

На правах рукописи

ДЕНИСОВ

Евгений Владимирович

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

3.1.6 – Онкология, лучевая терапия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Санкт-Петербург – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук».

Научные консультанты:

Доктор биологических наук, член-корр. РАН **Чердынцева Надежда Викторовна**

Доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ **Перельмутер Владимир Михайлович**

Официальные оппоненты:

Любченко Людмила Николаевна – доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом молекулярной генетики и клеточных технологий федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, (г. Москва)

Барлев Николай Анатольевич – доктор биологических наук, заведующий лабораторией регуляции экспрессии генов федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук, (г. Санкт-Петербург)

Кирсанов Кирилл Игоревич – доктор биологических наук, заведующий лабораторией канцерогенных веществ федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, (г. Москва)

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, (г. Москва)

Защита диссертации состоится « ___ » _____ 2022 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 21.1.033.01 при ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68).

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

Автореферат разослан « ___ » _____ 2022

Ученый секретарь диссертационного совета:

доктор медицинских наук

Филатова Лариса Валентиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Рак молочной железы (РМЖ) является ведущей онкологической патологией у женщин. В структуре смертности женщин от онкологических заболеваний РМЖ также имеет наибольший удельный вес [Каприн А.Д., 2019; Dyba T., 2021]. Такая удручающая статистика напрямую связана как с проблемами ранней диагностики заболевания, так и с низкой эффективностью терапии и отсутствием высокоэффективных методов предсказания и предотвращения риска прогрессирования РМЖ, неудачи в разработке которых во многом объясняются внутриопухолевой гетерогенностью данного заболевания.

Внутриопухолевая гетерогенность (ВОГ) представляет собой феномен сосуществования в пределах опухоли клеток как опухолевых, так и иммунных и стромальных с различными биологическими характеристиками. ВОГ вносит большой вклад в рост опухоли, инвазию, лимфогенное и гематогенное метастазирование, рецидивирование и рассматривается как ключевой фактор, определяющий развитие новообразования, поддержание онкогенного потенциала, выживание опухолевых клеток в условиях динамичного микроокружения и их устойчивость к лекарственному воздействию [Michor F., 2010; Marusyk A., 2012; Saunders N.A., 2012].

Выделяют три типа ВОГ: генетическая, эпигенетическая, и фенотипическая. Генетическая ВОГ проявляется в наличии опухолевых клеток с различными генными мутациями и хромосомными aberrациями [Dentro S.C., 2021]. Эпигенетическая ВОГ подразумевает различия опухолевых клеток в профиле метилирования ДНК, модификации гистонов и экспрессии некодирующих РНК [Assenov Y., 2018; Guo M., 2019]. Фенотипическая ВОГ наблюдается на уровне различий опухолевых клеток в размере, форме, рецепторном статусе, дифференцировке, паттернах инвазии и т.д. [Meyer A.S., 2019; Biswas A., 2021].

Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность (ВОМГ), являющаяся вариантом фенотипической ВОГ, встречается при большинстве онкологических заболеваний и представляет собой наличие в пределах опухоли различных морфологических (гистологических / инвазивных / инфильтративных) структур, отражающих специфические пространственные формирования опухолевых клеток. В опухоли может быть представлен какой-то один тип морфологических структур, либо несколько вариантов сразу. В зависимости от преобладания определенного варианта морфологических структур в опухоли, злокачественные новообразования классифицируют на гистологические подтипы, характеризующиеся индивидуальным прогнозом и ответом на терапию [Bosman F.T., 2010; Travis W.D., 2015]. Оценка количества определённых структур в ткани опухоли используется для установления степени злокачественности (tumor grading) злокачественных новообразований [Bloom H.J., 1957; Humphrey P.A., 2004]. Наличие определённых морфологических особенностей в опухолевой ткани

ассоциировано с прогнозом клинического течения заболевания и ответом на лечение [Zakowski M.F., 2009; Grigore A.D., 2016]. Комплексная оценка морфологического строения злокачественных новообразований с помощью подходов машинного обучения позволяет предсказывать молекулярный профиль опухолевых клеток [Kather J.N., 2020; Binder A., 2021].

Инвазивная карцинома неспецифического типа (от англ. *invasive carcinoma of no special type, IC NST*), составляющая основную долю РМЖ (до 80% всех случаев) демонстрирует значительную ВОМГ. Инвазивный компонент опухолевой ткани молочной железы представлен одиночными опухолевыми клетками и структурами опухолевых клеток различных форм и размеров [Завьялова М.В., 2006; Перельмутер В.М., 2006; Lakhani S.R., 2012]. Тубулярные (также описываемые как “hollow-like”) структуры образованы опухолевыми клетками, стоящими в 1-2 ряда и формирующими подобие трубок. Определение количества тубулярных структур в опухоли используется для оценки степени злокачественности РМЖ [Bloom H.J., 1957]. Солидные структуры представлены полями разной величины и формы, включающими сотни опухолевых клеток. Трабекулярные структуры, часто описываемые в англоязычной литературе как “cords of tumor cells”, сформированы 1-3 рядами опухолевых клеток. Альвеолярные (“morula-like”) структуры – это скопления округлой формы, насчитывающие до 30 опухолевых клеток. Дискретные группы представлены как отдельными опухолевыми клетками, так и их скоплениями (2-5 клеток). Количество различных типов морфологических структур в опухолевой ткани варьирует от случая к случаю [Завьялова М.В., 2006; Перельмутер В.М., 2006; Перельмутер В.М., 2007]. Реже встречаются структуры по типу карциноида и комедо-некроза (“comedo”), а также криброзные, папиллярные и микропапиллярные формирования опухолевых клеток, представляющие собой внутрипротоковые компоненты [Lakhani S.R., 2012]. Выделяют также так называемые “опухолевые почки” (“tumor buds”), представляющие собой одиночные опухолевые клетки и/или небольшие кластеры (2-6 клеток), расположенные на инвазивном фронте опухоли [Man Y.G., 2010; Liang F., 2013; Sun Y., 2014].

В настоящее время данные о природе внутриопухолевой морфологической гетерогенности РМЖ немногочисленны, отсутствуют сведения о механизмах формирования и специфических маркерах различных структур опухолей молочной железы. С одной стороны, можно предположить, что развитие ВОМГ при РМЖ связано с клональной эволюцией, где различные морфологические структуры являются генетически-обособленными популяциями опухолевых клеток со специфическими нарушениями, предопределяющими их форму. Ранее связь морфологического разнообразия опухоли и клональной эволюции была показана для IC NST трижды-негативного подтипа и метапластического РМЖ [Geyer F.C., 2010; Patani N., 2011]. При этом морфологические особенности опухолей молочной железы связаны не только с изменениями

генома, но и с уровнем метилирования ДНК, экспрессии микроРНК и различных генов, в т.ч. входящих в мультиплексную прогностическую панель PAM50 [Heng Y.J., 2017]. С другой стороны, не исключается вклад опухолевых стволовых клеток (ОСК) в формирование морфологических структур. Известно, что CD44⁺CD24⁻ ОСК преобладают в базальноподобных опухолях молочной железы с низкодифференцированным инфильтративным компонентом, который в основном представлен солидными структурами [Honeth G., 2008; Haupt B., 2010]. Помимо этого, морфологически обособленные формирования опухолевых клеток могут указывать на специфические паттерны инвазивного роста. Согласно литературным данным, опухолевая инвазия может реализовываться через миграцию одиночных клеток (индивидуальная инвазия), либо групп клеток (коллективная инвазия) [Friedl P., 2011, 2012]. Механизмы инвазии опухолевых клеток также различны: клетки могут двигаться по образу и подобию фибробластов (мезенхимальное движение) либо лейкоцитов (амебовидное движение) [Friedl P., 2011, 2012]. Различные молекулы, главным образом белки актинового цитоскелета и адгезии, вовлечены в регуляцию и реализацию клеточной миграции и могут предопределять морфогенез опухолевых клеток [Friedl P., 2011, 2012; Чикина А.С., 2014; Pandya P., 2017].

ВОМГ ассоциирована с прогрессированием РМЖ и эффективностью противоопухолевой терапии. Комплексный анализ морфологического строения ткани опухоли и генной экспрессии в опухолевых клетках обладает прогностической значимостью в отношении выживаемости больных трижды-негативным РМЖ [Wang C., 2013]. Оценка морфологии опухолевой ткани, ассоциированной с экспрессией рецептора эпидермального фактора роста Her2/ERBB2, позволяет предсказывать эффективность терапии трастузумабом и выживаемость больных РМЖ [Buchkov D., 2021]. Непосредственные и отдаленные результаты лекарственного лечения больных РМЖ также связаны с наличием и количеством определённых типов морфологических структур в ткани опухоли. Наличие "опухолевых почек" (tumor buds) ассоциировано с большим размером опухоли, лимфоваскулярной инвазией, низкой безрецидивной и общей выживаемостью больных РМЖ [Man Y.G., 2010; Liang F., 2013; Sun Y., 2014; Voutsadakis I.A., 2018]. Опухолевая прогрессия в целом (размер опухоли и частота лимфогенного и гематогенного метастазирования) более выражена в случаях с большим количеством различных типов морфологических структур [Перельмутер В.М., 2007]. Частота лимфогенного метастазирования возрастает по мере увеличения процента альвеолярных структур в инфильтративном компоненте РМЖ [Завьялова М.В., 2006]. Показатель количественного отношения трабекулярных структур к тубулярным, равный двум, свидетельствует о повышении риска одиночного метастазирования (либо в кости, либо в печень) в 3 раза, а сочетанного (в кости и печень одновременно) в 5 раз по сравнению со значением коэффициента, равным

единице [Перельмутер В.М., 2006]. У пременопаузальных больных с рецидивами в послеоперационном рубце чаще встречаются солидные или альвеолярные структуры, тогда как случаи с рецидивированием вне рубца характеризуются частым присутствием трабекулярных формирований [Вторушин С.В., 2010]. Наличие альвеолярных структур и высокое морфологическое разнообразие опухолей молочной железы ассоциировано с резистентностью к неоадьювантной химиотерапии [Завьялова М.В., 2008]. Однако, молекулярные факторы и механизмы, которые могли бы объяснить ассоциацию морфологических структур с риском прогрессирования РМЖ и эффективностью химиотерапии, в настоящее время не известны.

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

Степень разработанности темы

Внутриопухолевая гетерогенность, впервые упоминаемая ещё в трудах немецкого патолога Давида Ганземана в 1890 г. и описываемая на морфологическом уровне на протяжении 1950 – 1990-х годов, приобрела наибольшую популярность и актуальность в 21-м веке, когда в практике онкологических исследований стали широко применяться молекулярно-генетические методы. Именно в это время наблюдается всплеск исследований внутриопухолевой генетической гетерогенности, который привел к появлению и экспериментальной валидации двух основных гипотез её развития – роли клональной эволюции и опухолевых стволовых клеток – и демонстрации её вклада в метастазирование, рецидивирование и эффективность терапии злокачественных новообразований.

Значительно меньший прогресс достигнут в изучении внутриопухолевой морфологической гетерогенности злокачественных новообразований, в частности для инвазивной карциномы неспецифического типа, являющейся наиболее часто встречающейся гистологической формой РМЖ. Несколькими исследованиями показана зависимость эффективности НАХТ [Завьялова М.В., 2008], лимфогенного [Завьялова М.В., 2006; Завьялова М.В., 2008] и гематогенного [Перельмутер В.М., 2006] метастазирования и рецидивирования [Вторушин С.В., 2010; Перельмутер В.М., 2010] РМЖ от

внутриопухолевой морфологической гетерогенности. Обнаружены различия в пролиферативном потенциале различных морфологических структур [Завьялова М.В. 2009] и выраженности воспалительного инфильтрата между ними [Завьялова М.В. 2009; Перельмутер В.М., 2010]. Показана зависимость количества типов морфологических структур от локализации и синхронности/метахронности РМЖ [Завьялова М.В., 2010; Завьялова М.В., 2015]. Тем не менее, ничего не известно о природе внутриопухолевой морфологической гетерогенности. Данное обстоятельство послужило основанием для проведения исследования, направленного на изучение биологической природы внутриопухолевой морфологической гетерогенности и идентификацию факторов её вклада в эффективность НАХТ и прогрессию РМЖ.

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

Задачи:

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

Научная новизна исследования

Впервые определена молекулярно-генетическая природа внутриопухолевой морфологической гетерогенности при инвазивной карциноме молочной железы неспецифического типа. Установлено, что формирование различных морфологических структур носит неклональный характер и ассоциировано со стволовостью, эпителиально-мезенхимальным переходом и инвазивным ростом. CD44⁺CD24⁻ опухолевые стволовые клетки преобладают в многоклеточных структурах, главным образом в альвеолярных структурах, и практически отсутствуют в дискретных группах опухолевых клеток. Количество экспрессирующихся генов мезенхимального фенотипа возрастает в ряду: альвеолярные, тубулярные, солидные, трабекулярные и дискретные группы опухолевых клеток.

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

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

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

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты диссертационного исследования предоставляют информацию о клеточных и молекулярных факторах, ассоциированных с развитием внутриопухолевой морфологической гетерогенности рака молочной железы и её вкладом в опухолевую прогрессию и эффективность химиотерапии. Формирование различных морфологических структур не связано с хромосомными абберациями, а ассоциировано с экспрессией генов

эпителиально-мезенхимального перехода, наличием CD44⁺CD24⁻ опухолевых стволовых клеток и опухоль-ассоциированных макрофагов и фибробластов. Различия в степени выраженности CD44⁺CD24⁻ стволовости и эпителиальных и мезенхимальных характеристик, а также в экспрессии генов химиорезистентности, вероятно, являются причиной дифференциального вклада морфологических структур в лимфогенное и отдаленное метастазирование рака молочной железы и эффективность неoadъювантной химиотерапии.

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

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

Методология и методы исследования

В качестве материала исследования были формалин-фиксированные парафин-залитые (FFPE) и свежие образцы ткани инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа. Исследование проводилось с помощью гистологических, иммуногистохимических и молекулярно-генетических методов. Полученные данные обрабатывались с использованием биоинформатических и статистических методов. Гематоксилин и эозин-окрашенные срезы FFPE образцов опухоли и световая микроскопия использовались для анализа представленности различных типов морфологических структур в образцах опухолевой ткани. Иммуноокрашенные срезы FFPE образцов опухоли и конфокальная микроскопия использовались для оценки пространственной организации

морфологических структур, наличия CD44⁺CD24⁻ опухолевых стволовых клеток в различных морфологических структурах и опухоль-ассоциированных макрофагов и фибробластов в их микроокружении. Гематоксилин и эозин-окрашенные срезы свежих образцов ткани опухоли и лазерная микродиссекция использовались для получения различных морфологических структур. Сравнительная геномная гибридизация и полнотранскриптомный анализ на основе микроматриц применялись для цитогенетического и экспрессионного профилирования микродиссектированных морфологических структур. Данные полнотранскриптомного анализа использовались для сравнительной характеристики различных морфологических структур по экспрессии генов, вовлеченных в инвазию, в частности в эпителиально-мезенхимальный переход, и в химиорезистентность. Инвазивный и химиорезистентный фенотип каждого типа морфологических структур сравнивался с их вкладом в вероятность метастазирования рака молочной железы и эффективность неoadьювантной химиотерапии. Транскриптом морфологических структур с выраженным мезенхимальным фенотипом служил основой для поиска маркеров инвазии и риска гематогенного метастазирования рака молочной железы. РНК-секвенирование, совмещенное с лазерной микродиссекцией в режиме флуоресценции, использовалось для изучения транскриптома опухолевых клеток, экспрессирующих маркеры высокого риска метастазирования. На основании полученных результатов были предложены рекомендации по оценке внутриопухолевой морфологической гетерогенности и ассоциированных маркеров в клинической практике с целью предсказания риска прогрессии рака молочной железы и эффективности химиотерапии.

Положения, выносимые на защиту

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

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

3. Альвеолярные и трабекулярные структуры ассоциированы с эффективностью неoadьювантной химиотерапии больных инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа. Химиорезистентность альвеолярных структур связана с высоким

количеством CD44⁺CD24⁻ опухолевых стволовых клеток, трабекулярных – с выраженным эпителиально-мезенхимальным переходом.

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

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

Степень достоверности и апробация результатов

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

Результаты диссертационной работы были представлены на 3-м Норвежском симпозиуме по раку "Рост и пролиферация: молекулярные регуляторы рака" (Осло, 2011), конференции по раку молочной железы ИМРАКТ (Брюссель, 2013), I Международной конференции "Высокопроизводительное секвенирование в геномике" (Новосибирск, 2013), Всероссийской научной школе-конференции для молодых ученых РАМН «Современная онкология: достижения и перспективы» (Новосибирск, 2013), VI съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Ростов-на-Дону, 2014), 23-м конгрессе Европейской ассоциации исследования рака (Мюнхен, 2014), Международной молодежной научной конференции «Современные проблемы генетики, клеточной биологии и биотехнологии» (Томск, 2014), конференции "Прощай плоская биология: 3D модели и опухолевое микроокружение" (Берлин, 2014), VII съезде Российского общества медицинских генетиков (Санкт-Петербург, 2015), конференции ЕМВО «Клеточные и молекулярные механизмы взаимоотношения опухоли и микроокружения» (Томск, 2015), Международной научной конференции "Хромосома 2015" (Новосибирск, 2015), конференции Национального института исследования рака (Ливерпуль, 2015), Международных конференциях "Физика рака: трансдисциплинарные проблемы и клиническое применение" (Томск, 2016, 2017), 10-й Международной конференции по биоинформатике регуляции и структуры геномов и системной биологии (Новосибирск, 2016), XX-XXI Российском онкологическом конгрессе (Москва, 2016), 28-м симпозиуме EORTC-NCI-AACR по молекулярным

мишеням и терапии рака (Мюнхен, 2016), 3-м и 4-м Международных симпозиумах Лионского центра исследования рака (Лион, 2017, 2019), 1-й конференции EACR-MRS “Семена и почва: *in vivo* модели метастазирования” (Берлин, 2017), 22-й Международной конференции им. Чарльза Хайдельберга (Томск, 2018), 45-м конгрессе Международного общества онкологии и биомаркеров (Гамбург, 2018), Сателлитном симпозиуме V Всероссийской конференции по молекулярной онкологии (Москва, 2018), I-III Научно-практических школах «Секвенирование единичных клеток» (Томск, 2019-2021), Научно-практической конференции «Фундаментальная и клиническая онкология: достижения и перспективы развития» (Томск, 2019), 6-й конференции ZOO “Клеточная адгезия и миграция при воспалении и раке” (Роттердам, 2019), V конгрессе с международным участием “Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное” (Санкт-Петербург, 2020), III Байкальском медицинском молодежном форуме (Улан-Удэ, 2021).

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

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

Внедрение результатов

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

Личное участие автора в получении результатов

Автором самостоятельно изучена литература по тематике исследования, сформулированы цель и задачи диссертационной работы и проведено планирование экспериментов. Самостоятельно сформированы исследуемые группы больных инвазивной карциномой молочной железы

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

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

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

Объем и структура диссертации

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

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для решения задач была сформирована группа из 700 больных IC NST (возраст от 21 до 90 лет, T₁₋₄N₀₋₃M₀), проходивших лечение в отделении общей онкологии НИИ онкологии Томского НИМЦ с 1990 по 2015 гг. Пациенты были разделены на несколько групп в зависимости от выполняемых задач (Рисунок 1).

Первая группа из 676 пациенток (249 без НАХТ и 427 с НАХТ) использовалась для анализа исследования ассоциации тубулярных, альвеолярных, солидных, трабекулярных структур и дискретных групп

опухолевых клеток с эффективностью НАХТ и частотой лимфогенного и гематогенного метастазирования IC NST.

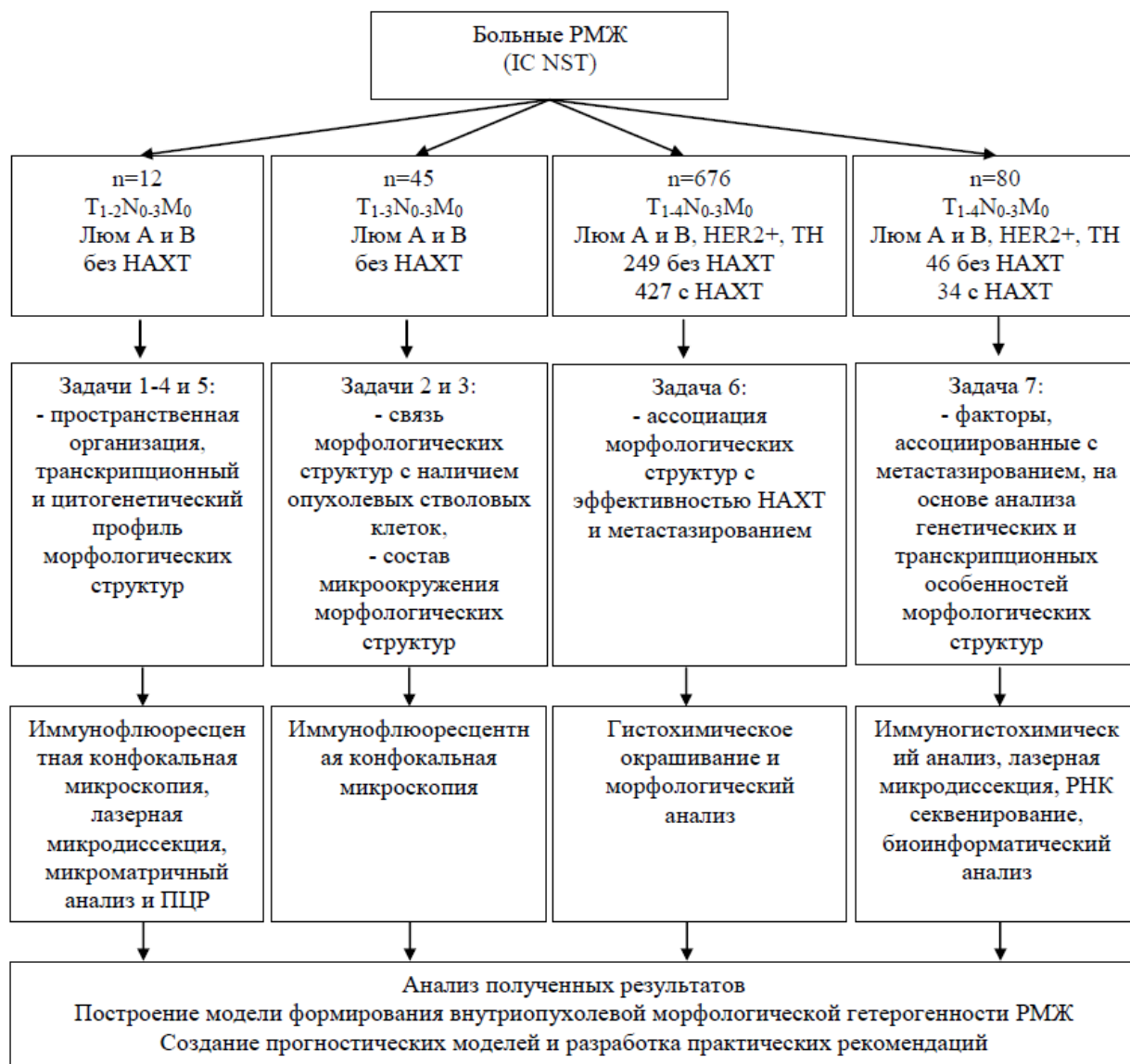


Рисунок 1 – Дизайн исследования

Вторая группа из 45 больных (без НАХТ) использовалась для иммунофлюоресцентного исследования представленности CD44⁺CD24⁻ ОСК в различных типах морфологических структур и популяций макрофагов (CD68⁺RS1⁻ и CD68⁺RS1⁺) и αSMA⁺FAP⁺ фибробластов (αSMA⁺FAP⁺ и αSMA⁻FAP⁺) в их микроокружении. Третья группа из 80 пациенток (46 без НАХТ и 34 с НАХТ) использовалась для иммуногистохимического исследования ассоциации экспрессии (инвазивных) маркеров, выделенных из числа дифференциально-экспрессирующихся генов между солидными/трабекулярными структурами, с одной стороны, и тубулярными и альвеолярными структурами, с другой стороны, с частотой гематогенного метастазирования IC NST. Четвёртая группа из 12 пациенток (без НАХТ) была включена в анализ пространственной организации, молекулярно-

генетическое исследование хромосомных aberrаций и экспрессионного профиля различных морфологических структур с помощью микроматриц, отбор на основе полученных данных маркеров опухолевой инвазии и анализ транскриптома клеток с различным инвазивным фенотипом.

НАХТ проводилась по режимам CMX/CMF (циклофосфан, метотрексат, капецитабин/5-фторурацил), САХ (циклофосфан, доксорубицин, капецитабин), FАС (5-фторурацил, доксорубицин, циклофосфан) и таксотер. Эффективность НАХТ оценивалась по результатам инструментального исследования (УЗИ и маммография) по шкале RECIST. Под наличием объективного ответа на НАХТ подразумевалась полная или частичная регрессия опухоли, под отсутствием – стабилизация или прогрессирование.

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

Работа выполнена на оборудовании Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» Томского НИМЦ и Томского регионального центра коллективного пользования с использованием классических и новых высокопроизводительных методов исследования. Анализ 3D организации различных морфологических структур, наличия и количества CD44⁺CD24⁻ ОСК в них и макрофагов и фибробластов в их микроокружении, а также колокализацию экспрессии белков KIF14, EZR и MIEAP в торпедоподобных структурах проводили с помощью иммуофлюоресцентного окрашивания на лазерном сканирующем микроскопе LSM 780, оценка микрофотографий – с использованием программы ZEN-2012-SP1 (Carl Zeiss, Германия). Различные типы морфологических структур и опухолевые клетки с экспрессией KIF14, EZR и MIEAP в составе торпедоподобных структур выделяли из опухолевой ткани с помощью лазерного микродиссектора PALM (Carl Zeiss, Германия). Сравнительную геномную гибридизацию на основе микрочипов и микроматричное экспрессионное профилирование различных морфологических структур выполняли на сканере SureScan Microarray Scanner (Agilent, США), анализ данных – с помощью программного обеспечения CytoGenomics v. 3.0.2.11 (Agilent, США). Валидацию данных микроматричного экспрессионного анализа проводили с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия). Секвенирование РНК опухолевых клеток, положительных и отрицательных по экспрессии KIF14, EZR и MIEAP, выполняли на платформе NextSeq500 (Illumina, США), анализ данных – с помощью программ STAR v. 2.7.3a [Dobin A., 2013], featureCounts [Liao Y., 2014] и DESeq2 [Love M.I., 2014]. Функциональное аннотирование дифференциально-экспрессирующихся генов как между различными типами морфологических структур, и так и между KIF14, EZR и MIEAP-

положительными и отрицательными опухолевыми клетками проводили с помощью онлайн-инструмента Enrichr [Xie Z., 2021].

Статистический анализ

t-критерий Стьюдента с поправкой на множественные сравнения Бенджамини-Хохберга, интегрированный в расширение Limma [Gentlemen R.C., 2004; Smyth G.K., 2005] среды R, использовался для подсчёта значимости различий в экспрессии генов между различными морфологическими структурами опухолевой ткани и нормальными протоками молочной железы.

Статистическая значимость различий в уровне экспрессии генов (РНК-секвенирование) между KIF14⁺ и KIF14⁻, MIEAP⁺ и MIEAP⁻, EZR⁺ и EZR⁻ клетками торпедоподобных структур опухолей молочной железы оценивалась с помощью теста Вальда с учетом поправки Бенджамини-Хохберга на множественные сравнения, интегрированного в программный пакет DESeq2 [Love M.I., 2014] среды R.

Различия в количестве генов эпителиального и мезенхимального фенотипа между разными морфологическими структурами оценивали с помощью теста ANOVA. Корреляция данных микроматричного экспрессионного профилирования и результатов количественной ПЦР выполнялась с использованием линейной регрессии и коэффициента детерминации (r^2). Ассоциацию хромосомных aberrаций с различными типами морфологических структур оценивали с помощью иерархического кластерного анализа и подсчёта евклидового расстояния. Различия в количестве CD44⁺CD24⁻ ОСК между разными морфологическими структурами оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Различия в частоте обнаружения макрофагов и фибробластов вблизи разных морфологических структур подсчитывали с помощью точного критерия Фишера, тогда как анализ различий в количестве данных клеток между микроокружениями структур проводили с использованием тест Фридмана и Вилкоксона для зависимых выборок. Зависимость частоты метастазирования РМЖ и вероятности ответа на НАХТ от наличия в опухоли тех или иных типов структур оценивали с помощью критериев χ^2 и Фишера. Показатели безметастатической выживаемости больных РМЖ с присутствием в опухоли морфологических структур и экспрессией белков KIF14, MIEAP и EZR анализировали с помощью метода Каплан-Майера и логрангового критерия (log-rank test). Модель пропорциональных рисков Кокса (Cox proportional hazard model) использовалась для оценки ассоциации безметастатической выживаемости больных РМЖ с наличием морфологических структур и экспрессией белков KIF14, MIEAP и EZR. Ассоциация представляли как отношение рисков (HR) с 95% доверительным интервалом и значением (log-rank test). Статистический анализ выполнялся в программе STATISTICA 8.0 (Statsoft, Inc., США). Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Также обсуждались различия на уровне тенденции ($p < 0,1$).

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Пространственная организация морфологических структур РМЖ

Использование иммунофлюоресцентного окрашивания, конфокальной микроскопии и 3D моделирования подтвердило ранее высказанные предположения о форме различных морфологических структур. Тубулярные структуры представляют собой формирования по типу “трубок” или “колец”, состоящие из одного слоя опухолевых клеток (Рисунок 2А). Альвеолярные структуры имеют округлую (сфероидальную) форму и содержат до 30 опухолевых клеток (Рисунок 2Б). Солидные структуры представляют группы различного размера и форм, состоящие из десятков и сотен опухолевых клеток (Рисунок 2В). Трабекулярные структуры сформированы 1-2 рядами опухолевых клеток (Рисунок 2Г). Дискретные группы опухолевых клеток включают в себя как единичные (одионочные) опухолевые клетки, так и скопления из 2-5 клеток с ярко выраженной эпителиальной морфологией (формой; Рисунок 2Д, Е).

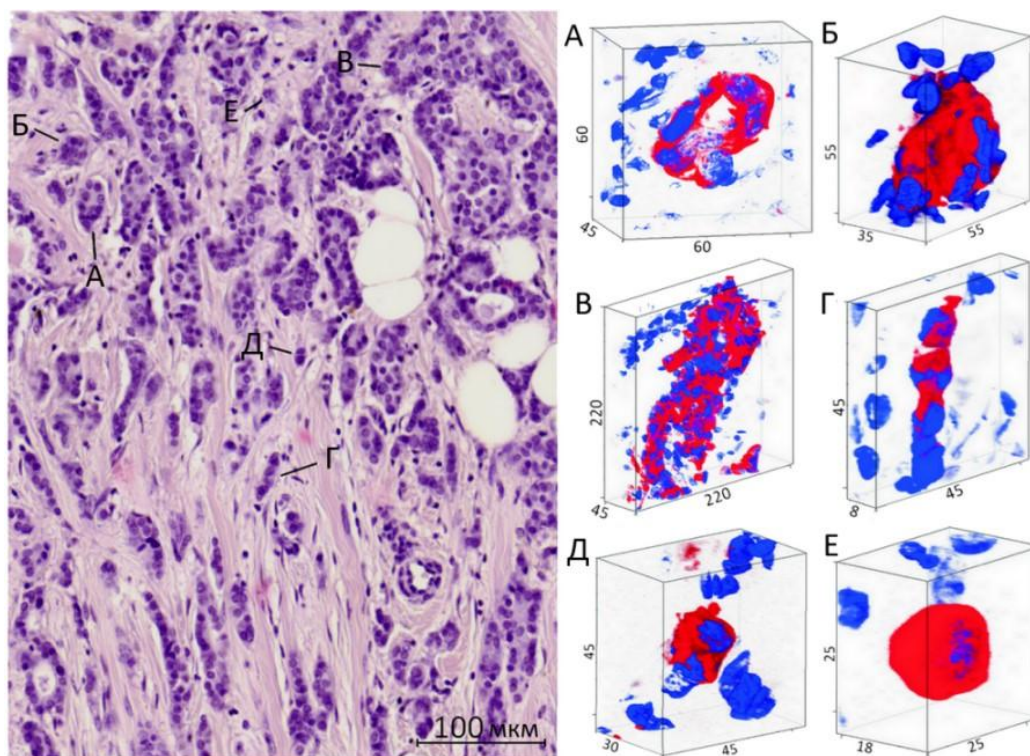


Рисунок 2 – Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность РМЖ (слева) и 3D визуализация пространственной организации различных морфологических структур (справа). А, тубулярная структура; Б, альвеолярная структура; В, солидная структура; Г, трабекулярная структура; Д, Е, дискретные группы опухолевых клеток. Гистохимическая (гематоксилин и эозин; слева) и иммунофлюоресцентная (красный цвет – цитокератин 7 (эпителиальный маркер), синий – краситель DAPI; справа) окраски. Цифрами на правой части рисунка указаны длины в мкм.

Представленность $CD44^+CD24^-$ опухолевых стволовых клеток в морфологических структурах РМЖ

$CD44^+CD24^-$ клетки характеризуются высокой туморогенностью и рассматриваются как один из типов ОСК при РМЖ (Al-Hajj M., 2003).

Частота и количество $CD44^+CD24^-$ ОСК были оценены в различных морфологических структурах РМЖ (Рисунок 3А). Данные клетки чаще всего обнаруживались в солидных (96,4%) и альвеолярных (91,6%) структурах по сравнению с трабекулярными, тубулярными и дискретными группами (75,0%, 57,9% и 33,3%, соответственно). Количество $CD44^+CD24^-$ ОСК было выше в солидных (0,11 (0,09-0,14)) и альвеолярных (0,13 (0,11-0,15)) структурах, в дискретных группах данные клетки практически отсутствовали (0,004 (0,002-0,007; $p < 0,05$; Рисунок 3Б).

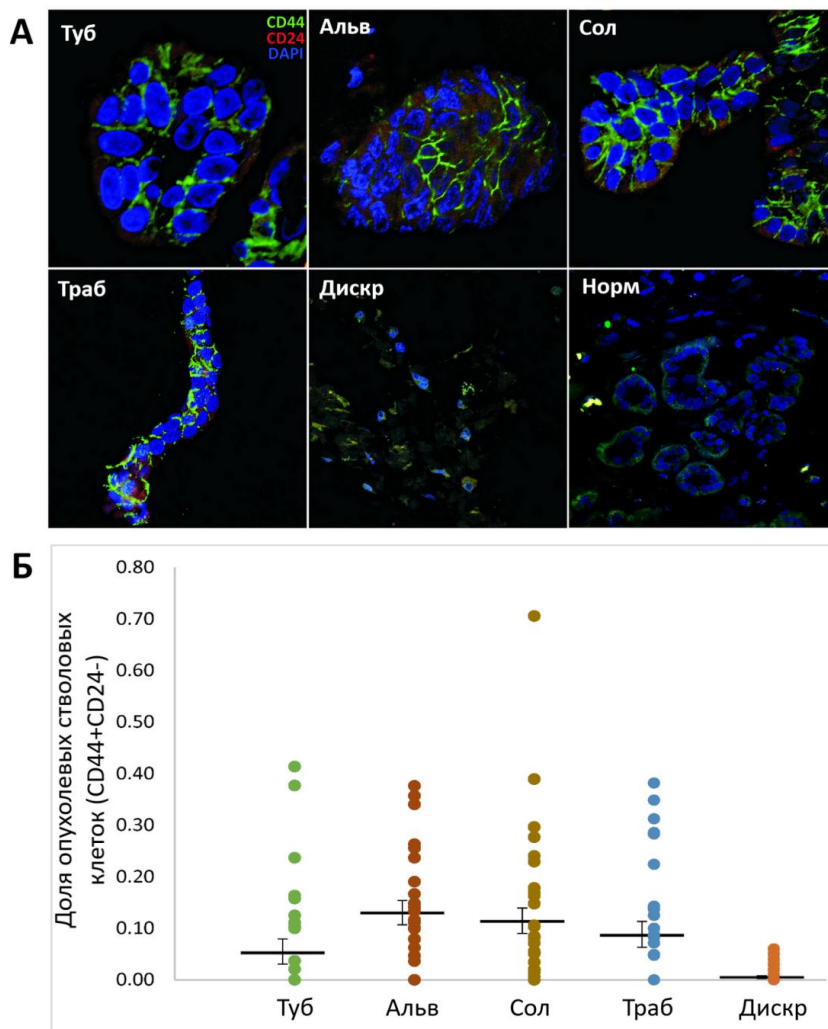


Рисунок 3 – Наличие (А) и доля $CD44^+CD24^-$ ОСК (Б) в различных морфологических структурах РМЖ. Статистически значимые различия: тубулярные против альвеолярных, солидных и дискретных ($0,0006 < p < 0,03$; t-критерий Стьюдента), альвеолярные против тубулярных и дискретных ($p = 0,0006$ и $0,00000005$, соответственно), солидные против тубулярных и дискретных ($p = 0,03$ и $0,00000001$, соответственно), трабекулярные против дискретных ($p = 0,00003$) и дискретные против всех остальных структур ($0,00000005 < p < 0,02$). Нормальные (норм) протоки молочной железы с отсутствием $CD44^+CD24^-$ клеток использовались как негативный контроль.

Цитогенетический профиль морфологических структур РМЖ

Для определения связи ВОМГ при РМЖ с хромосомными нарушениями было проведено цитогенетическое профилирование различных

морфологических структур (Рисунок 4) с использованием микроматричной сравнительной геномной гибридизации (aCGH).

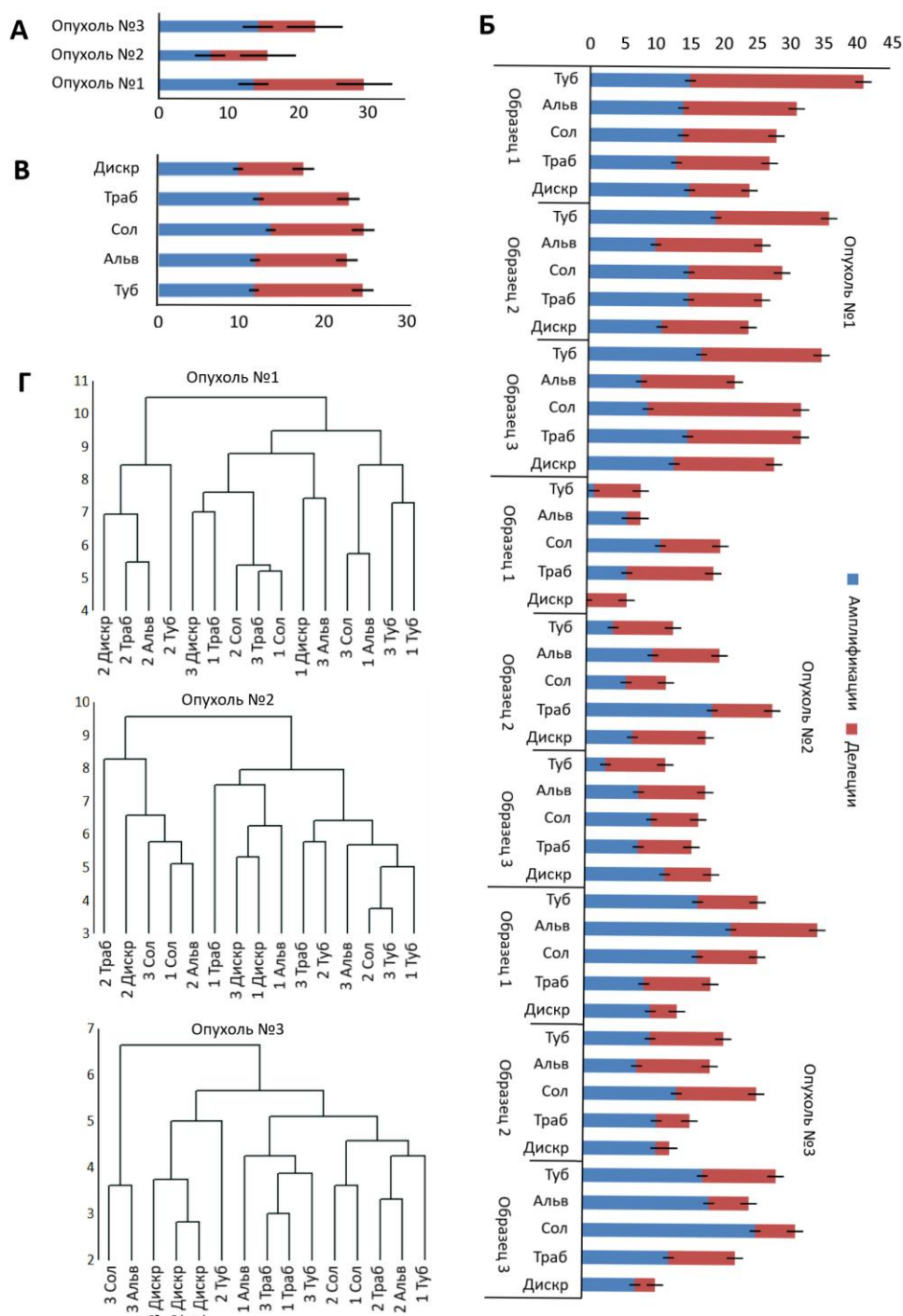


Рисунок 4 – Ассоциация ВОМГ РМЖ с хромосомными aberrациями. А, Количество хромосомных aberrаций в изученных опухолях молочной железы. Б, Количество хромосомных aberrаций в различных морфологических структурах трёх разных образцов (1-3) каждой опухоли молочной железы (1-3). В, Среднее количество хромосомных нарушений в различных морфологических структурах. Г, Кластерный анализ схожести различных морфологических структур друг с другом по общим хромосомным aberrациям.

Количество хромосомных нарушений варьировало от опухоли к опухоли (Рисунок 4А). Количество хромосомных aberrаций в различных

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

Не было обнаружено сходства морфологических структур одного типа в хромосомных нарушениях: кластеризация структур по принципу наличия одинаковых aberrаций носила хаотичный характер (Рисунок 4Г). Исключение составили дискретные группы опухолевых клеток одной опухоли молочной железы, которые были схожи друг с другом и несли одну и ту же дупликацию хромосомного региона 11p13, содержащую ген *PAX6*. По данным литературы, гиперэкспрессия *PAX6* вовлечена в пролиферацию опухолевых клеток и прогрессию РМЖ [Urrutia G., 2018; Jin M., 2020].

Транскрипционный профиль морфологических структур РМЖ

Микроматричный экспрессионный анализ показал сходство морфологических структур одного и того же типа, полученных из трёх разных опухолей молочной железы, друг с другом. Тубулярные структуры были более близки по профилю экспрессии к альвеолярным структурам, чем к другим морфологическим объединениям опухолевых клеток. Дискретные группы опухолевых клеток значительно отличались от остальных структур. В частности, различия в экспрессии транскриптов возрастали в ряду: тубулярные = альвеолярные, солидные, трабекулярные и дискретные группы опухолевых клеток (Рисунок 5А, Б).

Различное количество гипо- и гиперэкспрессирующихся генов обнаружено в морфологических структурах по сравнению с нормальным эпителием молочной железы (Рисунок 5В, Г). Среди транскриптов, гиперэкспрессирующихся во всех типах морфологических структур (p (FDR) $< 0,05$), были гены, кодирующие молекулы внеклеточного матрикса (*COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1* и др.) и фибронектин (*FN1* и *THC2507047*). Практически во всех типах структур были гиперэкспрессированы гены *HMGB3*, *S100A7* и *SFRP4*, являющиеся регуляторами дифференцировки, клеточного цикла, пролиферации и стволовости [Pawar N.M., 2018; Wen B., 2021; D'Amico F., 2022]. Специфические транскрипты, которые не экспрессировались в других структурах, были обнаружены только в трабекулярных (PKDREJ) и дискретных группах опухолевых клеток (MAMDC2, ADAMTS12, KIF1B и др.).

Биологические процессы и сигнальные пути, выраженные в морфологических структурах РМЖ

Функциональное аннотирование транскриптов, гипер- и гипоекспрессирующихся в каждом типе морфологических структур по отношению к нормальному эпителию ($|\log\text{-fold-change}| \geq \log 21,5$ и $p < 0,05$),

не показало наличие канонических сигнальных путей, специфических для разных морфологических структур (таблица 1).

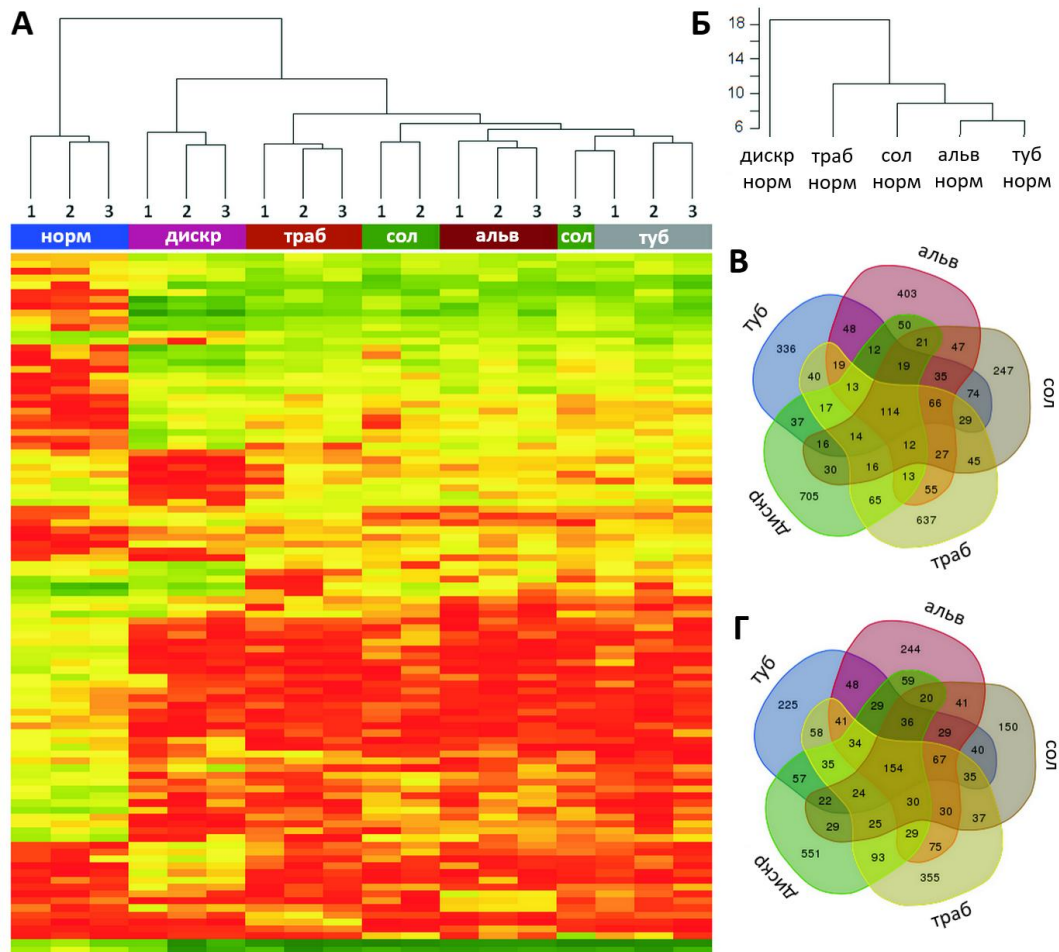


Рисунок 5 – Транскрипционный профиль различных морфологических структур РМЖ. А, Тепловая карта топ 100 дисрегулируемых транскриптов в морфологических структурах и нормальном эпителии молочной железы и иерархический кластерный анализ. 1-3 – случаи РМЖ. Б, Иерархический кластерный анализ морфологических структур на основании экспрессии всех транскриптов, нормализованных относительно неизмененного эпителия молочной железы. Ось Y показывает расстояние между кластерами. В, Г, количество специфических и общих транскриптов, гипер- и гипоекспрессирующихся в морфологических структурах, соответственно ($p < 0,05$).

Обнаруженные сигнальные пути были характерны либо для всех, либо только для части типов структур, но с разной статистической значимостью и количеством гипер/гипоекспрессирующихся генов. В альвеолярных структурах обнаружена гипорегуляция ErbB-опосредованного сигнального пути и сигналингов, вовлеченных в ЭМП и ремоделирование актинового цитоскелета. Для солидных структур характерна гиперрегуляция репарации ДНК на этапе сверточной точки G2/M клеточного цикла и гипорегуляция сигнального пути через p21-ассоциированные киназы (PAK). В трабекулярных структурах выявлена гипорегуляция сигналинга через рецептор к иммуноглобулину E (FcεRI) и сигналинга, активируемого тромбоцитарным фактором роста (PDGF). Для дискретных групп опухолевых

клеток характерна гиперрегуляция сигнального пути, вовлеченного в фиброз печени/активацию звездчатых клеток и гипорегуляция сигналинга острого миелобластного лейкоза. Только в трабекулярных структурах и дискретных группах опухолевых клеток не обнаружен сигнальный путь репарации ДНК на этапе G2/M клеточного цикла (таблица 1).

Таблица 1 – ТОП 5 канонических сигнальных путей, выраженных в различных морфологических структурах РМЖ по сравнению с нормальным эпителием молочной железы

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

FcεRI сигналинг	4,6	0,194	13,0	6,5	туб
Сигналинг острой фазы	4,2	0,16	8,3	7,7	все стр-ры
PDGF сигналинг	4,0	0,208	15,6	5,2	туб, альв
Сигналинг острого миелобластного лейкоза	3,9	0,203	13,9	6,3	все стр-ры
Дискретные группы опухолевых клеток					
Фиброз печени / Активация звездчатых клеток печени	7,2	0,202	3,8	16,4	все стр-ры
Сигналинг острого миелобластного лейкоза	5,8	0,253	17,7	7,6	все стр-ры
Онкостатин М сигнальный путь	3,1	0,265	11,8	14,7	траб
Сигналинг рака мочевого пузыря	3,0	0,184	9,2	9,2	сол
Паксиллин сигнальный путь	2,7	0,168	6,9	9,9	туб, сол, траб
Примечание: Гипо – гипозэкспрессирующиеся гены; Гипер – гиперэкспрессирующиеся гены; Соотношение – доля генов, вовлечённых в сигнальный путь; Log10p – логарифмированное значение уровня статистической значимости.					

Особенности микроокружения морфологических структур РМЖ

Различные типы морфологических структур отличались друг от друга клеточным составом микроокружения, в частности наличием и количеством популяций макрофагов (CD68⁺RS1⁻ и CD68⁺RS1⁺) и αSMA⁺FAP⁺ фибробластов (αSMA⁺FAP⁺ и αSMA⁻FAP⁺). Кроме того, экспрессия генов, ответственных за рекрутирование моноцитов и функциональное состояние макрофагов и фибробластов, была индивидуальной для каждого типа структур. Так, CD68⁺RS1⁻ макрофаги (противоопухолевый M1 фенотип) и фибробласты с фенотипом αSMA⁺FAP⁺ преобладали в микроокружении солидных структур по сравнению с другими морфологическими вариантами опухолевых клеток (0,71 против 0,30-0,66; p<0,05) и тубулярными и дискретными группами (1,80 против 0,45 и 0,40; p<0,05), соответственно (таблица 2). Макрофаги другого типа, CD68⁺RS1⁺ (проопухолевый M2 фенотип), превалировали в микроокружении солидных структур и дискретных групп по сравнению с другими структурами (0,45 и 0,44 против 0-0,25; p<0,05; таблица 2).

Только для дискретных групп была характерна одновременная гиперэкспрессия гена *CCL2* (logFC 3,54; p<0,05 в сравнении с нормальным эпителием молочной железы), вовлеченного в рекрутирование моноцитов, и гена *TGFb2* (logFC 3,28; p<0,05 в сравнении с нормальным эпителием молочной железы), продукт которого является одним из триггеров поляризации макрофагов в M2 фенотип и дифференцировки нормальных фибробластов в CAFs. Статистически значимая гиперэкспрессия *TGFb2* (logFC 3,23) также обнаружена в трабекулярных структурах, однако экспрессия гена *CCL2* была в 3 раза ниже (logFC -3,35; p<0,05) по сравнению с нормальным эпителием молочной железы.

Ген *BSG*, вовлеченный в формирование ангиогенного фенотипа в макрофагах, значимо выше экспрессировался в тубулярных структурах

(logFC 2,15; $p < 0,05$). Экспрессия генов *FGF2* и *PDGFA*, вовлечённых в стимуляцию дифференцировки нормальных фибробластов в CAFs и их пролиферацию, была ниже во всех типах структур по сравнению с неизменённым эпителием молочной железы ($p < 0,05$ и $0,001 < p < 0,1$).

Таблица 2 – Количество макрофагов и фибробластов в микроокружении различных морфологических структур РМЖ

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

Экспрессия генов эпителиального и мезенхимального фенотипов в морфологических структурах РМЖ

Различные типы морфологических структур характеризовались индивидуальным профилем экспрессии генов эпителиального и мезенхимального фенотипов и выраженностью сигнальных путей, вовлечённых в клеточную миграцию и инвазию (таблица 3, Рисунок 6).

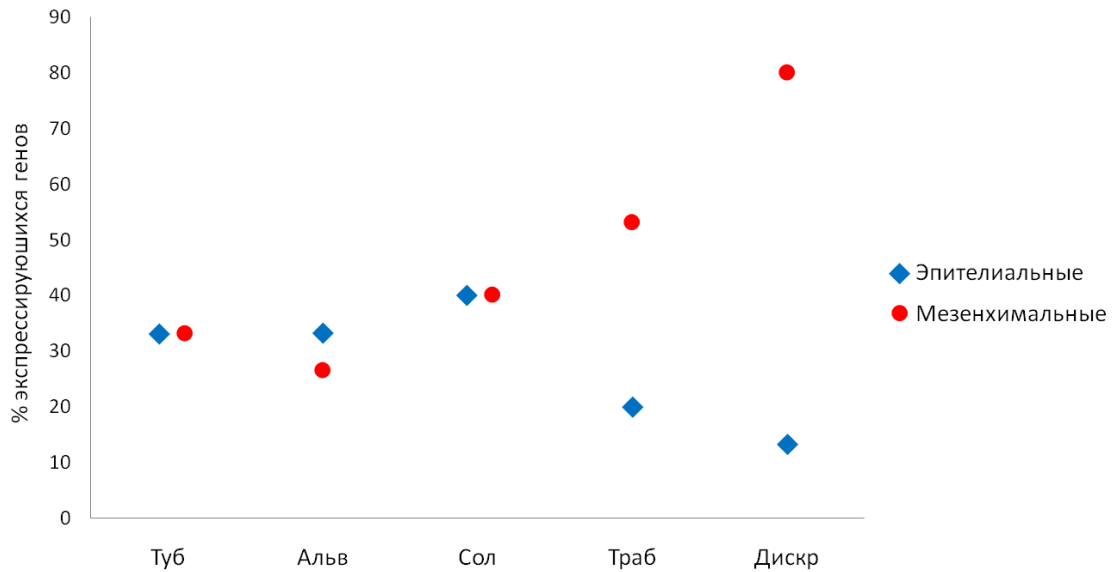


Рисунок 6 – Доля генов эпителиального и мезенхимального фенотипа в разных морфологических структурах РМЖ. Эпителиальные гены: *CDH1, CD24, CTNNA3, CLDN3, EPCAM, IL1B, JUP, KRT5, LCN2, OCLN, S100A8, SLPI, TJP1, TNFSF10, TP63*. Мезенхимальные гены: *ABCA6, DAB2, DCN, DOCK10, IL1R1, ITGA11, LPAR1, MMP14, PCOLCE, PDGFRA, PPAP2B, VASN, VIM, WNT5A, ZEB2*

Таблица 3 – Сигнальные пути инвазии, выраженные в различных морфологических структурах РМЖ

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

Примечание: Интенсивность красного цвета пропорциональна величине статистической значимости ($-\log_{10}(p)$).

Процент гиперэкспрессирующихся генов эпителиального фенотипа уменьшался в ряду: солидные, тубулярные = альвеолярные, трабекулярные, дискретные группы. Доля мезенхимальных генов возрастала в трабекулярных и дискретных группах. Наибольшая мезенхимальность была характерна для дискретных групп (80,0% (12/15)) по сравнению с другими структурами (26,6% (4/15) – 53,3% (8/15), $p=0,007$). Дискретные группы также характеризовались самой низкой долей эпителиальных генов (13,3% (2/15)); однако различия с другими структурами не были статистически значимыми.

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

Частота лимфогенного и гематогенного метастазирования у больных РМЖ в зависимости от ВОМГ

Индивидуальный профиль признаков $CD44^+CD24^-$ стволовости, экспрессии генов мезенхимального фенотипа и различная выраженность сигнальных путей миграции и инвазии, вероятно, обуславливают дифференциальный вклад различных морфологических структур в риск лимфогенного и гематогенного метастазирования (Рисунок 7).

При этом ассоциация ВОМГ с метастазированием зависит от наличия НАХТ. У больных, как без НАХТ, так и с ней, частота лимфогенных метастазов выше при наличии в альвеолярных (47,8% и 64,2%) и трабекулярных структур (43,0% и 57,7%) по сравнению со случаями без данных морфологических вариантов: 23,2% ($p=0,0004$) и 30,0% ($p=0,0012$) и 33,0% ($p<0,0001$) и 36,8% ($p<0,0001$), соответственно (Рисунок 7А, Б). Однако у больных с НАХТ лимфогенные метастазы также чаще наблюдаются при наличии дискретных структур, чем при их отсутствии (59,3% против 41,4%, $p=0,0002$; Рисунок 7Б). У пациентов, получавших НАХТ, наличие альвеолярных и трабекулярных структур также ассоциировано с высокой частотой гематогенного метастазирования (42,8% против 27,3%, $p=0,0036$; 41,9% против 20,7%, $p=0,0005$; Рисунок 7Б) и низкими показателями безметастатической выживаемости: HR (95% CI) 1,97 (1,21-3,22), $p=0,007$ и HR (95% CI) 2,27 (1,21-4,28), $p=0,012$, соответственно (Рисунок 8). Интересно, что ассоциация альвеолярных структур с гематогенным метастазированием наблюдалась только у пациенток с отсутствием ответа на НАХТ (58,5% против 28,6%, $p=0,001$; патент RU 2623150), тогда как трабекулярные структуры были связаны с метастатическим процессом у больных, чувствительных к химиотерапии (34,3% против 9,3%, $p=0,002$; Рисунок 9; патент RU 2627649).

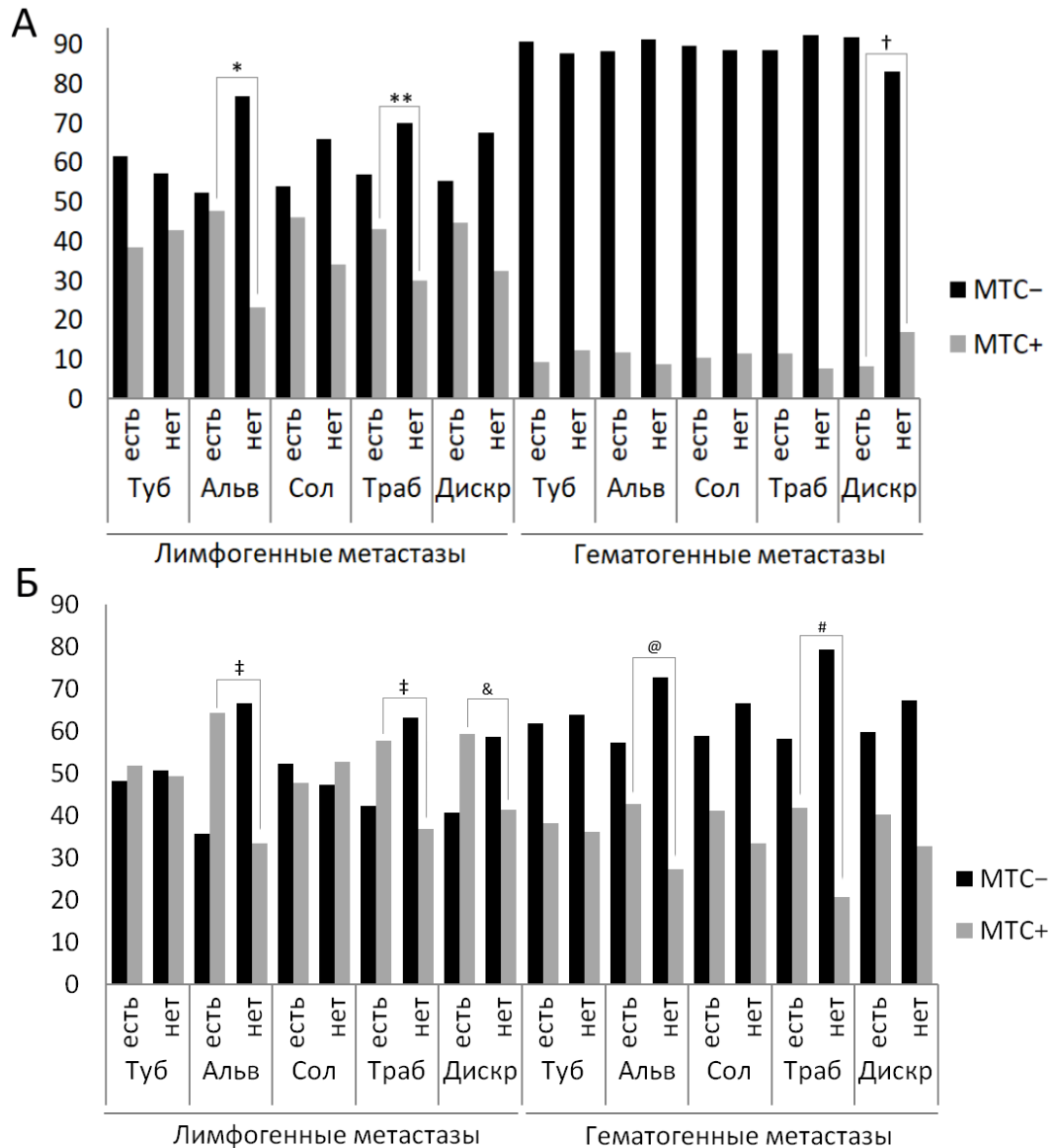


Рисунок 7 – Частота лимфогенного и гематогенного метастазирования у больных РМЖ с наличием различных морфологических структур. А, пациенты без НАХТ; Б, пациенты с НАХТ. * – $p=0,0004$; ** – $p=0,0012$; † – $p=0,043$; ‡ – $p<0,0001$; & – $p=0,0002$; @ – $p=0,0036$; # – $p=0,0005$.

Экспрессия генов химиорезистентности в морфологических структурах РМЖ

Различные морфологические структуры характеризуются индивидуальным профилем экспрессии генов химиорезистентности. Наибольшее число (70,4% (19/27)) генов химиорезистентности экспрессировалось в альвеолярных структурах, из них экспрессия 17 генов была повышена по сравнению с нормальным эпителием молочной железы ($p<0,05$; Рисунок 10). Однако, различия в количестве экспрессирующихся генов были статистически значимыми только в сравнении альвеолярных структур с тубулярными и дискретными группами (37,0% (10/27); $p=0,014$).

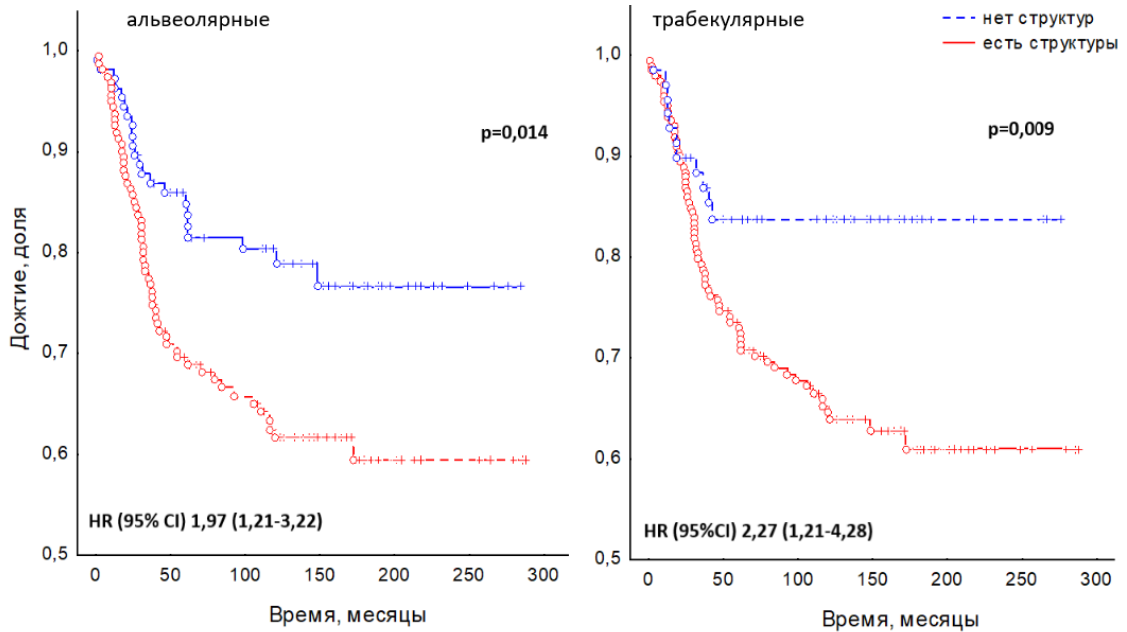


Рисунок 8 – Показатели безметастатической выживаемости больных РМЖ, получавших НАХТ, в зависимости от наличия альвеолярных и трабекулярных структур.

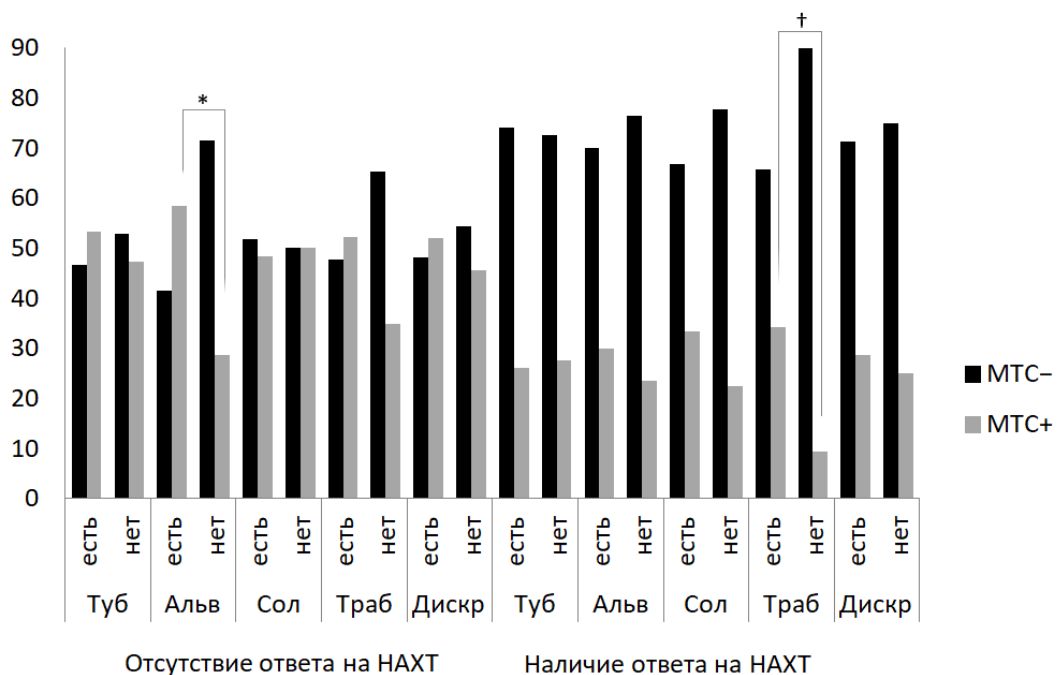


Рисунок 9 – Частота гематогенного метастазирования у больных РМЖ с различной эффективностью НАХТ; * – $p=0,001$; † – $p=0,002$.

Гены *ABCC1*, *ABCG1*, *ABCC11* и *ABCA12* гиперэкспрессировались только в альвеолярных структурах. Данные ABC-транспортёры обеспечивают устойчивость к широкому ряду химиопрепаратов. Биологические процессы “лекарственная устойчивость клеток (от англ. drug resistance of cells)” и “химиорезистентность опухолевых клеточных линий (от англ. chemotherapy resistance of carcinoma cell lines)”, определённые на основе функционального аннотирования дифференциально-экспрессирующихся

генов, статистически значимо выражены только в альвеолярных структурах ($-\log_{10}(p) = 3,16$ и $3,33$).

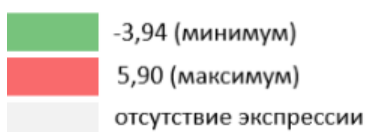
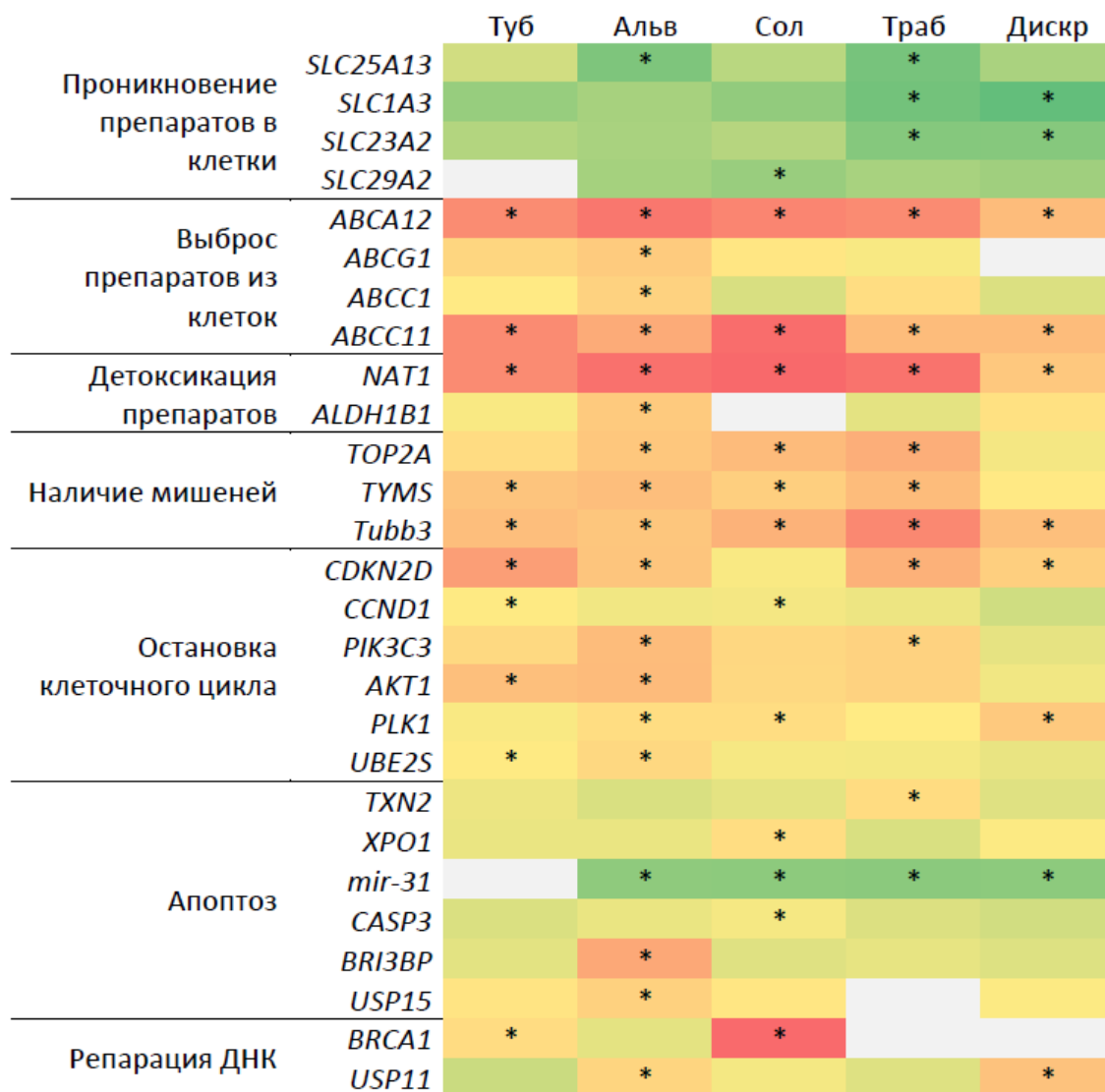


Рисунок 10 – Тепловая карта экспрессии генов лекарственной резистентности в морфологических структурах РМЖ. Туб – тубулярные; Альв – альвеолярные; Сол – солидные; Траб – трабекулярные; Дискр – дискретные. Цвет ячеек пропорционален уровню экспрессии генов: от зелёного (низкий уровень) до красного (высокий уровень).

Для остальных структур было характерно практически одинаковое количество экспрессирующихся генов химиорезистентности. Так, 13/27 (48,1%) генов значимо гипо- и гиперэкспрессировались в солидных и трабекулярных структурах и 10/27 (37,0%) генов – в тубулярных структурах и дискретных группах опухолевых клеток по сравнению с нормальным эпителием молочной железы ($p < 0,05$). Однако, в отличие от других структур,

трабекулярные варианты опухолевых клеток демонстрировали гипоекспрессию трёх из четырёх генов SLC-транспортеров: *SLC25A13*, *SLC23A2* и *SLC1A3*, что может обуславливать устойчивость к камптотецину, 5-фторурацилу и препаратам платины. Экспрессия генов, кодирующих ключевые факторы химиорезистентности, такие как ABCB1, ABCB4, ABCB5, ABCC3, ABCC5 и ABCG2, не была статистически значимой по сравнению с нормальным эпителием молочной железы.

Морфологическое строение химиорезистентных опухолей молочной железы

Индивидуальный транскрипционный профиль химиорезистентности, вероятно, обуславливает дифференциальный вклад различных морфологических структур в эффективность НАХТ. Ассоциация морфологических структур с результативностью химиотерапии может быть также связана с их различиями в количестве CD44⁺CD24⁻ ОСК и экспрессии генов мезенхимального и инвазивного фенотипа.

Альвеолярные структуры, для которых характерно наибольшее количество CD44⁺CD24⁻ ОСК и генов химиорезистентности, и трабекулярные структуры с транскрипционными характеристиками мезенхимальности и низкой активностью транспортеров, обеспечивающих поступление лекарственных средств в клетки, чаще обнаруживались в операционном материале пациенток с низкой эффективностью НАХТ, чем у больных с ответом на химиотерапию (59,6% против 46,1%, $p=0,012$; 71,5% против 53,9%, $p=0,001$, соответственно; Рисунок 11).

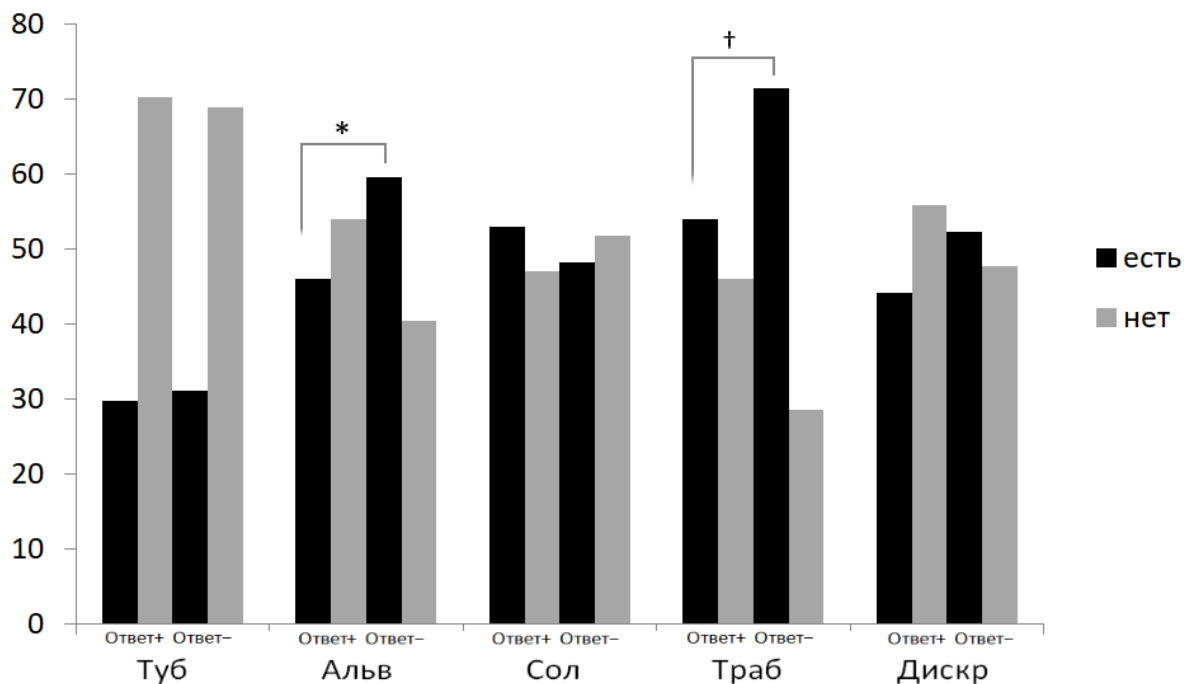


Рисунок 11 – Частота встречаемости различных морфологических структур в опухолевой ткани больных РМЖ с наличием и отсутствием ответа на НАХТ. Ответ+ – частичная регрессия. Ответ- – стабилизация и прогрессирование заболевания. Есть – наличие структур. Нет – отсутствие структур. * – $p=0,012$; † – $p=0,001$.

Частота встречаемости различных морфологических структур у больных РМЖ с наличием и отсутствием ответа на НАХТ зависела от состояния репродуктивной функции (Рисунок 12).

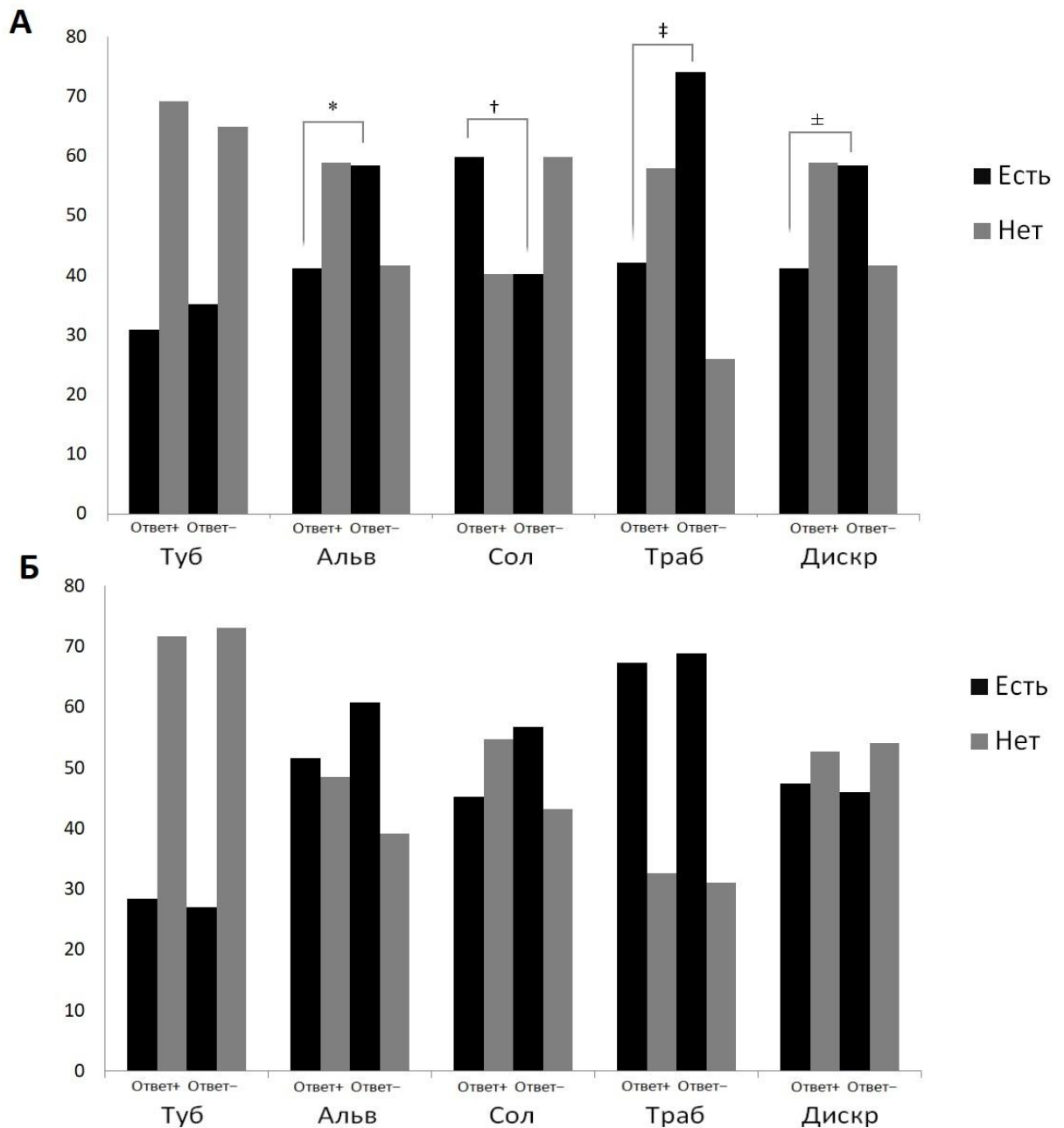


Рисунок 12 – Частота встречаемости различных морфологических структур в опухолевой ткани больных РМЖ с наличием и отсутствием ответа на НАХТ в зависимости от состояния менструальной функции. А, пациенты с сохраненной менструальной функцией; Б, пациенты в состоянии менопаузы. Ответ+ – частичная регрессия. Ответ– – стабилизация и прогрессирование заболевания. Есть – наличие структур. Нет – отсутствие структур. * – $p=0,020$; † – $p=0,009$; ‡ – $p<0,0001$; ± – $p=0,020$.

Альвеолярные, трабекулярные структуры и дискретные группы опухолевых клеток встречались чаще при отсутствии ответа на НАХТ, чем при его наличии, только у пременопаузальных пациенток: 58,4% против 41,1%, $p=0,020$; 74,0% против 42,1%, $p<0,0001$; 58,4% против 41,1%, $p=0,020$,

соответственно (Рисунок 12А). Напротив, частота солидных структур была значимо выше при наличии объективного ответа на НАХТ у пациенток с сохраненной менструальной функцией (59,8% против 40,3%, $p=0,009$; Рисунок 12А).

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

Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность как модель для идентификации маркёров метастазирования РМЖ

Полученные данные указывают на возможность использования внутриопухолевой морфологической гетерогенности IC NST как модели для изучения механизмов инвазии опухолевых клеток и идентификации маркёров метастазирования, а также мишеней для разработки терапии, направленной на подавление вероятности прогрессирования РМЖ. В данном исследовании в качестве объекта интереса были выбраны солидные и трабекулярные структуры, для которых показана значимая выраженность сигнальных путей клеточной миграции и инвазии. Дискретные группы опухолевых клеток были исключены из данного анализа ввиду их высокой гетерогенности. С помощью сравнения экспрессионного профиля солидных и трабекулярных структур с другими морфологическими вариантами опухолевых клеток выбраны гены, связанные по данным литературы с механизмами клеточной подвижности: ЭМП, ремоделирование цитоскелета, изменение клеточной адгезии и продукция матриксных протеаз, и с гетерогенной экспрессией на белковом уровне в пределах солидных и/или трабекулярных структур согласно базе данных The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>). Итого, 8 генов – *HAX1*, *PIP5K1B*, *WASF2*, *EZR*, *KIF14*, *ZMIZ1*, *DSC3* и *SPATA18* – было выбрано. Только три из них (*KIF14*, *EZR*, *SPATA18*) оказались связанными с частотой гематогенного метастазирования РМЖ. Ассоциация с частотой метастазов РМЖ была справедлива только для случаев, когда экспрессия *KIF14*, *EZR* и *SPATA18* наблюдалась в торпедоподобных структурах инвазивного компонента опухоли. У пациентов с позитивной экспрессией белков *KIF14* и *МIEAP* (кодируется геном *SPATA18*) и негативной экспрессией белка *EZR* на концах торпедоподобных структур чаще наблюдались гематогенные метастазы, чем у больных с отсутствием *KIF14* и *МIEAP* и наличием *EZR* (66,7% против 14,3%, $p=0,005$; 70,0% против 12,5%, $p=0,001$ и 73,7% против 13,3%, $p=0,001$). Безметастатическая выживаемость была хуже у больных РМЖ с экспрессией на концах торпедоподобных структур *KIF14* (HR (95% CI) 6,63 (1,50-29,29), $p=0,013$), *МIEAP* (HR (95% CI) 8,09 (1,83-35,75), $p=0,006$) и потерей *EZR* (HR (95% CI) 7,65 (1,72-33,93), $p=0,007$; Рисунок 13).

Важно, что само по себе наличие торпедоподобных структур не было связано с гематогенным метастазированием РМЖ. Частота отдаленного метастазирования также не была связана с экспрессией KIF14, MIEAP и EZR в других морфологических структурах: тубулярных, альвеолярных, солидных, трабекулярных и дискретных группах опухолевых клеток. Кроме того, экспрессия данных белков не была ассоциирована с молекулярным подтипом РМЖ, размером опухоли, степенью злокачественности, частотой лимфогенного метастазирования и рецидивирования.

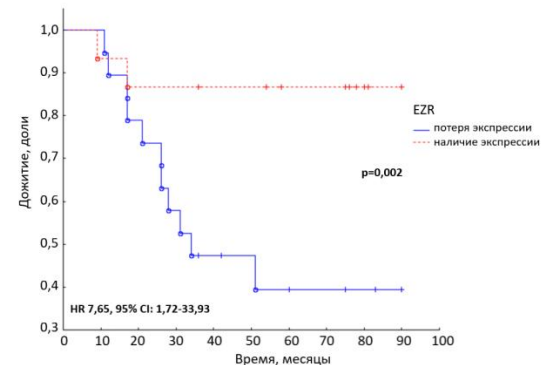
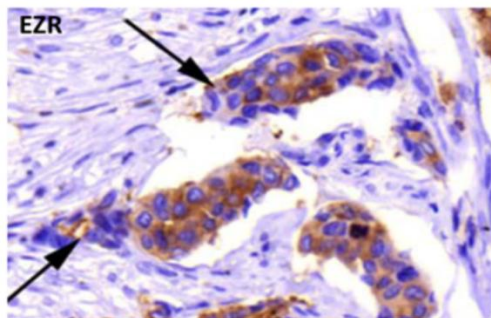
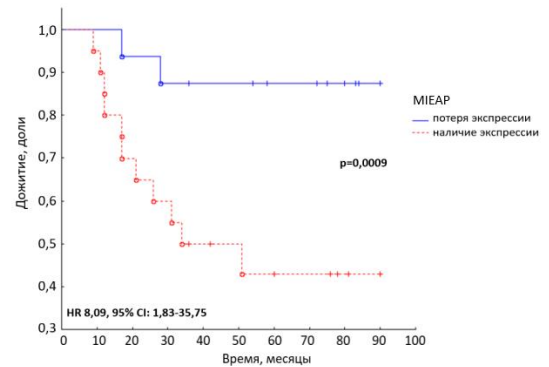
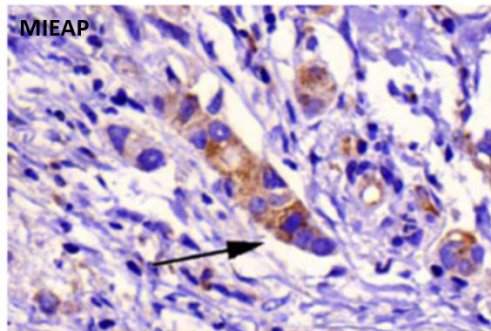
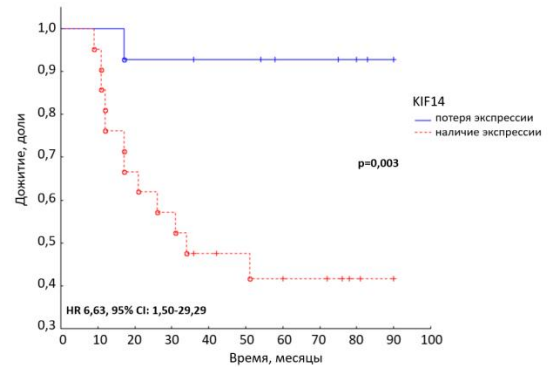
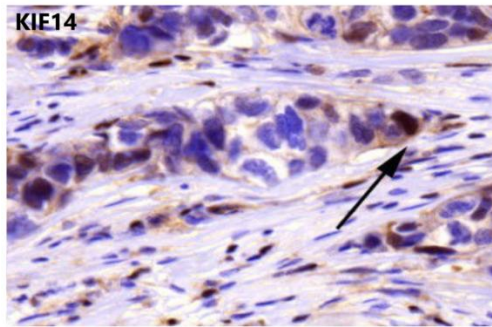


Рисунок 13 – Безметастатическая выживаемость больных РМЖ в зависимости от наличия ядерной экспрессии белка KIF14 и цитоплазматической экспрессии белков MIEAP и потери EZR на концах торпедоподобных структур. Стрелками обозначены концы торпедоподобных структур с наличием KIF14 и MIEAP и потерей EZR. Увеличение 400х.

Торпедоподобные структуры представляют собой образования вытянутой формы, состоящие из двух-трех параллельных рядов опухолевых клеток, и имеют широкое основание и заостренный конец, насчитывающий до трёх клеток (Рисунок 14). По данным настоящего исследования

торпедоподобные структуры встречаются в 54,7% опухолей молочной железы. Происхождение и природа данных структур является предметом дальнейших исследований.

Для понимания природы KIF14- и MIEAP-позитивных клеток и EZR-негативных клеток торпедоподобных структур и исследования механизмов связи с гематогенным метастазированием РМЖ был проведен анализ их транскриптома с помощью РНК-секвенирования. Гиперэкспрессирующиеся гены в KIF14-позитивных клетках ассоциированы с организацией коллагеновых волокон и метаболизмом эфирных липидов. Известно, что эфирные липиды связаны с агрессивностью РМЖ, рака предстательной железы и меланомы [Benjamin D.I., 2013; Hahnefeld L., 2020]. Среди генов с наибольшим уровнем экспрессии обнаружены *NHS* (регулятор ремоделирования актинового цитоскелета и морфологии клеток [Brooks S.P., 2010]), *CNOT2-DT* (длинная некодирующая РНК PRANCR, контролирующая клеточный цикл и пролиферацию [Cai P., 2020]), и *THBS4*, вовлеченный во взаимодействие клеток друг с другом и с внеклеточным матриксом и обладающий проангиогенной активностью [Stenina-Adognravi O., 2019].

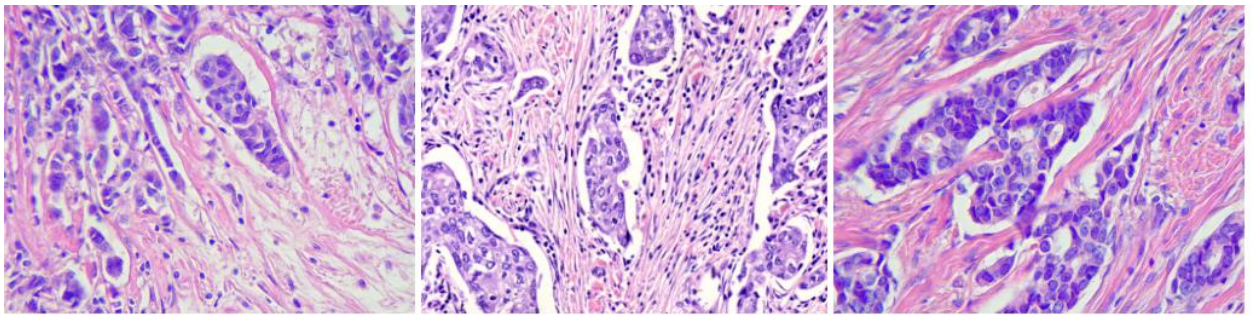


Рисунок 14 – Торпедоподобные структуры опухолевых клеток в инвазивной карциноме молочной железы неспецифического типа. Увеличение 200х.

В MIEAP-позитивных клетках гиперэкспрессирующиеся гены связаны преимущественно с митозом, которая ассоциирована с опухолевым ростом, миграцией, инвазией и метастазированием различных злокачественных новообразований [Vara-Perez M., 2019; Panigrahi D.P., 2020]. Среди генов с наибольшим уровнем экспрессии обнаружены *CCDC18*, функция которого не известна, и *SAMD9*, регулирующий пролиферацию клеток. Для EZR-негативных клеток характерна гиперрегуляция фагоцитоза, хемокин-опосредованного сигнального пути, синтеза и секреции различных гормонов и гиперэкспрессия генов *CD109*, *ID4*, *ST8SIA1* и *NR4A1*. Данные гены вовлечены в поддержание стволовости, промотирование ЭМП, миграции, инвазии и метастазирования опухолевых клеток [Тао J., 2014; Zhou F., 2014; Junankar S., 2015; Hedrick E., 2016; Donzelli S., 2018; Nguyen K., 2018]. Таким образом, по-видимому, экспрессия KIF14 и MIEAP и потеря EZR на концах торпедоподобных структур действительно являются маркерами инвазивного фронта многоклеточных групп опухолевых клеток,

движущихся коллективно. Прометастатическая роль данных белков связана с их вовлеченностью в ключевые механизмы метастатического каскада.

Модель формирования ВОМГ: ассоциация с прогрессией РМЖ и эффективностью химиотерапии

На основании результатов, полученных в настоящем исследовании, и литературных данных была предложена гипотетическая модель формирования ВОМГ при РМЖ (Рисунок 15). Фундаментом для построения данной модели послужили различия морфологических структур в транскрипционном профиле, в частности в количестве экспрессирующихся генов мезенхимального фенотипа, которое увеличивается в ряду: тубулярные = альвеолярные, солидные, трабекулярные структуры и дискретные группы опухолевых клеток.

Первыми, вероятно, появляются тубулярные структуры (Рисунок 15). Это подтверждается высокой дифференцировкой тубулярных структур, в частности, проявляющейся в их схожести с нормальными протоками молочной железы, а также самой низкой пролиферативной активностью по сравнению с другими структурами [Завьялова М.В., 2009].

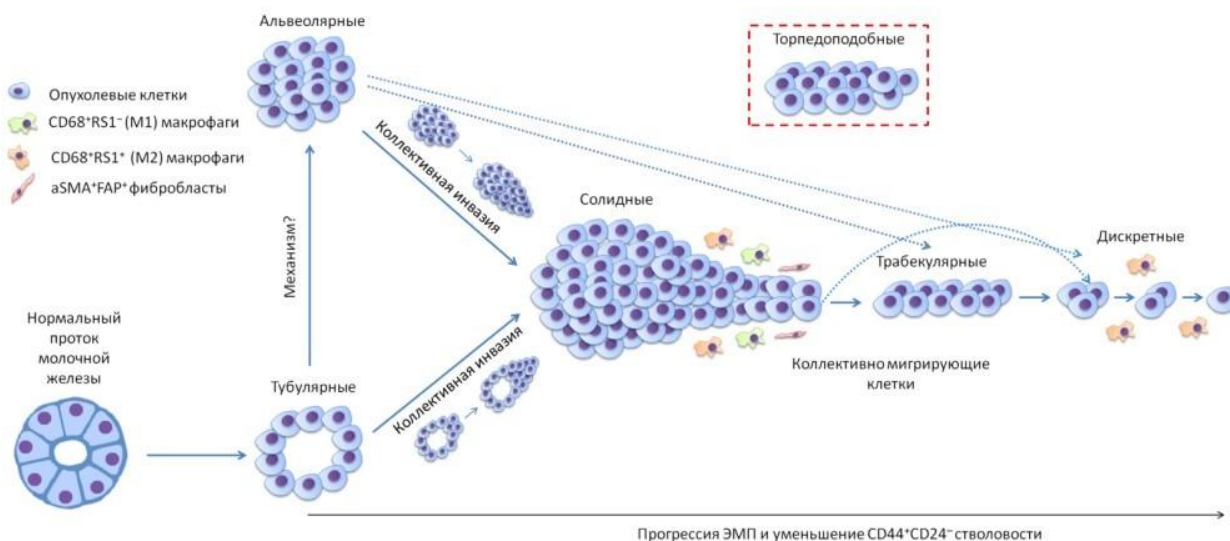


Рисунок 15 – Гипотетическая модель формирования ВОМГ при РМЖ

Альвеолярные структуры максимально схожи в транскрипционном профиле с тубулярными структурами и, вероятно, из них и формируются (Рисунок 15). Механизмом такого морфогенеза может быть базальная экстрюзия опухолевых клеток во внеклеточный матрикс и/или экстрюзия клеток в полость тубулярных структур с последующей их пролиферацией и ростом. Данное предположение основывается на том, что клетки, отделившиеся в ходе экстрюзии от тубулярных структур, не претерпевают значительных изменений, т.е. “сохраняют” первичный экспрессионный профиль, и дают начало альвеолярным структурам. Тем самым, вероятно, объясняется транскрипционная схожесть данных типов структур. Тем не менее, в отличие от тубулярных и других типов структур, для альвеолярных

структур характерно наибольшее количество экспрессирующихся генов химиорезистентности и $CD44^+CD24^-$ ОСК. Вероятно, эти особенности объясняют ассоциацию альвеолярных структур с высокой вероятностью гематогенного метастазирования РМЖ и устойчивостью к НАХТ (Рисунок 16).

Солидные структуры, вероятно, могут образовываться как из тубулярных, так и из альвеолярных структур через усиление ЭМП и формирование фронта коллективнодвигающихся опухолевых клеток (Рисунок 15). Данное предположение подтверждается тем, что в отличие от тубулярных и альвеолярных структур, в солидных структурах отмечается высокая экспрессия гена *VASN*, характерного для клеток-пионеров (от англ. *trailblazers*), прокладывающих путь при инвазивном росте опухоли и демонстрирующих мезенхимальные черты [Westcott J.M., 2015]. Кроме того, в солидных структурах начинает экспрессироваться ген металлопротеиназы MMP14, ранее описанный как один из ключевых факторов опухолевой инвазии [Thomson S., 2011; Castro-Castro A., 2016]. Усиление ЭМП и инвазивного потенциала солидных структур, вероятно, контролируется факторами, секретируемыми опухоль-ассоциированными макрофагами и фибробластами (Рисунок 15). Это подтверждается результатами настоящего исследования, что макрофаги с фенотипом $CD68^+RS1^+$ (M2) и αSMA^+FAP^+ фибробласты чаще встречаются в микроокружении солидных структур, и литературными данными о том, что иммунные и стромальные клетки, инфильтрирующие опухоли, способны активировать ЭМП и стимулировать инвазию опухолевых клеток [Zhang J., 2015; Fiori M.E., 2019]. По мере прогрессии ЭМП и уменьшения межклеточной адгезии инвазивный край солидных структур может отделяться от основной клеточной массы и трансформироваться в трабекулярные структуры (Рисунок 15).

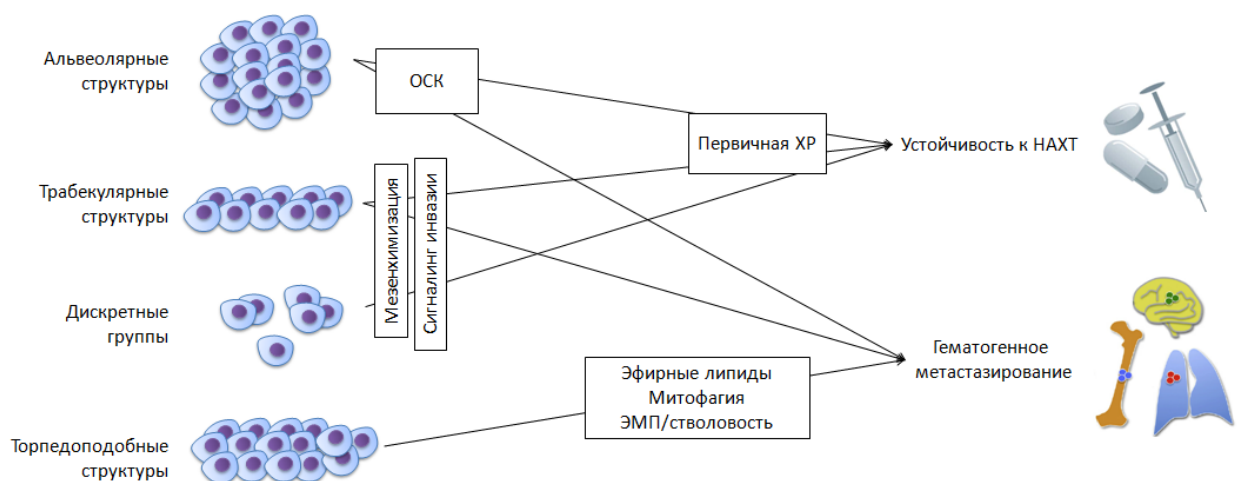


Рисунок 16 – Ассоциация ВОМГ с эффективностью неoadъювантной химиотерапии и гематогенным метастазированием РМЖ. НАХТ – неoadъювантная химиотерапия; ОСК – $CD44^+CD24^-$ опухолевые стволовые клетки; ХР – химиорезистентность; ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход.

Как следствие, трабекулярные структуры характеризуются снижением экспрессии “эпителиальных” генов и повышением количества гиперэкспрессирующихся генов мезенхимального фенотипа. Эти результаты могут объяснять значительную выраженность сигнальных путей опухолевой инвазии в трабекулярных структурах. Высокий уровень мезенхимизации может также являться причиной высокой экспрессии генов химиорезистентности в данных структурах, поскольку известно, что транскрипционные факторы, индуцирующие ЭМП, также активируют ABC транспортеры [van Staalduinen J., 2018]. Всё это, вероятно, является причиной ассоциации трабекулярных структур с высокой вероятностью гематогенного метастазирования РМЖ и низкой эффективностью НАХТ (Рисунок 16).

Прогрессирование ЭМП приводит к разрушению контактов между клетками и образованию небольших групп опухолевых клеток и единичных опухолевых клеток, коллективно именуемых как дискретные группы опухолевых клеток (Рисунок 15). Данный вариант морфологических структур характеризуется наибольшим количеством гиперэкспрессирующихся генов, характерных для мезенхимального фенотипа и кодирующих белки внеклеточного матрикса, и, как следствие, значительной ассоциацией с сигналингами опухолевой инвазии. В микроокружении дискретных групп часто обнаруживаются $CD68^{+}RS1^{+}$ (M2) макрофаги, которые, как в и случае солидных структур, могут оказывать проинвазивный эффект. Напротив, в составе дискретных групп редко обнаруживаются $CD44^{+}CD24^{-}$ ОСК. Вероятно, что прогрессия ЭМП отражается на изменениях в количестве $CD44^{+}CD24^{-}$ ОСК в различных морфологических структурах, поскольку сигнальные пути, лежащие в основе эпителиально-мезенхимальной пластичности и стволовости, во многом пересекаются. Так, стволовый фенотип скорее ассоциирован с одновременным наличием в клетке эпителиальных и мезенхимальных характеристик, чем только мезенхимальных [Grosse-Wilde A., 2015; Sahoo S., 2022]. Для дискретных групп характерна наименьшая среди всех структур экспрессия рецепторов к эстрогенам и прогестерону [Вторушин С.В. 2012] и наибольшая пролиферативная активность, оцененная по маркеру Ki-67 [Завьялова М.В. 2009]. Снижение экспрессии рецепторов к половым гормонам также указывает на более продвинутый ЭМП в дискретных группах [Willipinski-Stapelfeldt B., 2005].

Предложенная модель во многом гипотетическая и не рассматривает другие возможные пути эволюции морфологических структур. Например, не понятно, могут ли трабекулярные структуры образовываться из альвеолярных, а дискретные – напрямую из солидных и альвеолярных структур. Хотя, множественные иерархические связи между различными морфологическими структурами по результатам кластерного анализа данных цитогенетического профилирования (Рисунок 4) демонстрируют возможность трансформации одних структур в другие. Кроме того, ранее было показано, что в опухолях с одним типом структур равновероятно

наличие любого морфологического варианта, тогда как в случаях с двумя типами структур в качестве вторых присутствуют трабекулярные структуры [Zavyalova M. V., 2013]. Т.е., это, вероятно, говорит о том, что трабекулярные структуры могут формироваться из любого морфологического варианта опухолевых клеток.

Не понятна также природа торпедоподобных структур и их место в эволюции ВОМГ РМЖ. Вероятно, данные структуры могут образовываться от солидных структур, имеющих торпедоподобные выросты (протрузии). Интересно, что сами по себе торпедоподобные структуры не были связаны с гематогенным метастазированием РМЖ. Только, если на концах данных структур обнаруживалась экспрессия KIF14 и MIEAP и потеря EZR, наблюдалась связь с метастазированием и безметастатической выживаемостью. Механизмы регуляции экспрессии KIF14, MIEAP и EZR в торпедоподобных структурах не ясны. Тем не менее, обнаруженная ассоциация с метастазированием, вероятно, связана с активацией проинвазивных и прометастатических программ в KIF14- (высокий уровень эфирных липидов) и MIEAP-позитивных (митофагия) и EZR-негативных (ЭМП/стволовость) клетках.

Таким образом, ВОМГ РМЖ является результатом сложного взаимодействия клеток опухоли между собой и межклеточным матриксом, отражением способности к различным вариантам инвазивного роста опухоли и ассоциирована с метастазированием заболевания и эффективностью химиотерапии. При этом формирование различных морфологических структур, вероятно, является комплексным и пластичным процессом, в основе которого лежит ЭМП и/или CD44⁺CD24⁻ стволовость, и который контролируется различными экзо- и эндогенными факторами. В целом, ВОМГ РМЖ представляет собой эффективную модель для анализа молекулярных особенностей опухолевых клеток в процессе инвазии и поиска маркеров прогрессирования заболевания и мишеней для её предотвращения.

ВЫВОДЫ

1. Согласно конфокальной микроскопии и трёхмерной реконструкции опухолевой ткани, тубулярные, альвеолярные, солидные, трабекулярные структуры и дискретные группы, формирующие внутриопухолевую морфологическую гетерогенность инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа, являются пространственными формированиями со специфической формой и количеством опухолевых клеток.
2. Тубулярные, альвеолярные, солидные, трабекулярные структуры и дискретные группы представляют собой транскрипционно-обособленные популяции опухолевых клеток, характеризующиеся экспрессией и регуляцией как общих, так и специфических генов и сигнальных путей.
3. В альвеолярных структурах обнаружены значительная выраженность сигнальных путей лекарственной устойчивости ($-\log_{10}(p) > 3$) и наибольшее

количество экспрессирующихся генов химиорезистентности (70,4% (19/27)) по сравнению с тубулярными и дискретными группами опухолевых клеток (37,0% (10/27), $p=0,014$). Дискретные группы опухолевых клеток характеризуются наибольшим количеством экспрессирующихся генов мезенхимального фенотипа и значительной выраженностью сигнальных путей, вовлеченных в опухолевую инвазию ($-\log_{10}(p) > 2$) по сравнению с другими морфологическими структурами (80,0% (12/15) против 26,6% (4/15) – 53,3% (8/15), $p=0,007$).

4. Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа не связана с хромосомными aberrациями: морфологические структуры одного типа различаются цитогенетически как в пределах разных участков одной опухоли, так и между различными опухолями молочной железы.

5. Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа связана со стволовостью: $CD44^+CD24^-$ опухолевые стволовые клетки превалируют в многоклеточных морфологических структурах, главным образом в альвеолярных структурах (0,13), и практически отсутствуют в дискретных группах опухолевых клеток (0,004, $p<0,0000001$).

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

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

8. Выявлена ассоциация между метастазированием инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа и внутриопухолевой морфологической гетерогенностью, зависящая от эффективности НАХТ. У

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

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

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

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

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

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ДАННОЙ ТЕМЫ

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

- механизмы взаимодействия клеток различных морфологических структур и их микроокружения, возможность реципрокной регуляции;
- стабильность морфологических структур, возможность перехода из одного морфологического состояния в другое;

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

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Денисов Е.В., Цыганов М.М., Таширева Л.А., Литвяков Н.В., Завьялова М.В., Вторушин С.В., Чердынцева Н.В., Перельмутер В.М. Экспрессионная гетерогенность морфологических структур и их стромального микроокружения в опухолевой ткани молочной железы // Тезисы докладов Международной научной школы “Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии”. – 2011. – С. 58-60.
2. Zavyalova M., Perelmuter V., Vtorushin S., Denisov E., Litviakov N., Slonimskaya E., Cherdyntseva N. The breast tumor morphological heterogeneity and cancer progression // Abstracts of 3rd Norwegian Cancer Symposium “Growth and Proliferation: Molecular Regulators of Cancer”. – 2011. – P. 46.
3. Геращенко Т.С., Завьялова М.В., Денисов Е.В., Таширева Л.А., Литвяков Н.В., Цыганов М.М., Перельмутер В.М., Чердынцева Н.В. Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность инвазивного протокового рака молочной железы: формирование и молекулярно-генетические особенности // Медицинский академический журнал. – 2012. – Т. 12, № 4. – С. 66-68.
4. Дульцева Т.С., Цыганов М.М., Таширева Л.А., Вторушин С.В., Денисов Е.В. Генотипическая гетерогенность различных типов морфологических структур и их микроокружения в опухоли инвазивного протокового рака молочной железы // Сибирский онкологический журнал. Материалы VII региональной конференции молодых ученых им. Академика РАМН Н.В. Васильева “Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии”. – 2012. – Приложение № 1. – С. 63-64.
5. Denisov E., Tsyganov M., Tashireva L., Zavyalova M., Perelmuter V., Cherdyntseva N. Intratumoral heterogeneity in expression of chemotherapy response markers in invasive ductal breast carcinoma NOS // Annals of Oncology. Abstracts of 4th WIN Symposium: Efficacy of biomarkers and personalized cancer therapeutics. – 2012. – Vol. 23, № 5. – P. v21-v22.

6. Denisov E.V., Tashireva L.A., Dultseva T.S., Tsyganov M.M., Litviakov N.V., Zavyalova M.V., Perelmuter V.M., Cherdyntseva N.V. Molecular genetic characterization of intratumoral heterogeneity in invasive ductal NOS breast carcinoma // *European Journal of Human Genetics. Abstracts of European Human Genetics Conference.* – 2012. – Vol. 20, № 1. – P. 386.

7. Денисов Е.В., Дульцева Т.С., Таширева Л.А., Цыганов М.М., Литвяков Н.В., Завьялова М.В., Перельмутер В.М., Чердынцева Н.В. Поликлональность инвазивного протокового рака молочной железы: возможность разработки “пошаговой” химиотерапии // Тезисы VII съезда онкологов и радиологов стран СНГ, Казахский НИИ онкологии и радиологии. – 2012. – С. 433.

8. Завьялова М.В., Телегина Н.С., Вторушин С.В., Перельмутер В.М., Слонимская Е.М., Денисов Е.В., Чердынцева Н.В., Паталяк С.В. Особенности морфологического строения люминального А типа рака молочной железы // *Сибирский онкологический журнал.* – 2013. – № 1. – С. 38-41.

9. Завьялова М.В., Телегина Н.С., Вторушин С.В., Перельмутер В.М., Слонимская Е.М., Денисов Е.В., Чердынцева Н.В., Паталяк С.В., Скрыбин Н.А., Христенко К.Ю. Особенности лимфогенного метастазирования при люминальном А типе рака молочной железы // *Сибирский онкологический журнал.* – 2013. – № 2. – С. 41-44.

10. Геращенко Т.С., Денисов Е.В., Литвяков Н.В., Завьялова М.В., Вторушин С.В., Цыганов М.М., Перельмутер В.М., Чердынцева Н.В. Внутриопухолевая гетерогенность: природа и биологическое значение // *Биохимия.* – 2013. – Т. 78, Вып. 11. – С.1531-1549.

11. Zavyalova M.V., Perelmuter V.M., Vtorushin S.V., Denisov E.V., Litviakov N.V., Slonimskaya E.M., Cherdyntseva N.V. The presence of alveolar structures in invasive ductal NOS breast carcinoma is associated with lymph node metastasis // *Diagnostic Cytopathology.* – 2013. – Vol. 41, № 3. – P. 279-282.

12. Zavyalova M.V., Denisov E.V., Tashireva L.A., Gerashchenko T.S., Litviakov N.V., Skryabin N.A., Vtorushin S.V., Telegina N.S., Slonimskaya E.M., Cherdyntseva N.V., Perelmuter V.M. Phenotypic drift as a cause for intratumoral morphological heterogeneity of invasive ductal breast carcinoma not otherwise specified // *BioResearch Open Access.* – 2013. – Vol. 2, № 2. – P. 148-154.

13. Завьялова М.В., Денисов Е.В., Таширева Л.А., Геращенко Т.С., Скрыбин Н.А., Вторушин С.В., Телегина Н.С. Влияние клинико-патологических параметров рака молочной железы на формирование внутриопухолевой морфологической гетерогенности // *Сибирский онкологический журнал. Материалы VIII региональной конференции молодых ученых им. академика РАМН Н.В. Васильева “Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии”.* – 2013. – Приложение № 1. – С. 38-39.

14. Денисов Е.В., Геращенко Т.С., Завьялова М.В., Литвяков Н.В., Вторушин С.В., Перельмутер В.М., Чердынцева Н.В. Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность рака молочной железы как привлекательная модель для применения высокопроизводительных геномных и транскриптомных технологий, изучения филогении опухоли и поиска маркеров заболевания // Тезисы Международной конференции “Высокопроизводительное секвенирование в геномике”. – 2013. – С. 76.

15. Чердынцева Н.В., Денисов Е.В., Литвяков Н.В., Геращенко Т.С., Завьялова М.В., Перельмутер В.М. Внутриопухолевая гетерогенность: вклад в прогрессию злокачественных новообразований и резистентность к терапии // Тезисы третьей конференции Общества специалистов онкологов по опухолям органов репродуктивной системы. – 2013. – С. 71-72.

16. Денисов Е.В., Геращенко Т.С., Завьялова М.В., Гладышева Е.Г., Литвяков Н.В., Перельмутер В.М., Чердынцева Н.В. Молекулярно-генетические аспекты внутриопухолевой морфологической гетерогенности рака молочной железы // Тезисы

Всероссийской научной школы-конференции для молодых ученых РАМН по онкологии «Современная онкология: достижения и перспективы». – 2013. – С. 8-9.

17. Denisov E.V., Litviakov N.V., Zavyalova M.V., Vtorushin S.V., Tsyganov M.M., Gerashchenko T.S., Garbukov E.Y., Slonimskaya E.M., Perelmuter V.M., Cherdyntseva N.V. The presence of alveolar structures in breast tumors is associated with drug resistance gene upregulation and poor chemotherapy response // *Annals of Oncology. Abstracts of IMPAKT Breast Cancer Conference.* – 2013. – Vol. 24, № 3. – P. iii44-iii44.

18. Denisov E.V., Litviakov N.V., Zavyalova M.V., Perelmuter V.M., Vtorushin S.V., Tsyganov M.M., Gerashchenko T.S., Garbukov E.Y., Slonimskaya E.M., Cherdyntseva N.V. **Intratumoral morphological heterogeneity of breast cancer: neoadjuvant chemotherapy efficiency and multidrug resistance gene expression** // *Scientific Reports.* – 2014. – Vol. 4. – P. 1-7.

19. Скрябин Н.А., Денисов Е.В., Васильев С.А., Перельмутер В.М., Лебедев И.Н. Соматическая эволюция внутриопухолевой генетической гетерогенности при раке молочной железы // *Генетика человека и патология. Проблемы эволюционной медицины: сборник научных трудов / под ред. В.А. Степанова. Вып. 10.* – Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2014. – С. 148-151.

20. Геращенко Т.С., Васильева О.Ю., Денисов Е.В., Скрябин Н.А., Васильев С.А., Гладышева Е.Г., Завьялова М.В. Молекулярно-генетический портрет внутриопухолевой морфологической гетерогенности рака молочной железы // *Сибирский онкологический журнал. Материалы IX всероссийской конференции молодых ученых, посвященной памяти академика РАМН Н.В. Васильева “Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии”.* – 2014. – Приложение № 1. – С. 38-39.

21. Skryabin N.A., Denisov E.V., Perelmuter V.M., Vasilyev S.A., Lebedev I.N. Cytogenetic heterogeneity in breast cancer and its relationship with the morphological types of infiltrating component // *European Journal of Human Genetics. Abstracts of European Human Genetics Conference.* – 2014. – Vol. 22, Suppl. 1. – P. 458-459.

22. Денисов Е.В., Геращенко Т.С., Гладышева Е.Г., Завьялова М.В., Литвяков Н.В., Перельмутер В.М., Чердынцева Н.В. Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность рака молочной железы: экспрессионный и цитогенетический портрет // *Тезисы VI Съезда Вавиловского Общества Генетиков и Селекционеров (ВОГИС) и Ассоциированных Генетических Симпозиумов.* – 2014. – С. 111-112.

23. Denisov E., Gerashchenko T., Skryabin N., Vasilyev S., Zavyalova M., Perelmuter V., Cherdyntseva N. Expression and cytogenetic profile of intratumor morphological heterogeneity in breast cancer // *European Journal of Cancer. Proceedings of 23rd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research.* – 2014. – Vol. 50, № 5. – P. S76.

24. Скрябин Н.А., Денисов Е.В., Васильев С.А., Перельмутер В.М., Лебедев И.Н. Внутриопухолевая генетическая вариабельность при раке молочной железы и ее роль в развитии морфологической гетерогенности опухолевых клеток // *Труды VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Молекулярная диагностика 2014".* – 2014. – С. 109-110.

25. Васильева О.Ю., Чердынцева Н.В., Перельмутер В.М., Завьялова М.В., Крахмаль Н.В., Денисов Е.В., Геращенко Т.С. Инвазивный профиль различных морфологических структур опухолей молочной железы // *Евразийский онкологический журнал. Тезисы 8-го съезда онкологов и радиологов СНГ и Евразии.* – 2014. – № 3. – С. 251.

26. Завьялова М.В., Перельмутер В.М., Денисов Е.В., Чердынцева Н.В., Слонимская Е.М., Крахмаль Н.В., Вторушин С.В. Клинические и молекулярно-генетические аспекты морфологической гетерогенности рака молочной железы // *Евразийский онкологический журнал. Тезисы 8-го съезда онкологов и радиологов СНГ и Евразии.* – 2014. – № 3. – С. 264.

27. Денисов Е.В., Геращенко Т.С., Скрябин Н.А., Завьялова М.В., Перельмутер В.М. Биологические и клинические характеристики субпопуляций опухолевых клеток рака

молочной железы // Материалы Международной молодежной научной конференции «Современные проблемы генетики, клеточной биологии и биотехнологии». – 2014. – С. 10-11.

28. Denisov E., Gerashchenko T., Zavyalova M., Krakhmal N., Cherdyntseva N., Kzhyshkowska J., Perelmuter V. Metastatic gene expression profile of different morphological structures of breast tumors // Abstracts of EACR Conference Series 2014 "Goodbye Flat Biology: 3D Models & the Tumour Microenvironment". – 2014. – P. 29.

29. Крахмаль Н.В., Завьялова М.В., Денисов Е.В., Вторушин С.В., Перельмутер В.М. Инвазия опухолевых эпителиальных клеток: механизмы и проявления // *Acta Naturae*. – 2015. – Т. 7, № 2. – С. 18-31.

30. Denisov E.V., Geraschenko T.S., Zavyalova M.V., Litviakov N.V., Tsyganov M.M., Kaigorodova E.V., Slonimskaya E.M., Kzhyshkowska J., Cherdyntseva N.V., Perelmuter V.M. Invasive and drug resistant expression profile of different morphological structures of breast tumors // *Neoplasma*. – 2015. – Vol. 62, № 3. – P. 405-411.

31. Denisov E.V., Skryabin N.A., Vasilyev S.A., Gerashchenko T.S., Lebedev I.N., Zavyalova M.V., Cherdyntseva N.V., Perelmuter V.M. Relationship between morphological and cytogenetic heterogeneity in invasive micropapillary carcinoma of the breast: a report of one case // *Journal of Clinical Pathology*. – 2015. – Vol. 68, № 9. – P. 758-762.

32. Tashireva L.A., Denisov E.V., Savelieva O.E., Gerashchenko T.S., Zavyalova M.V., Perelmuter V.M. Heterogeneity of premetastatic niche gene expression in breast cancer cells // *Biopolymers & Cell*. – 2015. – Vol. 31. – P. 429-435.

33. Денисов Е.В., Скрябин Н.А., Геращенко Т.С., Паутова Д.Н., Завьялова М.В., Чердынцева Н.В., Перельмутер В.М. Морфологически обособленные опухолевые популяции рака молочной железы в понимании механизмов эволюции и прогрессии заболевания // *Медицинская генетика. Тезисы VII Съезда Российского общества медицинских генетиков*. – 2015. – Т. 14, № 2 (152). – С. 53.

34. Денисов Е.В., Геращенко Т.С., Паутова Д.Н. Клонально-инвазивные и опухоле-стволовые основы формирования внутриопухолевой морфологической гетерогенности рака молочной железы // *Научные труды XII Международной конференция студентов и молодых ученых "Перспективы развития фундаментальных наук"*. – 2015. – С. 790-792.

35. Геращенко Т.С., Денисов Е.В., Завьялова М.В., Кайгородова Е.В., Чердынцева Н.В., Перельмутер В.М. Вклад внутриопухолевой морфологической гетерогенности в химиорезистентность рака молочной железы: возможные механизмы // *Тезисы 1-го Российского онкологического научно-образовательного форума с международным участием «Белые Ночи – 2015»*. – 2015. – С. 435-436.

36. Денисов Е.В., Скрябин Н.В., Геращенко Т.С., Васильев С.А., Паутова Д.Н., Завьялова М.В., Чердынцева Н.В., Перельмутер В.М. Клональная эволюция рака молочной железы: связь с внутриопухолевой морфологической гетерогенностью // *Материалы Международной конференции "Хромосома 2015"*. – 2015. – С. 90-91.

37. Денисов Е.В., Скрябин Н.В., Тashireva Л.А., Геращенко Т.С., Завьялова М.В., Чердынцева Н.В., Перельмутер В.М. Связь морфологического разнообразия рака молочной железы с хромосомными нарушениями и опухолевой стволовостью: взгляд на механизмы опухолевой эволюции // *Успехи молекулярной онкологии. Материалы конференции "Молекулярная онкология: итоги и перспективы"*. – 2015. – Т. 2, № 4. – С. 13-14.

38. Геращенко Т.С., Денисов Е.В., Завьялова М.В., Перельмутер В.М., Чердынцева Н.В. Экспрессионное профилирование различных морфологических структур опухоли молочной железы: маркеры инвазии, метастазирования и химиорезистентности // *Успехи молекулярной онкологии. Материалы конференции "Молекулярная онкология: итоги и перспективы"*. – 2015. – Т. 2, № 4. – С. 29.

39. Denisov E., Gerashchenko T., Pautova D., Krakhmal N., Zavyalova M., Litviakov N., Slonimskaya E., Cherdyntseva N., Perelmuter V. Intratumor morphological heterogeneity in breast cancer and distant metastasis: Expression analysis of genes involved in cell motility and pre-metastatic niche formation // *European Journal of Cancer Supplements. Abstracts of the EMBO workshop "Cellular and molecular mechanism of tumour-microenvironment crosstalk"*. – 2015. – Vol. 13, № 1. – P. 13.

40. Denisov E., Skryabin N., Gerashchenko T., Wilhelm J., Pautova D., Zavyalova M., Cherdyntseva N., Perelmuter V. A study of the relationship between intratumor morphological heterogeneity and genetic changes in breast cancer // *Abstracts for the NCRI Cancer Conference*. – 2015. – № abstract A256.

41. Gerashchenko T., Denisov E., Zavyalova M., Cherdyntseva N., Perelmuter V. Intratumoral morphological heterogeneity of breast cancer and its implication in chemotherapy resistance // *The Breast. Abstracts of Advanced Breast Cancer Third International Consensus Conference*. – 2015. – Vol. 24, Suppl. 3. – P. S72.

42. Denisov E.V., Gerashchenko T.S., Tashireva L.A., Pautova D.N., Zavyalova M.V., Cherdyntseva N.V., Perelmuter V.M. The significance of intratumor morphological heterogeneity in breast cancer progression and pathogenetic mechanisms // *Annals of Oncology. Abstracts of ESMO Asia Congress*. – 2015. – Vol. 26, Suppl. 9. – P. 153-155.

43. Герашченко Т.С., Денисов Е.В., Завьялова М.В., Литвяков Н.В., Вторушин С.В., Паутова Д.Н., Крахмаль Н.В., Скрябин Н.А., Слепцов А.А., Чердынцева Н.В., Перельмутер В.М. Генетический портрет первичной лекарственной устойчивости различных морфологических структур рака молочной железы // *Медицинская генетика*. – 2016. – Т. 15, № 4. – С. 21-24.

44. Denisov E.V., Gerashchenko T.S., Tashireva L.A., Pautova D.N., Zavyalova M.V., Cherdyntseva N.V., Perelmuter V.M. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) spectrum in breast cancer: a correlation with intratumor morphological diversity // *Abstracts of the International Conference "Physics of cancer: interdisciplinary problems and clinical applications"*. – 2016. – P. 34.

45. Denisov E.V., Gerashchenko T.S., Tashireva L.A., Skryabin N.A., Buldakov M.A., Zavyalova M.V., Cherdyntseva N.V., Perelmuter V.M. Intratumor morphological heterogeneity in breast cancer: towards personalized prognosis and therapy // *Abstracts of the International symposium systems biology and biomedicine (SBioMed-2016)*. – 2016, Novosibirsk. – P. 26.

46. Gerashchenko T., Denisov E., Pautova D., Zavyalova M., Cherdyntseva N., Perelmuter V. Different breast tumor morphological structures reflect specific EMT states and contribute to cancer metastasis // *Annals of Oncology. Abstracts of the 41st ESMO Congress (ESMO 2016)*. – 2016. – Vol. 27, Suppl. 6. – P. vi545-vi551.

47. Denisov E., Gerashchenko T., Tashireva L., Buldakov M., Zavyalova M., Cherdyntseva N., Perelmuter V. Clinically relevant morphological structures as transcriptionally distinct tumor subpopulations and potential therapeutic targets in breast cancer // *European Journal of Cancer. Abstracts of 28th EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics*. – 2016. – Vol. 28, Suppl. 1. – S.40.

48. Герашченко Т.С., Завьялова М.В., Денисов Е.В., Крахмаль Н.В., Паутова Д.Н., Литвяков Н.В., Вторушин С.В., Чердынцева Н.В., Перельмутер В.М. Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность рака молочной железы как фактор, отражающий метастатический потенциал и чувствительность опухоли к химиотерапии // *Acta Naturae* – 2017. – Т. 9, № 1 (32). – С. 60-72.

49. Tashireva L.A., Denisov E.V., Gerashchenko T.S., Pautova D.N., Buldakov M.A., Zavyalova M.V., Kzhyshkowska J., Cherdyntseva N.V., Perelmuter V.M. Intratumoral heterogeneity of macrophages and fibroblasts in breast cancer is associated with the morphological diversity of tumor cells and contributes to lymph node metastasis // *Immunobiology*. – 2017. – Vol. 222. – P. 631-640.

50. **Denisov E.V., Skryabin N.A., Gerashchenko T.S., Tashireva L.A., Wilhelm J., Buldakov M.A., Sleptcov A.A., Lebedev I.N., Vtorushin S.V., Zavyalova M.V., Cherdyntseva N.V., Perelmuter V.M. Clinically relevant morphological structures in breast cancer represent transcriptionally distinct tumor cell populations with varied degrees of epithelial-mesenchymal transition and CD44+CD24- stemness // Oncotarget. – 2017. – Vol. 8. – P. 61163-61180.**

51. Denisov E.V., Gerashchenko T.S., Tashireva L.A., Krakhmal N.V., Zavyalova M.V., Cherdyntseva N.V., Perelmuter V.M. On the problem of the origin and evolution of different morphological structures in breast cancer // Abstracts of the International Conference "Physics of cancer: interdisciplinary problems and clinical applications". – 2017. – P. 34.

52. Denisov E.V., Gerashchenko T.S., Tashireva L.A., Novikov N.M., Krakhmal N.V., Zavyalova M.V., Cherdyntseva N.V., Perelmuter V.M. Intratumor morphological heterogeneity in breast cancer as a model for the study of cancer invasion // Abstracts of 3rd International Cancer Symposium Cancer Research Center of Lyon (CRCL). – 2017. – P. 74.

53. Denisov E.V., Gerashchenko T.S., Tashireva L.A., Krakhmal N.V., Zavyalova M.V., Cherdyntseva N.V., Perelmuter V.M. Morphologically distinct subpopulations of breast tumor cells as sources of “seeds” and initiators of premetastatic niche formation // Clinical & Experimental Metastasis. Abstracts of 1st Joint EACR-MRS Conference “Seed and Soil: In Vivo Models of Metastasis”. – 2017. – Vol. 34, № 8. – P. 499.

54. **Gerashchenko T.S., Denisov E.V., Novikov N.M., Tashireva L.A., Kaigorodova E.V., Savelieva O.E., Zavyalova M.V., Cherdyntseva N.V., Perelmuter V.M. Different morphological structures of breast tumors demonstrate individual drug resistance gene expression profiles // Experimental Oncology. – 2018. – Vol. 40, № 3. – P. 228-234.**

55. Denisov E.V., Gerashchenko T.S., Novikov N.M., Tashireva L.A., Krakhmal N.V., Zavyalova M.V., Gautreau A., Cherdyntseva N.V., Perelmuter V.M. The search for markers of collective cell invasion in breast cancer // Proceedings of the 22nd International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research. – 2018. – P. 24.

56. Denisov E., Gerashchenko T., Novikov N., Tashireva L., Krakhmal N., Zavyalova M., Gautreau A., Cherdyntseva N., Perelmuter V. The search for new markers of breast cancer invasion // Tumor Biology. Abstracts of 45th ISOBM congress. – 2019. – Vol. 41, № 7. – P. 47.

57. Gerashchenko T., Denisov E., Novikov N., Cherdyntseva N., Zavyalova M., Perelmuter V. Drug resistance gene expression profiles of different morphological structures in breast cancer // Tumor Biology. Abstracts of 45th ISOBM congress. – 2019. – Vol. 41, № 7. – P. 47-48.

58. **Gerashchenko T.S., Novikov N.M., Krakhmal N.V., Zolotaryova S.Y., Zavyalova M.V., Cherdyntseva N.V., Denisov E.V., Perelmuter V.M. Markers of cancer cell invasion: are they good enough? // Journal of Clinical Medicine. – 2019. – Vol. 8, № 8. – P. 1-18.**

59. Denisov E.V., Gerashchenko T.S., Novikov N.M., Tashireva L.A., Zavyalova M.V., Gautreau A., Cherdyntseva N.V., Perelmuter V.M. Heterogeneous expression of WAVE2 and SPATA18 at the tips of invasive structures of breast tumors contributes to poor metastasis-free survival // Abstracts 6th ZOO meeting “Cell adhesion and migration in inflammation and cancer”. – 2019. – P. 59

60. Gerashchenko T.S., Denisov E.V., Tashireva L.A., Zolotaryova S.Yu., Novikov N.M., Kiselev A.M., Zavyalova M.V., Cherdyntseva N.V., Perelmuter V.M. Heterogeneous expression of KIF14 contributes to decreased metastasis-free survival in breast cancer // Успехи молекулярной онкологии. Материалы V Всероссийской конференции по молекулярной онкологии. – 2019. – Т. 6, № 4, Приложение. – С. 39-40.

61. **Gerashchenko T.S., Zolotaryova S.Y., Kiselev A.M., Tashireva L.A., Novikov N.M., Krakhmal N.V., Cherdyntseva N.V., Zavyalova M.V., Perelmuter V.M., Denisov E.V. The activity of KIF14, Micap, and EZR in a new type of the invasive component, torpedo-like structures, predetermines the metastatic potential of breast cancer // Cancers. – 2020. – Vol. 12. – P. 1-17.**

62. Novikov, N.M., Zolotaryova, S.Y., Gautreau, A.M., Denisov E.V. Mutational drivers of cancer cell migration and invasion // *British Journal of Cancer*. – 2021. – Vol. 124. – P. 102-114.

Монография:

63. Крахмаль Н.В., Завьялова М.В., Савельева О.Е., Таширева Л.А., Денисов Е.В., Кайгородова Е.В., Перельмутер В.М. Морфологические и молекулярно-генетические проявления опухолевой инвазии при раке молочной железы / Под ред. В.М. Перельмутера, М.В. Завьяловой. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2017. – 124 с.

Патенты:

1. Денисов Е.В., Геращенко Т.С., Завьялова М.В., Перельмутер В.М., Чердынцева Н.В., Крахмаль Н.В., Слонимская Е.М., Литвяков Н.В., Таширева Л.А. Способ прогнозирования гематогенного метастазирования при инвазивной карциноме неспецифического типа молочной железы у пациенток с плохим ответом на неоадьювантную химиотерапию // Патент на изобретение RU 2623150, 22.06.2017. Заявка № 2016120477 от 25.05.2016. Бюл. № 18, дата 22.06.2017.

2. Геращенко Т.С., Денисов Е.В., Завьялова М.В., Крахмаль Н.В., Перельмутер В.М., Чердынцева Н.В., Слонимская Е.М., Литвяков Н.В., Савельева О.Е. Способ прогнозирования гематогенного метастазирования при инвазивной карциноме неспецифического типа молочной железы у пациенток с хорошим ответом на неоадьювантную химиотерапию // Патент на изобретение RU 2627649, 09.08.2017. Заявка № 2016120473 от 25.05.2016. Бюл. № 22, дата 09.08.2017.

Свидетельство о государственной регистрации базы данных:

1. Геращенко Т.С., Завьялова М.В., Крахмаль Н.В., Денисов Е.В., Перельмутер В.М. База данных молекулярно-морфологических характеристик опухоли и клинических параметров у пациентов с раком молочной железы // Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2018620127, 19.01.2018. Заявка № 2017621370 от 27.11.2017.

Благодарности

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

Выражаю глубокую признательность:

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

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

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

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

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

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

Список сокращений

Альв – альвеолярные структуры

ВКМ – внеклеточный матрикс

ВОМГ – внутриопухольевая морфологическая гетерогенность

Дискр – дискретные группы опухолевых клеток

ИГХ – иммуногистохимия

НАХТ – неoadъювантная химиотерапия

Норм – нормальные протоки молочной железы

ОСК – опухолевые стволовые клетки

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РМЖ – рак молочной железы

Сол – солидные структуры

Траб – трабекулярные структуры

Туб – тубулярные структуры

ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

HR (от англ. hazard ratio) – отношение рисков

OR (от англ. odds ratio) – отношение шансов

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

RR (от англ. relative risk) – относительный риск

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

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