поддержания стволового фенотипа клеток и самообновления или гены стволовости: *SOX2, DPPA2, DPPA4, GSK3B, TERT, BMP6, OCT4, SOX4, NOTCH4, PIM1, FZD9, FZD1, WNT2, SMO, CDK6, EPHA1, SHH, SNAI2, MYC, ALDH1A1, TGFBR1, KLF4, NOTCH1, VIM, BMI1, ITGB1, ZEB1, GATA3, NODAL, NANOG, DPPA3, CCND2, SOX1, ZIC2, KLF5, FLT3, CCNA1, SOX8, CCNF, ZSCAN10, SMAD4, SMAD2, SALL3, KLF1, KLF2, INSR, TGFBI*.

6. До лечения у больных без метастазов гиперэкспрессированы 3 из 13 изученных генов стволовости - *OCT3, BMI1* и *FLT3*, при этом у больных с наличием гематогенного метастазирования гиперэкспрессированы 7/13 генов стволовости – *OCT3, BMI1, SNAI2, TERT, TGFBI, TGFBR1* и *FLT3*. После проведения НХТ у больных без метастазов гиперэкспрессированы 6/13 генов стволовости - *OCT3, BMI1, KLF4, TGFBR1, TGFBI* и *FLT3*, в группе с метастазами гиперэкспрессированы 11 из 13 генов стволовости ($p=0,034$).

7. Частота амплификации 8q с регионом 8q24 (содержащим ген стволовости *MYC*) в опухоли больных до лечения составила 62% (37/60 случаев). Из 37 больных амплификация 8q в резидуальной опухоли после проведения НХТ сохранилась у 24/37 пациентов (65%), кроме этого еще у 3 пациентов амплификации 8q в опухоли возникли de novo под действием предоперационной терапии. Амплификация региона локализации гена *MYC* 8q24 в резидуальной опухоли приводит в повышенной экспрессии комплекса генов стволовости. У больных с амплификацией 8q24 после НХТ в 2.1-3.8 раза повышается, по сравнению с пациентами без амплификации 8q24, экспрессия 5/48 *GSK3B, MYC, GATA3, SMAD4, SMAD2* генов стволовости и в 2,1-2.3 раза снижается экспрессия генов *TERT, BMP6, NANOG* (при $p<0,05$).

8. Отсортированные дифференцированные опухолевые клетки CD44-CD24- культур опухоли молочной железы SK-BR-3 и MCF-7, содержащие 2-е и более амплификации генов стволовости были способны к дедифференцировке под действием ИЛ6 до опухолевых стволовых клеток с образованием маммосфер. Дифференцированные (CD44-CD24-) опухолевые клетки культуры опухоли молочной железы BT-549, которые не имели амплификаций генов стволовости, под действием ИЛ6 не были способны к дедифференцировке и образовывали ОСК и маммосфер.

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Полученные в итоге проведенного исследования результаты позволили понять ключевое звено процесса метастазирования – стволовая пластичность. Приобретение способности к стволовой пластичности – маркер готовности опухоли к метастазированию. Предотвращать развитие метастатической болезни, по нашему мнению, нужно ингибируя механизмы стволовой пластичности опухолевых клеток во вторичных органах. Стволовая пластичность, в отличие от ЕМТ (нормальном процессе многих эпителиальных клеток) это новоприобретенный опухолью механизм, поскольку в нормальных клетках этот механизм блокирован. Кроме того, не все опухоли способны к стволовой

пластичности. Если опухоль не способна к стволовой пластичности, то она не метастазирует. Следовательно, не все опухоли надо будет подвергать такому лечению. Нами установлен ключевой механизм приобретения способности к стволовой пластичности и снятия блока дедифференцировки - эктопическая экспрессия генов стволовости за счет амплификации регионов их локализации. В дальнейших исследованиях нужно понять, будет ли ингибирование эктопической экспрессии генов стволовости приводить к ингибированию способности к стволовой пластичности и метастазирования, и эффективность такого подхода для предотвращения развития метастатической болезни. На этой основе можно будет разработать принципиально новую линейку персонализированных противометастатических препаратов, основанных на оригинальном подходе – ингибированию способности к стволовой пластичности, который еще не используется в мире.

Список опубликованных работ по теме диссертации:

1. **Ибрагимова М.К.**, Цыганов М.М. Клональная эволюция опухоли молочной железы в процессе неoadъювантной химиотерапии и гематогенное метастазирование// Материалы XII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук». – 2015. – с. 808-810.
2. Tsyganov M., **Ibragimova M.**, Litviakov N., et al. Microarray research of allelic imbalance in breast cancers during neoadjuvant chemotherapy// European Journal of Cancer Supplements. – 2015. – с. 63-64
3. Litviakov N., **Ibragimova M.**, Tsyganov M., et al. Clonal evolution of breast tumor during neoadjuvant chemotherapy and metastasis// European Journal of Cancer Supplements. – 2015. – с. 34
4. **Ибрагимова М.К.**, Цыганов М.М., Литвяков Н.В. Клональная эволюция опухоли молочной железы в процессе неoadъювантной химиотерапии и гематогенное метастазирование// Успехи молекулярной онкологии. – 2015. – Т.2, №4, с. 45
5. Литвяков Н.В., **Ибрагимова М.К.**, Цыганов М.М., и др. Почему неoadъювантная химиотерапия, за исключением случаев полной регрессии, не улучшает выживаемость больных раком молочной железы// Злокачественные опухоли. – 2015. – Т.4, № 2 (спецвыпуск), с. 297-298.
6. Литвяков Н.В., Казанцева П., Цыганов М.М., **Ибрагимова М.К.**, и др. Несбалансированные хромосомные аномалии в опухоли молочной железы и эффективность неoadъювантной химиотерапии// Сборник тезисов онкологического форума «Белые Ночи – 2015». – 2015. – с. 501-502.
7. **Ибрагимова М.К.**, Цыганов М.М., Казанцева П.В., и др. Клональная эволюция опухоли молочной железы и гематогенное метастазирование в процессе неoadъювантной химиотерапии// Сибирский онкологический журнал. – 2015. – Прил. 1, с. 38-39.
8. **Ибрагимова М.К.**, Цыганов М.М., Казанцева П.В., и др. Отдаленное метастазирование и клональная эволюция опухоли молочной железы в процессе предоперационной терапии// Сборник тезисов Петербургского онкологического форума «Белые Ночи – 2015». – 2015. – с. 446-447.
9. Litviakov N.V., Cherdyntseva N.V., Tsyganov M.M., Slonimskaya E.M., **Ibragimova M.K.**, et al. Deletions of multidrug resistance gene loci in breast cancer leads to the down-regulation of its expression and predict tumor response to neoadjuvant chemotherapy// Oncotarget. – 2016. - V. 7, No. 7. - P.7829-7841. (Q1 IF 5,168), DOI: 10.18632/oncotarget.6953
10. **Ibragimova M.K.**, Tsyganov M.M., Cherdyntseva N.V., et al. Metastatic breast tumor clonal evolution during neoadjuvant chemotherapy// Materials international conference «Physics of cancer: interdisciplinary problems and clinical applications». – 2016. – pp. 33
11. **Ибрагимова М.К.**, Цыганов М.М. Клональная эволюция опухоли молочной железы в процессе неoadъювантной химиотерапии и гематогенное метастазирование// Сборник материалов всероссийской конференции молодых ученых-онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н.В. Васильева. – 2016. – с. 56-59
12. **Ибрагимова М.К.**, Цыганов М.М., Казанцева П.В., и др. Клональная эволюция опухоли молочной железы в процессе неoadъювантной химиотерапии и гематогенное метастазирование// Материалы III международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов OpenBio. – 2016. – с. 247-252
13. Litviakov N., Cherdyntseva N., Tsyganov M., **Ibragimova M.**, et al. The clonal evolution of a breast tumor during neoadjuvant chemotherapy and metastasis// Abstract Book of the 41st ESMO Congress (ESMO 2016), Copenhagen, Denmark / Ann Oncol. – 2016. – 27(6): vi94.
14. **Ибрагимова М.К.**, Цыганов М.М., Литвяков Н.В. Метастатические клоны опухоли молочной железы возникают в процессе клональной эволюции при проведении предоперационной химиотерапии// Материалы молодежного научного форума «OPEN SCIENCE». – 2016. – с. 18

15. **Ибрагимова М.К.**, Цыганов М.М., Литвяков Н.В. Появление в опухоли молочной железы при проведении неoadъювантной химиотерапии новых клонов, несущих амплификации, приводит к метастазированию// *Успехи молекулярной онкологии*. –2016. – Т. 3, № 4, с. 19
16. Литвяков Н.В., Казанцева П.В., Цыганов М.М., **Ибрагимова М.К.**, и др. Молекулярные маркеры для персонализированного назначения неoadъювантной химиотерапии большим раком молочной железы// *Acta Naturae*. –2016. – Т. 2, с.173
17. Литвяков Н.В., Казанцева П.В., **Ибрагимова М.К.**, и др. Технология персонализированного назначения неoadъювантной химиотерапии большим раком молочной железы// *Биомедицина-2016: сборник материалов форума*. – 2016. – с. 41.
18. **Ibragimova M.K., Tsyganov M.M., Litviakov N.V. Natural and chemotherapy-induced clonal evolution of tumors**// *Biochemistry (Moscow)*. – 2017. – Т. 82. № 4. – С. 413-425. (Q2 IF 1,97)
19. **Ибрагимова М.К.**, Цыганов М.М., Казанцева П.В. Метастатические клоны опухоли молочной железы возникают в процессе клональной эволюции при проведении предоперационной химиотерапии// *Сборник материалов XII всероссийской конференции молодых ученых-онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н.В. Васильева*. – 2017. – с. 56-58
20. **Ibragimova M.K., Tsyganov M.M., Kazantseva P.V., et al.** The study of CNA-status (copy number aberration) of tumor cells in patients with breast cancer// *Abstracts of the International conference "Physics of cancer: interdisciplinary problems and clinical applications": ISPMASB RAS*. – 2017. – pp. 43
21. **Deryusheva I.V., Tsyganov M.M., Garbukov E.Y., Ibragimova M.K., et al.** Genome-wide association study of loss of heterozygosity and metastasis-free survival in breast cancer patients// *Experimental Oncology*. – 2017. - V. 39.- P. 145–150. (Q3 IF 0,44)
22. **Tsyganov M.M, Freidin M.B., Ibragimova M.K., et al.** Genetic variability in the regulation of the expression cluster of MDR genes in patients with breast cancer// *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. – 2017.- V. 80, N.2.- P.251-260 (Q1 IF 3,033), DOI: 10.1007/s00280-017-3354-1
23. **Ibragimova M.K., Tsyganov M.M., Slonimskaya E.M., et al.** Copy number aberrations landscape of a breast tumor, connection with the efficiency of neoadjuvant chemotherapy// *AIP Conference Proceedings*. – 2017.- V. 1882, N.020026, P. 1-5. (Q4 IF 1,3), DOI: 10.1063/1.5001605
24. **Ибрагимова М.К.**, Цыганов М.М., Дерюшева И.В., и др. Назначение неoadъювантной химиотерапии большим РМЖ в зависимости от наличия в опухоли клонов с амплификациями регионов локализации генов сомато-стволового перехода// *Злокачественные опухоли*. – 2017. – Т.7, №3, с. 184-185
25. **Ибрагимова М.К.**, Цыганов М.М., Слонимская Е.М., и др. Метастатические клоны опухоли молочной железы// *Успехи молекулярной онкологии*. – 2017. – Т.4, №4., с. 26
26. Литвяков Н.В., **Ибрагимова М.К.**, Цыганов М.М., и др. Метастатические клоны опухоли молочной железы// *Сборник трудов конференции "Генетика человека и патология"*. – 2017. – Вып. 11, с. 124-125
27. Литвяков Н.В., **Ибрагимова М.К.**, Цыганов М.М., и др. Экспрессия генов сомато-стволового перехода в опухоли молочной железы при проведении неoadъювантной химиотерапии// *Материалы III Национального конгресса по регенеративной медицине «Гены и Клетки»*. – 2017. – с. 147
28. Литвяков Н.В., **Ибрагимова М.К.**, Слонимская Е.М., и др. Переход опухолевых нестволовых клеток в опухолевые стволовые клетки – ключевое звено процесса метастазирования// *Евразийский онкологический журнал*. – 2018. – Том 6, №1, с. 85
29. **Ибрагимова М.К.**, Цыганов М.М., Дерюшева И.В., и др. Метастатические клоны опухоли молочной железы// *Евразийский онкологический журнал*. –2018. – Том 6, №1, с. 140
30. **Ибрагимова М.К., Цыганов М.М., Писарева Л.Ф., и др.** Вирус-ассоциированный рак молочной железы (обзор и мета-анализ)// *Вопросы онкологии*. – 2018.- Т. 64, № 1.- С. 15-27. (IF 0,3)
31. Литвяков Н.В., **Ибрагимова М.К.**, Слонимская Е.М., и др. Сомато-стволовой переход опухолевых клеток - ключевое звено процесса метастазирования// *Материалы конференции, посвященной памяти советского и российского ученого Г.И. Абелева*. – 2018. – с. 64-65
32. **Ибрагимова М.К.**, Цыганов М.М., Дерюшева И.В., и др. Метастатические клоны опухоли молочной железы// *Материалы конференции, посвященной памяти советского и российского ученого Г.И. Абелева*. – 2018. – с. 39-40
33. **Слонимская Е.М., Казанцева П.В., Литвяков Н.В., Цыганов М.М., Ибрагимова М.К., и др.** Опыт персонализированного назначения неoadъювантной химиотерапии большим раком молочной железы: проспективное исследование// *Фарматека*. – 2018. № 7 (360).- С. 64-70. (IF 0,457)
34. **Ибрагимова М.К.**, Дерюшева И.В., Литвяков Н.В., и др. Значение экспрессии генов сомато-стволового перехода в прогрессии рака молочной железы// *Материалы IV Международного онкологического форума «Белые ночи 2018»*. – 2018. – с. 72

35. **Ибрагимова М.К.**, Цыганов М.М., Дерюшева И.В., и др. Значение экспрессии генов сомато-стволового перехода в прогрессировании рака молочной железы// Сборник материалов конгресса молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины». –2018. – с. 237-238
36. Казанцева П.В., Слонимская Е.М., Литвяков Н.В., **Ибрагимова М.К.**, и др. Предсказательная и прогностическая значимость метастатических клонов у больных люминальным В раком молочной железы// Сборник материалов конгресса молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины». – 2018. – с. 239-241
37. Tsyganov M.M., **Ibragimova M.K.**, Deryusheva I.V., et al. CNA landscape of breast tumor, connection with the efficiency of neoadjuvant chemotherapy// The 22nd International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research. – 2018. – pp. 109-111
38. Литвяков Н.В., **Ибрагимова М.К.**, Скурихин Е.Г., и др. Приобретение опухолевыми клетками способности к сомато-стволовому переходу определяет отдаленное метастазирование// Сборник научных трудов V международной конференции “ПОСТГЕНОМ’2018”. – 2018. – с 231
39. **Ибрагимова М.К.**, Цыганов М.М., Дерюшева И.В., и др. Персонализированное назначение неоадьювантной химиотерапии больным раком молочной железы в зависимости от наличия в опухоли маркеров метастатических клонов// Сборник научных трудов V международной конференции “ПОСТГЕНОМ’2018”. – 2018. – с 233
40. Небова Ю.А., **Ибрагимова М.К.**, Цыганов М.М. Экспрессия генов сомато-стволового перехода и макрофаг-ассоциированных генов в опухоли молочной железы// Сборник научных трудов XV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук». – 2018. – с. 110-112
41. **Ибрагимова М.К.**, Цыганов М.М., Дерюшева И.В., и др. Значение экспрессии генов сомато-стволового перехода в прогрессии рака молочной железы// Злокачественные опухоли. – 2018. – Том 8, №3 s1, с 239-240
42. **Ибрагимова М.К.**, Цыганов М.М., Дерюшева И.В., и др. Значение экспрессии генов сомато-стволового перехода в прогрессии рака молочной железы// Успехи молекулярной онкологии. – 2018. – с 67
43. Литвяков Н.В., Слонимская Е.М., **Ибрагимова М.К.**, и др. Построение индивидуального филогенетического древа эволюции опухоли пациента как новая основа для назначения предоперационной химиотерапии в целях элиминации метастатических клонов// Успехи молекулярной онкологии. – 2018. – с 110
44. **Tanas A.S., Sigin V.O., Kalinkin A.I., Litviakov N.V., Slonimskaya E.M., Ibragimova M.K., et al. Genome-wide methylotyping resolves breast cancer epigenetic heterogeneity and suggests novel therapeutic perspectives// Epigenomics. – 2019.- V. 11, N. 6.- P. 605-617. (Q1 IF 4,061), DOI: 10.2217/epi-2018-0213**
45. **Ибрагимова М.К.** Значение экспрессии генов стволовости в прогрессии рака молочной железы// Материалы научной конференции с международным участием «Нейрогуморальные механизмы регуляции физиологических функций в норме и при патологии». – 2019. – с. 65
46. **Ибрагимова М.К.** Значение экспрессии генов стволовости в прогрессии рака молочной железы// Фундаментальные и прикладные исследования: сборник научных трудов V Всероссийской конференции молодых ученых. – 2019. – с 35-39
47. Казанцева П.В., Слонимская Е.М., Цыганов М.М., **Ибрагимова М.К.**, и др. **Предиктивная и прогностическая значимость амплификаций генов стволовости в опухоли молочной железы больных, получавших неоадьювантную химиотерапию// Фарматека. – 2019.- Т. 26, № 7.- С. 50-56. (IF 0,457)**
48. Литвяков Н.В., Бычков В.А., **Ибрагимова М.К.**, и др. Экспрессия нестволовыми опухолевыми клетками молочной железы белков стволовости как новый in situ маркер метастазирования опухоли// Материалы международного онкологического форума Белые ночи 2019. – 2019. – с. 32-33.
49. **Ибрагимова М.К.**, Литвяков Н.В., Цыганов М.М., и др. Значение экспрессии генов стволовости в прогрессии рака молочной железы// Материалы международного онкологического форума Белые ночи 2019. – 2019. – с. 81
50. **Ибрагимова М.К.**, Цыганов М.М., Дерюшева И.В., и др. Значение экспрессии генов стволовости в прогрессировании рака молочной железы// Сборник материалов российской научно-практической конференции, посвященной 40-летию НИИ онкологии Томского НИМЦ. – 2019. – с. 109-111.
51. Казанцева П.В., Слонимская Е.М., Литвяков Н.В., Цыганов М.М., **Ибрагимова М.К.** Оптимизация хирургического лечения больных раком молочной железы с учетом генетического ландшафта опухоли// Сборник материалов российской научно-практической конференции, посвященной 40-летию НИИ онкологии Томского НИМЦ х. – 2019. – с. 112-114.

52. Литвяков Н.В., **Ибрагимова М.К.**, Цыганов М.М., и др. Стволовой переход определяет способность опухоли к метастазированию// *Acta naturae*. – 2019. – Т.2, с.188-189
53. **Ибрагимова М.К.**, Цыганов М.М., Дерюшева И.В., и др. Значение экспрессии генов стволовости в прогрессии рака молочной железы// *Acta naturae*. – 2019. – Т.2, с. 233
54. Цыганов М.М., **Ибрагимова М.К.**, Дерюшева И.В., и др. Делеции генов репарации и супрессоров могут вызывать возникновения клонов с амплификациями регионов, определяющих способность к метастазированию// *Acta naturae*. – 2019. – Т.2, с. 225
55. **Ибрагимова М.К.**, Цыганов М.М., Дерюшева И.В. Значение экспрессии генов стволовости в прогрессии рака молочной железы// *Материалы XVI международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук»*. – 2019. – с. 52-54
56. **Ибрагимова М.К.**, Цыганов М.М., Дерюшева И.В., и др. Значение экспрессии генов стволовости в прогрессии рака молочной железы// *Материалы всероссийской конференции «Опухолевые маркеры: молекулярно-генетические и клинические аспекты»*. – 2019. – с. 24-26
57. **Tsyganov M.M., Ibragimova M.K., Pevzner A.M., et al. Amplification of stem genes - new potential metastatic markers in patients with an early form of breast cancer// Journal of Korean Medical Science.** – 2019.- V. 34(49).- e312, P. 1-9. (Q2 IF 1,791), DOI: 10.3346/jkms.2019.34.e312
58. **Ибрагимова М.К.**, Цыганов М.М., Слонимская Е.М., Литвяков Н.В. Полнотранскриптомный анализ экспрессии генов в опухоли молочной железы с амплификацией длинного плеча 8-й хромосомы// *Успехи молекулярной онкологии*. – 2019. – с. 12-13
59. Литвяков Н.В., **Ибрагимова М.К.**, Цыганов М.М., и др. Проспективное исследование целесообразности назначения предоперационной химиотерапии больных раком молочной железы в зависимости от наличия в опухоли метастатических клонов// *Евразийский онкологический журнал*. – 2020. – Т. 8, № 2, с. 418
60. **Litviakov N.V., Ibragimova M.K., Tsyganov M.M., et al. Neoadjuvant chemotherapy induces the appearance of new copy number aberrations in a breast tumor and this associated with metastasis// Current Cancer Drug Targets.** – 2020.- V. 20, I. 9.- P. 681-688. (Q1 IF 2,9), DOI: 10.2174/1568009620666200506104523
61. **Litviakov N., Ibragimova M., Tsyganov M., et al. Amplifications of stemness genes and the capacity of breast tumors for metastasis// Oncotarget.** – 2020.- V. 11, No. 21.- P. 1988-2001. (Q1 IF 5,1), DOI: 10.18632/oncotarget.27608
62. **Sigin V.O ., Kalinkin A.I ., Kuznetsova E.B., Simonova O.A., Chesnokova G.G., Litviakov N.V., Slonimskaya E.M., Tsyganov M.M., Ibragimova M.K., et al. DNA methylation markers panel can improve prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in luminal B breast cancer// Scientific Reports.** – 2020.- V. 11.- Article number: 9239, P. 1-9. (Q1 IF 4,558), DOI: 10.1038/s41598-020-66197-1
63. **Litviakov N.V., Ibragimova M.K., Tsyganov M.M., et al. Association of the combination of stemness gene amplifications and copy number aberrations of WNT-signaling genes in breast tumors with metastasis// Siberian Journal of Oncology.** – 2020.- V.- 19(3).- P. 78–88. (Q4 IF 0,598)
64. **Ибрагимова М.К.**, Цыганов М.М., Литвяков Н.В. Транскриптом опухоли молочной железы с различным статусом амплификации длинного плеча 8 хромосомы// *Медицинская генетика*. – 2020. – Том 19, №6 (215), с. 31-32
65. **Ибрагимова М.К.**, Цыганов М.М., Слонимская Е.М., Литвяков Н.В. Аберрации числа копий в геноме опухоли молочной железы люминального подтипа В// *Бюллетень сибирской медицины*. – 2020. – Т. 19(3).- С.22–28. (Q4 IF 0,31)
66. **Litviakov N.V., Bychkov V.A., Stakheeva M.N., Ibragimova M.K., et al. Breast tumour cell subpopulations with expression of the MYC and OCT4 proteins// Journal of Molecular Histology.** – 2020. – V.- 51.- P. 717–728. (Q2 IF 2,531), DOI: 10.1007/s10735-020-09917-1
67. **Ибрагимова М.К.**, Цыганов М.М., Литвяков Н.В. Полнотранскриптомный анализ экспрессии генов в опухоли молочной железы с амплификацией длинного плеча 8 хромосомы// *Материалы VI Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2020»*. – 2020. – с. 283.
68. **Ибрагимова М.К.**, Певзнер А.М., Цыганов М.М. Полнотранскриптомный анализ экспрессии генов в опухоли молочной железы с амплификацией длинного плеча 8 хромосомы// *Материалы XVII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук»*. – 2020. – с. 31-34
69. **Pevzner A., Tsyganov M., Ibragimova M., et al. Mutations of BRCA1 gene in a tumor tissue and effectiveness of preoperative taxotere therapy in patients with luminal B breast cancer// Gene Reports.** – 2020. – V. 21., Article number: 100859. (Q4 IF 2,98), DOI: 10.1016/j.genrep.2020.100859
70. **Ibragimova M.K., Tsyganov M.M., Pevzner A.M., Litviakov N.V. Transcriptome of breast tumors with different amplification status of the long arm of chromosome 8// Anticancer research.** – 2021. – 41(1), P.187-95. (Q2 IF 1,938), DOI: doi.org/10.21873/anticancer.14764

Результаты интеллектуальной деятельности

По материалам диссертации зарегистрированы 2 патента:

1. RU № 2682879 «Способ прогнозирования безметастатической выживаемости у больных раком молочной железы на основе экспрессии генов сомато-стволового перехода в резидуальной опухоли после предоперационной терапии» от 22 марта 2019 г. (Бюл. № 9)
2. RU №2594251 «Способ персонализированного назначения неoadъювантной химиотерапии больным люминальным В раком молочной железы» от 20 июля 2016 г (Бюл. № 22)

Получены свидетельства о регистрации 8 баз данных:

1. № 2015621620 «База данных по нормальной генетической вариабельности опухоли молочной железы и уровня экспрессии в ней генов химиорезистентности» от 30 октября 2015 г.
2. № 2018620706 «База данных экспрессии генов сомато-стволового перехода в процессе предоперационной химиотерапии у больных с диагнозом рак молочной железы» от 16 мая 2018 г.
3. № 2019620470 «База данных частоты цитобендов с вариациями числа копий в опухоли молочной железы в процессе неoadъювантной химиотерапии» от 22 марта 2019 г.
4. № 2019620731 «База данных изменения амплификаций генов стволовости в опухоли молочной железы в процессе предоперационной терапии» от 08 мая 2019 г.
5. № 2019620995 «База данных по полногеномной оценке потери гетерозиготности в опухоли больных люминальным В раком молочной железы» от 6 июня 2019 г.
6. № 2020620411 «База данных копийности генов WNT – сигналинга в опухоли больных раком молочной железы» от 5 марта 2020 г.
7. №2020620652 «База данных изменения количества метастатических клонов в опухоли больных люминальным В раком молочной железы в процессе неoadъювантной химиотерапии» от 9 апреля 2020 г.
8. №2020622457 «База данных транскриптомов опухолей больных раком молочной железы в процессе неoadъювантной химиотерапии» от 30 ноября 2020 г.

Благодарности

Автор выражает особую благодарность профессору кафедры онкологии Медицинского факультета ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский Государственный университет» проф. Слонимской Е.М. (г. Санкт-Петербург), старшему научному сотруднику отделения общей онкологии НИИ онкологии Томского НИМЦ к.м.н. Гарбукову Е.Ю. (г. Томск), научному сотруднику лаборатории биотехнологии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН к.б.н. Нуштаевой А.А. (г. Новосибирск), старшему научному сотруднику лаборатории онковирусологии НИИ онкологии Томского НИМЦ к.б.н. Цыганову М.М. (г. Томск), и всем сотрудникам лаборатории онковирусологии НИИ онкологии Томского НИМЦ.

Грантовая поддержка

Работа поддержана грантами РФФИ 15-04-03091 «Клональная эволюция опухоли молочной железы в процессе химиотерапии», РФФИ 18-29-09131 «Феномен "замирания" опухоли в процессе химиотерапии», РНФ 17-15-01203 «Метастатические клоны опухоли молочной железы».