

**НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ОНКОЛОГИИ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО
УЧРЕЖДЕНИЯ «ТОМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»**

На правах рукописи

ИБРАГИМОВА МАРИНА КОНСТАНТИНОВНА

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

14.01.12 – онкология (биологические науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

д.б.н. Литвяков Н.В.

Томск – 2021

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	16
1.1 CNA-генетический ландшафт опухоли молочной железы и его изменение в процессе неoadъювантной химиотерапии	16
1.1.1 Частота CNA разных регионов в опухоли молочной железы.....	16
1.1.2 CNA-генетический ландшафт опухоли молочной железы при разных молекулярных подтипах.....	18
1.1.3 CNA-генетический ландшафт опухоли молочной железы и гематогенное метастазирование	20
1.1.4 Изменение CNA-генетического ландшафта опухоли молочной железы в процессе НХТ	22
1.2 Опухолевые стволовые клетки при раке молочной железы	25
1.2.1 Сигнальные пути, регулирующие опухолевые стволовые клетки молочной железы	26
1.2.2 Значение опухолевых стволовых клеток для метастазирования рака молочной железы	32
1.2.3 Маркеры опухолевых стволовых клеток при раке молочной железы	36
1.3. Гены индукции и поддержания плюрипотентности при раке молочной железы	41
ЗАКЛЮЧЕНИЕ К ЛИТЕРАТУРНОМУ ОБЗОРУ	51
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	54
2.1 МАТЕРИАЛЫ	54
2.1.1 Пациенты и лечение.....	54
2.1.2 Характеристика клеточных культур	56
2.1.3 База TCGA	58
2.1.4 База данных больных РМЖ	58
2.1.5 Забор опухолевого материала	60
2.2 ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ	61
2.3 МЕТОДЫ	62
2.3.1 Выделение РНК.....	62

2.3.2 Выделение ДНК	62
2.3.3 Капиллярный электрофорез	63
2.3.4 Количественная ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени	64
2.3.5 Микроматричный анализ	67
2.3.6 Полнотранскриптомный микроматричный анализ	68
2.3.7 Работа с клеточными культурами	69
2.3.8 Статистические методы	71
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	73
3.1. Описание CNA-ландшафта опухоли молочной железы люминального В подтипа до лечения.....	73
3.2 Изменение CNA-генетического ландшафта опухоли молочной железы в процессе НХТ и метастазирование.....	84
3.3 Ассоциация амплификаций 3q, 5p, 6p, 7q, 8q, 9p, 10p, 10q, 12p, 13q, 16p, 18q, 19p со смертностью при различных локализациях	97
3.4 Аннотация генов хромосомных регионов 3q, 5p, 6p, 7q, 8q, 9p, 10p, 10q, 12p, 13q, 16p, 18q, 19p.....	102
3.5 Исследование экспрессии генов стволовости в опухоли молочной железы	110
3.6. Полнотранскриптомный анализ опухоли молочной железы в процессе НХТ	115
3.7 Значение амплификаций генов стволовости для стволового перехода опухолевых клеток in vitro	124
ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	136
ВЫВОДЫ	144
ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ДАННОЙ ТЕМЫ	146
СОКРАЩЕНИЯ И УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ	147
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	148
ПРИЛОЖЕНИЯ	177

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

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

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

Химиотерапия, в том числе и неoadъювантная, является системным компонентом лечения рака молочной железы. По современным данным, химиотерапия, как минимум в 20% случаев может стимулировать появление мутаций, которые приводят к

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

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

Степень разработанности темы

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

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

Активно ведутся исследования по изучению клонального состава в паре опухоль/метастаз. Charlotte K.Y. Ng, et al. (2017), в работе представлено 9 случаев исследования CNA-генетического ландшафта первичных опухолей и их метастазов. Наблюдается значительная гетерогенность между первичной опухолью и метастазами, что связывают с независимой эволюцией метастазов [Ng C.K.et al 2017]. В 2015 году Brastianos P.K. и соавторы провели секвенирование опухолевой, нормальной ткани и метастазов для 86 пациентов с РМЖ. Были выявлены изменения, прогнозирующие чувствительность к ингибиторам PI3K/АКТ/mTOR, CDK и HER2/EGFR, и у 53% пациентов клинически информативные мутации не были обнаружены в первичных опухолях [Brastianos P.K.et al 2015]. Есть и экспериментальные исследования на эту тему

[Sprouffske K. et al 2020], однако все эти исследования скорее покажут пути развития метастазов, но не причину их появления и инициации, они не помогут ответить на вопрос, почему у одних пациентов метастазы развиваются, а у других нет и, соответственно, не помогут разработать точные прогностические критерии, которые послужат для персонализации лечения пациентов.

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

Еще в 2011 году была показана стволовая пластичность дифференцированных опухолевых клеток и приобретение стволового фенотипа дифференцированными опухолевыми клетками [Gupta P.V. et al 2011]. Двумя годами позже Chaffer C. с коллегами опубликовала данные о том, что разные опухоли существенно различаются по способности к стволовой пластичности (nonCSC to-CSC plasticity) или стволовому переходу и этим будет определяться их злокачественный потенциал и способность к прогрессии. Chaffer C. было высказано предположение, что способность к стволовому переходу, индукции стволовости, а также активность стволо-подобных опухолевых клеток определяет злокачественность опухоли и, главное, ее способность к метастазированию [Chaffer C.L. et al 2013]. Доказательство стволовой пластичности представили американские ученые, хотя и не высказывали такого предположения. Они показали, что селективная абляция Lgr5⁺ стволовых опухолевых клеток ограничивает рост первичной опухоли, но не приводит к регрессии опухоли. Вместо этого опухоли поддерживаются

пролиферативными Lgr5- клетками, которые непрерывно пытаются пополнить пул стволовых клеток, что приводит к быстрому повторному инициированию роста опухоли после прекращения лечения. Примечательно, что этот процесс имеет решающее значение для формирования и роста метастазов колоректального рака в печени [e Melo F.d.S.et al 2017]. Китайские ученые показали, что эктопическая коэкспрессия Oct4/Nanog наделила дифференцированные клетки немелкоклеточного рака легкого свойствами ОСК, включая самообновление, лекарственную устойчивость, ЭМП и высокую опухоль-иницирующую активность [Liu L.et al 2020]. Дедифференцированные стволоподобные клетки могут осуществлять коллективную инвазию [Quan Q.et al 2020].

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

Цель исследования

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

Задачи исследования

1. Описать CNA-ландшафт опухоли молочной железы люминального В HER2-негативного подтипа в зависимости от ответа на НХТ и основных клинико-морфологических параметров
2. Оценить изменения CNA-генетического ландшафта опухоли молочной железы в процессе неoadъювантной химиотерапии и связь этих изменений с метастазированием
3. Провести аналитическую работу по данным проекта TCGA: связь амплификаций 3q, 5p, 6p, 7q, 8q, 9p, 10p, 10q, 12p, 13q, 16p, 18q, 19p со смертностью при различных локализациях
4. Аннотировать гены, находящиеся в хромосомных регионах локализации амплификаций, возникающих под действием неoadъювантной химиотерапии
5. Оценить уровень экспрессии генов стволовости, находящихся в регионах локализации амплификаций, возникающих под действием неoadъювантной химиотерапии

6. Исследовать транскриптом опухоли больных с люминальным В HER2-негативным РМЖ в зависимости от наличия/отсутствия гематогенного метастазирования до и после проведения предоперационной химиотерапии
7. Оценить значение амплификаций генов стволовости для способности к стволовой пластичности дифференцированных опухолевых клеток.

Научная новизна исследования

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

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

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

индукции и поддержания стволового фенотипа клеток и самообновления или гены стволовости, всего в этих регионах локализовано 48 генов стволовости. Данные гены, помимо участия в индукции стволового фенотипа и роли в самообновлении стволовых клеток, имеют прямое отношение к канцерогенезу и прогрессии опухолей, причем важно то, что up-регуляция всех этих генов приводит к усилению метастазирования опухолей, при клинических исследованиях, в системах *in vivo* и к усилению туморогенности и маммосферообразования в системах *in vitro*.

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

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

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

Теоретическая и практическая значимость работы

На основе полученных результатов была сформулирована гипотеза и получены ее доказательства о способности опухоли к метастазированию. Приобретение способности к

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

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

Разработан и получен патент «Способ прогнозирования безметастатической выживаемости у больных раком молочной железы на основе экспрессии генов сомато-стволового перехода в резидуальной опухоли после предоперационной терапии» Патент RU № 2682879 от 22 марта 2019. Зарегистрировано 8 баз данных об изменениях генетического ландшафта опухоли молочной железы в процессе НХТ.

Методология и методы исследования

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

Положения, выносимые на защиту

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

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

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

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов исследования подтверждается достаточным клиническим материалом исследования, высоким методологическим и методическим уровнем с использованием современных информативных и полногеномных методов исследования: микроматричных, биоинформатических, молекулярно-генетических, экспериментальных моделей *in vitro*. Обоснованность полученных результатов подтверждается корректной статистической обработкой материала. Результаты представленной работы представлены и обсуждены на следующих конференциях: Всероссийская конференция «Молекулярная онкология: итоги и перспективы», Москва (2015-2019 гг.); Всероссийская конференция молодых ученых-онкологов, посвященная памяти академика РАМН Н.В. Васильева, Томск (2015-2020 гг.); Международный форум «Белые ночи», Санкт-Петербург (2015, 2018, 2020 гг.); Международная конференция «Перспективы развития фундаментальных наук», Томск (2015, 2019, 2020 гг.); Международная конференция OpenBio, г. Кольцово Новосибирской области (2016 г.); International conference “Physics of cancer: interdisciplinary problems and clinical Applications», Tomsk, Russia (2016, 2017 гг.); Российский онкологический конгресс, Москва (2017, 2018 гг.); Съезд онкологов и радиологов стран СНГ И Евразии, г. Сочи (2018 г.); Всероссийская конференция с международным участием «Опухолевые маркеры: молекулярно-генетические и клинические аспекты» г. Горно-Алтайск (2018, 2019 гг.); Всероссийская конференция «Новые технологии диагностики наследственных болезней», Москва (2018 г.); Международная конференция “Постгеном’2018”, г. Казань (2018 г.); II Объединенный научный форум: «Белки и пептиды», Сочи (2019 г.); Всероссийская конференция «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии», г. Ростов-на-Дону (2020 г.); Научно-практическая конференция РОМГ г. Москва (2020 г.).

Внедрение результатов исследования

Основные положения работы внедрены в учебный план автономной магистерской программы «Трансляционные химические и биомедицинские технологии» Томского

государственного университета по курсу «Молекулярная онкология». По материалам диссертации зарегистрированы 2 патента RU № 2682879 и RU №2594251, а также 8 баз данных (свидетельства о государственной регистрации базы данных № 2020620652, 2020620411, 2019620995, 2019620731, 2019620470, 2019620414, 2019620413, 2018620706).

Публикации по материалам диссертации

По теме диссертации опубликовано 72 печатные работы, в том числе, 18 статей в рецензируемых журналах из списка ВАК. Из них 12 статей в зарубежной печати, в том числе 6 статей Q1 и 4 статьи Q2.

Личный вклад автора

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

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

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

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов, списка литературы и

приложений. Работа изложена на 196 страницах, включает 37 рисунков и 15 таблиц. Список литературы содержит 477 источников.

ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 CNA-генетический ландшафт опухоли молочной железы и его изменение в процессе неoadъювантной химиотерапии

Понятие генетический ландшафт включает характеристику первичной последовательности ДНК и ее изменений (мутаций) различного типа. Один из таких типов изменений, это изменения числа копий - простая форма хромосомной нестабильности - в основном относится к увеличению или потере геномного содержимого в последовательностях генов по сравнению с эталонным геномом [MacDonald J.R.et al 2014]. В настоящее время известно, что наличие структурных хромосомных аномалий является частой составляющей опухолевых клеток и в опухолевых клетках имеются различные хромосомные аномалии отдельных локусов и числовые aberrации целых хромосом. Делеции или амплификации хромосомных регионов и отдельных хромосом называют aberrациями числа копий ДНК (CNA – Copy Number Aberration). CNA особенно распространены при солидных опухолях различных локализаций [Horlings H.M.et al 2010]. Хорошо известно, что в карциноме молочной железы наблюдается высокий уровень aberrаций числа копий в геноме [Desmedt C.et al 2016, Network C.G.A. 2012].

1.1.1 Частота CNA разных регионов в опухоли молочной железы

На сегодняшний день существует множество исследований, освещающих вопрос изучения CNA при раке молочной железы в различном контексте. В первую очередь рассматриваются частоты различных aberrаций числа копий в опухоли молочной железы. В прошлом десятилетии результаты проведения нескольких сравнительных исследований геномной гибридизации опухолей молочной железы и клеточных линий рака молочной железы указывают на часто наблюдаемые амплификации и делеции в 8, 13 и 17 хромосомах, в которых, как известно, содержатся гены, ассоциированные с РМЖ, такие как *BRCA1*, *ERBB2* и *MYC* [Bergamaschi A.et al 2006, Fridlyand J.et al 2006, Naylor T.L.et al 2005]. При этом, в настоящее время показано, что в опухоли молочной железы наиболее часто CNA наблюдаются в регионах 1q, 8q и 16q, а различные опухолевые клоны РМЖ могут характеризоваться специфическими структурными хромосомными и числовыми aberrациями, присутствием псевдодиплоидных и анеуплоидных клеточных популяций, которые образовались в результате одного или нескольких циклов клональной экспансии [Navin N.et al 2011, Ng C.K.et al 2012]. Амплификации в опухоли молочной железы также отмечаются в 1q, 8p12, 8q24.21, 17q12, 11q13.3, и 11q13.5, охватывая такие известные онкогены, как *HER2*, *c-Myc*, *CCND1*, и *PAK1*, делеции – на 8p, 11q, 16q и 17p

хромосомных локусах [Jönsson G. et al 2010]. Также в работе Huihan Wang и коллег, был проанализирован CNA-профиль 765 опухолей молочной железы по сравнению с нормальными образцами. При этом показано, что частота амплификаций была больше, чем частота делеций, и были идентифицированы амплификации длинного плеча 1 и 8 хромосом, и делеции 8p и 16q, как наиболее часто встречаемые при раке молочной железы [Wang H., Yan W. 2017]. M.G. Waugh в своей работе провел анализ амплификаций генов длинного плеча 1 хромосомы при раке молочной железы (n= 852). Согласно результатам работы, показано, что 10% образцов РМЖ имеют амплификации гена *PI4KB* [Waugh M.G. 2014]. В работе G.O. Silva с коллегами проведен анализ числа копий ДНК генов, расположенных в локусах 1q21-q23 при раке молочной железы. Выделено три потенциальных драйверных гена в изученных локусах (частота амплификации 47%) - *PI4KB*, *SHC1* и *NCSTN* [Silva G.O. et al 2015].

В различных исследованиях указано, что молодой возраст в диагностике рака молочной железы стал независимым фактором для более высокого риска рецидива и смерти, несмотря на то, что доля женщин до 40 лет с диагнозом РМЖ находится в диапазоне 7-10% [Azim H.A. et al 2012, Johnson R.H. et al 2015]. Стоит отметить работу Chen Chi и соавторов, в которой были рассмотрены изменения числа копий у молодых женщин с РМЖ. В исследовании канадских авторов были проанализированы 997 образцов РМЖ, из которых 130 принадлежали пациенткам в возрасте до 45 лет. Было показано, что для когорты старшего возраста имеется 96 503 и 47 943 отдельных областей CNA - амплификаций и делеций – на пациента, соответственно. Для когорты молодого возраста насчитывается 14 957 и 6 373 амплификаций и делеций на пациента, соответственно. Полученные данные также позволили построить тепловую карту распределения мутаций для генов, идентифицированных в специфичных для CNA областях, согласно результатам которой выделены наиболее часто амплифицированные и делетированные гены в группе пациенток молодого возраста. В тройке лидеров первой группы гены *CAPN2*, *CDC73* и *ASB13*, наиболее часто делетирован ген *SGCZ*. Также с помощью логистической регрессии проводили оценку статистической связи между экспрессией генов и мутационного статуса CNA. Показано, что 16 областей амплификаций (*ASB13*, *ATP4B*, *CAPN2*, *CDH12*, *CNOT4*, *EPN1*, *PDE4DIP*, *PI4KAP2*, *PPP4R1*, *SLC35B1*, *SMAD2*, *SPDEF*, *FAM107B*, *MACROD2*, *MMP26*, *NFIL3*) и 1 область делеции (*PTEN*) демонстрируют значительные ассоциации с изменениями экспрессии их генов. Однако направленность ассоциации неоднозначна. 14 из 16 амплифицированных областей коррелировали с высокой экспрессией гена, в то время как другие 2 (включая *MMP26* и *SPDEF*) были связаны с низкой экспрессией гена. Например, мутантный статус усиления CNA в *ASB13*, по-видимому, приводит к более

высокой экспрессии гена. С другой стороны, было обнаружено, что область делеции, охватывающая *PTEN*, связана с высоким уровнем экспрессии генов [Chi C. et al 2018].

Интересные данные получены в работе испанских ученых. Авторы на примере 98 опухолевых образцов показали, что метилирование генов-супрессоров связано с абберациями числа копий при раке молочной железы. Исследовали наличие CNA в опухоли (*HER2*, *BIRC5*, *MYC*, *TOP2A*, *ESR1*, *MTDH*, *CCND1*, *CCNE1*, *EGFR*, *EMSY*, *ADAM9*, *IKBKB*, *CDH1*, *CDC6*, *CPD*, *FGFR1*, *MED1*, *MAPT*, *PRMD14*, *AURKA*) и метилирование промотора 24 генов опухолевых супрессоров: *TIMP3*, *APC*, *CDKN2A*, *MLH1*, *ATM*, *RARB*, *CDKN2B*, *HIC1*, *CHFR*, *BRCA1*, *CASP8*, *CDKN1B*, *PTEN*, *BRCA2*, *CD44*, *RASSF1*, *DAPK1*, *VHL*, *ESR1*, *TP73*, *FHIT*, *IGSF4*, *CDH13* и *GSTP1*. Определили CNA, амплификации или делеции для 20 изученных генов. Частота возникновения CNA варьировала от 7% (*ESR1*) до 52% (*MED1*) и оставалась выше 39% для *MYC*, *FGFR1*, *BIRC5*, *CCND1*, *HER2* и *MED1*. В среднем обнаружили 31,0% от общих аббераций на пациента. Кластерный анализ классифицировал образцы в две группы в соответствии с процентом метилирования промотора: высокометилированная группа (n=16), содержащая в основном гиперметилированные гены, и гипометилированная группа (n=82) с гипометилированными генами. Гены *ATM*, *CDKN2A*, *VHL*, *CHFR* и *CDKN2B* показали наибольшие различия в среднем процентном содержании метилирования между этими группами. Высокометилированные образцы показали более высокую долю CNA, чем гипометилированные (p<0,001, OR=1,62; IC 95% [1,26, 2,07]). *CDC6*, *MAPT*, *MED1*, *PRMD14* и *AURKA* показали существенные различия в процентах CNA между двумя группами, превышающие 22%. Показано также, что метилирование в *RASSF1*, *CASP8*, *DAPK1* и *GSTP1* обеспечивает наибольшую вероятность CNA [Murria R. et al 2015].

Встречаются в литературе данные по изучению наличия амплификаций/делеций генов некоторых отдельно выбранных хромосом при РМЖ и экспрессии генов в них локализованных. В статье Curtis C. [Curtis C. et al 2012] с соавторами на примере РМЖ были идентифицированы позиции в геноме, где изменения числа копий гена и связанное с ним изменение экспрессии гена происходили наиболее часто. Гены, в которых произошли такие изменения, включают *ZNF703*, *PTEN*, *MYC*, *CCND1*, *MDM2*, *ERBB2*, *CCNE1*, *MDM1*, *MDM4*, *CDK3*, *CDK4*, *SAMK1D*, *PI4KB* и *NCOR1* (амплификации) и *PPP2R2A*, *MTAP* и *MAP2K4* (делеции).

1.1.2 CNA-генетический ландшафт опухоли молочной железы при разных молекулярных подтипах

Есть сведения о связи CNA опухолевой ДНК с молекулярными подтипами РМЖ и экспрессионными характеристиками опухоли [Bergamaschi A., Kim Y.H. 2006, Smid M.et al 2011, Weigman V.J.et al 2012]. Например, амплификации 1q21-43 и 16p12 хромосомных регионов и делеция 16q21-q24 связаны с наличием на клетках опухоли рецепторов к эстрогенам, а делеции 4p13-16 и 5q11.2-q31 сайтов ассоциированы с отсутствием прогестероновых рецепторов [Climent J.et al 2007]. Также показано, что при HER2-позитивном РМЖ гиперэкспрессия гена *ERBB2* связана с увеличением числа копий 17q21 [Tabarestani S.et al 2014].

Получены также интересные результаты по изучению частоты хромосомных aberrаций для пациенток с самым агрессивным – трижды негативным молекулярным подтипом РМЖ. Burstein M.D. и соавторами на большой выборке пациенток (n=278) с трижды негативным раком молочной железы охарактеризовали особенности частоты встречаемости CNA и показали, что наибольшая частота встречаемости амплификаций (более 84%) обнаружена в длинном плече 1 хромосомы 1q31.2, а также 3q26.1 и 8q23.3 локусах, а наибольшая частота делеций – в 8p23.2, 9p21.3 и 10q23.31 локусах [Burstein M.D.et al 2015]. В 2019 году опубликована работа Gómez-Miragaya J. с коллегами, где также подробно описан CNA-ландшафт клеточной модели метастатического трижды негативного РМЖ. Анализ частоты встречаемости CNA в данной клеточной модели показал наличие наиболее часто встречающихся амплификаций в локусах 1q, 8q и 10p, а также часто встречающихся делеций в локусах 1p, 4p, 5q, 10q, 15q и Xp [Gómez-Miragaya J., Díaz-Navarro A. 2019]. Уникальной в этом отношении работой является исследование по изучению эволюции числа копий при трижды негативном РМЖ, опубликованное в 2016 году. В данной работе авторы секвенировали по 1000 отдельных клеток из опухолей 12 пациентов и идентифицировали 1-3 основных клональных субпопуляции в каждой опухоли, которые имели общую эволюционную линию, для каждой из которых проанализировали и сравнили наличие CNA. Согласно результатам работы, часто встречались амплификации 5 хромосомы, с увеличением количества копий генов *MAP3K1*, *ERBB2IP* и *PIK3R1*, а также 10p и 12q, с увеличением количества копий генов *GATA3* и *MDM2*, соответственно. Более того, отдельно были проанализированы данные по 6 уникальным метастабильным опухолевым клеткам с наличием неклональных CNA – амплификации 5p и 18p, авторы также указывают на то, что метастабильные опухолевые клетки приобретали единичные CNA в более поздние стадии развития опухоли. Более того, отмечается, что в дополнение к прохождению стабильных клональных экспансий опухоли у пациентов с трижды негативным РМЖ могут продолжать приобретать единичные CNA на более поздних стадиях развития опухоли. Тем не менее, результаты

работы показывают, что большинство aberrаций числа копий приобретается на самых ранних стадиях развития опухоли с последующим стабильным расширением клонального состава [Gao R. et al 2016]. В другой работе показано, что CNA, обнаруженные при трижды негативном РМЖ, включают амплификации в локусах 1q, 8q и 10p, делеции в локусах 5q и 8p, и, соответственно, амплификации генов *EGFR*, *FGFR2* и делеции *PARK2*, *PTEN* [Shah S.P., Roth A. 2012]. Примечательно, что при трижды негативном РМЖ не регистрируется одновременного наличия амплификации 1q и делеции 16q, как при ER-положительном раке молочной железы [Curtis C., Shah S.P. 2012].

Интересной работой является исследование Hui Chen с коллегами, в котором были проанализированы aberrации числа копий 42 образцов первичного рака молочной железы в зависимости от гормонального статуса, с оценкой экспрессии рецептора эстрогена (ER), рецептора прогестерона (PR) и рецептора эпидермального фактора роста человека (HER2). Выделяли опухоли с позитивным/отрицательным статусом по гормональным рецепторам (ER, PR) (HR+/-) и HER2+/- . Результаты геномного анализа показали, что CNA варьировалось от 0,2% до 65,7% во всех исследованных случаях (среднее значение-22,7%; медиана- 18,2%) Среднее количество CNA составляло 29,7% в группе HR+/HER2+, 19,5% в группе HR+/HER2-, 19% в группе HR-/HER2 + и 16,4% в группе HR-/HER2 + и достоверно не различалось среди четырех подтипов рака молочной железы (p=0,15). При этом выявлено значительное увеличение числа копий в 8p11 в группе HR+/HER2-, в 8q в группах HR+ и HR-/HER2- и в 17q12-q21 в группе HER2+ [Chen H. et al 2017].

1.1.3 CNA-генетический ландшафт опухоли молочной железы и гематогенное метастазирование

Отдельно стоит отметить исследования, посвященные изучению ассоциации наличия CNA и метастазирования при РМЖ. В исследовании В. Sahlia и соавторов проведен комплексный геномный и эпигеномный анализ опухоли молочной железы с наличием метастазирования в головной мозг (n=23). Было проведено секвенирование генома, которое объединило данные по количеству копий генов, экспрессии генов и наборов данных метилирования ДНК в образцах метастазов. Идентифицировали частые амплификации в 1q, 5p, 8q, 11q и 20q и частые делеции в 8p, 17p, 21p и Xq. Часто амплифицированные и сверхэкспрессированные гены включали *ATAD2*, *BRAF*, *DERL1*, *DNMTRB* и *NEK2A*. Гены *ATM*, *CRYAB* и *HSPB2* в свою очередь были обычно гипоекспрессированы. Авторами сделан вывод о том, что гены *ATAD2* и *DERL1* были среди часто амплифицированных и сверхэкспрессируемых генов, что позволяет предположить, что они могут играть важную роль в метастазировании в головной мозг

при раке молочной железы. При этом, *ATAD2* является транскрипционным коактиватором *ESR1*, необходимым для индукции экспрессии генов-мишеней эстрадиола, таких как *CCND1*, *MYC* и *E2F1* [Salhia B. et al 2014a]. В другой работе авторы проводили сравнительный геномный анализ первичных опухолей и метастазов при раке молочной железы. Сравнили число копий ДНК и мутационные профили первичного рака молочной железы и метастазов у 23 пациентов, используя сравнительную геномную гибридизацию и секвенирование следующего поколения 365 онкогенов. Медиана задержки между диагнозом первичного рака и профилированным метастазированием составила 36 месяцев (диапазон от 0 до 149). Что касается метастатических образцов, два пациента не получали какой-либо системной терапии до удаления или биопсии, тогда как 21 пациент получал системную терапию, главным образом химиотерапию и гормональную терапию, а также химиотерапию и таргетную терапию (анти-ERBB2 и ингибитор *PI3K*, *BKM120*). Основными метастатическими сайтами были печень, кожа и контралатеральные лимфатические узлы. При сравнении профиля генома 23 первичных опухолей и 23 метастазов показано, что в опухолевых образцах наиболее часто амплифицированные регионы были на 1q, 8q, 11q, 17q и 20q, делетированные регионы на 8p, 11q и 16q, при этом профили генома метастазов показали аналогичные измененные области с аналогичными частотами изменений. Как показано с помощью корреляционной матрицы, генерируемой со всеми зондами, каждый метастатический образец более сильно коррелировал со своей парной первичной опухолью, чем с другими образцами. Иерархическая кластеризация данных по количеству копий ДНК показала, что большинство из парных первичных и метастатических образцов (22 пар из 23) сгруппирована вместе, что предполагает генетическое сходство и потенциальное клональное отношение. Затем провели сравнение CNA на известных онкогенных драйверах, расположенных в регионах, часто амплифицированных при раке молочной железы: *ERBB2* (17q12), *CCND1* (11q13.3), *FGFR1* (8p11.23), *MYC* (8q24), and *PAK1* (11q14.1). *ERBB2* был наиболее часто амплифицированным, а согласование состояния с амплификацией/без амплификации между первичными опухолями и парными метастазами составила 100% для *ERBB2* и *FGFR1*, 96% для *CCND1* и *PAK1*, и 88% для *MYC* [Bertucci F. et al 2016]. В работе Cathy B. Moelans с коллегами изучено изменения числа копий в регионе 8p11-12 на 244 образцах первичного рака молочной железы. Было показано, что наличие ≥ 1 амплификации или ≥ 1 делеции в области 8p11-12 свидетельствует об ухудшении общей выживаемости пациентов. После коррекции на возраст, стадию, подтип, размер опухоли и статус ER/PR/HER2 наличие делеции в области 8p11 была признана независимой прогностической переменной для общей выживаемости

($p=0,022$). Присутствие, по крайней мере, одной амплификации высокого уровня в 8p было показателем для худшей безрецидивной выживаемости в многопараметрическом анализе ($p=0,038$). Только в ER-позитивных опухолях делеция в регионе 8p12 была связана с ухудшением безрецидивной выживаемости ($p=0,041$). Более того, делеции *FGFR1* и *ZNF703* (8p11) наблюдалась у 25% пациентов, что коррелировало с более низкими уровнями экспрессии мРНК и независимо предсказывало низкую выживаемость, особенно у пациентов, не получавших системное лечение. Амплификация *FGFR1* в 8p11 и делеция *DUSP26* и *UNC5D*, расположенных в 8p12, независимо предсказывали худшую выживаемость рецидивов и метастазов. Амплификация в регионе 8p12, включая *WRN*, *NRG1*, *DUSP26* и *UNC5D*, наблюдаемые у 20-30% пациентов, были связаны с более высокой экспрессией мРНК и независимо предсказывали чувствительность к химиотерапии. Делеции в 8p12 независимо предсказывали устойчивость к лучевой терапии [Moelans C.V. et al 2018].

1.1.4 Изменение CNA-генетического ландшафта опухоли молочной железы в процессе НХТ

Крайне малочисленны данные, представленные в литературе по вопросу изменения CNA-генетического ландшафта опухоли молочной железы в процессе неoadъювантной химиотерапии. В работе Justin M. Valko с соавторами представлены результаты молекулярного профилирования трижды негативного рака молочной железы после неoadъювантной химиотерапии. При оценке изменений в процессе НХТ, были обнаружены амплификации *de novo* (не обнаруженные в образце до лечения) и обогащение (обнаруженное в образце до лечения, но увеличенное в образце после лечения) при оценки мутационных аллелей и CNA. Многие из этих обогащений и амплификаций *de novo* произошли в генах, включающих регуляторы клеточного цикла и гены пути PI3K / mTOR. Также при дальнейшем исследовании CNA в парных образцах авторы обнаружили, что количество копий членов семейства *AKT* и *CCND* было увеличено в процессе НХТ. Количество копий *MYC* и *MCL1* было увеличено в нескольких случаях после НХТ. Амплификаций *MCL1* может быть связана с резистентностью *de novo* к химиотерапии

Амплификации генов *MCL1* (54%) и *MYC* (35%) были обнаружены после НХТ. Амплификации *MYC* были обнаружены в основном в трижды негативных опухолях (42% в трижды негативных опухолях по сравнению с остальными 10%, $P = 0,018$). Также в остаточной опухоли увеличивалась частота делеций *PTEN* и амплификаций *JAK2*. Эти приобретения *de novo* могут играть роль в приобретенной терапевтической

резистентности. Амплифицированы гены *CCND1*, *CCND2*, *CCND3*, *CDK4*, *IGF1R*, *PIK3CA*, *RAF1*, *JAK2*, *MDM2*, *MYC*, *MCL1*, делетированы *AKT2*, *PTEN*. Многие из амплифицированных генов входят в группу регуляторов клеточного цикла [Balko J.M. et al 2014].

Важно рассмотреть также результаты работы Charissa Kim и коллег. Исследование также посвящено эволюции химиорезистентности при трижды негативном раке молочной железы. В исследование включены 20 пациентов, которые получали НХТ: антрациклин (эпирубицин) и таксан (доцетаксел) в течение двух курсов, после чего четыре курса в сочетании с ингибитором ангиогенеза бевацизумабом. Образцы биопсии собирали до лечения, после двух циклов терапии (в середине лечения) и во время хирургического удаления остаточной резидуальной, которое произошло после шести курсов НХТ. Секвенирование экзома было выполнено на образцах от 20 пациентов, в то время как более детальный анализ с использованием одноклеточного секвенирования ДНК и РНК был выполнен для восьми пациентов. Среди 20 пациентов у 10 не было выявлено мутаций после лечения, в то время как 10 показали остаточные мутации после лечения. Примечательно, что авторы не наблюдали увеличения мутационной нагрузки в ответ на НХТ ни у одного из пациентов. Чтобы исследовать эволюцию числа копий в процессе НХТ, провели секвенирование на 900 отдельных клетках из соответствующих образцов 8 пациентов, из которых четыре пациента с клональным вымиранием и четырех пациента с клональной персистенцией на основе их классификации по данным секвенирования экзома. В первой группе пациентов было показано, что поликлональные опухоли имели общих эволюционных предков, о чем свидетельствуют общие CNA генов *MET*, *MYC* и *PTEN* в P6; *MDM4*, *EGFR* и *PTEN* в P2; *MYC* и *PTEN* в P9; *MYC*, *MET*, *TP53* и *CDKN2A* в P1. Эти опухоли также имели CNA, которые появились на более поздних стадиях эволюции опухоли. Однако, независимо от количества клональных субпопуляций, НХТ приводила к исчезновению опухолевых клеток у этих пациентов. Далее оценили эволюцию числа копий у 4 пациентов с клональной персистенцией (группа 2). Обнаружено, что у всех четырех пациентов меньшая часть опухолевых клеток до лечения сгруппировалась с опухолевыми клетками после лечения, что позволяет предположить, что они имеют устойчивый генотип. Чтобы идентифицировать специфические CNA в клонах, связанных с резистентностью, авторы вычислили согласованные профили числа копий из отдельных клеток. Хотя большинство CNA были распределены между субклонами, также идентифицировали специфические CNA, которые встречались исключительно в хеморезистентных клонах. В образце P14 резистентный клон имел две фокальные делеции на 3p, включая делецию 3p26 (*IL5RA*) и 3p24-22 на (*RARB*). Этот клон

расширился после НХТ с 7,7% до 71,8%. В P11 два клона, связанных с резистентностью, включая клон С, который увеличился с 5,7% до 41,4%, и клон Е, который появился в середине лечения на 2,6% и расширился до 37,8%, появились после НХТ. Связанный с резистентностью клон С имел делеции 4p15 (*PCDH7*, *DTHD1*), 11q21-22 (*MAML2*), 13q (*RBI*, *BRCA2*, *FOXO1*). Напротив, устойчивый клон Е имел делецию в 6q и 20chr (*PAK7*). Экспансия двух минорных клонов с разными генотипами предполагает конвергентную эволюцию к устойчивому фенотипу. CNA, специфичные для устойчивых субклонов, также были идентифицированы в P12 и P15. Однако полученные данные не выявили каких-либо рецидивов CNA в резистентных кломах среди четырех пациентов второй группы. Также при помощи дифференциального анализа экспрессии идентифицированы 59–275 ДЭГ (дифференциально экспрессируемые гены), повышающие регуляцию в химиорезистентных опухолевых клетках после лечения у каждого пациента. В список включены известные гены *MYC*, *ERBB3*, *KIT* и *PIK3R1* [Kim C. et al 2018].

Годом позже опубликована статья Loibl S. С соавторами, в которой благодаря методу NGS проведено комплексное исследование молекулярных событий при раке молочной железы на выборке n=851. Авторами оценена значимость геномных изменений для ответа на неoadъювантную химиотерапию в исследовании GeparSepto. Панель исследования включала 16 генов для анализа мутаций (*AKT1*, *BRAF*, *CDH1*, *EGFR*, *ERBB2*, *ESR1*, *FBXW7*, *FGFR2*, *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, *SF3B1*, *TP53*, *HNFI1A*, *PIK3CA*, *PTEN*) и 8 генов для анализа изменения числа копий (*CCND*, *ERBB2*, *FGFR1*, *PAK1*, *PIK3CA*, *TOP2A*, *TP53*, *ZNF703*). Было показано, что наиболее распространенными геномными изменениями в процессе НХТ были мутации *TP53* (38,4%) и *PIK3CA* (21,5%) и 8 различных амплификаций (*TOP2A* 34,9%; *ERBB2* 30,6%; *ZNF703* 30,1%; *TP53* 21,9%; *PIK3CA* 24,1%; *CCND1* 17,7%; *PAK1* 14,9%; *FGFR* 12,6%). Все остальные изменения имели распространенность менее 5% [Loibl S., Treue D. 2019].

Исследование С. Sotiriou и соавторов, в котором с использованием CytoScan HD arrays проанализированы данные по 185 пациенткам с РМЖ показало, что распределение CNA было сходным с распределением, наблюдаемым у пациентов с HER2+ из наборов данных METABRIC и TCGA. Амплификация *ERBB2* была предиктором высокого объективного ответа на НХТ (p=0,0007). Уровень геномной нестабильности был связан с ответом на НХТ независимо от амплификации *ERBB2*. GISTIC анализ выявил 159 повторяющихся регионов CNA в остаточной резидуальной опухоли при сравнении с биопсией. Амплификации 2 областей 6q23-24 в биопсии были достоверно связаны с более высоким объективным ответом на НХТ (p=0,00005 и p =0,00087). Наиболее значимый регион 6q23-24 содержал 39 генов, некоторые из которых по уровню экспрессии также

предсказывали объективный ответ на НХТ (например, *MAP3K5*). Однако, не было обнаружено амплифицированной области или гена, коррелирующих с прогнозом безрецидивной выживаемости, после множественной тестовой коррекции [Sotiriou C. et al 2017].

1.2 Опухолевые стволовые клетки при раке молочной железы

Стволовые клетки (СК) как таковые характеризуются способностью к самообновлению и образованию дифференцированных потомков. Регуляция этих процессов имеет основополагающее значение для поддержания пула стволовых клеток в ткани [Reya T. et al 2001]. Стволовые клетки в свою очередь дают начало потомству, способному дифференцироваться во все другие типы клеток [Wu J. and Belmonte J.C.I. 2016]. СК не могут выживать ни вне окружающей среды, ни в отсутствие специфических факторов и цитокинов [Guo G. et al 2016, Ouspenskaia T. et al 2016]. Интересно, что окружающая среда и/или специфические стимулы могут способствовать появлению новых СК, поскольку клетки в целом сохраняют способность дедифференцироваться и возвращаться к состоянию развития, а также способны к симметричному делению для увеличения популяции СК [Daniel M.G. et al 2016, Wahlster L. and Daley G.Q. 2016].

Известно, что все типы злокачественных новообразований состоят из различных популяций опухолевых клеток, которые придают опухоли свойства гетерогенности. Среди всех популяций клеток опухолевые стволовые клетки (ОСК) играют ключевую роль в возникновении и прогрессировании рака. Такие злокачественные клетки демонстрируют все аспекты стволовости, вопреки физиологической роли взрослых СК, неспособны поддерживать гомеостаз тканей из-за неконтролируемого деления и поддерживают прогрессирование злокачественных новообразований [Kaseb H.O. et al 2016]. Особенности стволовости, характерные для СК и ОСК, обеспечивают поддержание и выживание опухоли за счет потенциала самообновления и дифференцировки, а также поддержания организации микроокружения [Gedye C. et al 2016, Visvader J.E. and Clevers H. 2016].

Таким образом, опухолевые стволовые клетки, это небольшая популяция клеток в опухоли, обладающая свойствами стволовости, поддерживающая прогрессирование рака - повышенную способность к самообновлению, росту, метастазированию и размножению. ОСК могут обучать соседние клетки снабжать их питательными веществами и сотрудничать в условиях оторванности от иммунной системы, создавая среду, благоприятную для роста опухоли. ОСК образуют гетерогенные клеточные популяции, часто с высоким потенциалом пластичности [Cabrera M.C. et al 2015, Chaffer C.L. et al 2011], высокой устойчивостью к стрессовым факторам в пределах

микроокружения опухоли (таких как низкий уровень кислорода или питательных веществ) или к индукции гибели клеток под действием химиотерапевтических препаратов - устойчивостью к традиционной противоопухолевой терапии [Borovski T. et al 2011, Chen W. et al 2016, Plaks V. et al 2015], и состоянием покоя как общего ответа на стрессорное воздействие [Chen W., Dong J. 2016].

Опухолевые стволовые клетки молочных желез (ОСКм) существуют в виде очень небольшой доли клеток в молочной железе, которые недифференцированы и могут продуцировать новые ОСКм посредством самообновления, а также вызывать дифференцировку клетки посредством симметричных и асимметричных делений [Sotiropoulos C. et al 2006]. Предполагается, что асимметричные деления приводят к появлению прогениторных клеток [Aragona M., Dekoninck S. 2017, Lloyd-Lewis B., Harris O.B. 2017, Soteriou D. and Fuchs Y. 2018]. Считается, что функционирование ОСКм происходит через тесное взаимодействие с их специфической клеточной средой, которая также называется нишей стволовых клеток молочной железы [Sreekumar A. et al 2015]. Конкретные места расположения этих клеток с их уникальными характеристиками самообновления и дифференцировки остаются предметом дискуссий, равно как и их роль при раке молочной железы. ОСКм часто называют медленно-циклическими и долгоживущими стволовыми клетками или прогениторными клетками, которые существуют как единая популяция. Существует еще много споров по поводу возможности дифференцировки данных клеток, а также их пластичности [Mascre G. et al 2012].

1.2.1 Сигнальные пути, регулирующие опухолевые стволовые клетки молочной железы

Многие мутации, обнаруженные в опухолях, так или иначе участвуют в активации путей самообновления клеток, в том числе и стволовых клеток. При раке множественные пути самообновления клеток могут не только усиливаться, но и непрерывно активироваться. Эта активация программы самообновления является неотъемлемой частью стволовости ОСК, активно способствуя прогрессированию опухоли и метастазированию, вызывая высокий клеточный оборот и продукцию предшественников [Cabrera M.C., Hollingsworth R.E. 2015, Mani S.A. et al 2008, O'Brien C.A. et al 2010].

Сигнальные пути WNT (wingless), Sonic Hedgehog (SHH), NOTCH, BMP/TGF- β (bone morphogenetic proteins/transforming growth factor β (костный морфогенетический белок/трансформирующий фактор роста β)), NRF2 и PI3K/АКТ/mTOR способствуют самообновлению стволовых и/или прогениторных клеток в различных органах. При нарушении регуляции эти пути могут способствовать онкогенезу.

В настоящее время в мировой литературе опубликованы данные по каждому из вышеуказанных сигнальных путей.

Каноническая передача сигналов WNT/B-catenin при раке молочной железы

Каноническая передача сигналов WNT играет важную роль во многих биологических и патологических процессах, таких как развитие молочной железы и онкогенез молочной железы, эмбриональную индукцию, формирование клеточной полярности, а также в поддержании гомеостаза тканей [Czerwinska P. and Kaminska B. 2015]. Каноническая передача сигналов WNT/B-catenin инициируется связыванием секретируемых белков WNT с рецепторами Frizzled и рецептором липопротеинов низкой плотности LRP5/6. Взаимодействие WNT с рецепторами индуцирует ингибирование белка GSK-3 β , который является негативным регулятором пути WNT, и стимулируется β -катенином. Ингибирование белка GSK-3 β приводит к накоплению β -катенина в цитоплазме и его последующей транслокации в ядро для действия в качестве активатора ко-транскрипции вместе со связывающим белком CBP и факторами: усиливающим факторы транскрипции Т-клеток (TCF/LEF), онкогенами MYC и CCND1 [58-61] [Mohammed M.K.et al 2016, Nusse R. and Clevers H. 2017, Yang K.et al 2016].

При раке молочной железы передача сигналов WNT активируется через аутокринный механизм. Хотя мутации в передаче сигналов WNT не распространены при раке молочной железы, было показано, что приблизительно в 50% клинических случаев РМЖ наблюдается высокий уровень стабилизированного β -катенина, а также высокая частота амплификаций генов позитивных стимуляторов WNT [Bafico A.et al 2004, Krishnamurthy N. and Kurzrock R. 2018], например, DVL – положительный регулятор передачи сигналов WNT амплифицирован в 50% случаев при РМЖ [Nagahata T.et al 2003]. И наоборот, связанный с Frizzled белок FRP1 (ингибитор WNT) делетирован в 78% случаев рака молочной железы и его делеция связана с плохим прогнозом [Veecck J.et al 2008]. Подавление активности ингибитора WNT DKK1 показано при метастатическом РМЖ [Zhou X.-l.et al 2010].

Путь WNT/B-catenin активирован в базально-подобных опухолях молочной железы и это коррелирует с худшим прогнозом [Khramtsov A.I.et al 2010]. Активированный β -катенин способствует развитию трижды негативного и HER2+ РМЖ [Schade B.et al 2013]. В этой связи, новым направлением терапии стала восстановление ингибиторов Wnt, которые не экспрессируются в опухоли из-за метилирования промоторов или делеции генов ингибиторов WNT в опухоли. Восстановление ингибиторов эффективно замедляет рост опухолей в эксперименте [Li M.et al 2018, Yin X.et al 2013].

Экспрессия WNT1 в эпителиальных клетках молочной железы человека увеличивает самообновление опухолевых стволовых клеток, устойчивость к апоптозу и неспособность к старению [Kakarala M. and Wicha M.S. 2008]. Согласно данным F. Vaillant и соавторов, расширенный пул опухолевых стволовых клеток молочной железы был идентифицирован из популяции прогениторных клеток на мышинной модели MMTV за счет активности Wnt1 [Vaillant F. et al 2008]. Кроме того, ингибирование WNT1 изменяет фенотип стволовых клеток CD44+CD24-ALDH1- и уменьшает их способность к образованию опухолей и клеточной миграции [Jang G.-B. et al 2015]. Подавление передачи сигналов GSK3/ β -catenin через ингибирующую активность протеинкиназы D1 (PRKD1) достаточно для снижения стволовости и химиорезистентности клеток рака молочной железы [Kim d.Y. et al 2016].

Недавние исследования показали еще несколько путей, по которым Wnt-сигналинг участвует в поддержании стволовости. Модуляции ядерного антиген-ассоциированного фактора пролиферирующих клеток (PAF) в ОСК молочной железы способствует их способности к самообновлению и гетерогенности [Wang Xinet al 2016]. Выделяя разные по латентности опухолевые клетки из клеточных линий рака легких и молочной железы, Malladi S. и коллеги продемонстрировали, что экспрессия Sox2 или Sox9 активирует DKK1, естественный ингибитор Wnt, и заставляет клетки переходить в состояние покоя [Malladi S. et al 2016]. Gujral T. и соавторы также обнаружили, что уровень Wnt5a/b и его рецептора Frizzled2 повышены в опухолях и в нескольких линиях опухолевых клеток (молочной железы, легких, печени и толстой кишки). Frizzled2 индуцирует ЭМП по неканоническому пути, стимулируя стволовость [Gujral T.S. et al 2014]. Таким образом, передача сигналов WNT может играть важную роль в поддержании свойств опухолевых стволовых клеток молочной железы.

Передача сигналов Notch при раке молочной железы

В настоящее время известно пять Notch-лигандов: Delta-like (Dll) 1, 3, 4 и Jagged (JAG) 1, 2, которые являются отдельными трансмембранными белками. Существует четыре рецептора Notch, связывающихся с этими лигандами и действующими через один и тот же основной сигнальный путь. Лиганд Notch на одной клетке связывается с внеклеточным доменом рецептора Notch на другой соседней клетке, затем лиганд-рецепторный комплекс Notch подвергается нескольким ключевым протеолитическим расщеплениям, образуя внеклеточный домен Notch и внутриклеточный домен Notch (NICD). NICD действует как транскрипционный фактор и регулирует нижестоящие гены-мишени [Radtke F. and Raj K. 2003]. Высокий уровень экспрессии Jag1 и/или Notch1 в опухоли коррелирует с плохим исходом и является независимым прогностическим показателем при раке молочной железы [Dickson B.C. et al 2007, Reedijk M. et al 2008].

Гиперэкспрессия других компонентов пути Notch, также связана с уменьшением выживаемости пациентов с РМЖ [Han J.et al 2011]. Передача сигналов Notch может способствовать метастазированию путем активации программ ЭМП и активации ангиогенеза, за счет потери NUMB, эволюционно консервативного белка, который называют опухолевым супрессором [Zhang J.et al 2016].

При раке молочной железы и опухолях, полученных из клеточной линии рака молочной железы, Notch3 и Jag1 являются ключевыми регуляторами обновления ОСК и их выживания при гипоксии [Sansone P.et al 2007]. Экспрессия Notch значительно повышалась в ОСК при гипоксии и приводила к устойчивости к ингибированию PI3K/mTOR пути [Bhola N.E.et al 2016]. Путь Notch играет особую роль в увеличении количества ОСК при симметричном делении [Harrison H.et al 2010a] и способствует дедифференцировке прогениторных клеток, стимулируя ЭМП [Nigam A. 2013, Sethi N. and Kang Y. 2011]. Ингибирование Notch1 специфическими антителами значительно уменьшает субпопуляцию CD44+CD24- ОСК и частоту метастазов в мозг при РМЖ [Czerwinska P. and Kaminska B. 2015]. Напротив, клетки, экспрессирующие Notch демонстрировали способность к самообновлению, увеличивая экспрессию маркеров стволовых клеток, таких как Oct4, Sox2 и CD44 [Lee S.H.et al 2016].

В целом, нарушение регуляции передачи сигналов Notch инициирует развитие нескольких типов рака, в том числе и РМЖ [Teodorczyk M. and Schmidt M.H. 2015]. Клетки, экспрессирующие Notch, проявляли более высокую способность к инициации опухоли по сравнению с Notch-негативными клетками [D'Angelo R.C.et al 2015], передача сигналов Notch играет важную роль в поддержании свойств стволовых клеток молочной железы.

Передача сигналов Hedgehog (HH) и Sonic Hedgehog (SHH) при раке молочной железы

Передача сигналов SHH играет решающую роль в росте и дифференцировке клеток во время формирования эмбриональной ткани и в развитии молочной железы [Jiang J. and Hui C.-c. 2008]. Разрушение его нижестоящих транскрипционных мишеней, PTCH-1 или GLI-2 приводит к серьезным дефектам морфогенеза протоков молочной железы [García-Zaragoza E.et al 2012]. Было показано, что разрушение этих генов также происходит при РМЖ, что показывает значение SHH в онкогенезе опухоли молочной железы. Активация SHH может способствовать рецидиву при РМЖ и может служить предиктором послеоперационного рецидива. Одним из механизмов этого, является корреляция с инвазивностью опухолевых клеток молочной железы при высокой экспрессии SHH, PTCH-1, GLI-1 и SMOH [Jeng K.-S.et al 2014].

В пути hedgehog трансмембранный белок Patched (PTCH) является рецептором для семейства сигнальных молекул hedgehog (Sonic-Shh, Indian-Ihh и Desert-Dhh) [Czerwinska P. and Kaminska B. 2015] и связан с ранним эмбриональным онкогенезом [Nigam A. 2013]. PTCH конститутивно подавляет активность пути Hh посредством его взаимодействия с трансмембранным белком Smoothed (SMO). При этом отмечается, что гиперэкспрессия этих компонентов пути, то есть SHH, PTCH1 и GLI1 обнаруживается в большинстве случаев при РМЖ [Czerwinska P. and Kaminska B. 2015].

В целом, активация сигнального пути Hedgehog связана с развитием нескольких типов рака, включая опухоли молочной железы, мозга и поджелудочной железы [Yang L. et al 2010]. Показано, что передача сигналов Hh регулирует самообновление в стволовых клетках молочной железы [Liu S. et al 2006]. Все больше доказательств подтверждают роль пути Hh в развитии метастазирования, в частности, посредством инициации ЭМП [Ke Z. et al 2015, Steinway S.N. et al 2014] посредством активации белков, таких как MMP-9 и экспрессии E-кадгерина [Fan H.-X. et al 2014].

Передача сигналов BMP/TGF- β при раке молочной железы

Согласно данным некоторых исследований, было показано, что стимуляция ЭМП TGF- β происходит вместе с образованием ОСКм [Mani S.A., Guo W. 2008]. ОСКм с фенотипом CD44⁺CD24⁻ демонстрируют повышенную экспрессию многих генов, которые, как известно, являются мишенями TGF- β , и они типичны для мезенхимальных и мигрирующих типов клеток. В одном из экспериментов, когда клетки MDA-MB-231 (модель РМЖ) инъецировали бестимусным мышам, наблюдали изменение действия TGF- β . Способствующий развитию рака (онкогенные и метастатические) TGF- β был нейтрализован гетеродимером BMP7 или BMP2/7, что уменьшило активность сигнального пути Smad и увеличило инвазивность раковых клеток. Кроме того, активность выживания и антиапоптотических путей часто увеличивается в ОСК [Czerwinska P. and Kaminska B. 2015].

Передача сигналов NRF2 при раке молочной железы

NRF2-опосредованный антиоксидантный путь является новым механизмом, который, частично, объясняет химио-, радиоустойчивость опухолевых стволовых клеток. В ОСКм, по сравнению с обычными клетками молочной железы, была обнаружена значительно более высокая экспрессия NRF2 и генов-мишеней этого пути. ОСКм извлекают выгоду из более низкого уровня АФК (активных форм кислорода) при высокой экспрессии NRF2 и генов-мишеней этого пути. Это приводит к снижению повреждения при химио/радиотерапии. В тоже время «молчание» NRF2 задерживает образование маммосфер и изменяет устойчивые к терапии фенотипы в клетках MCF-7 [Ryoo I.-g. et al

2015]. С другой стороны, некоторые гены, участвующие в пентозофосфатном пути (PPP), также регулируются гиперактивированным NRF2. NRF2 может подтолкнуть покоящиеся опухолевые клетки к пролиферации или обойти вызванную лечением метаболическую блокаду, называемую «адаптацией метаболической сети» [Mitsuishi Y. et al 2012]. Поскольку опухолевые клетки генерируют больше АФК, чем нормальные клетки, а для ОСК требуется низкий уровень АФК для поддержания покоя и самообновления, считается, что совместное использование химиотерапевтических веществ, которые ослабляют их антиоксидантную способность, делает опухоли уязвимыми для химио- и радиотерапии, при этом нормальные ткани практически не подвержены влиянию. Для этой цели на доклинических моделях рака были протестированы различные природные ингибиторы NRF2, такие как apigenin, all-trans retinoic acid, brusatol, chrysin, cryptotanshinone, luteolin, trigonelline, и wogonin [Bai X. et al 2016]. К сожалению, точные механизмы, посредством которых эти ингибиторы оказывают ингибирующее действие на NRF2, плохо изучены, но, тем не менее, это обеспечивает новый подход к химиотерапии.

Передача сигналов PI3K/AKT/mTOR при раке молочной железы

Активация передачи сигналов PI3K при РМЖ часто отмечалась в последние несколько лет в литературе и может быть в основном обусловлена генетическими мутациями в компонентах этой сети. Например, мутации в тирозинкиназном рецепторе могут aberrантно повышать активность PI3K [Polyak K. and Weinberg R.A. 2009], потеря функции PTEN обнаруживается примерно у 50% пациентов с РМЖ [Pandolfi P.P. 2004]. Соматические мутации в PIK3CA широко распространены и они также могут увеличивать каталитическую активность PI3K при РМЖ. Мутация PIK3CA запускает амплификацию centrosom и повышает толерантность к тетраплоидизации в клетках РМЖ [Berenjeno I.M. et al 2017]. PIK3CA может индуцировать необратимые изменения генома и способствовать онкогенезу, что свидетельствует об онкогенной роли PI3K. В работе Chang L. и соавторов продемонстрировано, что активация сигнального пути PI3K/AKT/mTOR была связана с усилением фенотипов ОСК и индукцией ЭМП в радиорезистентных клетках рака предстательной железы [Chang L. et al 2013]. В ОСКм сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR связан с CD44-метастазами. Кроме того, на примере трижды негативного РМЖ показано, что устойчивая стволовость также частично зависит от регулируемой PI3K трансактивации нескольких путей самообновления, таких как передача сигналов Wnt/ β -catenin [Solzak J.P. et al 2017].

Ингибирование сигнального пути PI3K для ингибирования роста опухоли не является новой идеей. Ингибиторы, такие как everolimus и temsirolimus, которые показали лучшие фармакодинамические параметры и фармакокинетические свойства, чем

garapycin, использовались в течение нескольких лет и продемонстрировали неплохую эффективность [Cidado J. and Park B.H. 2012]. Однако, несмотря на то, что ингибиторы первого и второго поколения могут продемонстрировать хороший ингибирующий эффект на передачу сигналов PI3K, их действие на ОСК ограничено. Ингибирование PI3K ингибитором buparlisib может стимулировать путь Wnt с обратной связью, который придает трижды негативным клеткам РМЖ стволоподобный фенотип [Solzak J.P., Atale R.V. 2017]. Кроме того, воздействие ингибиторов PI3K может стимулировать зависимую от GLP-1 стволовость в клетках MDA-MB-231 и MCF-7 [Posada I.M.et al 2017].

Показано, что мутации PIK3CA вызывают дедифференцировку прогениторных опухолевых клеток протоков молочной железы в стволовые опухолевые клетки [Koren S.et al 2015].

1.2.2 Значение опухолевых стволовых клеток для метастазирования рака молочной железы

На сегодняшний день установленным фактом является то, что больные раком молочной железы подвергаются риску развития метастазов в течение всей своей жизни [Scully O.J.et al 2012]. РМЖ преимущественно метастазирует в кости (частота встречаемости 47–60%), печень (частота встречаемости 19–20%), легкое (частота встречаемости 16–34%) и мозг (частота встречаемости 10–16%) [Chen W.et al 2018, Riggi N.et al 2018]. Что касается первичной опухоли, которая впоследствии метастазировала, то она является весьма неоднородной и это сильно затрудняет оценку факторов риска метастазирования [Santa-Maria C.A. and Gradishar W.J. 2015]. Изучалась геномная эволюция метастазирования РМЖ - 299 образцов от 170 пациентов с локально рецидивирующим или метастазировавшим раком молочной железы - и было обнаружено, что метастазирование или рецидив распространяются от первичных опухолей с дальнейшим приобретением мутаций и независимой эволюции метастазов, поскольку большинство приобретенных мутаций в отдаленных метастазах не были обнаружены в первичных опухолях [Yates L.R.et al 2017]. Результаты обширных геномных исследований показали, что первичные опухоли и метастазы различных типов рака тесно связаны с генетической точки зрения, но не было обнаружено генетических изменений, которые однозначно прослеживались бы до возникновения метастазирования [Garraway L.A. and Lander E.S. 2013, Naxerova K. and Jain R.K. 2015, Vogelstein B.et al 2013]. Эти результаты дают возможность предположить, что метастазирующие клетки могут происходить из субпопуляции в первичной опухоли и обладают генетическими изменениями,

необходимыми для роста как первичной, так и метастатической опухоли [Riggi N., Aguet M. 2018].

Небольшая субпопуляция ОСК, которая находится на вершине онкогенной иерархии, может сохранять плюрипотентность и давать начало гетерогенному, дифференцированному потомству, сохраняя при этом свою собственную численность [Riggi N., Aguet M. 2018]. Учитывая тот факт, что ОСК проявляют свойства, инициирующих опухоль клеток, возможно, что они также могут обладать способностью к метастазированию, выступая в качестве клеток, инициирующих развитие метастатических колоний [Celià-Terrassa T. and Kang Y. 2016, Oskarsson T. et al 2014, Peitzsch C. et al 2017]. Предполагается, что латентная фаза онкогенеза молочной железы может включать распространение клеток на ранней, предсимптомной стадии развития первичной опухоли. Диссеминированные опухолевые клетки остаются необнаруженными в течение многих лет, прежде чем проявлять клинически идентифицируемые метастазы [Hartkopf A.D. et al 2014, Hosseini H. et al 2016]. Спящие опухолевые клетки со свойствами стволовых клеток могут быть активированы в ответ на повреждение, вызванное химиотерапией, чтобы способствовать образованию новой опухоли или метастаза [Soteriou D. and Fuchs Y. 2018]. Тем не менее, убедительные клинические доказательства для установления механистической связи между ОСК и метастазированием опухоли отсутствуют, хотя на моделях мышей было показано, что клетки, инициирующие метастазирование, могут существовать в ОСК рака молочной железы. Кроме этого, предполагается, что циркулирующие опухолевые клетки в крови могут играть активную роль в метастазировании, и наличие ЦОК коррелирует с плохим прогнозом и увеличением количества метастатических участков у онкобольных [Bacelli I. et al 2013].

Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) является важным клеточным процессом, который связан с метастазирующими опухолевыми клетками [Lamouille S. et al 2014, Nieto M.A. et al 2016]. ЭМП необходим для осуществления отдельными эпителиальными клетками мезенхимального движения. Мигрирующие опухолевые клетки при помощи ЭМП могут претерпевать изменения от эпителиального до мезенхимоподобного фенотипа [Riggi N., Aguet M. 2018]. Этот процесс является обратимым. Восстанавливать свой эпителиальный фенотип клетки могут посредством мезенхимально-эпителиального перехода (МЭП) [Nieto M.A., Huang R.Y.-J. 2016]. На экспериментальных моделях показано, что клетки в состоянии ЭМП также способствуют метастазированию соседних не-ЭМП клеток, посредством активации Hedgehog / GLI сигнального пути [Neelakantan D. et al 2017]. Кроме того, процесс ЭМП может быть частичным и мезенхимальные признаки могут накладываться на эпителиальный

интерфейс, что играет роль в метастазировании [Sánchez-Tilló E. et al 2012, Tsai J.H. and Yang J. 2013]. Недавно была показана регуляция ЭМП при гипоксии в микроокружении опухоли [Ye X. et al 2017]. С другой стороны, на модели карциномы поджелудочной железы опровергли влияние ЭМП на метастазирование, предполагая, что данный механизм скорее опосредует устойчивость опухоли к терапии [Fischer K.R. et al 2015, Zheng X. et al 2015].

Метастатический каскад состоит из 5 этапов: инвазия, интравазация, перенос (транспортировка), экстравазация и колонизация [Tsai J.H. and Yang J. 2013]. Доказательства роли ЭМП в интравазации разнообразны и убедительны. Было обнаружено, что при раке предстательной железы миграция через эндотелиальный клеточный барьер зависит от экспрессии *ZEB1* в клетках простаты человека PC-3, которые проявляют фенотип ЭМП [Drake J.M. et al 2009]. Клетки рака молочной железы MCF-7, экспрессирующие *Snail1*, могут мигрировать через базальную мембрану посредством мобилизации матричных металлопротеиназ (MMP1 и MMP2). Кроме того, было показано, что эти клетки способствуют ангиогенезу и интравазации в сосудистую сеть [Ota I. et al 2009].

Роль ЭМП в переносе по кровотоку была рассмотрена в исследовании циркулирующих опухолевых клеток поджелудочной железы на мышинной модели. В большинстве случаев эти клетки обладали мезенхимальным фенотипом. Кроме того, эти клетки экспрессировали *Zeb1*, что свидетельствует о ЭМП. ЦОК в состоянии ЭМП наблюдалось до метастазирования в печени [Rhim A.D. et al 2012]. В другом исследовании показана связь циркулирующих опухолевых клеток с тромбоцитарными клетками, которые окружают ЦОК, защищая их и являясь источником TGF- β для активации пути TGF- β и NF- κ B. Активация этих сигнальных путей приводит к мезенхимальному фенотипу и увеличению метастазирования *in vivo* [Labelle M. et al 2011].

Была показана роль ЭМП и в процессе экстравазации. Экспрессия фактора ЭМП *Twist1* увеличивала как экстравазацию и внутрисосудистую миграцию, также фактор роста эндотелия сосудов, продуцируемый при ЭМП увеличивает экстравазацию через стенку кровеносных сосудов [Stoletov K. et al 2010]. Обратный ЭМП процесс МЭП происходит в месте метастазирования и это подтверждается тем фактом, что большинство макрометастазов являются эпителиальными. Экспериментальные данные, показывают, что, в то время как ЭМП необходим для интравазации и экстравазации, активация ЭМП сигнальных путей, в месте метастазирования, необходима для пролиферации опухолевых клеток и образования макрометастазов [Tsai J.H. et al 2012].

Опубликованы данные о роли ОСК и ЭМП в метастатических процессах при РМЖ. Известно, что первичные опухоли выделяют большое количество опухолевых клеток в кровообращение, и только небольшая часть этих клеток (~ 2%) способна инициировать рост в виде микрометастазов, и, по оценкам, только ~ 0,02% ЦОК образуют отдаленные макрометастазы [Gupta G.P. and Massagué J. 2006]. Более 10-ти лет назад стали появляться свидетельства того, что ОСК, хотя первоначально идентифицированные как субпопуляция опухолевых клеток с высокими онкогенными свойствами при трансплантации иммунодефицитным мышам, являются клетками, которые опосредуют метастазирование опухоли, устойчивость к лечению и рецидив заболевания при раке молочной железы. Исследование профилирования генов при РМЖ показало, что ОСК обладают инвазивной генной сигнатурой, которая коррелирует с увеличением метастазирования и плохой общей выживаемостью [Liu R. et al 2007]. Связь ОСК и метастазированием подтверждается также наблюдением, что диссеминированные клетки в костном мозге у больных раком молочной железы имеют фенотип ОСК [Balic M. et al 2006]. При исследовании трижды негативного РМЖ на мышинной модели, спонтанные метастазы легкого анализировали с использованием неинвазивной оптической визуализации, а метастатические опухолевые клетки собирали и также анализировали. Это исследование показало, что метастатические опухолевые клетки высоко экспрессируют маркер CD44 и способны регенерировать опухоли после трансплантации у мышей с иммуносупрессией [Liu H. et al 2010]. В работе Vaccelli I. и соавторов проводилась идентификация популяции циркулирующих в крови опухолевых клеток от больных раком молочной железы, которая инициирует метастазирование. Было показано, что число ОСК с фенотипом EpCAM+CD44+MET+CD47+ увеличивалось с прогрессией опухоли, в то время как не было обнаружено существенных изменений в количестве ОСК, представляющих основную популяцию опухолей [Vaccelli I., Schneeweiss A. 2013]. В другом исследовании субпопуляция клеток рака молочной железы с фенотипом Oct4^{hi}/CD44^{hi/med}/CD24^{-/+}, демонстрирующих свойства ОСК, включая самообновление, циклический покой, асимметричное деление, высокую метастатическую и инвазивную способность, также было обнаружено в кровообращении у пациентов с РМЖ, которые проходили или уже завершили лечение [Patel S.A. et al 2012].

Также необходимо отметить, что индукция ЭМП имеет тенденцию вызывать увеличение экспрессии генов, связанных со стволовостью и ОСК в некоторых типах опухолей. Это изучено и на примере нормальной ткани молочной железы и раке молочной железы. Одно из таких исследований показало, что индукция ЭМП в иммортализованных эпителиальных клетках молочной железы человека была достаточной для индукции

экспрессии маркеров стволовых клеток. Это сопровождалось увеличением образования маммосфер *in vitro* и метастазов у ксенографтов. Наряду с этим было показано, что экспериментально индуцированный ЭМП увеличивает количество клеток со свойствами стволовых клеток в эпителиальных клетках молочной железы [Sigurdsson V. et al 2011]. Наконец, в нормальной ткани молочной железы избыточная экспрессия транскрипционных факторов *SNAI2* и *SOX9* была достаточной для того, чтобы подтолкнуть клетки к приобретению стволового фенотипа [Guo W. et al 2012].

1.2.3 Маркеры опухолевых стволовых клеток при раке молочной железы

ОСК были впервые идентифицированы и выделены Al-Hajj [Al-Hajj M. et al 2003] на модели ксенотрансплантата, полученной от пациента с РМЖ в 2003 году. Онкогенная субпопуляция клеток содержала поверхностный маркер $CD44^{+}CD24^{-/low}$. В последующие несколько лет такие субпопуляции были обнаружены в ранних диссеминированных клетках из костного мозга пациентов с РМЖ и ассоциировались с возникновением рецидива и отдаленного метастазирования [Baccelli I., Schneeweiss A. 2013]. Наличие недифференцированных $CD44^{+}CD24^{-/low}$ клеток в опухоли после химиотерапии ассоциировалось с неблагоприятным исходом у пациентов с инвазивным протоковым раком. Кроме того, увеличение доли $CD44^{+}CD24^{-/low}$ клеток в опухолевой массе было тесно связано с лимфогенным метастазированием [Lin Y. et al 2012]. Эти данные позволили предположить важное значение ОСК при рецидиве и метастазировании РМЖ. Однако, $CD44^{+}CD24^{-/low}$ клетки не являются универсальным маркером. В клеточных линиях MDA-MB-231 и MDA-MB-361 большинство клеток демонстрируют $CD44^{+}CD24^{-/low}$ фенотип, но только 5% и 12% из них обладают онкогенной способностью, соответственно [Hwang-Verslues W.W. et al 2009]. Кроме того, корреляция между увеличением доли ОСК в опухолевой ткани молочной железы и плохим прогнозом увеличивается, когда в комбинации с $CD44^{+}CD24^{-/low}$ фенотипом используется альдегиддегидрогеназа 1 (ALDH1) [Shao J. et al 2016]. В этой связи для специфической и эффективной идентификации ОСК из разных клеточных линий/опухолевой ткани лучше использовать несколько маркеров. Предполагаемые фенотипы ОСК, идентифицированные при РМЖ до настоящего времени показаны в Таблице 1. Функциональный вклад в терапевтическую резистентность и прогрессирование некоторых из них при РМЖ обсуждается в данном разделе.

Таблица 1. Предполагаемые фенотипы ОСК при РМЖ в литературных источниках

Фенотипы	Источники образцов	Литература
----------	--------------------	------------

ABCG2 ⁺	Клеточная линия HCC1937	[Leccia F.et al 2014]
ANTXR1 ⁺	Метастатическая опухоль молочной железы мыши, клеточная линия TMD231	[Chen D.et al 2013]
CD29 ⁺	Клеточная линия MCF-7	[Cariati M.et al 2008]
CD61 ⁺	Опухоль молочной железы мыши MMTV-Wnt-1	[Kakarala M. and Wicha M.S. 2008]
CD133 ⁺	Первичная опухоль молочной железы человека; клеточные линии MDA-MB-231, MCF-7 и ZR-75; опухоль молочной железы мыши BRCA1-	[Liu TJet al 2013, Sansone P.et al 2016]
CXCR4 ⁺	Метастатическая область РМЖ человека; клеточная линия MCF-7; клеточные линии мыши 4T1, 4T07, 168Farn и 67NR	[Mukherjee S.et al 2016]
PROCR ⁺	Клеточная линия MDA-MB-361; жировая ткань молочной железы мыши с MDA-MB-231	[Schaffner F.et al 2013]
CD24 ⁺ CD29 ⁺	Первичная опухоль молочной железы BRCA1-мыши; предопухолевая ткань молочной железы мышей MMTV-Wnt1	[Rahal O.M.et al 2013]
CD24 ⁺ CD49f ⁺	Первичная опухоль молочной железы BRCA1-мыши	[Vassilopoulos A.et al 2008]
CD44 ⁺ CD24 ^{-/low}	Первичная опухоль молочной железы человека; клеточные линии MCF-7, BT-549, MDA-MB-231, MDA-MB-361, MDA-MB-468, T47D, ZR75, SK-BR-3 и HCC1937; первичная опухоль молочной железы BRCA1-мыши	[Lin Y., Zhong Y. 2012]
CD49f ^{hi} CD61 ^{hi}	Трансгенная модель HER2/neu мыши	[Lo P.-K.et al 2012]
CD133+ALDH1 ⁺	Инвазивная протоковая опухоль молочной железы человека	[Lv X.et al 2016]
CD44 ⁺ CD24 ^{-/low} ABCG2 ⁺	Клеточные линии MDA-MB-231 и MCF-7	[Sun M.et al 2015]
CD44 ⁺ CD24 ^{-/low} ALDH1 ⁺	Инвазивный протоковый РМЖ человека; клеточные линии MDA-MB-231, MDA-MB-453, MDA-MB-468, SUM149, SUM159, SK-BR-3, ZR-75 и HCC1954	[Chiotaki R.et al 2016, Shao J., Fan W. 2016]
CD44 ⁺ CD24 ^{-/low} EpCAM ⁺	Клеточные линии MCF-7, MDA-MB-231, SUM149 и SUM159	[Al-Hajj M., Wicha M.S. 2003]
CD44 ⁺ CD24 ^{-/low} SSEA-3 ⁺	Клеточные линии MCF-7 и MDA-MB-231	[Cheung S.K.et al 2016]
CD44 ⁺ CD49f+C D133/2+	Первичная ER- опухоль молочной железы человека	[Meyer M.J.et al 2010]
CD44 ⁺ CD133 ⁺ ALDH1 ^{+/hi}	Клеточная линия MDA-MB-468	[Croker A.K.et al 2009]
CD133 ^{hi} CXCR4 ^{hi} ALDH1 ^{hi}	Инвазивная протоковая опухоль молочной железы человека	[Saha S.et al 2017]
EpCAM ⁺ CD49f ⁺	Аберрантные клетки-предшественники человека из BRCA1-мутантной ткани молочной железы	[Lim E.et al 2009]
EpCAM ^{hi} PROCR ^{hi} SSEA-3 ⁺	Клеточные линии MCF-7 и MDA-MB-231	[Cheung S.K., Chuang P.-K.

		2016]
GD2 ⁺ GD3 ⁺ GD3S _{hi}	Клеточные линии MDA-MB-231 и MDA-MB-468	[Liang Y.-J.et al 2017]

CD44 был первым эффективным поверхностным маркером, использованным для идентификации ОСК. Как клеточный рецептор, CD44 опосредует связь с микроокружением через взаимодействие с внеклеточными лигандами, такими как гиалуроновая кислота (ГК). Взаимодействие CD44 и ГК может стимулировать RhoA-специфическую передачу сигнала, опосредовать передачу сигналов c-Src kinase/Twist/miR-10b/RhoA, и активацию передачи сигналов пути PI3K/AKT [Bourguignon L.Y.et al 2010]. При этом, Ghatak S. и соавторы показали, что ГК может также ингибировать путь PI3K/AKT, активируя PTEN [Ghatak S.et al 2002]. Эти исследования указывают на двойственную природу CD44. Также Al-Hajj M. и соавторы обнаружили, что всего 100 клеток с фенотипом EpCAM+CD44+CD24-/low способны вызвать образование основной массы опухолей, содержащих фенотипически неопухолевые клетки у мышей NOD/SCID [Al-Hajj M., Wicha M.S. 2003]. Высокая экспрессия CD44 может быть результатом отсутствия p53 и важна для врожденной устойчивости ОСК [Cicalese A.et al 2009]. Сообщалось также, что взаимодействие HA-CD44 активировало сигнальные пути Nanog/miR-21 или Nanog/STAT3, а затем усиливало антиапоптоз и увеличивало экспрессию Р-глюкопротеина (P-gp), который опосредует выброс доксорубина и паклитаксела из клеток MCF-7 против градиента концентрации [Bourguignon L.Y.et al 2009]. Также опубликованы данные о том, что HA-меченные наночастицы использовались для нацеливания на CD44+ ОСК и продемонстрировали большой потенциал для усиления химиотерапевтического эффекта *in vitro* [Muntimadugu E.et al 2016]. Известно, что ОСК с фенотипом CD44+ тесно связаны с метастазированием. Показано, что доля ранних диссеминированных опухолевых клеток с фенотипом CD44+CD24- в костном мозге пациентов с РМЖ составила примерно 72% [Balic M., Lin H. 2006]. Необходимо отметить, что в 2010 году с помощью методов неинвазивной визуализации наблюдали возникновение спонтанного метастазирования в легкие и лимфатические узлы при трансплантации CD44+ ОСК мышам [Liu H., Patel M.R. 2010].

Подобно CD44, интегрины *CD29*, *CD49f* и *CD61* также являются рецепторами клеточной поверхности внеклеточных лигандов, таких как фибронектин и ламинин. Они могут гетеродимеризоваться друг с другом и опосредовать адгезию клеток к внеклеточному матриксу, осуществляя двунаправленную связь с микроокружением. CD29, CD49f и CD61, которые кодируют субъединицы гетеродимерного интегрин $\beta 1$, $\alpha 6$ и $\alpha 3$, соответственно, чаще всего регистрируются при РМЖ, и было продемонстрировано,

что они являются эффективными маркерами ОСК. Например, использование CD29 или CD49f в сочетании с CD24 позволило идентифицировать ОСК из BRCA1-мутантной первичной опухоли молочной железы мыши [Vassilopoulos A., Wang R.-H. 2008]. Кроме того, было обнаружено, что субпопуляция клеток, отделенных от клеток MCF-7, несет фенотип CD29. По сравнению с родительскими клетками, эти клетки CD29 показали повышенную онкогенную способность и более высокую устойчивость к проапоптозу, что может быть связано с активацией ERK-/АКТ-ассоциированных сигнальных путей [Cariati M., Naderi A. 2008]. Указывается, что наличие клеток CD49f в опухолях молочной железы связано с увеличением вероятности метастазирования и более коротким временем выживания у пациентов [Ye F. et al 2015]. В предопухолевых тканях мышей MMTV-Wnt-1 были обнаружены аберрантные предшественники с фенотипом CD61+. У них был сильный потенциал инициировать опухоли молочных желез у мышей [Vaillant F., Asselin-Labat M.-L. 2008]. В Her2+ первичных опухолях молочной железы у мышей субпопуляция опухолевых клеток, которые проявляли устойчивость к доксорубину и паклитакселу, имели CD49f+ и CD61+ фенотип [Lo P.-K., Kanojia D. 2012].

Другой известный маркер ОСК CD133 представляет собой трансмембранный белок. В норме он является маркером гематопоетических стволовых клеток и эндотелиальных прогениторных клеток. Хотя точная роль CD133 при РМЖ остается неясной, клетки РМЖ с CD133+ фенотипом обладают стволоподобными свойствами. Эти клетки показывают значительную устойчивость к ДНК-повреждающим агентам и способность образовывать опухоли у мышей NOD/SCID [Wright M.H. et al 2008]. Liu T. и соавторы обнаружили, что клетки MDA-MB-231 с фенотипом CD133+ обладают более высокой колониеобразующей эффективностью [Liu T., Sun B. 2013]. Было обнаружено, что количество CD133+ клеток увеличивается в опухолях у пациентов с устойчивым к гормонотерапии раком молочной железы, способствуя возникновению метастазирования независимо от ER-статуса пациентов [Sansone P., Ceccarelli C. 2016]. В 2017 году опубликованы интересные данные о том, что высокая экспрессия IL6 в микроокружении опухоли также способствует росту опухоль-ассоциированных фибробластов *in vivo*. Экзосомы могут переносить miR-221 в клетки опухоли молочной железы и вносить вклад в активацию Notch3, которая необходима для размножения клеток CD133 [Sansone P. et al 2017].

ALDH1 является NAD(P)+-зависимым ферментом, который опосредует окисление внутриклеточных альдегидов в карбоновые кислоты. Ginestier C. и соавторы обнаружили, что ALDH1 является общим маркером нормальных и опухолевых стволовых клеток молочной железы. Их исследование показало, что ALDH1 действовал как независимый прогностический фактор низкой выживаемости у больных РМЖ [Ginestier C. et al 2007]. В

исследовании *in vitro* было подтверждено, что клетки с фенотипом CD44+CD24-ALDH1+MDA-MB-231 и CD44+CD133-ALDH1+MDA-MB-468 обладали более сильной онкогенной и метастатической способностью по сравнению с клетками ALDH1^{low}CD44^{low} [Croker A.K., Goodale D. 2009]. Анализ образования маммосфер показал, что блокада ALDH или ингибирование ретиноидной передачи сигналов увеличивали долю ОСК в нескольких клеточных линиях РМЖ, включая 184A1, SUM149, SUM159 и HCC1954, а анализ экспрессии генов показал, что сигнальные клеточные пути самообновления далее активируются в этих клеточных линиях [Ginestier C. et al 2009].

CXCR4 является мембранным хемокиновым рецептором. SDF-1, также известный как CXCL12 - фактор стромальных клеток, является единственным лигандом для активации CXCR4. Как нейтрализация CXCR4, так и его нокаут ингибируют рост трансплантированной опухоли молочной железы и нарушают направленное метастазирование в лимфатические узлы и легкое [Müller A. et al 2001]. Mukherjee S. и соавторы обнаружили, что немигрирующие ОСК способствовали превращению нестволовых опухолевых клеток в метастатические CSCCR4+ клетки в первичной ткани рака молочной железы человека. Их результаты не только указали на потенциал CXCR4 в качестве маркера ОСК молочной железы, но также представили доказательства для опосредованного превращения нестволовых опухолевых клеток в стволовые. В преобразовании клеток показано снижение E-кадгерина и увеличение виментина, что позволяет предположить, что они подверглись и ЭМП [Mukherjee S., Manna A. 2016]. Гиперактивация CXCR4 тесно связана с изменениями микроокружения опухоли. Секреция SDF-1 может быть вызвана различными воздействиями цитотоксических агентов, облучением и гипоксией, подразумевая, что текущая терапия может быть триггером метастазирования CXCR4+ клеток. Кроме того, CAF также могут повышать уровень SDF-1 в микроокружении опухоли. Индуцированная CAFs передача сигналов SDF-1/CXCR4 поддерживает стволовость опухолевых клеток и метастатические фенотипы посредством передачи сигналов NF-κB *in vivo* [Huang M. et al 2010]. Экспрессия CXCR4 также может регулироваться транскрипцией с помощью передачи сигналов семейства FOX, P53, TGF-β или Hh, сайты связывания этих факторов были обнаружены в областях промотора CXCR4 или проксимального энхансера в нескольких клеточных линиях РМЖ: Hs5787T, T47D, MDA-MB-361, MDA-MB-231, MCF-7 и MDA-MB-468 [Müller A., Homey B. 2001]. Активация передачи сигналов SDF-1/CXCR4 может увеличить фосфорилирование 60 белков, связанных с миграцией и инвазией CD44+CD24- ОСК при РМЖ [Yi T. et al 2014].

Белок ABCG2 высоко экспрессируется в нескольких хеморезистентных клеточных линиях РМЖ. По сравнению с стволовыми клетками CD44+CD24-/low клетки из клеточных линий рака молочной железы MCF-7, MDA-MB-231 и SK-BR-3 показали более высокую экспрессию ABCG2 [Sun M., Yang C. 2015]. ANTXR1 является специфичным для опухоли эндотелиальным маркером, который опосредует ангиогенез опухоли. Более высокая экспрессия ANTXR1 на клеточной поверхности CD44+CD24- и ALDH1+ клеточной линии TMD231 РМЖ была обнаружена Chen D. и коллегами. Их работа показала, что избыточная экспрессия ANTXR1 активировала ключевые гены клеточной пролиферации, репликации ДНК и пути передачи сигналов пути WNT, придавая повышенный туморогенный и метастатический потенциал клеткам РМЖ. Более того, согласно результатам данной работы, ANTXR1 частично опосредует индукцию стволовости опухолевых клеток. Авторы утверждают, что по наличию ANTXR1, можно отсортировать субпопуляцию злокачественных ОСК РМЖ [Chen D., Bhat-Nakshatri P. 2013]. EpCAM (CD326 или ESA) считается маркером эпителиальных опухолей. Недавние исследования показали, что EpCAM играет важную роль в миграции и метастазировании опухолевых клеток. EpCAM+ циркулирующие опухолевые клетки при РМЖ содержат субпопуляцию метастазирующих клеток [Baccelli I., Schneeweiss A. 2013]. PROCR является специфическим маркером ОСК для трижды негативного РМЖ. В работе Hwang-Verslues и соавторов показано, что клетки PROCR+ линии MDA-MB-361 и MDA-MB-231 показали 2-кратное и 9-кратное увеличение эффективности колониеобразования, соответственно, по сравнению с клетками PROCR- [Hwang-Verslues W.W., Kuo W.-H. 2009].

Экспрессия GD3S была заметно увеличена в GD2+ ОСК РМЖ. При этом, нокдаун GD3S значительно снижал экспрессию GD2 и нарушал их способность мигрировать и образовывать маммосферы, нарушал инициацию и поддержание ЭМП, в то время как сверхэкспрессия GD3S способствовала возникновению стволовых свойств и метастатического потенциала в клеточных линиях MDA-MB-231, MDA-MB-468 и MCF- [Liang Y.-J., Wang C.-Y. 2017, Sarkar T.R. et al 2015].

1.3. Гены индукции и поддержания плюрипотентности при раке молочной железы

Еще в 2012 году профессором Yamanaka S. получена Нобелевская премия за разработку метода получения стволовых клеток человека, а именно iPS-клеток - индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, из зрелых фибробластов. Ученым удалось с помощью генного коктейля (*Oct3*, *KLF4*, *Sox2* и *Myc*) «перепрограммировать» клетки, которые уже «получили» в организме дифференцировку [Takahashi K. and

Yamanaka S. 2006]. На сегодняшний день уже известными являются некоторые гены, которые связаны с индукцией стволовых свойств или поддержанием стволового состояния клеток. Например, гены *LIFR* (5p13), *BMP6* (6p24.3), *FZD1* (7q21.13), *SMAD9* (13q13.3), *ZIC2* (13q32.3), *SMAD4* (18q21.1), *INSR* (19p13.2) активированы в праймированных стволовых клетках [Weinberger L.et al 2016]. Гиперэкспрессия генов *OCT4*, *NANOG*, *SOX2*, участвующих в перепрограммировании дифференцированных клеток в плюрипотентные стволовые клетки, была выявлена в ряде низкодифференцированных опухолей, которые отличаются высокой степенью злокачественности [Ben-Porath I.et al 2008]. Гены *C-MYC* и *FZD8* играют главную роль в регуляции опухолевых стволовых клеток трижды негативного рака молочной железы [Yin S.et al 2015].

В данном разделе будут подробнее рассмотрены известные гены индукции и поддержания плюрипотентности и их функции при раке молочной железы.

Ген *DPPA2* экспрессируется специфически в плюрипотентных стволовых клетках, участвует в поддержании их плюрипотентности и самообновлении [Monk M.et al 2008, Watabe T. 2012]. В различных исследованиях была проанализирована экспрессия *DPPA2* в опухолях различных локализаций, включая ЗНО (злокачественное новообразование) печени, мелкоклеточного рака легких и лимфомы. Было показано, что *DPPA2* экспрессировался примерно в 30% образцах опухоли. При этом, плоскоклеточный рак экспрессировал *DPPA2* на более высоких уровнях по сравнению с другими гистологическими подтипами злокачественных новообразований [John T.et al 2008]. Наряду с *DPPA2* ген *DPPA4* является одним из генов, который высоко экспрессируется в эмбриональных стволовых клетках. Его экспрессия может регулироваться генами *OCT4* и *SOX2* [Chakravarthy N.et al 2008]. *DPPA4* значительно экспрессируется в линиях опухолевых клеток и опухолевых тканях, включая рак толстой кишки и колоректальные клеточные линии [14]. Po-Yuan Tung и соавт. обнаружили, что *DPPA4* является онкогеном как в мышечных клетках, так и в иммортализованных дермальных фибробластах человека. Кроме того, сверхэкспрессия *DPPA4* индуцирует пролиферацию клеток через гены, связанные с регуляцией перехода G1/S [Tung P.Y.et al 2013]. Оба гена *DPPA4* и *DPPA2* являются двумя лучшими маркерами плюрипотентности, используемыми для валидации индуцированных плюрипотентных стволовых клеток [Kang R.et al 2015]. Еще один ген *DPPA3* является мишенью *TBX3*, который участвует в поддержании состояния плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток мыши [Waghray A.et al 2015]. Ген *DPPA3* был наиболее экспрессирован на стадии прогениторных клеток, его экспрессия увеличивает скорость пролиферации клеток гепатоцеллюлярной карциномы, способность формирования очагов и колоний, а также миграцию и инвазию. *DPPA3* снижал уровень

метиляции CG-островков в функциональных областях генома, которые вовлечены в процесс развития и дифференцировку клеток [Yan Q.et al 2018].

Ген *TERT* служит для поддержания функции теломер путем добавления de novo теломерных повторов на концах хромосом. В нормальных тканях, *TERT* экспрессируется в стволовых и прогениторных клетках. Реактивация теломеразы присутствует до 90% случаев опухолей человека и позволяет пролиферирующим (стволовым и прогениторным) опухолевым клеткам поддерживать длину теломер [Vinagre J.et al 2014]. Мутация *TERT*-промотора зарегистрированы в различных опухолях и были определены как мутации, повышающие активность промотора [Horn S.et al 2013, Huang F.W.et al 2013, Killela P.J.et al 2013].

Костный морфогенетический белок-6 (*BMP-6*) принадлежит к суперсемейству TGF- β . *BMP-6* аномально экспрессирован и регулируется альфа-рецептором эстрогена в клетках рака молочной железы [Zhang M.et al 2007]. Кроме того, имеются данные о том, что *BMP-6* индуцирует экспрессию E-кадгерина путем репрессии δ EF1 в клетках MDA-MB-231, а потеря экспрессии E-кадгерина коррелирует с инвазивностью опухоли и метастазированием [Yang S.et al 2007].

Ген *OCT3* (*POU5F1*, *OCT4*), входит в состав коктейля Яманака и представляет собой фактор транскрипции [Hwang S.S.et al 2016]. *OCT3* специфически экспрессирован в тотипотентных эмбриональных стволовых клетках млекопитающих и зародышевых клетках, играя ключевую роль в регуляции и поддержании плюрипотентности и самообновления. Он формирует трёхмерный комплекс с *SOX2* и контролирует экспрессию ряда генов, участвующих в эмбриональном развитии. Репрессия *OCT3* вызывает потерю плюрипотентности и способности к новообразованию. Экспрессию *OCT3* необходимо контролировать, чтобы стабилизировать самовозобновление стволовых клеток или наоборот, программы развития [Cho Y.et al 2018a]. *TGF β 1* стимулирует экспрессию *OCT3* при раке молочной железы [Mandal G.et al 2018]. Экспрессия *OCT3* не ассоциирована с возрастом, размером и стадией опухоли, однако она коррелировала с гистологическим классом, молекулярным подтипом и лимфогенным метастазированием. Уровни экспрессии *OCT3* значительно выше в тканях пациентов с гистологическими опухолями III степени, а также наблюдается повышенная экспрессия гена в HER2 + опухоли в сравнении с люминальными A и B подтипами [Cai S.et al 2016].

Группа генов SOX (SRY-Box Transcription Factor), которые участвуют в индукции и поддержании плюрипотентности, состоит из *SOX1*, *SOX2*, *SOX4*, *SOX8*, *SOX9*. *SOX1* и *SOX2* являются двумя тесно связанными факторами транскрипции, относящимися к подгруппе семейства SOXB1, которые в значительной степени участвуют в регуляции

плюрипотентных стволовых клеток и нервных стволовых клеток [Zhang S. and Cui W. 2014]. *SOX2* входит в состав коктейля Яманаки, а *SOX1* участвует в раннем эмбриогенезе, развитии ЦНС и поддержании нервных стволовых клеток [Kan L.et al 2004]. *SOX1* и *SOX2* произошли от общего предка путем дупликации генов в ходе эволюции и имеют сходные последовательности, паттерны экспрессии и функции [Archer T.C.et al 2011]. В линиях нервных и опухолевых клеток наблюдается коэкспрессия разных транскрипционных вариантов *SOX1* [Ahmad A.et al 2017]. Метилирование промоторных областей *SOX1*, *TERT* является новым маркером предраковых заболеваний шейки матки [Rogeri C.D.et al 2018]. *SOX2* запускает индукцию типичных факторов эмбриональных карцином, плюрипотентности и эпигенетического репрограммирования, таких как *DPPA3*, *NODAL*, *ZIC* [Nettersheim D.et al 2015]. *SOX2* рассматривается в качестве ключевого регулятора плюрипотентности и самообновления в эмбриональных и опухолевых стволовых клетках, в том числе и при раке молочной железы [Sarkar A. and Hochedlinger K. 2013, Tam W.L. and Ng H.H. 2014].

Значение *SOX4* было продемонстрировано в канцерогенезе многих локализаций, он активирован при большинстве типов рака по сравнению с нормальными тканями [Rhodes D.R.et al 2004]. Данный ген находится в области хромосомы 6p22, которая амплифицирована при раке мочевого пузыря и раке легких. При раке легкого было обнаружено, что *SOX4* является единственным сверхэкспрессированным геном в клетках, несущих амплификацию 6p22 относительно нормальной ткани [Medina P.P.et al 2009]. Гиперэкспрессию *SOX4* связывают с канцерогенезом колоректального рака, показано, что гиперэкспрессия наблюдается у больных с плохим исходом [Andersen C.L.et al 2009]. В норме *SOX8* участвует в остеогенезе, поддержании пролиферации остеобластов и предотвращении дифференцировки клеток. *SOX8* экспрессируется в остеобластах, и у мышей с дефицитом *SOX8* наблюдается снижение пролиферации остеобластов и преждевременная дифференцировка, приводящая к остеопении [Schmidt K.et al 2005]. До недавнего времени *SOX8* не рассматривался как онкоген вовсе. *SOX8* и *SOX9* придает опухолевым клеткам свойства, подобные стволовым клеткам [Song S.et al 2014]. В 2019 году в исследовании Nailin Tang и соавторов, было обнаружено, что *SOX8* проявлял активность онкогена и играл ключевую роль в прогрессировании трижды негативного рака молочной железы, экспрессируясь в опухолевых стволовых клетках. *ZEB1* были фактором транскрипции для активации экспрессии *SOX8*. Одновременная активация *SOX8* и *ZEB1* способствовала росту и миграции опухолевых клеток и регулировала свойства опухолевых стволовых клеток. Высокая экспрессия *SOX8* в опухоли пациентов была ассоциирована с плохим исходом [Tang H.et al 2019]. *SOX9* активируется в ряде

базальноклеточных карцином и невральных опухолей, и его экспрессия способствует онкогенным и метастазирующим свойствам клеток опухоли молочной железы человека в ксенографтах [Quist S. et al 2016].

KLF (Krüppel-like factors) представляют собой высоко консервативные транскрипционные факторы по типу цинковых пальцев (zinc-finger proteins), которые регулируют широкий спектр клеточных функций, включая пролиферацию клеток, апоптоз, дифференцировку и неопластическую трансформацию [Kaczynski J. et al 2003]. Несколько *KLF* (*KLF1*, *KLF2*, *KLF4*, *KLF9*, *KLF13* и *KLF16*) имеют общий сигнал ядерной локализации, необходимый для посттрансляционного транспорта к ядру [Bourillot P.-Y. and Savatier P. 2010]. *KLF1* способен активировать промотор CD44, являющегося основным маркером стволовых клеток и является регулятором многих компонентов механизма клеточного цикла [Tallack M.R. and Perkins A.C. 2013]. Экспрессия *KLF1* в клетках лейкемии мышей показала 2-кратное увеличение по сравнению с контролем [Tanaka Y. et al 2014]. *KLF4* входит в состав коктейля Яманаки, играет важную роль в росте клеток, пролиферации, дифференцировке, а также в самообновлении стволовых клеток, индукции и поддержании плюрипотентности. Ядерная локализация *KLF4* ассоциируется с повышенным риском рецидива или смерти при первичном раке молочной железы. Однако, уровень экспрессии *KLF4* обратно коррелирует с размером опухоли и подавляет ER α -зависимую прогрессию рака молочной железы [Ali A. et al 2016]. Нокдаун *KLF4* приводит к повышению устойчивости к тамоксифену, а гиперэкспрессия *KLF4* подавляет рост, инвазию и миграцию клеток гормонзависимую линию MCF-7/TAM [Jia Y. et al 2018]. Klf4 индуцирует эпителиальные гены, включая E-кадгерин и тем самым приводит к мезенхимально-эпителиальному переходу. Блокирование MET ухудшает перепрограммирование фибробластов в плюрипотентные клетки, тогда как предотвращение EMT в эпителиальных клетках не мешает индукции iPSC [Li R. et al 2010]. MET происходит во вторичных органах и необходим для приобретения опухолевыми клетками стволового фенотипа. Ген *KLF5* может действовать как онкоген. В некоторых исследованиях сообщалось об амплификации числа копий в области хромосомы 13q, несущей ген *KLF5* в опухолях желудка и слюнных желез [Deng N. et al 2012]. Гиперэкспрессия этого гена обнаружена в опухолях области головы и шеи [Zhang X. et al 2018], аденокарциноме легких, плоскоклеточном раке легких и при колоректальном раке [Campbell J.D. et al 2016, Giannakis M. et al 2016, Zhang X. et al 2016].

Четыре NOTCH-рецептора (Notch1–4) - это крупные трансмембранные белки. Передача сигналов *NOTCH* играет ключевую роль в нормальном развитии многих тканей и типов клеток, благодаря различным воздействиям на дифференцировку, выживание

и/или пролиферацию клеток. Путь *NOTCH* задействован в канцерогенезе шейки матки [Talora S.et al 2002]. Опубликованы данные о связи активирующих мутаций в *NOTCH1* с острым лимфобластным лейкозом, раком молочной железы и раком толстой кишки [Roy M.et al 2007] [113]. Есть данные, указывающие на двойственную роль *NOTCH1* при разных локализациях, при одних он действует как онкоген, при других как супрессор опухолевого роста [Lefort K.et al 2016]. Повышенная экспрессия *NOTCH4* в культивируемых эпителиальных клетках молочной железы вызывает независимый от прикрепления рост, инвазию и потерю контактного ингибирования [Soriano J.V.et al 2000]. Harrison H. установлено, что *NOTCH4* вовлечен в регуляцию активности стволовых клеток рака молочной железы [Harrison H.et al 2010b] и устойчивость к гормонотерапии ER+ рака молочной железы [Simões V.M.et al 2015].

Высококонсервативное семейство циклинов участвует в механизмах клеточного цикла. *CCND1*, *CCND2* и *CCND3* являются белками семейства циклинов D-типа, и все три тесно связаны между собой. Широко известно, что их киназная активность способствует онкогенным процессам, усиливая передачу сигналов, опосредованную циклинзависимой киназой, которая блокирует белок ретинобластомы, подавляющий опухоль [Musgrove E.A.et al 2011]. Показано, что экспрессия *CCND2* повышена у пациентов с колоректальным раком с запущенным заболеванием и поздними стадиями [Mermelshtein A.et al 2005]. Кроме того, *CCND2* часто обнаруживается в избытке в инвазивном крае при КРР, выступая в качестве независимого предиктора метастазирования в печень, способствуя сохранению стволовых клеток и радиорезистентности [Park S.-Y.et al 2019, Sarkar R.et al 2010]. *CCNA1* (Cyclin A1) представляет собой ген, кодирующий белок. Заболевания, связанные с *CCNA1* - миелоидный лейкоз и рак яичка (<https://www.genecards.org/>). Метилирование промоторов генов металлопротеазы *TIMP3* и циклина *CCNA1*, служат маркерами прогнозирования, связанными с развитием рецидивов и вторичных первичных опухолей при плоскоклеточных опухолях области головы и шеи [Rettori M.M.et al 2013]. *OCT4*, в сотрудничестве с miR-335, индуцирует гиперфосфорилирование RB, подавляя *PPI* через *NIP1* и *CCNF* [Schoeftner S.et al 2013]. В ОСК ингибирование *Lin28* (белка коктейля Яманаки) репрессирует нисходящие онкогены, такие как *MYCN*, *CCNF*, *RRM2* [Phung T.L.et al 2015]. В исследовании Oana Tudoran и соавторов проводилось исследование регуляции сигнальных путей, связанных со стволовыми клетками, в ответ на лечение доксорубицином в клетках трижды негативного рака молочной железы Hs578T. В составе дерегулированных генов Oct4 сигналинга был *CCNF* [Tudoran O.et al 2015]. Путь *OCT4-NIP1/CCNF* обеспечивает ферментативную инактивацию pRB в клетках рака яичника и повышенная экспрессия

OCT4-NIPPI/CCNF-CPC определяет высокоагрессивный подтип СРЯ [Comisso E.et al 2017].

Гены WNT сигналинга также в значительной степени связаны с индукцией и поддержанием плюрипотентности. Члены семейства «frizzled» генов кодируют белки трансмембранного домена, которые являются рецепторами для сигнальных белков WNT. *FZD9* экспрессируется преимущественно в мышцах, почках, костях, глазах, яичках и головном мозге и играет важную роль в поддержании популяций стволовых клеток в крови, коже и кишечнике [Kolben T.et al 2012]. Экспрессия *FZD9* повышена при астроцитоме и остеосаркоме [Wang Q.et al 2017]. Также нокдаун *FZD9* ингибировал пролиферацию клеток, подвижность и экспрессию циклина D1 в клеточных линиях гепатобластомы [Fujimoto T.et al 2009]. Было показано, что циркулирующие опухолевые клетки, высвобождаемые первичными опухолями, экспрессируют ген *WNT2*, что увеличивает их склонность к дальнейшему метастазированию [Chen J.et al 2012].

SMADs белки являются транскрипционными факторами, которые опосредуют множественные сигнальные пути в том числе WNT, TGF β , BMP. Белки SMAD (*SMADs 1-9*) являются регуляторами транскрипции передачи сигналов трансформирующего фактора роста- β (TGF β) и костного морфогенетического белка (BMP) [Omata Y.et al 2016]. В работе S. Tsukamoto с соавторами описана уникальность *SMAD9*, являющегося регулятором клеточного роста и апоптоза в опухолевых клетках [Tsukamoto S.et al 2014]. *SMAD4* транслоцируется в ядро в виде гетеротримерного комплекса *SMAD2/SMAD3-SMAD4* после активации рецепторов семейства TGF β . Нокдаун *SMAD4* эффективно ингибирует TGF- β -индуцированный эпителиально-мезенхимальный переход клеток опухоли молочной железы. Эмбриональные стволовые клетки человека (ESC) остаются недифференцированными после нокдауна *SMAD4*. *SMAD4* необходим для стабилизации недифференцированного состояния ESCs [Avery S.et al 2010, Deckers M.et al 2006]. *SMAD2*-позитивные клетки считаются опухолевыми стволовыми клетками при раке толстой кишки [Suzuki R.et al 2015]. Передача сигналов *NODAL* усиливает экспрессию *ALDH1*, *CD44*, *CD133*, *SOX2*, *OCT4* и *NANOG* путем активации пути *SMAD2/3*, тем самым увеличивая туморогенность и способность образовывать маммосферы клеток опухоли молочной железы [Gong W.et al 2017]. Рак поджелудочной железы экспрессирует высокие уровни TGF- β , и это коррелирует с плохим прогнозом [Javle M.et al 2014]. TGF β 1 сверхэкспрессируется в опухоли молочной железы человека, и его уровень экспрессии коррелирует с метастазированием [Drabsch Y. and Ten Dijke P. 2011]. *SMAD2* и *SMAD3* играют разные роли в передаче сигналов TGF β 1, что приводит либо к подавлению, либо к развитию рака молочной железы. Нокдаун *SMAD2* увеличивает агрессивность

метастатических клеток MDA-MB-231 рака молочной железы человека, в то время как нокдаун *SMAD3* продлевает латентность и задерживает рост метастазов в костях, указывая на то, что избирательное нацеливание на *SMAD2* или *SMAD3* может привести к различным терапевтическим реакциям [Petersen M.et al 2010]. Разрабатываемые терапевтические стратегии в основном направлены на отмену активности рецепторов TGFβ, что может привести к полной блокаде передачи сигналов TGFβ, опосредованной как *SMAD2*, так и *SMAD3* [Chen P.-S.et al 2012].

Онкогены *PIM* сверхэкспрессируются в широком спектре опухолей гематологического и эпителиального происхождения [Keeton E.K.et al 2014]. Гиперэкспрессия *PIM1* и *PIM3* способствует усилению пролиферации опухолевых клеток [Fischer K.M.et al 2009]. Наблюдается повышенная экспрессия *PIM1* и частые aberrации числа копий (CNAs) гена в клетках базально-подобного трижды негативного РМЖ [Brasó-Maristany F.et al 2016].

Семейство секретируемых белков-лигандов пути Hedgehog (Hh) Smoothed (*SMO*), играет важную роль в развитии млекопитающих, действуя как морфогенный фактор роста и выживаемости. siSMO уменьшает пролиферацию клеток и число инвазивных клеток глиомы [Rahman M.M.et al 2018]. Соматические мутации гена *SMO* активируют сигнальный путь hedgehog при раке молочной железы [Han B.et al 2015]. Сверхэкспрессия *SMO* в модельной клеточной линии CML мыши увеличивала частоту стволовых опухолевых клеток в 4 раза и способствовала прогрессии CML. Генетический нокдаун *SMO* в стволовых опухолевых клетках приводил к полной элиминации опухолевых стволовых клеток при раке толстой кишки *in vivo* [Matsui W.H. 2016]. Семейство секретируемых белков Hedgehog (HH) включает Sonic (*SHH*), Indian (*IHH*) и Desert (*DHH*). Ингибирование HH-каскад приводит к ингибированию роста, инвазии и метастазирования злокачественных новообразований молочной железы, предстательной железы, поджелудочной железы и мозга как *in vitro*, так и *in vivo* [Bar E.E.et al 2007, Ramaswamy B.et al 2012]. Сигнальные пути *WNT*, *BMP/TGF-β*, *SHH* и *NOTCH* способствуют самообновлению стволовых и/или клеток-предшественников в различных органах, но нарушение регуляции этих путей может способствовать онкогенезу и поддержанию стволового фенотипа [Czerwinska P. and Kaminska B. 2015].

Белок, кодируемый геном *CDK6* (Cyclin Dependent Kinase 6), является членом семейства серин-треонинкиназ - комплекса, который важен для прогрессирования фазы G1 клеточного цикла и перехода G1/S. Абберрантная экспрессия *CDK6* была обнаружена при раке поджелудочной железы, Т-клеточной лимфоме, злокачественной глиоме и медуллобластоме, что свидетельствует о непосредственном участии данного гена в

опухолевой прогрессии [Costello J.F.et al 1997, Lee K.-H.et al 2009, Mendrzyk F.et al 2005]. Высокий уровень *CDK6* у пациентов с раком мочевого пузыря связан с худшей выживаемостью [Li J.et al 2019]. В работе Changhao Chen и соавторов *CDK6* рассмотрен в качестве участника регуляции развития немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) [Chen C.et al 2018].

Ген *EPHA1* (EPH Receptor A1) принадлежит к подсемейству рецепторов эфрина семейства протеин-тирозинкиназ. Этот ген экспрессируется в некоторых линиях опухолевых клеток человека и участвует в канцерогенезе (по данным <https://www.genecards.org/>). Ген *EPHA1* гипометилирован и высоко экспрессируется в ИПСК (индуцированные плюрипотентные стволовые клетки) [Nishino K. and Umezawa A. 2016]. Более того, в 2017 году был зарегистрирован патент «Эпигенетические маркеры плюрипотентности» авторов и показано, что клеточная популяция, содержащая плюрипотентные клетки, демонстрировала пониженное метилирование областей генов *ARMC7*, *SLOX*, *SOX2*, *OCT4*, *SALLA*, *EPHA1* и/или *REX1* относительно контрольного уровня [United States, Pub. No.: US 2017 / 0321274].

Группа генов, связанные с индукцией EMT, которые также участвуют в индукции и поддержании стволового фенотипа, включает: *SNAI2*, *VIM*, *ZEB1*, *BMI*, *MYC*. *SNAI2* индуцирует первую фазу ЭМП, включая диссоциацию десмосом, клеточное распространение и иницирование разделения клеток. мРНК *SNAI2* экспрессируется в плаценте, меланоцитах, эмбриональных стволовых клетках, лейомиосаркоме, нейробластоме и глиобластоме. *SNAI2* прямой регулятор ядерной транскрипции в эпителиальных клетках опухоли молочной железы [Salgado B.S.et al 2014, Shankar J. and Nabi I.R. 2015]. Гиперэкспрессия *SNAI2* индуцирует развитие рака, в то время, как гипоэкспрессия обуславливает обратный эффект [Pérez-Caro M.et al 2008]. Апоптоз-индуцированная экспрессия *BMI/SNAI2*, может приводить к метастазированию, регулируя выживаемость опухолевых клеток молочной железы [Merino D.et al 2015]. *VIM* представляет собой ген, кодирующий белок виментин, функцией которого является механическая трансдукция сигнала от поверхности клетки к ядру, что вызывает реорганизацию цитоскелета, связанного с миграцией. Экспрессия *VIM* повышает инвазию и миграцию клеток РМЖ, наблюдается при лимфогенном метастазировании, а также способствует развитию агрессивного фенотипа и плохому прогнозу трижды негативного РМЖ за счет усиления инвазивности [Jafari N.et al 2018, Liu Tonget al 2013, Tian J.et al 2017, Yamashita N.et al 2013]. Ген *BMI1* является членом семейства Polycomb 1 (PcG) участвует в эмбриональном развитии и самообновлении тканевых стволовых клетках, участвует в регенерации и экспрессирован во многих тканях [Patel N.et al 2018].

Аберрантная экспрессия гена связана с многочисленными видами рака (в том числе и раком молочной железы) и обуславливает резистентность к некоторым химиопрепаратам [Ojo D.et al 2018, Sahasrabudde A.A. 2016]. Гиперэкспрессия *BM11* повышает потенциал самообновления эпителиальных клеток молочной железы и приводит к активации фенотипа опухолевых стволовых клеток. *BM11* связан со стабилизацией *SNAIL*, снижением негативной регуляции супрессора опухоли *P TEN* и индукцией эпителиально-мезенхимного перехода [Gergely J.E.et al 2018]. Нокдаун *BM11* в опухолевых клетках молочной железы индуцирует эпителиальную морфологию клеток, уменьшает экспрессию генов, связанных со стволовым состоянием клеток. Гиперэкспрессия *BM11* в опухоли способствует повышению экспрессии *NANOG*, тогда как опухоли с низким уровнем экспрессии *BM11* имеют сниженный уровень экспрессии *NANOG* [Paranjape A.N.et al 2014]. *ZEB1* является регулятором транскрипции, участвующим в эмбриональном развитии и прогрессировании рака. *ZEB1* индуцирует эпителиально-мезенхимальный переход в клетках рака молочной железы и других карциномах, способствует метастазированию, возникновению химио- и радиорезистентности [Eger A.et al 2005, Krebs A.M.et al 2017, Meidhof S.et al 2015, Zhang P.et al 2014]. Индукция гиперэкспрессии *ZEB1* в зрелых опухолевых клетках молочной железы приводит к индукции в них стволового фенотипа [Chaffer C.L., Brueckmann I. 2011, Chaffer C.L., Marjanovic N.D. 2013].

Протоонкоген *MYC* кодирующий белок, который является транскрипционным фактором роста, регулирующим метаболизм, пролиферацию, индукцию и поддержание плюрипотентности (входит в состав коктейля Яманаки). Избыточная экспрессия белка *MYC* обнаружена во многих новообразованиях, включая рак молочной железы, и связана с более агрессивным клиническим поведением. При раке молочной железы амплификация гена *MYC* наблюдается в 13% – 50% случаев, тогда как диапазон избыточной экспрессии белка гораздо шире (12% -100%) [Camarda R.et al 2016].

ALDH1A1 был предложен в качестве маркера стволовых клеток рака молочной железы [Charafe-Jauffret E.et al 2013b]. Тем не менее, сообщалось о противоречивых данных о роли *ALDH1A1* в прогнозе больных раком молочной железы. Некоторые исследования показали, что экспрессия белка *ALDH1A1* связана с поздней стадией рака, большим размером опухоли, химиорезистентностью и плохим прогнозом [Zhong Y.et al 2013, Zhong Y.et al 2014].

Ген *GATA3* (GATA Binding Protein 3) кодирует белок, который принадлежит к семейству транскрипционных факторов GATA. *GATA3* может заменить *OCT4* в перепрограммировании в индуцированные плюрипотентные клетки [Shu J.et al 2013b].

Член суперсемейства трансформирующего фактора роста бета (TGFβ) *NODAL* является установленным регулятором раннего эмбрионального развития. Экспериментальные данные *in vitro* и *in vivo* продемонстрировали, что ингибирование передачи сигналов *NODAL* снижает агрессивные характеристики опухолевых клеток, клинические данные показали связь экспрессии *NODAL* с исходами у пациентов с различными типами онкозаболеваний [Bodenstine Thomas M. et al 2016]. *NODAL* aberrантно активируется при меланоме, глиоме, раке молочной железы, раке простаты и раке эндометрия [Quail D.F. et al 2012b]. Важно, что экспрессия при злокачественных новообразованиях коррелирует с ростом и прогрессированием рака и может быть прогностическим маркером [Strizzi L. et al 2012]. Аномально экспрессируемый *NODAL* способствует пролиферации, инвазии, миграции опухолевых клеток, ингибирует апоптоз и стимулирует ангиогенез [Quail D.F. et al 2012a].

NANOG является белком, впервые обнаруженным в эмбриональных стволовых клетках, регулирующим функции транскрипционной регуляции, самообновления и плюрипотентности. Вместе с *SOX2* и *OCT4*, *NANOG* играет ключевую роль в поддержании свойств эмбриональных стволовых клеток. Подавление *NANOG* вызывает дифференцировку эмбриональных стволовых клеток мыши и человека [Darr H. et al 2006]. *NANOG* участвует в онкогенезе и опухолевой прогрессии аденокарциномы эндометрия человека, рака желудка, колоректального рака и рака легкого [Lin T. et al 2012, Zhou X. et al 2011]. При гепатоцеллюлярной карциноме человека *NANOG* играет решающую роль в поддержании самообновления опухолевых стволовых клеток [Shan J. et al 2012].

Выделяют и другие гены, которые участвуют в индукции и поддержании плюрипотентности и играют важную роль в канцерогенезе и прогрессии опухолей. Это такие гены как: *ITGB1*, *ZIC2*, *FLT3*, *CDX2*, *ZSCAN10*, *SALL3*, *INSR*, *TGFB*, *TGFBRI*

ЗАКЛЮЧЕНИЕ К ЛИТЕРАТУРНОМУ ОБЗОРУ

На сегодняшний день существует множество исследований, освящающих вопрос изучения CNA при раке молочной железы в различном контексте. В первую очередь рассматриваются частоты различных aberrаций числа копий в опухоли молочной железы. Согласно результатам многочисленных исследований показано, что наиболее часто в опухоли молочной железы наблюдаются амплификации и делеции в 1, 8, 11, 13, 16 и 17 хромосомах. При этом отмечают и определенные онкогены с высокой частотой делеции или амплификации, локализованные в данных хромосомных локусах - *BRCA1*, *ERBB2*, *MYC*, *CCND1*, *FGFR1*, *PTEN* и проч. Также опубликованы данные по изучению CNA-генетического ландшафта опухоли молочной железы при разных молекулярных подтипах,

выявлены особенности частоты хромосомных aberrаций для трижды негативного РМЖ. Выявлены особенности экспрессионного профиля - показано, что при HER2-позитивном РМЖ гиперэкспрессия гена *ERBB2* связана с увеличением числа копий 17q21. Отдельной строкой идут исследования, посвященные изучению ассоциации наличия CNA и метастазирования при РМЖ. Благодаря развитию данного направления исследований, за последние 5 лет удалось идентифицировать частые амплификации (1q, 5p, 8q, 11q и 20q), делеции (8p, 17p, 21p и Xq), сверхэкспрессированные (*ATAD2*, *BRAF*, *DERL1*, *DNMTRB* и *NEK2A*) и гипоекспрессированные гены (*ATM*, *CRYAB* и *HSPB2*) в образцах метастазов головного мозга при РМЖ. А также в прогностическом плане показать, что наличие делеции в области 8p11 является независимой прогностической переменной для общей выживаемости, а наличие делеции в 8p12 независимо предсказывает устойчивость к лучевой терапии.

Однако, данные по вопросу изменения CNA-генетического ландшафта опухоли молочной железы в процессе неoadъювантной химиотерапии в литературе крайне малочисленны. Показано, что для трижды негативного РМЖ количество копий членов семейства *AKT* и *CCND*, а также количество копий генов *MYC* и *MCL1* было увеличено в процессе НХТ. Также определено, что наиболее распространенными геномными изменениями в процессе НХТ при РМЖ являются мутации *TP53* и *PIK3CA* и 8 различных амплификаций (*TOP2A*, *ERBB2*, *ZNF70*, *TP53*, *PIK3CA*, *CCND1*, *PAK1*, *FGFR*).

Актуальным направлением сегодня является вопрос значения опухолевых стволовых клеток для метастазирования рака молочной железы. Известно, что опухолевые стволовые клетки - небольшая популяция клеток в опухоли, обладающая свойствами стволовости, поддерживающая прогрессирование рака - повышенную способность к самообновлению, росту, метастазированию и размножению. В настоящее время определены сигнальные пути, регулирующие опухолевые стволовые клетки молочной железы (WNT (wingless), Sonic Hedgehog (SHH), NOTCH, BMP/TGF- β (bone morphogenetic proteins/transforming growth factor β) (костный морфогенетический белок/трансформирующий фактор роста β)), NRF2 и PI3K/AKT/mTOR), опубликованы данные о роли ОСК и эпителиально-мезенхимального перехода в метастатических процессах при РМЖ. А также выявлены маркеры опухолевых стволовых клеток для данного типа рака, тогда как предполагаемыми фенотипами ОСК при РМЖ в литературных источниках определены ABCG2+, ANTXR1+, CD29+, CD61+, CD133+, CXCR4+, PROCR+, CD24+CD29+, CD24+CD49f+, CD44+CD24⁻/low, CD49fhiCD61hi, CD133+ALDH1+, CD44+CD24⁻/lowABCG2+, CD44+CD24⁻/lowALDH1+, CD44+CD24⁻/lowEpCAM+, CD44+CD24⁻/lowSSEA-3+, CD44+CD49f+CD133/2+, CD44+CD133+ALDH1+/hi,

CD133hiCXCR4hiALDH1hi, EpCAM+CD49f+, EpCAMhiPROCRhiSSEA-3+,
GD2+GD3+GD3Shi

Еще в 2012 году профессором Yamanaka S. получена Нобелевская премия за разработку метода получения стволовых клеток человека, а именно iPS-клеток - индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, из зрелых фибробластов. Ученым удалось с помощью генного коктейля (*OCT3*, *KLF4*, *SOX2* и *MYC*) «перепрограммировать» клетки, которые уже «получили» в организме дифференцировку. На сегодняшний день уже известными являются некоторые гены, которые связаны с индукцией стволовых свойств или поддержанием стволового состояния клеток. Например, гены *LIFR*, *BMP6*, *FZD1*, *SMAD9*, *ZIC2*, *SMAD4*, *INSR* активированы в праймированных стволовых клетках. Гиперэкспрессия генов *OCT4*, *NANOG*, *SOX2*, участвующих в перепрограммировании дифференцированных клеток в плюрипотентные стволовые клетки, была выявлена в ряде низкодифференцированных опухолей, которые отличаются высокой степенью злокачественности, а гены *C-MYC* и *FZD8* играют главную роль в регуляции опухолевых стволовых клеток трижды негативного рака молочной железы.

В главе 1 подробнее рассмотрены более пятидесяти известных генов (*SOX2*, *DPPA2*, *DPPA4*, *GSK3B*, *TERT*, *LIFR*, *BMP6*, *OCT3*, *SOX4*, *NOTCH4*, *PIM1*, *FZD9*, *FZD1*, *WNT2*, *SMO*, *CDK6*, *EPHA1*, *SHH*, *SNAI2*, *MYC*, *ALDH1A1*, *TGFBR1*, *KLF4*, *NOTCH1*, *KLF6*, *VIM*, *BMI1*, *ITGB1*, *ZEB1*, *GATA3*, *NODAL*, *NANOG*, *DPPA3*, *CCND2*, *SOX1*, *ZIC2*, *KLF5*, *SMAD9*, *FLT3*, *CCNA1*, *CDX2*, *SOX8*, *CCNF*, *ZSCAN10*, *SMAD4*, *SMAD2*, *SALL3*, *KLF1*, *KLF2*, *INSR*, *TGFB1*) индукции и поддержания плюрипотентности и их функции при раке молочной железы.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 МАТЕРИАЛЫ

2.1.1 Пациенты и лечение

В исследование включены 60 больных РМЖ T₁₋₄N₀₋₃M₀ (IIA–IIIB стадии) люминального В HER2-негативного подтипа, с морфологически верифицированным диагнозом, в возрасте 32–68 лет (средний возраст 46,2±0,4 лет (Mean±SE)), получавшие лечение в клинике НИИ онкологии Томского НИМЦ в период с 2006 по 2018 гг. Перед лечением было проведено иммуногистохимическое исследование для определения молекулярного подтипа опухоли. Люминальный В HER2-негативный подтип рака молочной железы определялся по ER +, PR + или -, Ki67 > 30%. При иммуногистохимическом окрашивании на HER2 ++, проводили FISH анализ и подтверждали отсутствие амплификации гена HER2. HER2 – тестирование выполнено в соответствии с рекомендациями Американского Общества Клинической Онкологии/Колледжа Американских Патологов [Wolff A. C. et al 2007, Wolff Antonio Cet al 2007]. Для стадирования РМЖ использована TNM-классификация AJCC (8-е издание, 2017 г.). В Таблице 2 представлены клинико-морфологические параметры больных РМЖ.

Исследование проходило в соответствии с Хельсинкской Декларацией 1964 г. (исправленной в 1975 и 1983 гг.) и с разрешения локального этического комитета института (протокол №1, от 14 января 2013 года), все пациенты подписали информированное согласие на исследование.

Больные имели IIA – IIIB стадии и в соответствии с «Consensus Conference on Neoadjuvant Chemotherapy in Carcinoma of the Breast, April 26 – 28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania» [Schwartz G.F. and Hortobagyi G.N. 2004] в неoadъювантном режиме получали 4-8 курсов химиотерапии по схемам FAC (фторурацил, доксорубицин, циклофосфан), AC (доксорубицин, циклофосфан), CAH (циклофосфан, доксорубицин, кселода), CP (циклофосфан, цисплатин) и монотерапию таксотером, АСТ (доксорубицин, циклофосфан, таксотер) и АТ (доксорубицин, таксотер). Через 3-5 недель после НХТ проводилась операция в объеме радикальной или подкожной мастэктомии, радикальной резекции, секторальной резекции с аксиллярной лимфаденэктомией или другого вида органосохранной операции, далее больным проводилась лучевая терапия и/или гормональное лечение назначались по показаниям.

Таблица 2. Клинико-морфологические параметры обследованных больных РМЖ.

Клинико-морфологический параметр	Число больных (абс. ч., %)
----------------------------------	----------------------------

Возраст (лет)	≤45	24 (40,0%)
	>45	36 (60,0%)
Менструальный статус	Пременопауза	33 (55,0%)
	Постменопауза	27 (45,0%)
Гистологический тип	Инвазивный протоковый рак	51 (85,0%)
	Инвазивный дольковый рак	2 (3,3%)
	Медулярный рак	1 (1,7%)
	Другие типы	6 (10,0%)
Размер опухоли	T ₁	6 (10,0%)
	T ₂	51 (85,0%)
	T ₃	2 (3,3%)
	T ₄	1 (1,7%)
Лимфогенное метастазирование	N ₀	29 (48,3%)
	N ₁	24 (40,0%)
	N ₂	3 (5,0%)
	N ₃	4 (6,7%)
Рецепторы эстрогена	+	60 (100%)
Рецепторы прогестерона	+	49 (81,7%)
	–	11 (18,3%)
Рецепторы эпидермального фактора роста HER2	0/+	49 (81,7%)
	++ без амплификации	11 (18,3%)
Молекулярный подтип	Люминальный В HER2-	60 (100%)
Гистологическая форма	Уницентрическая	41 (68,3%)
	Мультицентрическая	19 (31,7%)
Схема НХТ	CAX	14 (23,4%)
	FAC/AC	27 (45,0%)
	Таксотер	11 (18,3%)
	AT/ACT	3 (5,0%)
	CP	5 (8,3%)
Ответ на НХТ	Прогрессирование	2 (3,3%)
	Стабилизация	16 (26,7%)
	Частичная регрессия	34 (56,7%)
	Полная морфологическая регрессия	8 (13,3%)
Среднее время наблюдения за пациентами, месяц (M ± SE)		52,4±3,8 (min-max:10-144)
Частота метастазирования		15 (25,0%)

Эффективность предоперационной химиотерапии оценивали по критериям ВОЗ и Международного противоракового союза (International Union Against Cancer) [Hayward J. et al 1977] с помощью УЗИ и/или маммографии, которые проводили до лечения, после 2 курсов НХТ и перед операцией. Регистрировали полную регрессию (100% уменьшение опухоли), частичную регрессию (уменьшение объема опухоли более чем на 50%), стабилизацию (снижение объема менее чем на 50% или увеличение не более, чем на 25%) и прогрессирование (увеличение объема опухоли более чем на 25%). Все случаи полной регрессии были подтверждены морфологически. Согласно международным

рекомендациям, при проведении предоперационной химиотерапии больные РМЖ со стабилизацией или прогрессированием составляют группу с отсутствием ответа на НХТ, а больные с частичной и полной регрессией – группу с объективным ответом [Kaufmann M. et al 2012].

Также в работу включены 8356 пациентов со злокачественными новообразованиями различных локализаций для проведения аналитической работы по данным проекта [TCGA cBioPortal for Cancer Genomics](#). Из них: Плоскоклеточный рак легкого – 985 больных, Аденокарцинома желудка – 324 пациента, Рак прямой кишки – 388 больных, Плоскоклеточный рак головы и шеи – 512 больных, Рак мочевого пузыря – 401 пациент, Аденокарцинома толстой кишки – 433 больных, Рак пищевода – 163 пациента, Серозная цистаденокарцинома яичников – 552 больных, Аденокарцинома легких – 503 пациента, Меланома кожи – 461 больной, Плоскоклеточный рак шейки матки – 296 пациентов, Рак молочной железы – 1048 больных, Саркома мягких тканей – 248 больных, Светлоклеточный рак почки – 763 пациента, Рак тела матки – 336 больных, Аденокарцинома простаты – 472 пациента, Рак щитовидной железы – 471 больной.

2.1.2 Характеристика клеточных культур

В работу были использованы следующие культуры клеток опухоли молочной железы: BT-474, BT-549, MDA-MB-231, MDA-MD-468, MCF7, SK-BR-3 и T47D. Характеристика данных культур приведена в Таблице 3.

Таблица 3. Характеристика клеточных культур, используемых в исследовании

Клеточная культура	Характеристики	Описание
BT-474	Люминальный B; ER+, PR+/-, HER2+; высокая экспрессия Ki-67	Линия клеток BT-474 является удобной платформой для исследования механизмов метастазирования <i>in vitro</i> и разработки новых противоопухолевых препаратов для лечения метастатического рака молочной железы. Линия BT-474 была выделена E. Lasfargues и W.G. Coutinho из солидной инвазивной протоковой карциномы груди [Lasfargues E. et al 1979, Lasfargues E.Y. et al 1978]. BT-474 характеризуется сверхэкспрессией HER-2 и ER. Клетки BT-474 растут в ответ на эстрадиол, но проявляют устойчивость к антагонисту ER тамоксифену.
BT-549	Claudin-low; ER-, PR-, HER2-; низкая экспрессия E-cadherin	Линия клеток трижды негативного рака молочной железы (в ней отсутствует экспрессия рецептора эстрогена (ER) и прогестерона (PR), а также амплификация HER2 (рецептора эпидермального фактора роста человека). Линия BT-549 была выделена в 1978 году W.G. Coutinho и E.Y. Lasfargues.

		Исходная ткань состояла из инвазивной опухоли, которая метастазировала в 3 из 7 региональных лимфатических узлов [Lasfargues E.Y., Coutinho W.G. 1978].
MDA-MB-231	Claudin-low; ER-, PR-, HER2-; низкая экспрессия E-cadherin	Линия MDA-MB-231 представляет собой эпителиальную клеточную линию РМЖ человека, полученную из метастатической аденокарциномы молочной железы [Cailleau R. et al 1978], и является одной из наиболее часто используемых линий клеток РМЖ в медицинских исследовательских лабораториях. MDA-MB-231 - это высокоагрессивная, инвазивная и низкодифференцированная линия клеток трижды негативного РМЖ [Chavez K.J. et al 2010]. Для данной линии показана низкая экспрессия маркера пролиферации Ki-67, и наличие маркеров, связанных со стволовыми клетками рака молочной железы, таких как CD44+CD24-/low [Holliday D.L. and Speirs V. 2011].
MDA-MD-468	Базальный; ER-, PR-, HER2-; EGFR+ и/или cytokeratin 5/6+, высокая экспрессия Ki67	Химиочувствительная линия клеток трижды негативного РМЖ MDA-MB-468 была выделена в 1977 г. R. Cailleau и др. из метастатической аденокарциномы молочной железы [Cailleau R., Olive M. 1978]. Характеризуется следующими параметрами: наличием экспрессии эпидермального фактора роста (EGF), трансформирующего фактора роста альфа (TGF alpha), EGFR+ и/или cytokeratin 5/6+. Также показана высокая экспрессия маркера пролиферации Ki-67.
MCF7	Люминальный А; ER+, PR+/-, HER2-; низкая экспрессия Ki-67	Линия MCF7 представляет собой неинвазивную клеточную линию РМЖ человека, относящуюся к люминальному А подтипу (ER+, PR+/-, HER2-). MCF7 является малоагрессивной клеточной линией, как правило, имеющей низкий метастатический потенциал [Gest C. et al 2013]. Данная линия была выделена в 1973 г. Dr. Soule и коллегами из метастатической аденокарциномы молочной железы [Soule H. et al 1973]. Клетки MCF-7 хорошо подходят для исследований устойчивости к антигормональной терапии, поскольку они легко культивируются и сохраняют экспрессию ER, при наличии таргетной терапии [Sweeney E.E. et al 2012].
SK-BR-3	HER2 - позитивный; ER-, PR-, HER2+; высокая экспрессия Ki-67	Химиочувствительная линия клеток SkBr3 была получена из аденокарциномы молочной железы в 1970 году (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center) [Trempe G. 1976]. Клеточная линия сверхэкспрессирует HER2. Имеет следующий молекулярный профиль: ER-, PR-, HER2+, высокая экспрессия маркера пролиферации Ki-67. Данная клеточная линия используется в терапевтических исследованиях, особенно в контексте нацеливания на HER2.
T47D	Люминальный А;	T47D представляет собой клеточную линию РМЖ

	ER+, HER2-; экспрессия Ki-67	PR+/-, низкая экспрессия Ki-67	человека, относящуюся к люминальному А подтипу (ER+, PR+/-, HER2-), полученную из протоковой карциномы молочной железы. Характеризуется наличием низкого уровня экспрессии Ki-67. Данную линию клеток часто используют в биомедицинских исследованиях, связанных с гормональной терапией в виду ее чрезвычайной устойчивости к эстрогенам и антиэстрогенам [Horwitz K.B.et al 1982].
--	------------------------------------	--------------------------------------	--

2.1.3 База TCGA

Атлас генома рака (The Cancer Genome Atlas) - это крупномасштабная совместная работа Национального института рака (NCI) и Национального исследовательского института генома человека (NHGRI) по картированию геномных и эпигеномных изменений, которые возникают при 32 типах рака человека, в том числе девять редких опухолей. Основная цель проекта- поддержать новые открытия посредством создания каталога соматических аберраций, встречающихся в различных новообразованиях, и ускорить темпы исследований, направленных на улучшение диагностики, лечения и профилактики рака.

Данные проекта публикуются сразу после того, как признаются технически правильными с помощью показателей контроля качества. Информация, генерируемая TCGA, централизованно управляется и вводится в базы данных по мере ее поступления, что делает данные быстро доступными для всего исследовательского сообщества. К январю 2015 года TCGA сгенерировала около 1,7 петабайта данных примерно для 11 500 случаев опухоли и соответствующих образцов нормальной ткани [Wang Z.et al 2016].

2.1.4 База данных больных РМЖ

Для выполнения исследований были созданы 8 электронных баз данных для регистрации пациентов со злокачественными новообразованиями молочной железы, обратившихся в клинику НИИ онкологии. На электронные базы данных получены регистрационные Свидетельства о государственной регистрации базы данных № 2015621620 от 30 октября 2015 г. «База данных по нормальной генетической вариабельности опухоли молочной железы и уровня экспрессии в ней генов химиорезистентности», № 2018620706 от 16 мая 2018 г. «База данных экспрессии генов сомато-стволового перехода в процессе предоперационной химиотерапии у больных с диагнозом рак молочной железы», № 2019620470 от 22 марта 2019 г. «База данных частоты цитобендов с вариациями числа копий в опухоли молочной железы в процессе неoadъювантной химиотерапии», № 2019620731 от 08 мая 2019 г. «База данных изменения

амплификаций генов стволовости в опухоли молочной железы в процессе предоперационной терапии», № 2019620995 от 6 июня 2019 г «База данных по полногеномной оценке потери гетерозиготности в опухоли больных люминальным В раком молочной железы», № 2020620411 от 5 марта 2020 г «База данных копийности генов WNT – сигналинга в опухоли больных раком молочной железы», №2020620652 от 9 апреля 2020 г «База данных изменения количества метастатических клонов в опухоли больных люминальным В раком молочной железы в процессе неoadъювантной химиотерапии» и №2020622457 от 30 ноября 2020 г «База данных транскриптомов опухолей больных раком молочной железы в процессе неoadъювантной химиотерапии».

Базы данных выполнены на основе СУБД «Microsoft Office Excel 2007» и имеют характер деперсонифицированной сводной таблицы. Однотипные данные сгруппированы в отдельных столбцах, при этом в первом столбце указан шифр (Пин код), кодирующий фамилию, имя и отчество пациентов, по которым ведется учет.

Разработанные базы данных предназначены для регистрации больных раком молочной железы, получающих лечение в НИИ онкологии, систематизации персональных клинико-морфологических данных и данных об уровне экспрессии генов стволовости и химиорезистентности, а также учета наличия метастатических клонов в опухоли молочной железы на каждого пациента. Базы являются основой при проведении исследований с целью оптимизации стратегии лечения больных с РМЖ на основе исследуемых факторов. Базы рабочие, постоянно пополняются, не требует особого обучения персонала. Фрагмент базы данных представлен на Рис. 1.

1	Код/шифр	Наличи	Age	Возра	umor S	T	Node	N	Тенора	Ленора	логиче	Хема Н	НАС1	umber ci	Кол-во	факт Y	факт I	CT resiz	факт C
4	20173	есть	>45	53	T1-2	2	N0	0	Post	пауза	ирующий	FAC	FAC-CAX	х курсов	4	49	31	SD+P	таблицизи
7	20176	есть	>45	56	T1-2	2	N1-3	3	Post	пауза	ирующий	FAC	FAC-CAX	х курсов	4	33	67	CR+PR	зная регр
9	20178	есть	>45	48	T1-2	1	N1-3	1	Pre	Сохране	ирующий	FAC	FAC-CAX	х курсов	4	36	64	CR+PR	зная регр
10	20179	есть	>45	46	T1-2	1	N1-3	1	Pre	Сохране	ирующий	FAC	FAC-CAX	х курсов	2	96	4	SD+P	таблицизи
13	20182	есть	<45	43	T1-2	2	N1-3	1	Pre	Сохране	ирующий	FAC	FAC-CAX	х курсов	4	есс. мелких	48	SD+P	таблицизи
14	20183	есть	>45	48	T1-2	2	N0	0	Pre	Сохране	ирующий	FAC	FAC-CAX	х курсов	2	83	17	SD+P	таблицизи
15	20184	есть	>45	57	T1-2	2	N1-3	1	Post	пауза	ирующий	CAX	FAC-CAX	х курсов	4	14	86	CR+PR	Частичная
16	20185	есть	>45	50	T1-2	2	N1-3	1	Post	пауза	ирующий	FAC	FAC-CAX	х курсов	3	26	74	CR+PR	Частичная
17	20186	есть	>45	47	T1-2	1	N0	0	Pre	Сохране	ирующий	FAC	FAC-CAX	х курсов	4	0	100	CR+PR	ная регресс
18	20187	есть	<45	39	T1-2	1	N1-3	2	Pre	Сохране	ирующий	FAC	FAC-CAX	х курсов	2	311	-211	SD+P	ирование
20	20189	есть	>45	51	T1-2	2	N0	0	Post	пауза	ирующий	FAC	FAC-CAX	х курсов	4	21	79	CR+PR	Частичная
21	20190	есть	>45	57	T1-2	2	N0	0	Post	пауза	ирующий	OMK	FAC-CAX	х курсов	4	15	85	CR+PR	Частичная
23	20192	есть	>45	68	T1-2	2	N1-3	1	Post	пауза	ирующий	CAX	FAC-CAX	х курсов	4	17	73	CR+PR	Частичная
24	20193	есть	>45	47	T1-2	2	N1-3	1	Pre	Сохране	ирующий	CAX	FAC-CAX	х курсов	4	6	94	CR+PR	Частичная
25	20194	есть	>45	47	T1-2	2	N0	0	Pre	Сохране	ирующий	CAX	FAC-CAX	х курсов	2	93	7	SD+P	таблицизи
27	20196	есть	>45	39	T1-2	2	N1-3	1	Pre	Сохране	ирующий	CAX	FAC-CAX	х курсов	4	32	68	CR+PR	Частичная
28	20197	есть	>45	60	T1-2	2	N1-3	1	Post	пауза	ирующий	CAX	FAC-CAX	х курсов	2	90	10	SD+P	таблицизи
33	20202	есть	>45	51	T1-2	2	N0	0	Post	пауза	ирующий	CAX	FAC-CAX	х курсов	4	11	89	CR+PR	Частичная
34	20203	есть	>45	44	T1-2	1	N0	0	Pre	Сохране	ирующий	CAX	FAC-CAX	х курсов	4	0	100	CR+PR	ная регресс
36	20205	есть	>45	54	T1-2	1	N1-3	2	Post	пауза	ирующий	FAC	FAC-CAX	х курсов	4	95	66	CR+PR	Частичная
37	20206	есть	>45	51	T1-2	2	N1-3	2	Pre	Сохране	ирующий	FAC	FAC-CAX	х курсов	2	166	-66	SD+P	ирование
38	20207	есть	>45	52	T1-2	2	N1-3	1	Post	пауза	ирующий	FAC	FAC-CAX	х курсов	2	112	-12	SD+P	ирование
39	20208	есть	>45	45	T3-4	4	N0	0	Post	пауза	ирующий	FAC	FAC-CAX	х курсов	4	68	75	CR+PR	Частичная
41	20210	есть	>45	38	T1-2	2	N1-3	1	Pre	Сохране	ирующий	1	FAC-CAX	х курсов	2,5	120	-20	SD+P	таблицизи
46	20215	есть	>45	44	T1-2	1	N1-3	1	Pre	Сохране	ирующий	FAC	FAC-CAX	х курсов	3	102	98	CR+PR	Частичная
48	20217	есть	>45	46	T1-2	2	N0	0	Pre	Сохране	ирующий	FAC	FAC-CAX	ше 2-х курсов	82	18	SD+P	таблицизи	
49	20218	есть	>45	45	T3-4	3	N1-3	1	Pre	Сохране	ирующий	CAX	FAC-CAX	х курсов	4	37	63	CR+PR	Частичная
54	20223	есть	>45	48	T1-2	2	N0	0	Post	пауза	ирующий	FAC	FAC-CAX	х курсов	2	100	0	SD+P	таблицизи
57	20226	есть	>45	49	T1-2	1	N0	0	Post	пауза	ирующий	AC(3);CAX	FAC-CAX	х курсов	5	62	18	CR+PR	Частичная
58	20227	есть	>45	48	T1-2	2	N1-3	1	Pre	Сохране	ирующий	FAC	FAC-CAX	х курсов	4	76	24	SD+P	таблицизи
60	20229	есть	>45	49	T1-2	2	N1-3	1	Pre	Сохране	ирующий	FAC	FAC-CAX	х курсов	4	63	37	SD+P	таблицизи
62	20231	есть	>45	49	T1-2	2	N0	0	Post	пауза	ирующий	FAC	FAC-CAX	х курсов	4	42	58	CR+PR	Частичная
63	20232	есть	>45	50	T1-2	2	N1-3	3	Post	пауза	ирующий	FAC	FAC-CAX	х курсов	2	72	28	SD+P	таблицизи
64	20233	есть	>45	43	T1-2	2	N1-3	1	Pre	Сохране	ирующий	FAC	FAC-CAX	х курсов	2	78	9	SD+P	таблицизи
66	20235	есть	>45	38	T1-2	2	N1-3	1	Pre	Сохране	ирующий	FAC	FAC-CAX	х курсов	4	17	83	CR+PR	Частичная
67	20236	есть	>45	54	T1-2	2	N0	0	Post	пауза	ирующий	FAC	FAC-CAX	х курсов	4	82	18	SD+P	таблицизи
68	20237	есть	>45	49	T1-2	2	N0	0	Post	пауза	ирующий	FAC	FAC-CAX	х курсов	4	146	-46	SD+P	ирование
69	20238	есть	>45	59	T1-2	2	N1-3	1	Post	пауза	ирующий	FAC?	FAC-CAX	ше 2-х курсов				CR+PR	Частичная
71	20240	есть	>45	57	T1-2	2	N1-3	1	Post	пауза	ирующий	FAC	FAC-CAX	х курсов	4	13	87	CR+PR	Частичная

Рис. 1. Фрагмент «Базы данных экспрессии генов сомато-стволового перехода в процессе предоперационной химиотерапии у больных с диагнозом рак молочной железы»

В приведенной базе данных пациентов возможна работа со следующей информацией: 1) пин-код пациента; 2) наличие информированного согласия; 3) данные амбулаторной карты – ее номер, диагноз на момент оперативного вмешательства; 4) анамнестические данные пациента – возраст, возраст менархе, состояние менструальной функции, наследственная отягощенность, количество родов, количество аборт; 5) характеристика опухоли – стадия заболевания по классификации TNM, гистологический тип опухоли, количество лимфоузлов, количество лимфоузлов с метастазами, гистологическая форма опухоли, степень злокачественности, фоновая патология, статус рецепторов эстрогенов, прогестерона и HER2/neu, молекулярный подтип опухоли; 6) сведения о лечении пациентов – схема НХТ, количество курсов, эффект предоперационной химиотерапии, степень лекарственного патоморфоза, вид операции, адъювантная химиотерапия (схема, количество курсов), адъювантная лучевая терапия (наличие, суммарная очаговая доза), адъювантная гормонотерапия (наличие, препарат); 7) исход лечения – дата, локализация и наличие отдаленного метастазирования, наличие и дата рецидивирования, жизненный статус, безрецидивная, общая и безметастатическая выживаемость; 8) информация об уровне экспрессии генов стволовости в биопсийном и операционном материале каждого больного. Список генов включает гены стволовости: *OCT3*, *SMO*, *MYC*, *SNAI2*, *MOB3B*, *KLF4*, *BMI1*, *VIM*, *FLT3*, *LAT*, *SMAD2*, *LMNB2*, *KLF1*, *TERT*, *TGFBI*, *TGFBR1*, 9) наличие хромосомных aberrаций в геноме на каждого пациента, 10) информация о биологическом материале – наличие образцов (до лечения и после операции), дата взятия операционного материала, наличие РНК из опухолевых образцов, наличие ДНК из опухолевых образцов, наличие ДНК из крови, наличие образцов крови.

Первичная систематизация для последующего статистического анализа, многоаспектный поиск и настройка полей входного формата под конкретный запрос являются необходимыми условиями эффективной работы исследователей.

2.1.5 Забор опухолевого материала

В качестве исследуемого материала, были использованы биопсийные опухолевые образцы (~10 мм³), взятые до лечения под контролем УЗИ, а также операционный материал (~60–70 мм³) после НХТ. Образцы опухоли помещали в раствор RNAlater (Ambion, USA) и сохраняли при температуре –80°C (после 24-часовой инкубации при +4°C) для дальнейшего выделения РНК и ДНК.

2.2 ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ

На Рис. 2 представлен дизайн исследования, согласно этапам, которого проведено выполнение всех запланированных задач представленной работы. Так, первым блоком исследований была идентификация изменений, возникающих в опухоли пациентов под действием НХТ, а также ассоциация изменений CNA с гематогенным метастазированием. Вторым блоком выполненной работы было проведение валидации полученных результатов: ассоциация амплификаций 8356 больных с 17 солидными ЗНО (по данным TCGA), со смертностью при данных локализациях (по данным ВОЗ). Выявление системы генов, присутствующих во всех выявленных амплифицированных регионах. Оценка ассоциации экспрессии генов стволовости, присутствующих во всех регионах локализации амплификаций с метастазированием. Полнотранскриптомный анализ связи экспрессии генов (в том числе и всех генов стволовости) с амплификацией гена стволовости *MYC*. Финальной частью валидации полученных результатов было проведение эксперимента по подтверждению образования маммосфер отсортированными дифференцированными опухолевыми клетками стандартных культур опухоли молочной железы, содержащими и не содержащими амплификации генов стволовости.

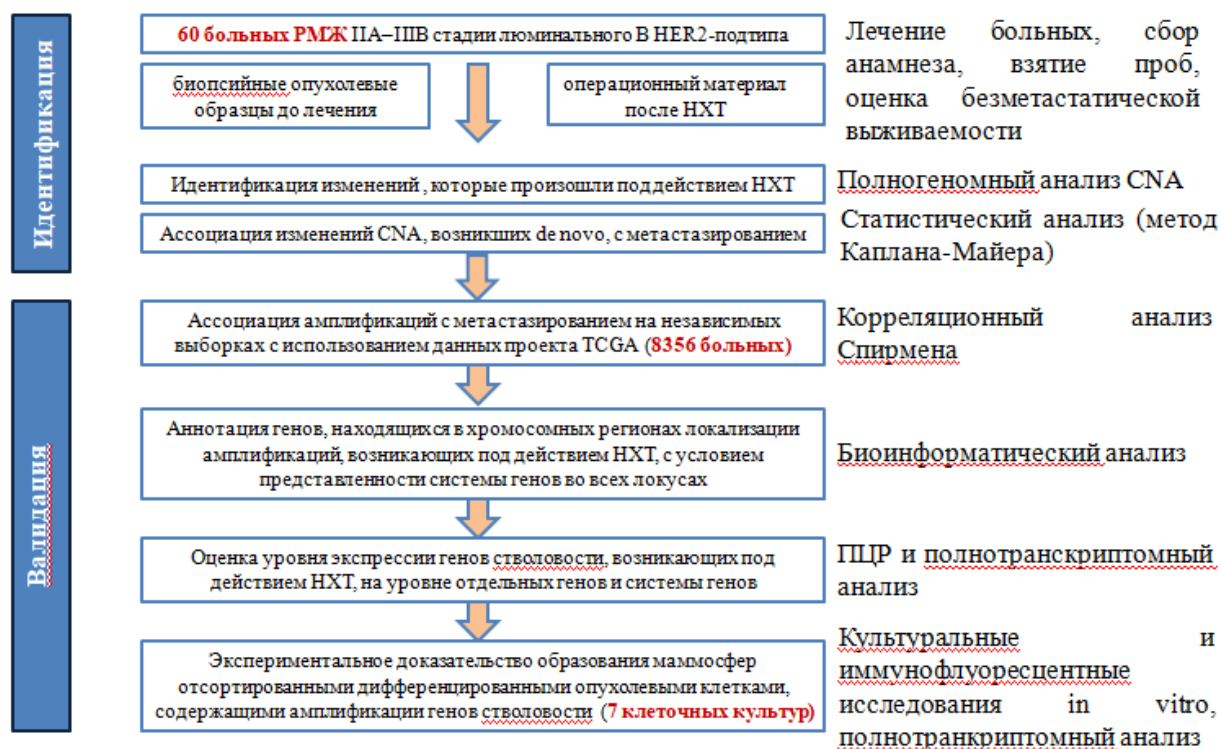


Рис. 2. Дизайн исследования

По результатам работы сформулирована гипотеза о роли стволовой пластичности дифференцированных опухолевых клеток в приобретении способности к

метастазированию и значении амплификаций генов стволовости для индукции процесса дедифференцировки.

2.3 МЕТОДЫ

2.3.1 Выделение РНК

Тотальная РНК была выделена из 60 парных образцов опухоли молочной до лечения и после НХТ от каждого пациента. РНК выделяли с помощью набора RNeasy Plus mini Kit, содержащего ДНК-азу I (Qiagen, Germany, #74134) в соответствии с инструкцией производителя. Далее на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, USA) оценивали концентрацию и чистоту выделения РНК. Концентрация РНК составила от 15 до 150 нг/мкл, $A_{260}/A_{280} = 1,65-1,95$; $A_{260}/A_{230} = 1,80-1,95$. Целостность РНК оценивалась при помощи капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, USA) и набора R6K ScreenTape (Agilent Technologies, USA #5067-5367). RIN составил 5,8 – 9,0. (Рис. 3).

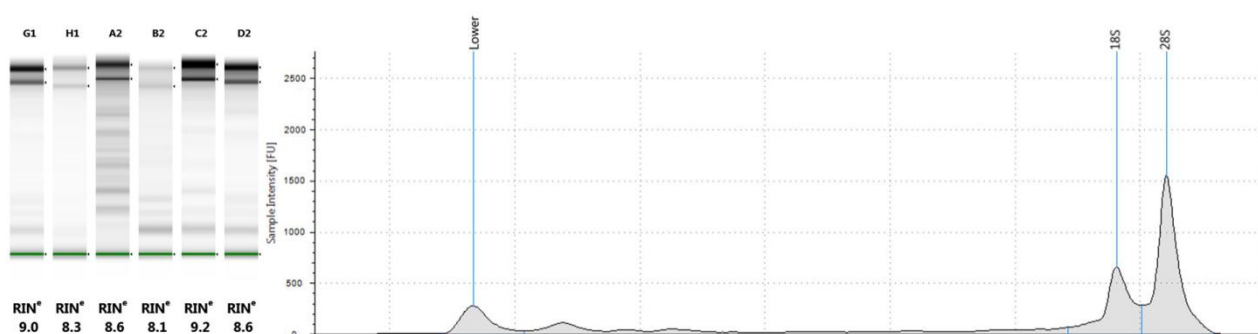


Рис. 3. Электрофореграмма и денситограмма тотальной РНК, выделенной из опухоли молочной железы при помощи набора RNeasy Mini Kit Plus (Qiagen, Germany).

Капиллярный электрофорез выполнен на приборе TapeStation (Agilent Technologies, USA). Видны бенды 28S и 18S рибосомальной РНК и показатель целостности РНК - RIN (RNA Integrity Number) составил 8.3. Спектрофотометрические показатели этого образца РНК – $A_{260}/A_{280} = 1.91$, $A_{260}/A_{230} = 2.13$, концентрация – 129 нг/мкл.

Выделенная РНК хранилась при -80°C в низкотемпературном морозильнике (Sanyo, Japan) и использовалась для дальнейших исследований.

2.3.2 Выделение ДНК

ДНК из опухолевой ткани молочной железы выделяли из 60 парных образцов опухоли молочной до лечения и после НХТ от каждого пациента при помощи набора QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Germany # 51304) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию и чистоту выделения ДНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, USA). Концентрация составила от 50 до 290 нг/мкл,

$A_{260}/A_{280} = 2,01-2,26$; $A_{260}/A_{230} = 2,09-2,33$. Целостность ДНК оценивалась при помощи капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, USA) с использованием набора Agilent Genomic DNA ScreenTape System Quick Guide (Agilent Technologies, USA # 5067-5365) (Рис. 4). На рисунке 4 хорошо видно, что фрагменты ДНК, в основном, имеют массу более 48 kbp.

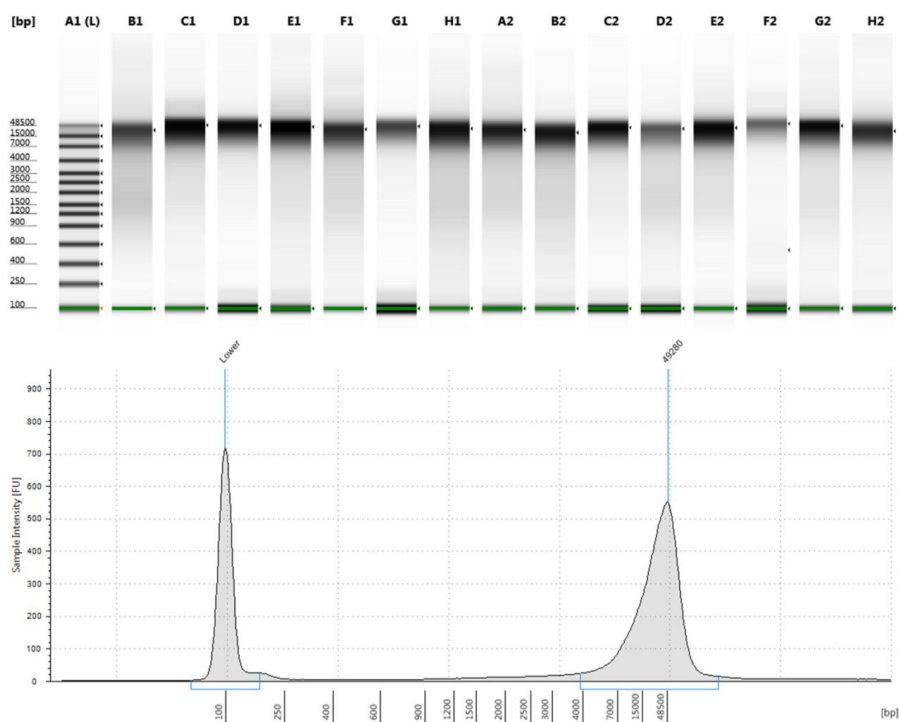


Рис. 4. Электрофореграмма и денситограмма ДНК, выделенной из биопсийных образцов опухоли молочной железы. Видна хорошая целостность ДНК, масса ДНК более 48 kbp. A1 – маркер молекулярной массы; B1..H2 – образцы ДНК опухолей больных; нижний бенд на каждой дорожке – маркер прохождения электрофореза.

Выделенная ДНК хранилась при -80°C в низкотемпературном морозильнике (Sanyo, Japan) и использовалась для дальнейших микроматричных исследований.

2.3.3 Капиллярный электрофорез

Целостность РНК оценивалась при помощи капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, USA) с использованием набора Agilent R6K ScreenTape System Quick Guide. Предварительно подготовленную смесь, состоящую из 4 мкл R6K Sample Buffer и 1 мкл образца РНК, перемешивали и инкубировали при 72°C 3 мин, затем охлаждали образец 2 мин при -20°C и помещали в прибор 2200 TapeStation (Agilent Technologies, USA). Для оценки целостности ДНК использовали набор Agilent Genomic DNA ScreenTape System Quick Guide. К 1 мкл исследуемого образца ДНК добавляли 10 мкл Genomic DNA Sample Buffer, перемешивали на вортексе, центрифугировали для

осаждения капель и помещали пробу в прибор для капиллярного электрофореза 2200 TapeStation. Дополнительно первой пробиркой в приборе ставится маркер молекулярной массы, в объеме 4 мкл.

Проверку чистоты ПЦР-продуктов проводили с набора Agilent D1000 ScreenTape Assay, позволяющий анализировать качество и чистоту полученного ампликона от 35 до 1,000 bp. По результатам анализа длина ампликона соответствовала подобранным праймерам (Таблица 4).

2.3.4 Количественная ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени

Уровень экспрессии генов *TERT* (5p15.33); *OCT3* (6p21.33); *SMO* (7q32.1); *SNAI2* (8q11.21); *MYC* (8q24.21); *TGFBR1* (9q22.33); *KLF4* (9q31.2); *BM11* (10p12.2); *VIM* (10p13); *FLT3* (13q12.2); *SMAD2* (18q21.1); *KLF1* (19p13.13) оценивали при помощи обратнотранскриптазной количественной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR) с оригинальными праймерами и зондами по технологии TaqMan (Таблица 4) на амплификаторе Rotor-Gene-6000 (Corbett Research, Australia). Для получения кДНК на матрице РНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора RevertAid™ (Thermo Fisher Scientific, USA) со случайными гексануклеотидными праймерами в соответствии с инструкцией к набору.

ПЦР ставился в трех репликах в объеме 15 мкл, содержащем 250 мкМ dNTPs (Sibenzyme, Россия), 300 нМ прямого и обратного праймеров, 200 нМ зонда, 2.5 мМ MgCl₂, 19 SE buffer (67 мМ Tris-HCl pH 8,8 при 25°C, 16.6 мМ(NH₄)₂SO₄, 0,01 % Tween-20), 2,5 ед. HotStart Taq polymerase (Sibenzyme, Россия) и 50 нг кДНК. Двух шаговая программа амплификации включала 1 цикл – 94°C, 10 мин – предварительная денатурация; 40 циклов – 1 шаг 94°C, 10 сек и 2 шаг 20 сек – при температуре 60°C. В качестве гена-рефери использовались два гена рефери: GAPDH (glyceraldehydes-3-phosphatedehydrogenase) и АСТВ (actin beta), уровень экспрессии генов нормализовался по отношению к экспрессии генов-рефери. Синтез праймеров и проб осуществляла фирма ДНК-синтез (Москва, Россия).

В качестве калибратора использовалась пулированная от 25 пациентов РНК, выделенная из нормальной ткани молочной железы, полученной во время операции от больных, которым не проводилась НХТ. Уровень экспрессии измерялся в условных единицах. Относительная экспрессия оценивалась с помощью метода Pfaffl [Pfaffl M.W. 2001] и следующая формула (1) использовалась для того, чтобы определить отношение экспрессии между образцом и калибратором:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta Ct, \text{target}(\text{calibrator} - \text{test})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta Ct, \text{ref}(\text{calibrator} - \text{test})}} \quad (1)$$

где E – эффективность реакции, Ct пороговый цикл генов мишеней (target) и гена-реферри (ref). $\Delta Ct, \text{target}(\text{calibrator} - \text{test}) = Ct$ гена мишени в калибраторе минус Ct гена мишени в опытном образце; $\Delta Ct, \text{ref}(\text{calibrator} - \text{test}) = Ct$ гена-рефери в калибраторе минус Ct гена-рефери в опытном образце.

Таблица 4. Последовательность праймеров и проб исследованных генов

Гены	Ампликон	Последовательность
<i>OCT3</i> NM_001173531.2	144 bp	F 5'- ggattacagtcccaggacatc -3'
		R 5'- ctgaataccttcccaaataga-3'
		Probe 5'- tgccaagctcctgaagcagaa -3'
<i>SMO</i> NM_005631.5	112 bp	F 5'- cgggactatgtgctatgtcag -3'
		R 5'- ggttgatcttctccaccagaa -3'
		Probe 5'- accaagcagcccatcctgact -3'
<i>MYC</i> NM_001354870.1	109 bp	F 5'- cagcagcgactctgaggag -3'
		R 5'- agcagaaggtgatccagactct -3'
		Probe 5'- agaggcaggctcctggcaaa -3'
<i>SNAI2</i> NM_003068.5	116 bp	F 5'- gaactggacacacatacagtgatta -3'
		R 5'- cacacagtgatgggctgta -3'
		Probe 5'- ccatgcctgtcataccacaacca -3'
<i>KLF4</i> NM_001314052.1	109 bp	F 5'- gggtttggctctgtttct -3'
		R 5'- caggtggctgcctcattaa -3'
		Probe 5'- cacctgaaccccaagtcaacg -3'
<i>BMI1</i> NM_005180.9	94 bp	F 5'- tctttgaccagaacagattgg -3'
		R 5'- gctgggcatcgtaatgtatctt -3'
		Probe 5'- tcggaaagtaacaaagacaaagaga -3'
<i>VIM</i> NM_003380.5	87 bp	F 5'- gccctaaaggaaccaatga -3'
		R 5'- gtcttgtagttagcagcttcaa -3'
		Probe 5'- tgcgtgaaatggaagagaacttg -3'
<i>FLT3</i> NM_004119.2	97 bp	F 5'- tcttgataacggatacagcatatc -3'
		R 5'- ggtaaattgggcatcatcatt -3'
		Probe 5'- tcataagcaccagccaggagaatat -3'
<i>SMAD2</i> NM_001003652.3	106 bp	F 5'- atgtgtaccataccaagcactt -3'
		R 5'- ggtttgttcagagaagctgtaaa -3'
		Probe 5'- ccaaatac gatagatcagtgggataca -3'
<i>KLF1</i> NM_006563.4	166 bp	F 5'- tccaggtgtgatagccgag -3'
		R 5'- gtatggcttctcccctgtgt -3'
		Probe 5'- tgcggcaagagctacaccaa -3'
<i>TERT</i> NM_001193376.1	88 bp	F 5'- ttctggatttgcaggtgaac -3'
		R 5'- catgcgtgaaacctgtacg -3'

		Probe 5'- caacatctacaagatcctcctgctg -3'
<i>TGFB1</i> NM_000660.6	122 bp	F 5'- caactattgcttcagctccac -3'
		R 5'- ggcagaagttggcatggta -3'
		Probe 5'- aggtccttgccggaagtcaatgta -3'
<i>TGFB1</i> NM_001130916.2	93 bp	F 5'- gcagcagacaataaagacaatg-3'
		R 5'- tctgtttaagtgatcaaaaaggga-3'
		Probe 5'- tggactcagctctggttggtgctc-3'
<i>GAPDH</i> NM_002046.3	124 bp	F 5'- gccagccgagccacatc -3'
		R 5'- ggcaacaatatccactttaccaga -3'
		Probe 5'- cgccaatacgaacaaatccg -3'
<i>ACTB</i> NM_001101.3	73 bp	F 5'- gagaagatgaccagatcatgtt -3'
		R 5'- atagcacagcctggatagcaa -3'
		Probe 5'- agacctcaacaccccagccat -3'

Примечание: все пробы – FAM →BHQ1; NM – номер последовательности РНК в NCBI Nucleotide Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>); bp – base pair; F – прямой праймер; R –обратный праймер.

На Рис. 5 представлены кинетические и стандартная калибровочная кривые для гена рефери *GAPDH*.

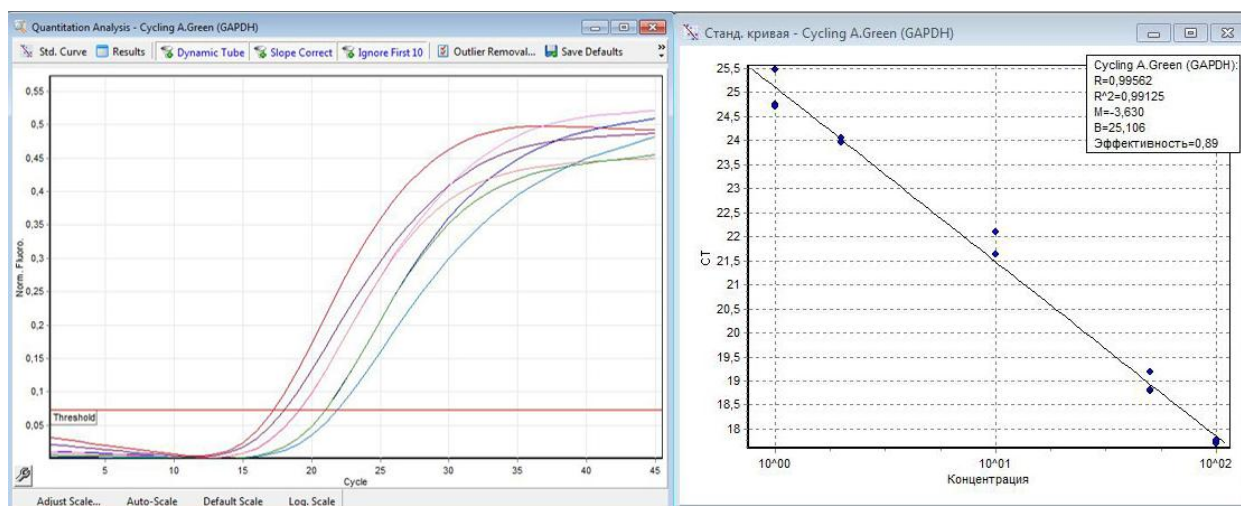


Рис. 5. Кинетические кривые амплификации и стандартная кривая для количественной ПЦР гена рефери *GAPDH*

Таким образом, в качестве результата использовалось различие в экспрессии генов *OCT3*, *SMO*, *MYC*, *SNAI2*, *MOB3B*, *KLF4*, *BM11*, *VIM*, *FLT3*, *LAT*, *SMAD2*, *LMNB2*, *KLF1*, *TERT*, *TGFB1*, *TGFB1* относительно *GAPDH* и *ACTB* и нормальной ткани молочной железы.

2.3.5 Микроматричный анализ

Микроматричный анализ проводили на микроматрицах (ДНК-чипах) высокой плотности фирмы Affymetrix (USA) CytoScan™ HD Array, (<http://www.affymetrix.com/esearch/search.jsp?pd=prod520004&N=4294967292>).

Микроматрица. CytoScan™ HD Array содержит 2 млн 670 тыс. маркеров – 1 млн 900 тыс. непалиморфных маркеров и более 750 тыс. однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), позволяющих определить структурные вариации более всех генов. Наличие полиморфных маркеров на микроматрице позволяет, также определить участки с потерей гетерозиготности (LOH). Процедуры пробоподготовки, гибридизации и сканирования проводили в соответствии с протоколом производителя на системе Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix, USA). Для обработки результатов использовали программу «Chromosome Analysis Suite 4.0» (Affymetrix, USA) (рис. 6), которая разработана специально для анализа результатов чипирования на матрице CytoScan™ HD Array. При помощи программы в хромосомах определяли абберации числа копий CNA – Copy Number Aberration – делеции и амплификации (Loss и Gain). Поскольку в образцах опухолевой ткани обязательно присутствуют стромальные элементы и другие нормальные клетки, в полученной ДНК высок процент нормальной геномной ДНК. Микрочип CytoScan™ HD Array позволяет выявлять 5% и более мутантной ДНК. Практически во всех случаях CNA были мозаичными, т.е. мутантная опухолевая ДНК определялась на фоне нормальной ДНК. Процент мутантной ДНК – статус числа копий (CN-state), колебался от 15 до 88%. В программе «Chromosome Analysis Suite 3.2» мозаицизм графически представляется аллельными пиками (Allele Peaks) с 4-мя «полосками» (AAA, AAB, ABB, BBB) (Рис. 6). Показатель snpQC колебался от 9 до 25 и отрицательно коррелировал с частотой CNA. Даже при низких значениях snpQC ширина Allele Peaks была «хорошей» (по классификации базы progenetix [Cai H. et al 2012]) для идентификации CNA.

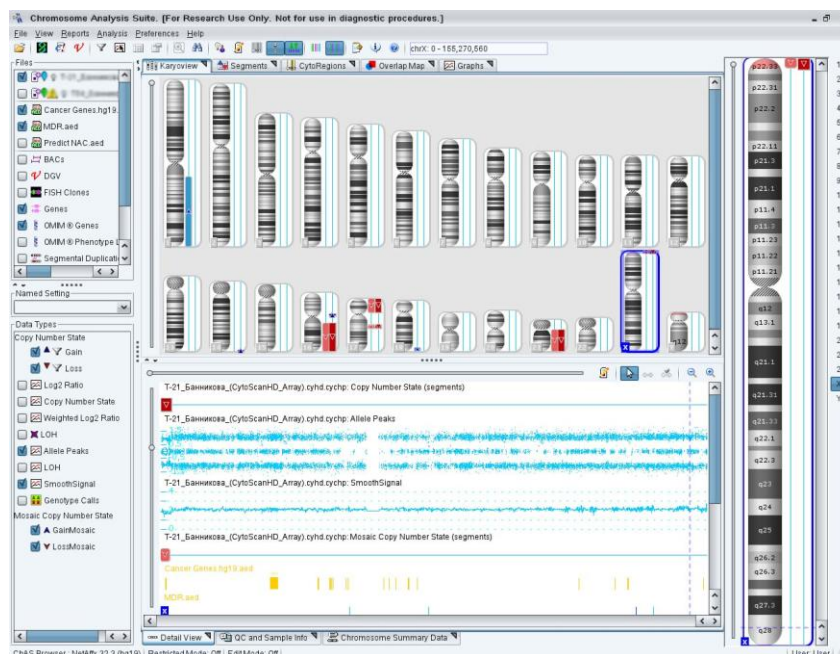


Рис. 6. Диалоговое окно программы Chromosome Analysis Suite 3.2

2.3.6 Полнотранскриптомный микроматричный анализ

Полнотранскриптомный микроматричный анализ проводился на микрочипе Clariom™ S Assay, human (ThermoFisher Scientific, USA) для определения дифференциально экспрессируемых генов. Данная микроматрица позволяет проанализировать дифференциальную экспрессию более 20 тыс. основных генов человека. Процедуры пробоподготовки, гибридизации и сканирования проводили в соответствии с протоколом производителя на системе Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix, USA). Процедура полнотранскриптомного микроматричного анализа состояла из нескольких этапов: синтез первой цепи кДНК (First-Strand cDNA Synthesis), очистка (Cleanup), синтез 3' адаптора (3' Adaptor Synthesis), подготовка к синтезу транскрипционной кРНК in vitro (Pre-IVT Amplification), синтез транскрипционной кРНК in vitro (In Vitro Transcription cRNA Synthesis), отмывка кРНК с магнитными частицами (ds-cDNA Purification & Quantification), синтез двуцепочечной кДНК 2 цикла (2nd-Cycle ds-cDNA Synthesis), отмывка двуцепочечной кДНК 2 цикла с магнитными частицами (cRNA Purification & Quantification), гидролиз РНК (RNA Alkaline Hydrolysis), фрагментация и «маркировка» (Fragmentation and Labeling), гибридизация на микроматрице (Hybridization). Последними этапами является промывка и окрашивание с последующим сканированием и анализом полученных данных.

Анализ данных микрочипа осуществлялся при помощи программы Transcriptome Analysis Console (TAC) software 4.0 (Рис. 7). Произведен анализ спектра

дифференциально-экспрессируемых генов в опухолевых клетках в биопсийном материале до лечения и операционном после НХТ.

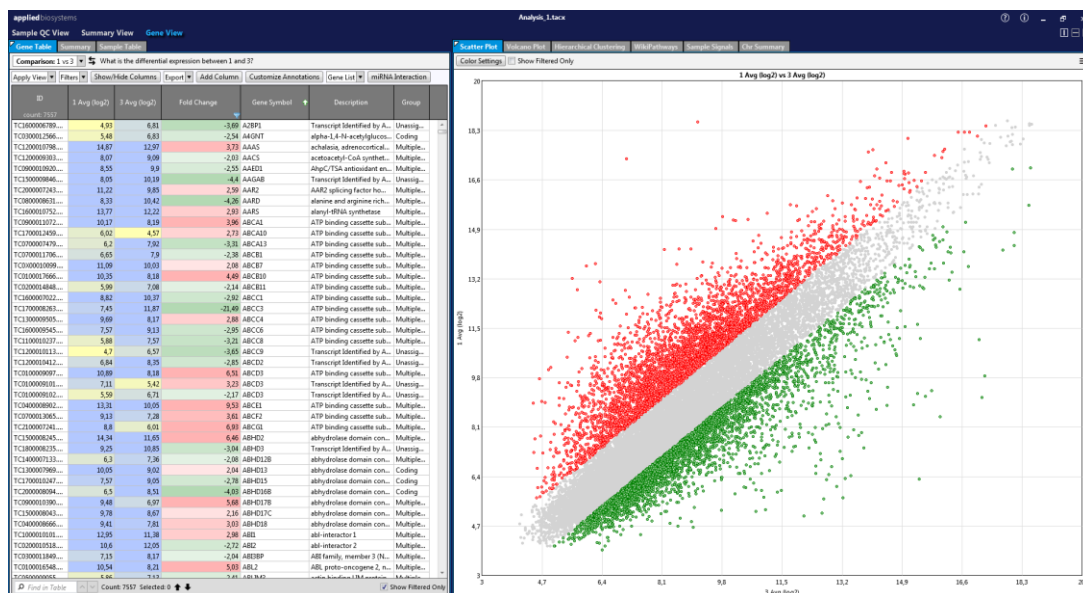


Рис. 7. Диалоговое окно программы Transcriptome Analysis Console.

2.3.7 Работа с клеточными культурами

Культивирование линий клеток

Клетки MCF-7 культивировали в среде IMDM, клетки SK-BR-3 культивировали в среде DMEM:F12, клетки BT-549 культивировали в среде DMEM, клетки MDA-MB-231 культивировали в среде L15 содержащей 10% эмбриональную фетальную сыворотку коровы (FBS), раствор 2 мМ L-глутамин в присутствии 10% FBS, 2 мМ L-глутамин, раствор антибиотиков-антимикотиков (100 ед/мл пенициллин, 0.1 мг/мл стрептомицин и 0.25 мкг/мл амфотерицин).

Клетки открепляли от подложки с помощью TripLE™ (Gibco BRL Co., Invitrogen) при достижении монослоя, открепленные клетки разбавляли полной ростовой средой в соотношении 1:3 – 1:4 (v:v) для продолжения культивирования. Все клеточные культуры культивировали при температуре 37.0±1.0°C в атмосфере 5.0±0.5% CO₂ (стандартные условия) (инкубатор CO₂ Heraeus Hera cell).

Реактивы для клеточного сортирования: антитела к CD44 (IgG), конъюгированные с PE и антитела к CD24 (IgG), конъюгированные с PE-Cy™ 7 (BD Pharmingen™).

Буферные растворы: PBS: 137 мМ NaCl, 2.7мМ KCl, 10 мМ (PO₄³⁻), pH 7.5.

Материалы для культивирования клеток: флаконы для культивирования с площадью поверхности 25 см², 75 см², 24 – луночные планшеты с площадью лунки 1,864 см² (TPP, Швейцария).

Оборудование.

Термостат (BIOSAN, Латвия), центрифуга Minispin (Eppendorf, Германия), CO₂-инкубатор (Heraeus, Германия), инвертированный исследовательский микроскоп AxioScope 2 Plus (Carl Zeiss, Германия); инвертированный исследовательский микроскоп Eclipse Ti2 (Nikon Corporation, Япония), флуоресцентный микроскоп ZOE™ (Bio-Rad, США), сенсоры для подсчёта клеток Scepter™ Sensors (Millipore, Мексика), счетчик клеток и анализатор жизнеспособности Countess (Invitrogen, США), клеточный сортер Sony SH800 (Sony Biotechnology, США).

Анализ поверхностных маркеров клеток методом проточной цитофлуориметрии.

Опухолевые клетки (2×10^5 на лунку) молочной железы, выращивали в 6-луночных планшетах (TPP, Швейцария), открепляли от подложки с помощью TripLE™. Открепленные клетки, промывали в PBS. Клетки инкубировали с маркерами стволовых клеток опухоли молочной железы CD44 и CD24 - мечеными мышиными антителами против человека (антитела к CD44 (IgG), конъюгированные с PE и антитела к CD24 (IgG), конъюгированные с PE-Cy™ 7 (BD Pharmingen™)) в PBS с добавлением 10% нормальной козьей сыворотки в течение 30 минут при комнатной температуре в темноте. Клетки промывали PBS, ресуспендировали в 500 мкл PBS и использовали для анализа на клеточном сортере Sony SH800 (Sony Biotechnology, США), а данные были проанализированы с помощью программного обеспечения FlowJo X (BD Biosciences). Клеточный дебрис был исключен из анализа по величине прямого и бокового рассеяния, для статистической оценки анализировали всего десять тысяч событий.

Выделения специфических клеточных популяций методом сортировки клеток.

Опухолевые клетки ($5-6 \times 10^6$ на флакон) молочной железы, выращивали в культуральных флаконах площадью 75 см^2 в стандартных условиях, открепляли от подложки с помощью TripLE™. Клетки инкубировали с мечеными мышиными антителами против человека (CD24, CD44) в PBS в течение часа при комнатной температуре в темноте. Клетки промывали PBS, ресуспендировали в 500 мкл PBS и использовали для анализа на клеточном сортере Sony FX500 (Sony Biotechnology, США), а данные были проанализированы с помощью программного обеспечения FlowJo X (BD Biosciences). Клеточный дебрис был исключен из анализа по величине прямого и бокового рассеяния, для статистической оценки анализировали всего десять тысяч событий. Для клеточного сортирования использовали сопла диаметра 100 мкм (Sony Biotechnology, США) и произведена настройка сортировки по капле в центр лунки планшета.

Сортировка популяции клеток CD44⁺/24⁺ и клеток дикого типа проводилась в лунку (10^2 клеток на лунку) 24-луночного культурального планшета, содержащего 500 мкл

питательной среды. После выделения клетки культивировали при стандартных условиях (инкубатор CO₂ Heraeus Hera cell). Для оценки влияния ИЛ-6 на формирования маммосфер клеточные популяции CD44⁺/CD24⁻ культивировали в среде DMEM:F12 в присутствии 20 нг/мл EGF, 20 нг/мл bFGF, 5 мкг/мл инсулина, 2% B27, 0.4% BSA в стандартных условиях с добавлением с добавлением 50 нг/мл ИЛ-6 сразу после проведения сортинга и через 24 часа. Последующая оценка клеток и маммосфер осуществлялась с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа исследовательского класса Eclipse Ti2 (Nikon Corporation, Япония) с компьютерной системой фотодокументации и флуоресцентного микроскопа ZOE™ (Bio-Rad, США).

Выделение ДНК из клеточных культур было проведено при помощи наборов QIAamp DNA Kit (Qiagen, Germany) и оценена их целостность при помощи капиллярного электрофореза.

Исследование CNA-генетического ландшафта клеточных культур проводили при помощи полногеномной микроматрицы CytoScan HD Array (Affymetrix, USA). Анализ данных микроматричного исследования осуществляли при помощи программы Chromosome Analysis Suite 3.0. Во всех клеточных культурах определяли наличие амплификаций генов стволовости.

2.3.8 Статистические методы

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «STATISTICA 8.0» (StatSoft Inc., США). Критерий Шапиро-Уилка использовался для проверки нормальности. Для каждой выборки вычисляли среднее арифметическое и среднюю квадратичную ошибку. Для проверки гипотезы о значимости различий между исследуемыми группами использовали критерий Стьюдента, в случае отличия распределения выборки от нормального по критерию Шапиро-Уилка для проверки гипотезы о значимости различий между исследуемыми группами использовали непараметрический критерий Вилкоксона-Манна-Уитни. Для оценки корреляции использовали непараметрический коэффициент корреляции Спирмена. Различия между исследуемыми группами считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$. Для анализа общей и безметастатической выживаемости использовались кривые выживаемости, построенные по методу Каплана-Майера [Kaplan E.L. and Meier P. 1958]. Сравнение достоверности различий между группами производилось с помощью log-rank теста. Сравнение частот по качественным данным анализировали при помощи двухстороннего критерия Фишера. Отношение шансов – OR, относительный риск – RR и уровень значимости p-level по двухстороннему критерию Фишера вычисляли при помощи

калькулятора <http://vassarstats.net/odds2x2.html>. При оценки дифференциально-экспрессируемых генов использовали показатель Fold Change >2 и p-val<0,05 после процедуры нормализации данных в программе TAC 4.0.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

В настоящее время известно, что наличие структурных хромосомных аномалий является обязательной составляющей опухолевых клеток и в опухолевых клетках имеются различные хромосомные аномалии отдельных локусов и числовые aberrации целых хромосом. Делеции или амплификации хромосомных регионов и отдельных хромосом называют aberrациями числа копий ДНК (CNA – Copy Number Aberration). В ходе выполнения настоящей работы был изучен CNA-ландшафт (делеции и амплификации участков хромосом) исследуемых проб опухолевой ДНК. Для выполнения этой задачи был собран банк биологического материала больных РМЖ и составлен подробный регистр клинико-морфологических данных 60 больных люминального В HER2-негативного подтипа. В таблице 2 (Материал и методы) представлены наиболее важные клинико-морфологические параметры пациенток, включенных в исследование.

У каждой больной был произведен забор биопсийного материала опухоли до начала лечения с помощью пистолетной биопсии под контролем УЗИ. ДНК из опухолевой ткани биопсийных образцов до лечения изучалась при помощи микроматрицы высокой плотности CytoScan HD Array (Affymetrix, USA), позволяющей оценить делеции и амплификации ДНК во всех опухолевых клетках одновременно и провести количественный анализ представленности мутации (или несущего мутацию клона) на фоне нормальной ДНК. Для обработки результатов микроматричного анализа использовалась программа «Chromosome Analysis Suite 3.0» (Affymetrix, USA), которая разработана специально для анализа результатов чипирования на матрице CytoScan™ HD Array.

На Рис. 8а и 8б представлен пример анализа данных в программе «Chromosome Analysis Suite 3.0» (Affymetrix, USA), где синим цветом показано наличие амплификаций, красным – делеций в каждой хромосоме.

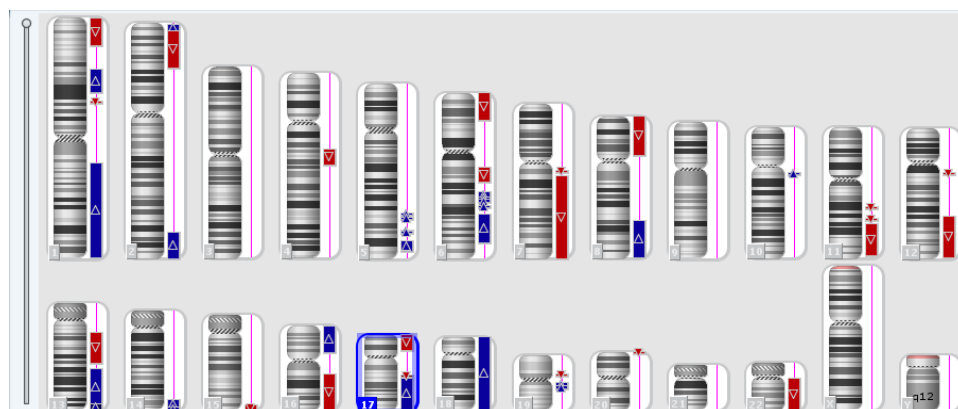


Рис. 8а. Пример анализа данных в программе «Chromosome Analysis Suite 3.0» (Affymetrix, USA).

Примечание: синим цветом показано наличие амплификаций, красным – делеций в каждой хромосоме.

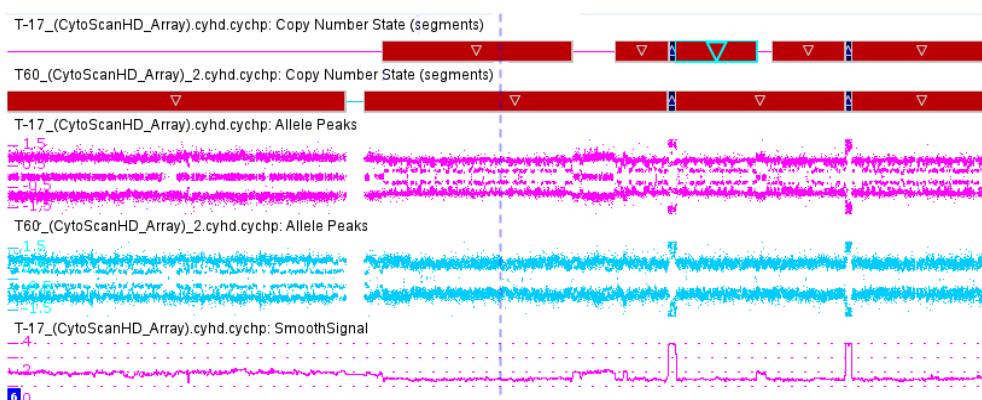


Рис. 8б. Пример анализа данных в программе «Chromosome Analysis Suite 3.0» (Affymetrix, USA).

Примечание: в программе «Chromosome Analysis Suite 2.0» мозаицизм графически представляется аллельными пиками (Allele Peaks) с 4-мя «полосками» (AAA, AAB, ABB, BBB)

Первым этапом выполнения данной задачи было проведение описания CNA-ландшафта опухоли до лечения. В Таблице 5 представлен анализ частоты встречаемости сегментных CNA по каждой хромосоме.

Таблица 5. Частота встречаемости амплификаций и делеций для каждой хромосомы

Хромосома	Амплификации (частота, %)	Делеции (частота, %)
1	0%-78,0%	2,0%-34,0%
2	2,0%-12,0%	18,0%-32,0%
3	6,0%-24,0%	8,0%-36,0%
4	4,0%-12,0%	22,0%-34,0%
5	4,0%-24,0%	4,0%-16,0%
6	2,0%-20,0%	8,0%-54,0%
7	8,0%-20,0%	4,0%-18,0%
8	2,0%-66,0%	0%-66,0%
9	4,0%-18,0%	6,0%-30,0%
10	0%-30,0%	12,0%-32,0%
11	0%-38,0%	10,0%-60,0%

12	0%-12,0%	6,0%-22,0%
13	0%-12,0%	0%-52,0%
14	0%-44,0%	0%-38,0%
15	0%-12,0%	0%-30,0%
16	4,0%-40,0%	4,0%-62,0%
17	0%-48,0%	12,0%-70,0%
18	4,0%-14,0%	24,0%-34,0%
19	0%-10,0%	8,0%-30,0%
20	12,0%-40,0%	2,0%-18,0%
21	0%-12,0%	0%-26,0%
22	0%-14,0%	0%-56,0%
X	0%-10,0%	12,0%-26,0%

Было установлено, что наибольшее количество амплификаций в общей группе пациенток, включенных в исследование, (более 70,0%) было обнаружено в следующих локусах: 1q25.3, 1q31.2-32.3, 1q41-44. Наибольшая частота делеций (более 66,0%) было обнаружена в локусах 8p21.1, 17p13.3, 17p13.1. Также обнаружены локусы с полным отсутствием сегментных CNA. В локусах 1p22.2, 10q23.31-26.11, 11q23.1-23.2, 12q11, 13p13-11.1, 13q13.2-14.3, 14p13-14q11.1, 15p13-15q11.1, 17p13.3, 17p13.1-12, 19p13.3, 21p13-21q11.1, 22p13-11.1, Xp21.2-21.1, Xp11.3, Xp11.21, Xp11.1, Xq12, Xq13.2, Xq21.2-21.33 показано отсутствие амплификаций, в локусах 8q12.1-13.2, 8q21.11, 8q22.2-24.21, 13p13-11.1, 14p13-14q11.1, 15p13-15q11.1, 21p13-21q11.1, 22p13-11.2 – отсутствие делеций. При этом, отсутствие в локусах 11q23.1-23.2, 13q14.11-13q14.13-14.2, 17p13.3, 17p13.1-12 амплификаций сопровождалось наличием более 50,0% делеций, и, наоборот, отсутствие в локусах 8q21.11, 8q22.2-24.21 делеций сопровождалось наличием более 52,0% амплификаций. Также идентифицированы участки с одновременным отсутствием делеций и амплификаций, это прицентромерные участки в локусах 13p13-11.1, 14p13-14q11.1, 15p13-15q11.1, 21p13-21q11.1, 22p13-11.2. Это связано с техническим ограничением, во всех этих участках нет маркеров на микроматрице CytoScan HD Array (Affymetrix, USA), поэтому CNA не детектируется.

Таким образом, благодаря использованию данной технологии микроматричного анализа, посчитана частота амплификаций и делеций в каждой хромосоме. CNA-статус у каждой пациентки весьма варьировал: показано и как полное отсутствие, так и наличие хромосомных аномалий в более чем в 60% генома. На Рис. 9 и 10 представлены примеры данных генетически «чистого» CNA-ландшафта и большого количества амплификаций и делеций у исследуемых больных, соответственно. На Рис. 11 представлена частота амплификаций и делеций в каждой хромосоме для пациенток, включенных в исследование.

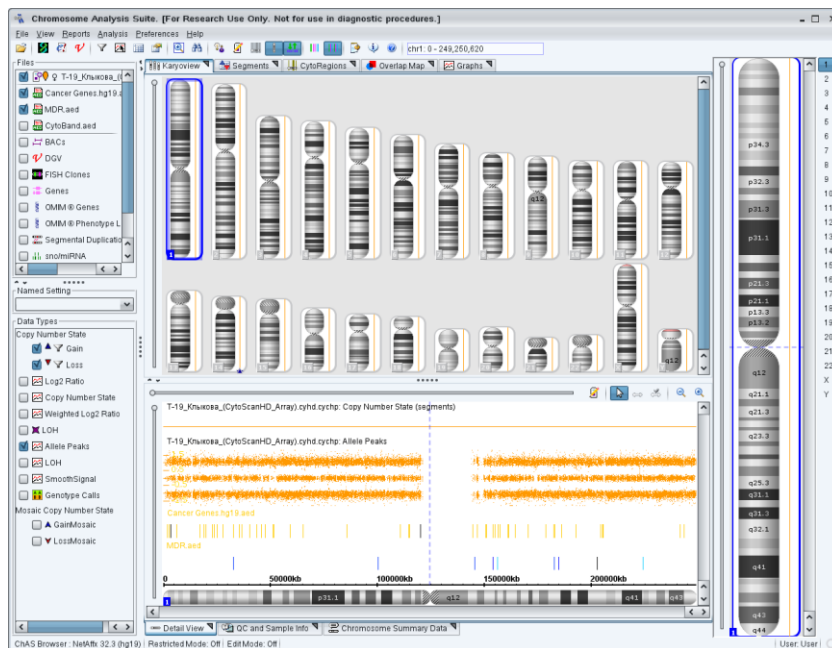


Рис. 9. Пример отсутствия хромосомных аномалий у пациентки К.



Рис. 10. Пример наличия хромосомных аномалий в более чем 60% генома у пациентки К2.

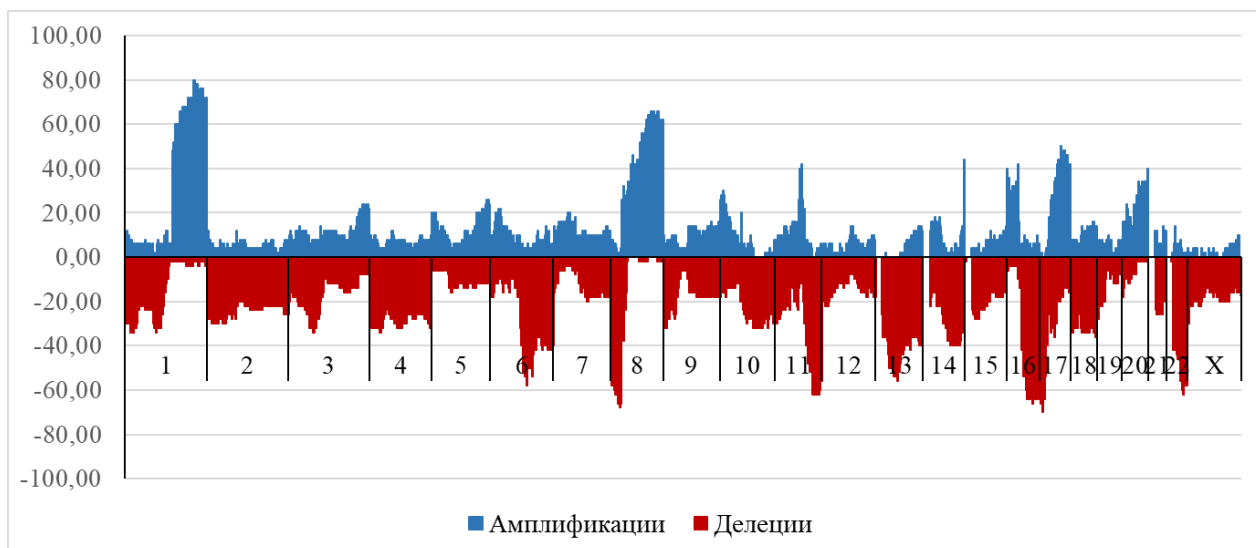


Рис. 11. Частота встречаемости CNA у больных раком молочной железы люминального В подтипа до лечения.

Также подсчитаны числовые хромосомные аномалии. Показано, что трисомия чаще всего наблюдалась в 7, 8, 12 и 17 хромосомах. Моносомия – в 3, 4, 9, 11, 18 и X-хромосомах.

Далее нами была изучена ассоциация ответа на НХТ с частотой встречаемости ХА до лечения. Было выделено 2 группы пациенток: группа 1 – пациентки со стабилизацией и прогрессированием после проведения НХТ (n=18), группа 2 – пациентки с частичной и полной регрессией опухоли после лечения (n=42). Группы пациентов статистически не различались по основным клинико-морфологическим параметрам (данные не представлены).

Для группы пациенток со стабилизацией и прогрессированием после проведения НХТ (группа 1) было установлено, что наибольшее количество амплификаций (более 61,4%) было обнаружено в следующих локусах: 1q21.3-25.3, 8q21.11-24.3. Интересно отметить, что при наличии 61,4% амплификаций в регионах 8q21.11-24.3 зарегистрировано полное отсутствие делетированных участков. Максимальное количество делеций (более 69,2%) в данной группе пациенток было обнаружено в локусах 16q13, 16q21-24.3. При этом, в данных локусах при наибольшей частоте делеций показано полное отсутствие амплифицированных участков. Данные по отсутствию амплификаций, отсутствию делеций и одновременному отсутствию CNA в данной группе пациенток представлены в Приложении 1 (Таблицы 1, 2, 3). Общая картина частоты встречаемости CNA у больных со стабилизацией и прогрессированием опухолевого процесса представлена на Рис. 12.

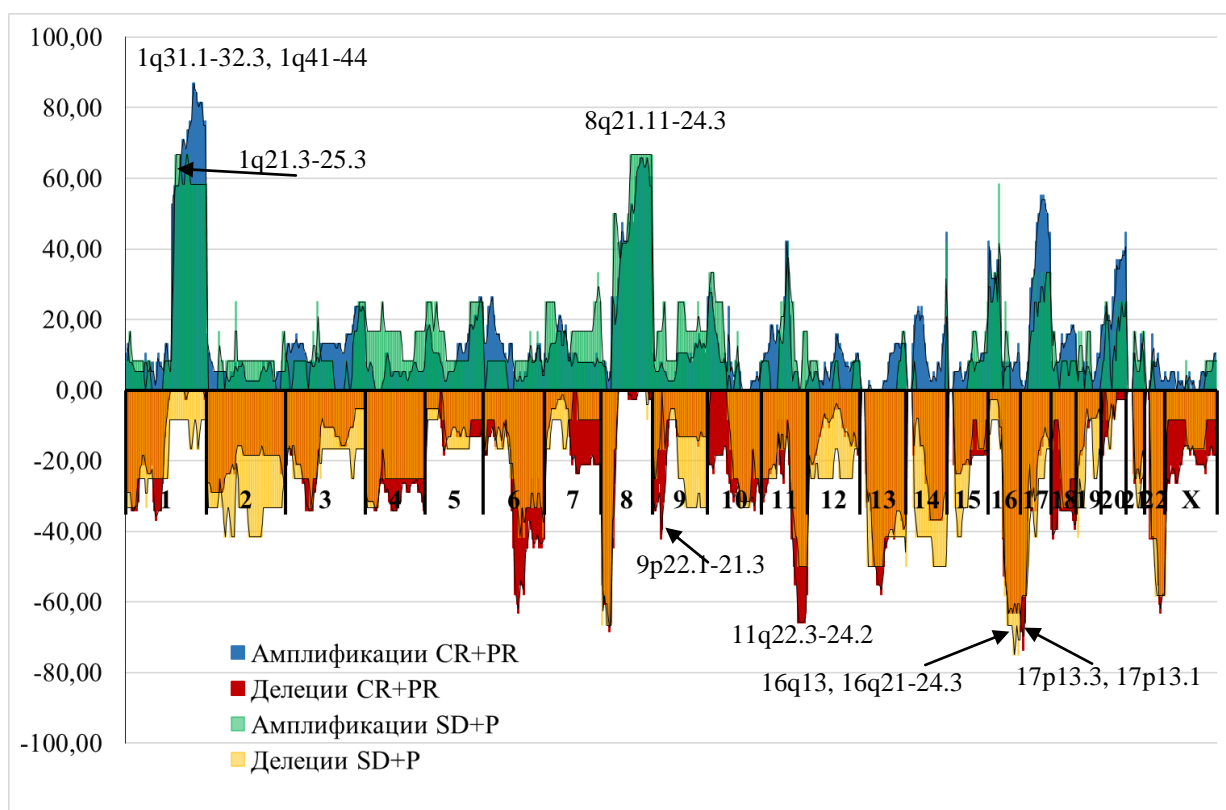


Рис. 12. Частоты встречаемости CNA у больных со стабилизацией и прогрессированием (SD+P - 1 группа) и больных с полной и частичной регрессией (CR+PR - 2 группа)

Для группы пациенток с частичной и полной регрессией опухоли после лечения (группа 2) показано, что максимальная частота встречаемости амплификаций (70,6% и более) была также обнаружена в длинном плече 1 хромосомы 1q24.2-24.3, 1q25.3, 1q31.1-32.3, 1q41-44 регионах, причем, в отличие от первой группы частота амплификаций была выше, чем у больных со стабилизацией и прогрессированием. Интересно отметить, что при максимальной частоте встречаемости амплификаций в данных регионах показано полное отсутствие делетированных участков, в то время как у больных со стабилизацией или прогрессированием в этом регионе частота делеций составила 10-20%. Максимальное количество делеций (67,65% и более) во 2 группе пациентов с полной и частичной регрессией отмечено в длинном плече 11 хромосомы и коротком плече 17 хромосомы 11q22.3-24.2, 17p13.3, 17p13.1 локусах. Данные по отсутствию амплификаций, отсутствию делеций и одновременному отсутствию CNA в данной группе пациенток представлены в Приложении 1. Общая картина частоты встречаемости CNA у больных с частичной и полной регрессией опухоли также представлена на Рис. 12, что позволяет визуально сравнить картины CNA-ландшафта опухолей до лечения больных с плохим и хорошим ответом на НХТ.

В результате сравнения частот встречаемости CNA в данных группах пациенток при помощи двухстороннего критерия Фишера, было показано, что наличие объективного ответа на НХТ (частичная и полная регрессия) наблюдалось при большем количестве делеций в 9p22.1 и 9p21.3 регионах, в частности, у 42,8% и 40,0% с частичной и полной регрессией идентифицированы делеции данных регионов при полном отсутствии делеций в них в группе пациенток со стабилизацией и прогрессированием ($p=0,007$ и $p=0,008$, соответственно). Потенциально эти локусы могут выступать в качестве предиктивных маркеров хорошего ответа на НХТ у больных люминальным В HER2-негативным подтипом раком молочной железы. Необходима проспективная валидация.

Следующим этапом работы было изучение ассоциации наличия/отсутствия лимфогенного метастазирования (N) с частотой встречаемости CNA. Было выделено 2 группы пациенток: группа 1 – пациентки с отсутствием лимфогенного метастазирования N0 ($n=29$), группа 2 – пациентки с наличием метастазов в региональные лимфоузлы N1-3 ($n=31$).

Различия в частоте распределения CNA в опухоли пациенток в зависимости от наличия/отсутствия лимфогенного метастазирования опухоли не были статистически значимы.

Для группы пациенток без лимфогенного метастазирования (группа 1) было показано, что максимальная частота встречаемости амплификаций (70,83% и более) была обнаружена в 1q32.1-1q32.3, 1q41, 8q22.2-24.21 регионах. Максимальное количество делеций (62,5% и более) в данной группе отмечено в 8p21.2-21.1, 8p12, 11q22.3, 17p13.1 регионах. Данные по отсутствию амплификаций, отсутствию делеций и одновременному отсутствию CNA в данной группе пациенток представлены в Приложении 1. Общая картина частоты встречаемости CNA у больных с N0 представлена на Рис. 13.

Для группы пациенток с наличием метастазов в региональные лимфоузлы (группа 2) показано, что максимальная частота встречаемости амплификаций (76,92% и более) была обнаружена также в длинном плече 1 хромосомы с некоторым смещением в теломерную область (1q25.1-1q25.3, 1q31.3-44). При этом, максимальное количество делеций (73,08% и более) в данной группе отмечено в 17p13.3, 17p13.1 локусах, и при этом, в данных регионах полностью отсутствуют амплификации. Данные по отсутствию амплификаций, отсутствию делеций и одновременному отсутствию CNA в данной группе пациенток представлены в Приложении 1. Общая картина частоты встречаемости CNA у больных N1-3 опухоли также для качественного сравнения представлена на Рис. 13.

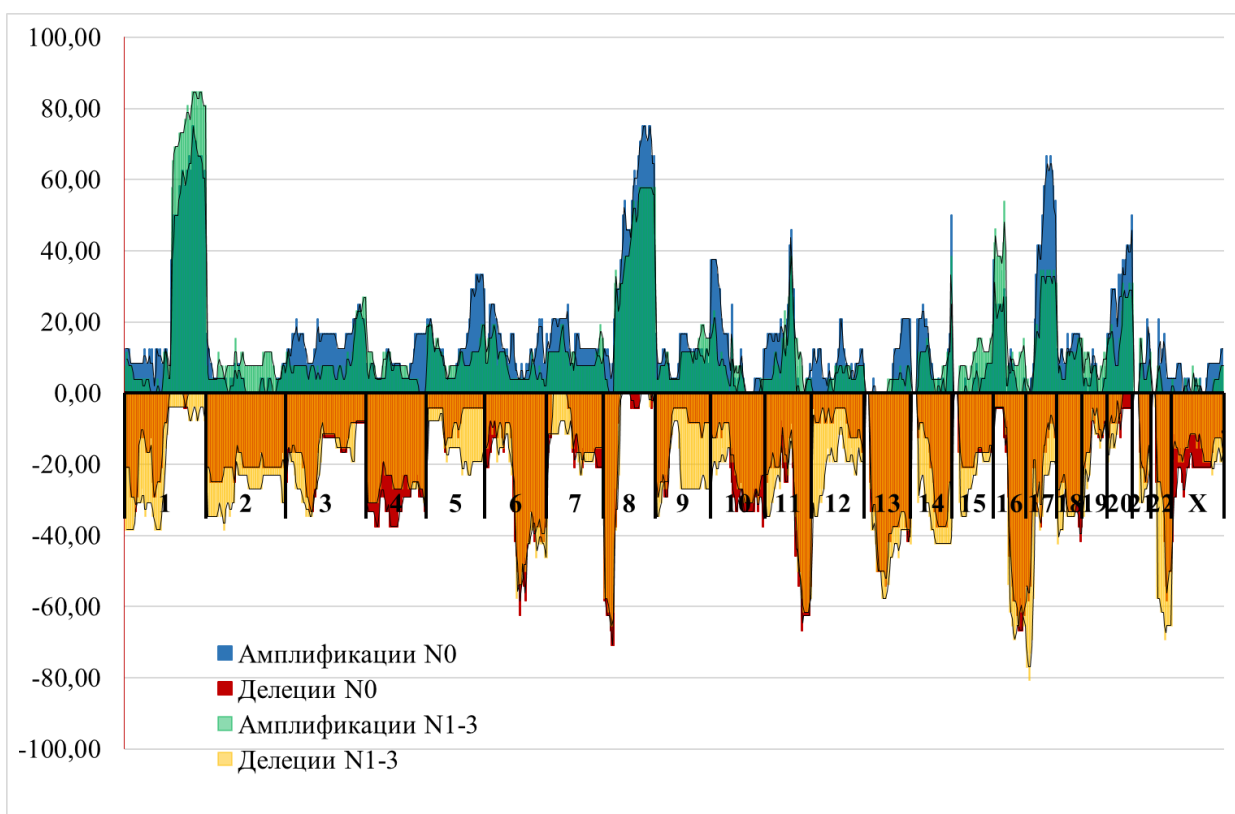


Рис. 13. Частота встречаемости CNA у больных в зависимости от наличия (N1-3)/отсутствия (N0) лимфогенного метастазирования

Следующим этапом работы было изучение ассоциации возрастного критерия пациенток, включенных в исследование (≤ 45 ; >45 лет) с частотой встречаемости CNA.

Было выделено 2 группы пациенток: группа 1 – пациентки возраста до 45 лет включительно ($n=24$), группа 2 – пациентки возраста старше 45 лет ($n=36$).

Было показано отсутствие статистически значимых различий в частоте распределения CNA в данных группах пациенток в зависимости от их возрастного распределения.

Для группы пациенток возраста до 45 лет включительно (группа 1) максимальная частота встречаемости амплификаций (70,0% и более) была обнаружена в 1q25.3, 1q31.3, 1q32.1-1q32.3, 1q41-44 регионах. Максимальное количество делеций (75,0% и более) в данной группе отмечено в 8p21.2, 8p21.1, 8p12, 17p13.3-17p13.1 регионах. Данные по отсутствию амплификаций, отсутствию делеций и одновременному отсутствию CNA в данной группе пациенток представлены в Приложении 1. Для группы пациенток возраста старше 45 лет (группа 2) показано, что максимальная частота встречаемости амплификаций (73,33% и более) была обнаружена в 1q31.1-32.3, 1q41-44 регионах. Максимальное количество делеций (66,67% и более) в данной группе отмечено в 11q22.3, 11q23.1, 11q23.2, 16q21, 16q22.1-16q22.3, 16q23.1-16q23.3, 16q24.1-16q24.3 локусах. Необходимо отметить, что в регионах 11q23.1, 11q23.2, 16q22.1-16q22.3, 16q23.1-16q23.3,

16q24.1 при максимальной частоте встречаемости делеций полностью отсутствуют амплификации. Данные по отсутствию амплификаций, отсутствию делеций и одновременному отсутствию CNA в данной группе пациенток представлены в Приложении 1. Общая картина частоты встречаемости CNA у больных старше 45 лет в опухоли представлена на рисунке 14.

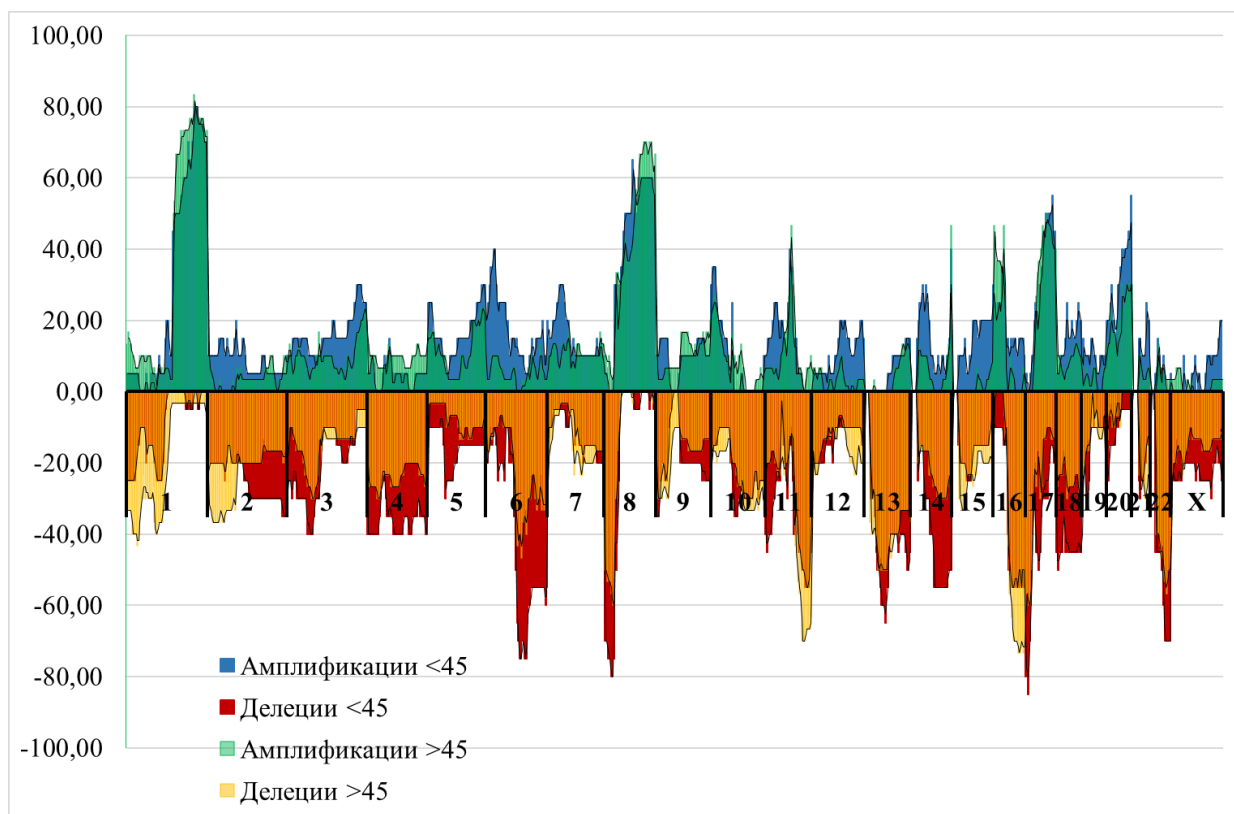


Рис. 14. Частота встречаемости CNA в группах больных до 45 лет включительно (≤ 45) и после 45 лет

Следующим этапом работы было изучение ассоциации менструального статуса пациенток, включенных в исследование (пременопауза/ постменопауза) с частотой встречаемости ХА.

Было выделено 2 группы пациенток: группа 1 – пациентки с пременопаузой (n=33), группа 2 – пациентки с постменопаузой (n=27). Показано отсутствие статистически значимых различий в частоте распределения CNA в данных группах пациенток в зависимости от их распределения по менструальному статусу.

Для группы пациенток с пременопаузой (группа 1) было показано, что максимальная частота встречаемости амплификаций (70,37% и более) была обнаружена в 1q32.1-1q32.3, 1q41-42.2 регионах. Максимальное количество делеций (66,67% и более) в данной группе отмечено в 8p21.2-21.1, 8p12, 17p13.3-17p13.1 регионах. Данные по отсутствию амплификаций, отсутствию делеций и одновременному отсутствию CNA в данной группе

пациенток представлены в Приложении 1. Общая картина частоты встречаемости CNA у больных с пременопаузой представлена на Рис. 15.

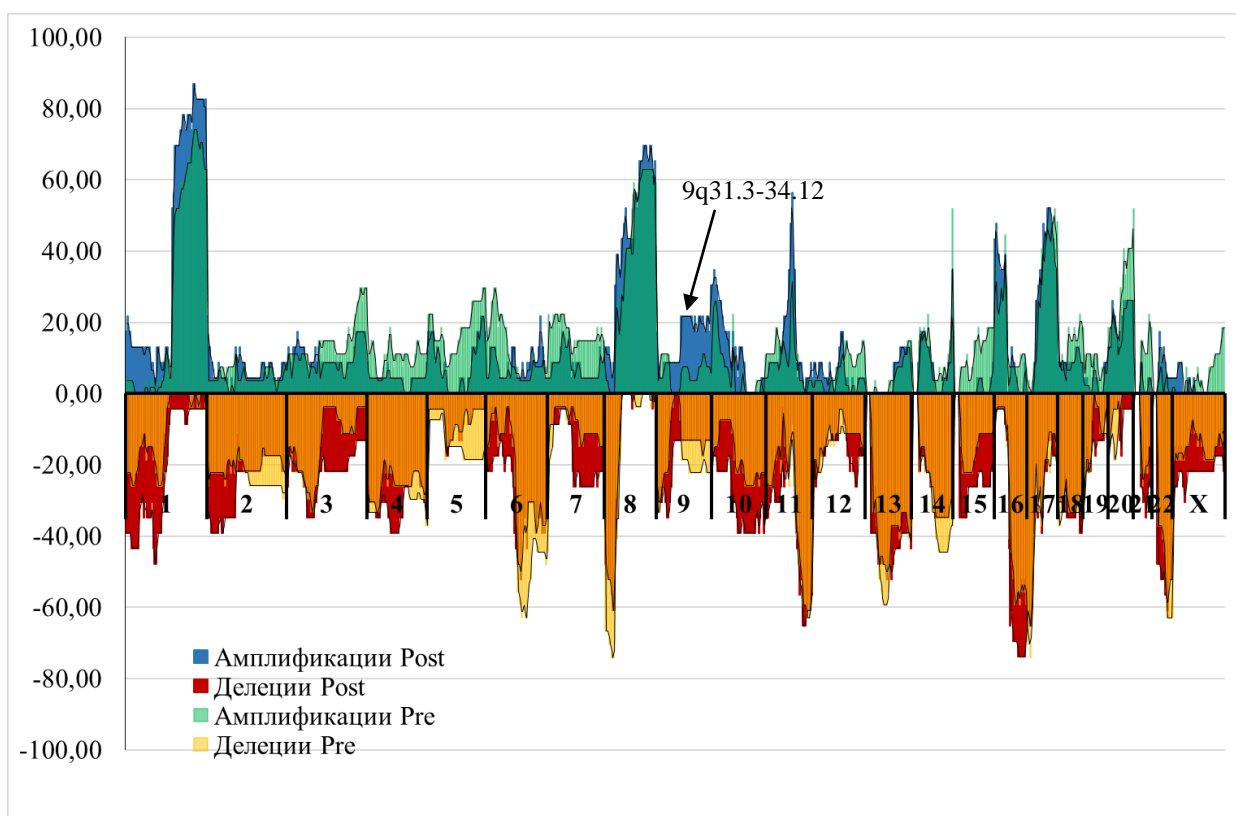


Рис. 15. Частота встречаемости CNA у больных РМЖ в зависимости от менструального статуса (Pre - пременопауза, Post – постменопауза)

Для группы пациенток с постменопаузой (группа 2) показано, что максимальная частота встречаемости амплификаций (78,26% и более) была обнаружена в тех же регионах, что и у больных старше 45 лет: 1q25.3, 1q31.1-32.3, 1q41-44, за исключением 1q25.3, который есть у больных с постменопаузой. Максимальное количество делеций (66,67% и более) в данной группе отмечено в 8q11.21-24.21, 8q24.23-24.3, 13p13, 13p12, 13p11.2, 13p11.1, 14p13, 14p12, 14p11.2, 14p11.1, 14q11.1, 15p13, 15p12, 15p11.2, 15p11.1, 15q11.1, 20q11.1, 21p13, 21p12, 21p11.2, 21p11.1, 21q11.1, 22p13, 22p12, 22p11.2, 22p11.1 локусах. Необходимо отметить, что в регионах 13p13, 13p12, 13p11.2, 13p11.1, 14p13, 14p12, 14p11.2, 14p11.1, 14q11.1, 15p13, 15p12, 15p11.2, 15p11.1, 15q11.1, 20q11.1, 21p13, 21p12, 21p11.2, 21p11.1, 21q11.1, 22p13, 22p12, 22p11.2, 22p11.1 при максимальной частоте встречаемости делеций отсутствуют амплификации. Данные по отсутствию амплификаций, отсутствию делеций и одновременному отсутствию CNA в данной группе пациенток представлены в Приложении 1.

В результате сравнения частот встречаемости CNA в данных группах пациенток при помощи двухстороннего критерия Фишера, было показано, что в постменопаузальном периоде наблюдалось большее количество амплификаций в 9q31.3-34.12 регионах, в

частности, у 26,1% с постменопаузой определены амплификации данных регионов при полном отсутствии амплификаций (0/27) в них в группе пациенток с пременопаузой ($p=0,006$) (Рис. 15).

Известно, что CNA могут влиять на экспрессию генов, как правило, при делециях экспрессии генов, локализованных в делетированном регионе, снижена, при амплификациях – повышена [Huang N., Shah P.K. 2012, Xu Y., DuanMu H. 2012]. CNA особенно распространены при солидных опухолях различных локализаций, и в частности, в опухоли молочной железы [Horlings H.M., Lai C. 2010]. В опухоли молочной железы наиболее часто CNA наблюдаются в регионах 1q, 8q и 16q. Показано, что различные опухолевые клоны рака молочной железы могут характеризоваться специфическими структурными хромосомными и числовыми aberrациями, присутствием псевдодиплоидных и анеуплоидных клеточных популяций, которые образовались в результате одного или нескольких циклов клональной экспансии [Navin N., Kendall J. 2011, Ng C.K., Pemberton H.N. 2012]. Таким образом, наличие структурных хромосомных аномалий является частой составляющей опухолевых клеток и в опухолевых клетках имеются различные хромосомные аномалии отдельных локусов и числовые aberrации целых хромосом [McGranahan N., Burrell R.A. 2012].

Согласно опубликованным данным, амплификации в опухоли молочной железы отмечаются в 1q, 8p12, 8q24.21, 17q12, 11q13.3, и 11q13.5, охватывая такие известные онкогены, как HER2, c-Мус, CCND1, и PAK1, делеции – на 8p, 11q, 16q и 17p хромосомных локусах [Jönsson G., Staaf J. 2010]. Есть сведения о связи CNA опухолевой ДНК с молекулярными подтипами РМЖ и экспрессионными характеристиками опухоли [Bergamaschi A., Kim Y.H. 2006], [Smid M., Hoes M. 2011, Weigman V.J., Chao H.-H. 2012]. Например, амплификации 1q21-43 и 16p12 хромосомных регионов и делеция 16q21-q24 связаны с наличием на клетках опухоли рецепторов к эстрогенам, а делеции 4p13-16 и 5q11.2-q31 сайтов ассоциированы с отсутствием прогестероновых рецепторов [Climent J., Dimitrow P. 2007].

Согласно последним литературным данным, получены также интересные результаты по изучению частоты хромосомных aberrаций для пациенток с самым агрессивным – трижды негативным молекулярным подтипом РМЖ. Matthew D. Burstein и соавторами на большой выборке пациенток ($n=278$) также с трижды негативным раком молочной железы охарактеризовали особенности частоты встречаемости CNA и показали, что наибольшая частота встречаемости амплификаций (более 84%) обнаружена в длинном плече 1 хромосомы 1q31.2, а также 3q26.1 и 8q23.3 хромосомах, а наибольшая частота делеций – в 8p23.2, 9p21.3 и 10q23.31 хромосомах [Burstein M.D., Tsimelzon A. 2015]. Частично эти

результаты пересекаются с нашими данными, в частности наибольшая частота амплификаций у наших пациентов при люминальном В РМЖ также отмечается в длинном плече 1 хромосомы. Частота амплификаций в длинном плече 8 хромосомы существенно ниже. Высокая частота делеций в коротком плече 8 хромосомы, также, как и в выборке трижды негативного РМЖ. Кроме того, у наших больных часто встречаются делеции в коротком плече 17 хромосомы 17p13.3, 17p13.1.

В 2019 году опубликована работа Jorge Gómez-Miragaaya с соавторами, где также подробно описан CNA-ландшафт клеточной модели метастатического трижды негативного РМЖ. Анализ частоты встречаемости CNA в данной клеточной модели показал наличие наиболее часто встречающихся амплификаций в локусах 1q, 8q и 10p, а также часто встречающихся делеций в локусах 1p, 4p, 5q, 10q, 15q и Xp [Gómez-Miragaaya J., Díaz-Navarro A. 2019].

При этом, не стоит ограничиваться ассоциативными данными по анализу частоты хромосомных aberrаций при РМЖ. Важно понимать, что подобные данные в совокупности могут составлять основу для разработки новых маркеров эффективности лечения пациенток с патологией молочной железы. Так, например, в исследовании Казанцевой и соавторов были рассмотрены молекулярно-генетические маркеры эффективности неoadъювантной химиотерапии с применением антрациклинов у больных раком молочной железы, где на выборке из 46 пациенток с РМЖ показано, что делеции 18p11.21; 11q22.1 и ампликации 1q24.1-43 локусов можно рассматривать в качестве предсказательных критериев высокой эффективности НХТ, а наличие хотя бы одного из представленных маркеров позволяет в 85,3% наблюдений предсказать высокую эффективность предоперационного лечения антрациклинами [Казанцева П.В. et al 2016].

Таким образом, в настоящей работе описан CNA-ландшафт опухоли молочной железы люминального В HER2-негативного подтипа в зависимости от ответа на НХТ и основных клинико-морфологических параметров. В обсуждении показаны отличительные особенности CNA-ландшафта опухолей люминального В HER2-негативного подтипа по сравнению с трижды негативным подтипом. Такие отличия вполне могут обеспечить сигнатуры, характерные для молекулярных подтипов и обнаруженных в свое время Perou с соавт благодаря исследованию транскриптома [Perou C.M. et al 2000].

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

Была проведена оценка изменения CNA-генетического ландшафта опухоли молочной железы люминального В HER2-негативного подтипа в процессе

неoadъювантной химиотерапии и связь этих изменений с метастазированием. В этой связи у каждого из 60 обследованных больных РМЖ было изучено изменение числа и состава CNA в опухоли молочной железы при проведении НХТ.

Первым этапом данной части исследования было сравнение частот встречаемости амплификаций и делеций у больных до и после предоперационной химиотерапии. Было показано, что максимальная частота встречаемости амплификаций до лечения (76,0% и более) отмечена в 1q32.1-1q32.3, 1q41, 1q42.12, 1q42.13, 1q42.2 локусах. При этом, в данных локусах частота встречаемости делеций не превышала 4,0%. Максимальная частота встречаемости делеций до проведения НХТ (66,0% и более) показана в 8p21.1, 17p13.3, 17p13.1 локусах, при этом, в данных локусах не обнаружено наличие делетированных участков. После проведения НХТ частота встречаемости амплификаций снижается, так максимальное количество (50,0% и более) амплификаций отмечено в 1q32.1 и 1q32.2 локусах, тогда как частота встречаемости делеций в данных регионах не превышала 4,76%. Также снижается и частота встречаемости делеций после проведения НХТ. Было показано, что максимальное количество делетированных участков (45,24% и более) обнаружено в 16q21 и 16q22.1 локусах, при этом, частота встречаемости амплификаций в данных локусах не превышала 7,14%. При этом, максимальное количество амплификаций (66,0%) при отсутствии делетированных участков в опухоли до лечения было отмечено в 8q23.1,-8q23.3, 8q24.21 локусах. Однако, после проведения предоперационной терапии максимальное количество амплификаций (45,24%) при отсутствии делетированных участков в опухоли до лечения было отмечено в 1q21.3 и 1q22 локусах. Аналогичный анализ был проведен для подсчета количества делеций в опухоли до и после проведения НХТ. Было показано, что максимальное количество делеций (70,0%) при отсутствии амплифицированных участков в опухоли до лечения было отмечено в 17p13.1 локусе. Максимальное количество делеций (42,86%) при отсутствии амплифицированных участков в опухоли до лечения было отмечено в 11q23.3 локусе. Абсолютное отсутствие амплификаций и делеций в данной группе пациенток и до, и после проведения НХТ отмечено в 13p13, 13p12, 13p11.2, 13p11.1, 14p13, 14p12, 14p11.2, 14p11.1, 14q11.1, 15p13, 15p12, 15p11.2, 15p11.1, 15q11.1, 21p13, 21p12, 21p11.2, 21p11.1, 21q11.1, 22p13, 22p12, 22p11.2 локусах.

Таким образом, показано статистически значимое снижение частоты встречаемости амплификаций ($p=0,00028$, $RR=0,4$ (0,24-0,68)) и делеций после проведения предоперационной химиотерапии ($p=0,0003$, $RR=0,33$ (0,18-0,61)).

На Рис.16 представлена общая частота встречаемости CNA в группе пациенток с люминальным В РМЖ до и после проведения НХТ.

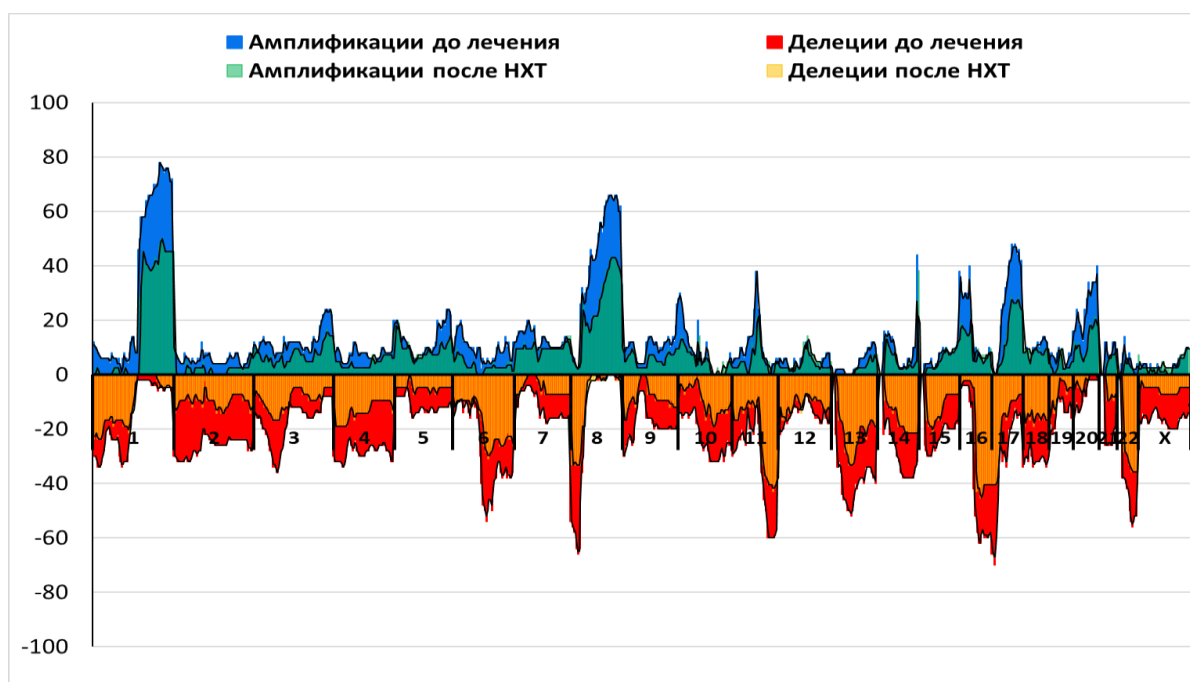


Рис. 16. Частота встречаемости CNA в группе пациенток с люминальным В РМЖ до и после проведения НХТ

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

безметастатическая выживаемость этих пациенток составила всего 30% (у 9/13 пациенток развились метастазы). На Рис. 17 представлена безметастатическая выживаемость пациенток с отсутствием изменений частоты CNA, уменьшением частоты CNA и появлением новых CNA (увеличение частоты CNA) при проведении НХТ.

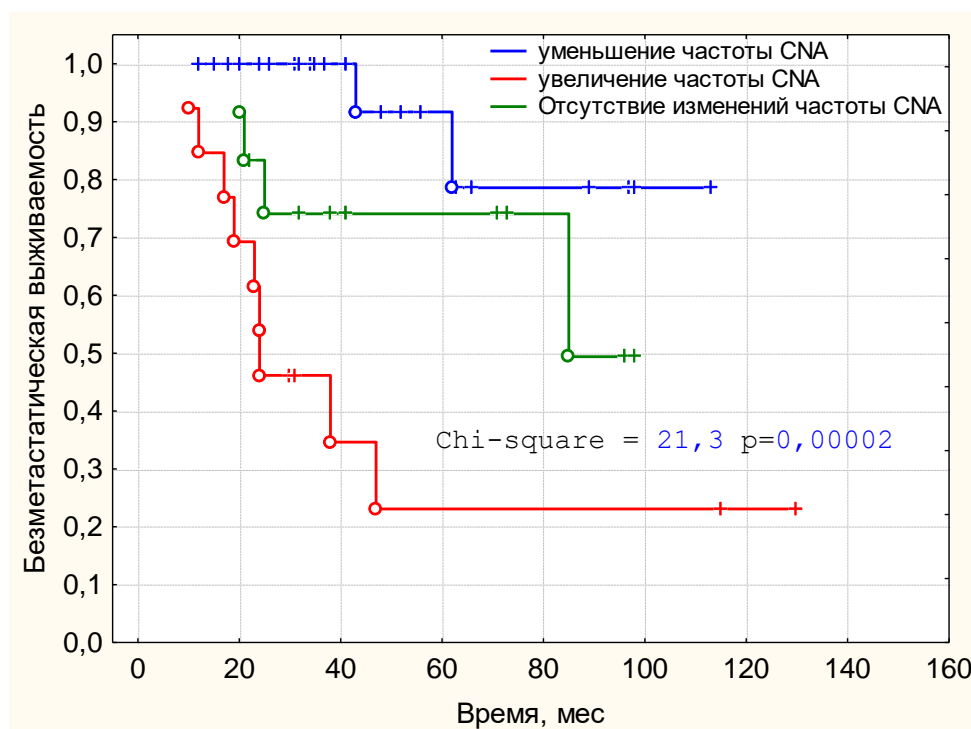


Рис. 17. Безметастатическая выживаемость больных люминальным В РМЖ в зависимости от изменения CNA в процессе лечения.

По данным литературы, пациенты с низким уровнем CNA имели более продолжительную общую выживаемость при большинстве типов рака, включая немелкоклеточный рак легкого, уротелиальный рак мочевого пузыря, рак молочной железы, глиобластому, по сравнению с пациентами с высоким уровнем CNA [Tang X.-R. et al 2019]. Zhang и коллеги (2018) предложили частоту CNA в качестве прогностического критерия для оценки общей выживаемости больных раком молочной железы, поскольку их анализ показал, что частота CNA имеет значительную связь с общей выживаемостью в модели Кокса [Zhang L. et al 2018]. В первичной когорте рака предстательной железы TCGA частота CNA в опухоли в значительной степени связана с рецидивом индивидуально ($p < 0,0001$; на 5% частоты CNA, HR = 1.27; 95% CI, 1.13, 1.42)) [Abeshouse A. et al 2015].

Далее была проведена стратификация и оценено, от какого типа изменений частоты CNA в процессе НХТ (частоты делеций или/и частоты амплификаций) больше зависит безметастатическая выживаемость больных РМЖ. Так же, как и для изменения частоты CNA, отдельно для изменения частоты делеций и частоты амплификаций все больные

были разделены на три группы с отсутствием изменений частоты делеций или амплификаций, с уменьшением частоты делеций или амплификаций и с увеличением частоты делеций или амплификаций. Отдельно для изменения частоты делеций и частоты амплификаций были построены кривые безметастатической выживаемости Каплана-Майера.

На Рис. 18 представлена безметастатическая выживаемость пациенток с отсутствием изменений частоты делеций, уменьшением и увеличением частоты делеций в процессе НХТ. Различия между группами по безметастатической выживаемости статистически значимы, ($p=0,0035$), однако они существенно ниже, чем при изменении частоты CNA. При отсутствии изменения частоты делеций выживаемость почти такая же, как и при уменьшении частоты делеций. Различия в безметастатической выживаемости между группами с благоприятным исходом (уменьшение частоты делеций) и группы с неблагоприятным исходом (увеличение частоты делеций) составляет всего 41% (у 5/38 пациентов развились метастазы) против 46% (у 7/13 пациентов развились метастазы), в отличие от CNA, где разница соответствующими между группами составляет почти 64% (см. выше). Иначе говоря, изменение частоты делеций вносит вариабельность в ассоциацию изменения частоты CNA с метастазированием.

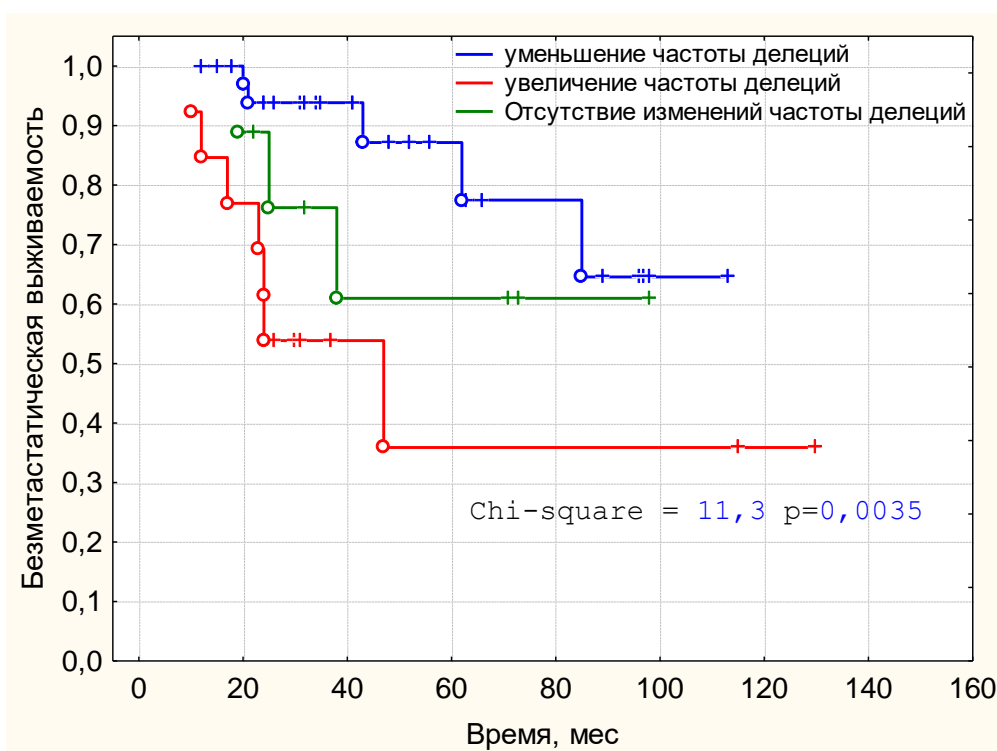


Рис. 18. Безметастатическая выживаемость больных люминальным В РМЖ в зависимости от изменения частоты делеций в процессе лечения.

Анализ безметастатической выживаемости пациенток в зависимости от изменения частоты амплификаций показал значительное увеличение уровня статистической

значимости по сравнению с ассоциацией безметастатической выживаемости с CNA (Рис. 19, $p=0,00000$). Безметастатическая выживаемость у больных с уменьшением частоты амплификаций в процессе предоперационного лечения составляет 100% (у 0/33 пациентов развились метастазы). У пациенток с отсутствием изменений частоты амплификаций показаны промежуточные показатели выживаемости 79% (у 3/14 пациентов развились метастазы). Группа пациенток с увеличением частоты амплификаций в процессе НХТ безметастатическая выживаемость составила всего 8% (у 12/13 пациентов развились метастазы).

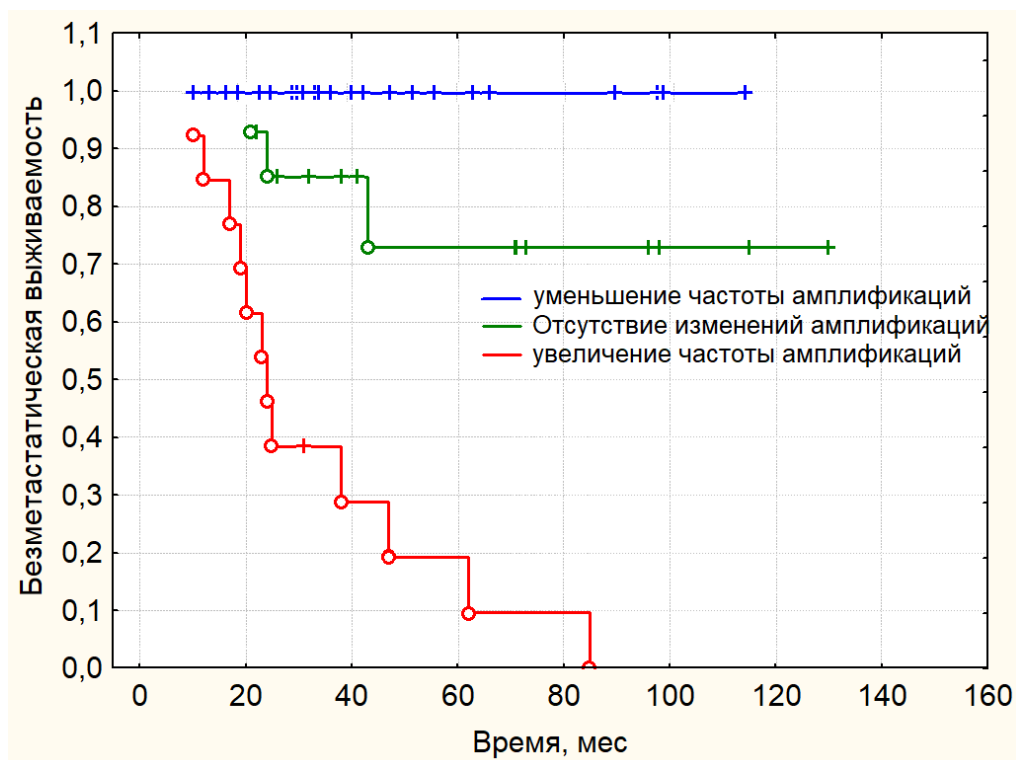


Рис. 19. Безметастатическая выживаемость больных РМЖ в зависимости от изменения частоты амплификаций в процессе лечения.

Таким образом, именно амплификации в большей степени ассоциированы с метастазированием. По-видимому, они имеют прямое отношение к механизмам метастазирования.

Если учитывать важность амплификаций для метастазирования (у всех пациентов в опухоли которых появлялись *de novo* амплификации развивались метастазы), то можно предположить, что появляться, под действием НХТ, амплификации будут в тех регионах, которые непосредственно отвечают за механизмы метастазирования, и определив хромосомные регионы, в которых появляются амплификации, можно определить генные системы участвующие в реализации процесса метастазирования. В этой связи на следующем этапе были установлено, амплификации в каких хромосомных регионах появлялись у больных после проведения НХТ. На Рис. 20 приведены хромосомные

регионы для каждого из 12 пациентов из группы, которые появлялись в резидуальной опухоли под действием НХТ.

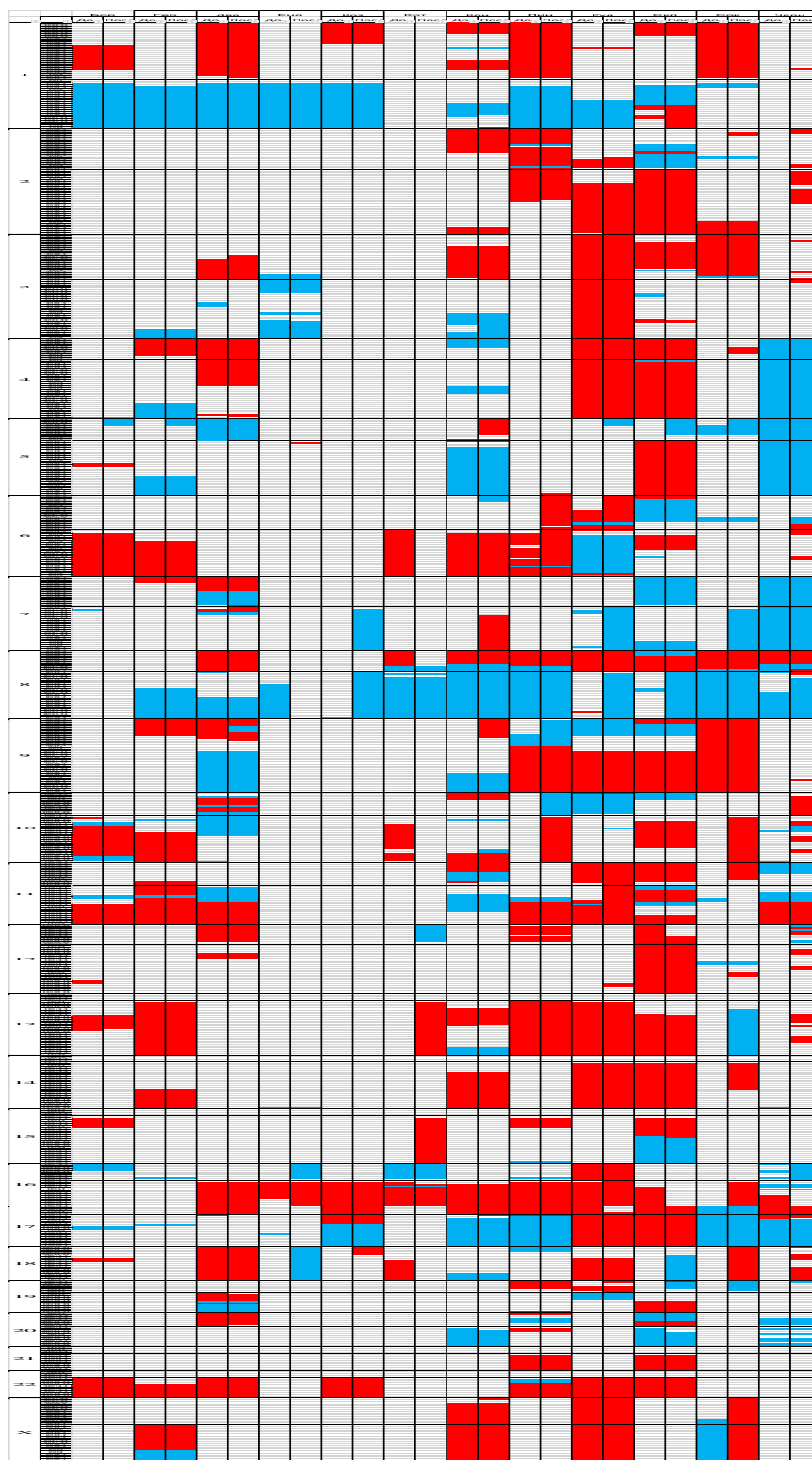


Рис. 20. Изменение CNA-генетического ландшафта опухоли молочной железы в процессе НХТ, пациентов с увеличением частоты амплификаций

Показано, что возникают *de novo* под действием НХТ амплификации в следующих хромосомных регионах: 3q(26.31-27.1), 5p(15.33-15.2), 6p(25.2-24.2; 21.2-12.2), 7q(11.1-

36.3), 8q(11.21-24.3), 9p(24.2-21.2), 10p(15.3-11.1), 10q(21.3-22.2; 25.1-25.2), 12p(13.33-11.22) 13q(12.3-34), 16p(13.3-11.2), 18q(11.1-23) 19p(13.3-12). У всех этих пациентов независимо от эффекта НХТ отмечалось гематогенное метастазирование, причем у 8/12 больных опухоль метастазировала в срок до 30 месяцев и только 2 больных пережила 5 летний период.

Далее у всех пациентов в резидуальной опухоли было прослежено количество амплификаций разных регионов из списка: 3q(26.31-27.1), 5p(15.33-15.2), 6p(25.2-24.2; 21.2-12.2), 7q(11.1-36.3), 8q(11.21-24.3), 9p(24.2-21.2), 10p(15.3-11.1), 10q(21.3-22.2; 25.1-25.2), 12p(13.33-11.22) 13q(12.3-34), 16p(13.3-11.2), 18q(11.1-23) 19p(13.3-12) (Таблица 6). Установлено, что метастазы развились у 15 пациентов и у всех пациентов в резидуальной опухоли были амплификации не менее 2 хромосомных регионов из представленного выше списка. Если в резидуальной опухоли было 1 амплификация или не было амплификаций, то у пациентов не развивались метастазы.

Таблица 6. Состав клонов с амплификациями из списка в опухоли до лечения и после НХТ и метастазирование пациентов

Пациент #	Амплифицированные регионы из списка		Изменение в процесс НХТ	Наличие метастазов	БМ выживаемость, мес
	До лечения	После НХТ			
A126/3	3q8q16p	Нет	Элиминация	Нет	24
B386/2	5p6p8q16p	Нет	Элиминация	Нет	
G265/5	3q10p13q	Нет	Элиминация	Нет	35
I133/4	8q10p	Нет	Элиминация	Нет	35
Ya134/1	6p13q18q	Нет	Элиминация	Нет	
K467/2	8q16p19p	Нет	Элиминация	Нет	
Sh244/4	6p16p	Нет	Элиминация	Нет	
B394/2	7q9p10p19p	Нет	Элиминация	Нет	31
M483/1	7q8q	Нет	Элиминация	Нет	22
V396/2	8q10p16p	Нет	Элиминация	Нет	24
S577/2	3q8q9q10p16p	Нет	Элиминация	Нет	
S702/2	8q10p	Нет	Элиминация	Нет	32
K345/2	16p	Нет	Элиминация	Нет	18
M366/2	6p16p	Нет	Элиминация	Нет	
L355/3	8q10p	Нет	Элиминация	Нет	52
Sh198/2	5p6p8q9q10p16p	Нет	Элиминация	Нет	66
L234/2	3q6p	3q	Элиминация	Нет	37
S454/3	7q16p	16p	Элиминация	Нет	113
K677/2	5p8q9q10p16p	8q	Элиминация	Нет	22
D390/2	3q7q8q10p	8q	Элиминация	Нет	43
S156/1	3q5p6p8q10p13q	3q	Элиминация	Нет	97
V567/2	3q6p8q	3q8q	Элиминация	Нет	48
G232/3	5p8q10p	5p8q	Элиминация	Нет	24
H3332	5p8q9p9q10p16p	5p8q	Элиминация	Нет	56

J245/4	3q6p8q	3qр8q	Элиминация	Нет	
O324/2	8q13q16p18	3q8q16p	Элиминация	Нет	30
	3q5p7q9p10p10q 18q19p19q	3q7q18q19q	Элиминация	Нет	89
K187/1	Нет	Нет	Нет изменений	Нет	
M187/2	Нет	Нет	Нет изменений	Нет	98
S667/1	Нет	Нет	Нет изменений	Нет	26
D121/1	Нет	Нет	Нет изменений	Нет	130
Sh332/1	Нет	Нет	Нет изменений	Нет	32
V134/4	Нет	Нет	Нет изменений	Нет	71
J134/2	Нет	Нет	Нет изменений	Нет	73
Ch341/1	Нет	Нет	Нет изменений	Нет	38
D256/2	5p	5p	Нет изменений	Нет	98
P167/3	8q10p	8q10p	Нет изменений	Нет	96
N111/2	5p8q16p	5p8q16p	Нет изменений	Нет	115
B278/1	5p8q16p19p	5p8q16p19p	Нет изменений	Да	21
M289/3	5p8q9q10q	5p8q9q10q	Нет изменений	Да	19
K544/1	6p7q8q9p	6p7q8q9p	Нет изменений	Нет	63
G373/2	8q16p19p	8q16p19p	Нет изменений	Нет	26
J259/4	5p7q16p18q19p	5p7q16p18q19 p	Нет изменений	Да	24
Ch233/3	5p7q8q10p16p	5p7q8q10p16p	Нет изменений	Нет	41
G178/3	6p7q8q10p10q16 p	6p7q8q10p10q 16p	Нет изменений	Нет	32
P244/3	16p	5p16p	Индукция	Да	25
B156/5	Нет	7q8q	Индукция	Да	22
Yu176/4	8q	5p8q10	Индукция	Да	10
K743/3	3q8q	3q5p8q	Индукция	Да	62
L188/4	8q16p	5p8q16p	Индукция	Да	85
K299/2	8q18q	6p8q18q	Индукция	Нет	31
R198/4	6p8q	6p8q13q	Индукция	Да	43
S232/2	8q	3q16p18q	Индукция	Да	47
Ch145/1	7q9p10p	5p7q9p10p	Индукция	Да	12
E106/2	8q9q13q	3q6p8q9q13q	Индукция	Да	12
S300/3	6p9p10p	6p7q8q9p10p	Индукция	Да	20
E148/1	8q	5p7q10q8q16p	Индукция	Да	23
S133/1	8q	5p6p7q8q13q1 9p	Индукция	Да	17

Таким образом, можно полагать, что опухолевые клоны, несущие амплификации минимум в двух хромосомных регионах из списка: 3q(26.31-27.1), 5p(15.33-15.2), 6p(25.2-24.2; 21.2-12.2), 7q(11.1-36.3), 8q(11.21-24.3), 9p(24.2-21.2), 10p(15.3-11.1), 10q(21.3-22.2; 25.1-25.2), 12p(13.33-11.22) 13q(12.3-34), 16p(13.3-11.2), 18q(11.1-23) 19p(13.3-12) являются потенциальными метастатическими клонами («семенами»), которые могут выходить в кровеносное русло и, при наличии «благоприятных» условий в органах-мишенях («почве»), с очень высокой вероятностью формируют очаги вторичного опухолевого роста. Определено, что необходимым условием формирования

метастатического клона является наличие 2 и более амплификаций из обозначенного выше списка, в то время как 1 амплификация не достаточна для осуществления метастазирования. Элиминация обозначенных амплификаций под действием НХТ приводит к 100% безметастатической выживаемости, напротив, индукция новых амплификаций сочетается почти со 100% метастазированием.

Во многих исследованиях было показано, что химиотерапия может элиминировать опухолевые клоны и приводит к увеличению безметастатической выживаемости. Хорошо известно, что при проведении НХТ у больных раком молочной железы достижение полной морфологической регрессии приводит к статистически значимому увеличению безметастатической и общей выживаемости [Kaufmann Manfred et al 2012, Prowell T.M. and Pazdur R. 2012].

С другой стороны, появляется все больше работ о том, что химиотерапия и таргетная терапия у некоторых пациентов может стимулировать образование новых мутаций, что приводит к формированию резистентности и прогрессии опухоли. Особенно много таких работ по гемобластомам, прежде всего это связано с доступностью для исследования опухолевого материала гемобластозов на этапах лечения. У больных острым лимфобластным лейкозом было показано, что при рецидиве заболевания после химиотерапии возникают целый ряд новых мутаций, в частности, в 44% (24/55) случаях наблюдались мутации в генах *NRAS*, *KRAS* и *PTPN11*. Авторы считают, что химиотерапия играет ведущую роль в возникновении этих мутаций и стимулирует за счет этого рецидивирование и развитие резистентности [Oshima K., Khiabani H. 2016]. Аналогичные данные были получены Landau et al. (2015), образование мутаций *de novo* было обнаружено в 97% случаев и в 25 % (15/59) случаев были обнаружены мутации *de novo* гена *TP53* [Landau D.A., Tausch E. 2015]. Findlay et al. (2016) исследовали 30 образцов аденокарциномы пищевода до лечения и после двух курсов предоперационной химиотерапии по схеме оксалиплатин-фторурацил. У неответствующих на химиотерапию больных в опухоли после лечения возникли мутации *TP53* (их не было в начальных образцах) и это коррелировало с плохим исходом ($\approx 20\%$ больных). Резистентные опухоли также имели драйверные мутации *de novo* в *TP53*, *SF3B1*, *TAF1*, *CCND2*, *FBXW7*, *SMARC4A* и *CNTNAP5* и *amp ERBB2*, *CCND2*, *TERT* и *CCNE1* [Findlay J.M., Castro-Giner F. 2016]. Неoadьювантная химиотерапия в некоторых случаях стимулировала метастазирование рака молочной железы, через micro-anatomical structures called tumor microenvironment of metastasis (TMEM) [Roychoudhury S. et al 2018]. Кроме этого, у некоторых пациентов и в эксперименте было показано, что химиотерапия может способствовать этапам процесса метастазирования: стимулировать ЭМП в опухолевых

клетках [Morel A.-P. et al 2008], стимулировать инвазию, интравазацию, воспаление [Sato R., Semba T. 2016], выброс CTCs в кровь [Mani S.A., Guo W. 2008], может способствовать метастазированию в органы за счет увеличения адгезии опухолевых клеток на эндотелии сосудов через повышение экспрессии VEGFR1 [Wellner U. et al 2009].

В 2019 году опубликована статья «Mutational diversity and therapy response in breast cancer - a sequencing analysis in the neoadjuvant GeparSepto trial», в которой благодаря методу NGS проведено комплексное исследование молекулярных событий при раке молочной железы (n=851). Авторами оценена значимость геномных изменений для ответа на неoadъювантную химиотерапию в исследовании GeparSepto. Панель исследования включала 16 генов для мутации (*AKT1*, *BRAF*, *CDH1*, *EGFR*, *ERBB2*, *ESR1*, *FBXW7*, *FGFR2*, *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, *SF3B1*, *TP53*, *HNFI1A*, *PIK3CA*, *PTEN*) и 8 генов для анализа изменения числа копий (*CCND1*, *ERBB2*, *FGFR1*, *PAK1*, *PIK3CA*, *TOP2A*, *TP53*, *ZNF703*). Было показано, что наиболее распространенными геномными изменениями были мутации *TP53* (38,4%) и *PIK3CA* (21,5%) и 8 различных амплификаций (*TOP2A* 34,9%; *ERBB2* 30,6%; *ZNF703* 30,1%; *TP53* 21,9%; *PIK3CA* 24,1%; *CCND1* 17,7%; *PAK1* 14,9%; *FGFR* 12,6%). Все остальные изменения имели распространенность менее 5%. Более того, было обнаружено, что генетическая гетерогенность в различных подтипах РМЖ (lum/HER2neg против HER2pos против TNBC) была в значительной степени связана с различиями в ответе на НХТ [Loibl S., Treue D. 2019].

По данным литературы фокальные амплификации из обозначенного нами выше списка, часто встречаются в опухоли и ассоциированы с неблагоприятным исходом. Согласно базе www.progenetix.org по частоте встречаемости при опухолях всех изученных локализаций (177 типов опухолей) амплификация **8q24.31** оказалась наиболее распространенной CNA и встречалась более чем в 30% всех образцов [Cai H., Kumar N. 2012]. Наиболее значимым геном в этом локусе по данным COSMIC является протоонкоген *c-Myc* [Jönsson G., Staaf J. 2010], а по совместительству и ген стволовости, входящий в коктейль Синью Яманаки [Takahashi K. and Yamanaka S. 2006]. Установлено, что амплификации **8q** региона предсказывают развитие метастазов у больных РМЖ [Zhang Y. et al 2009].

В другом исследовании на примере 8227 опухолей различных локализаций было определено, что наиболее часто встречаются амплификации в 1q, 5p, 7p, **8q**, и 20q хромосомных регионах [Kim T.-M. et al 2013]. При этом, пациенты с карциномой протоков высокой степени *in situ* (DCIS) часто демонстрируют амплификации в регионах 5p, 8q, 17q и 20q [Adachi H. and Tsujimoto M. 2002]. В исследовании Wikman H et al (2012) в первичной опухоли молочной железы больных с метастазами в головной мозг была

показана высокая частота (более 30%) амплификаций локусов **8q, 16p**. В метастазах амплификации были найдены во многих локусах, в том числе и в нескольких из нашего списка **5p, 7, 8q, 10p, 18** с частотой встречаемости более 30% случаев [Wikman H. et al 2012]. Magbanua M.J.M et al (2013) показали, что в циркулирующих опухолевых клетках метастатического рака молочной железы часто встречались амплификации в **5p, 10p, 8q, 13q** [Magbanua M.J.M. et al 2013]. Таким образом, в различных исследованиях показано, что амплификации из списка являются маркерами неблагоприятного исхода.

Опубликовано исследование С. Sotiriou и соавторов (2017), в котором с использованием CytoScan HD arrays проанализированы данные по 185 пациенткам с РМЖ. Было показано, что распределение CNA было сходным с распределением, наблюдаемым у пациентов с HER2+ из наборов данных METABRIC и TCGA. Уровень анеуплоидии не был связан с объективным ответом на НХТ или показателями безрецидивной выживаемости. Интересно, что было много существенных различий в профилях CNA между пациентками ER+ и ER-. Это отражает различия, наблюдаемые между пациентками ER + и ER- среди HER2- в TCGA ($p = 63\%$) и METABRIC ($p = 56\%$). Амплификация ERBB2 была предиктором высокого объективного ответа на НХТ ($p=0,0007$). GISTIC анализ выявил 159 повторяющихся регионов CNA. Амплификации 2 областей в 6q23-24 были достоверно связаны с более высоким объективным ответом на НХТ ($p=0,00005$ и $p = 0,00087$, FDR = 0,006 и 0,05). Наиболее значимый регион 6q23-24 содержал 39 генов, некоторые из которых по уровню экспрессии также предсказывали объективный ответ на НХТ (например, *MAP3K5*). Однако, не было обнаружено амплифицированной области или гена, коррелирующих с прогнозированием безрецидивной выживаемости, после множественной тестовой коррекции [Sotiriou С., Rothé F. 2017].

На Рис. 21 показан клинический случай появления клонов с амплификациями из нашего списка в опухоли после проведения НХТ и эти же амплификации наблюдались в метастазе, возникшем через 28 месяцев.

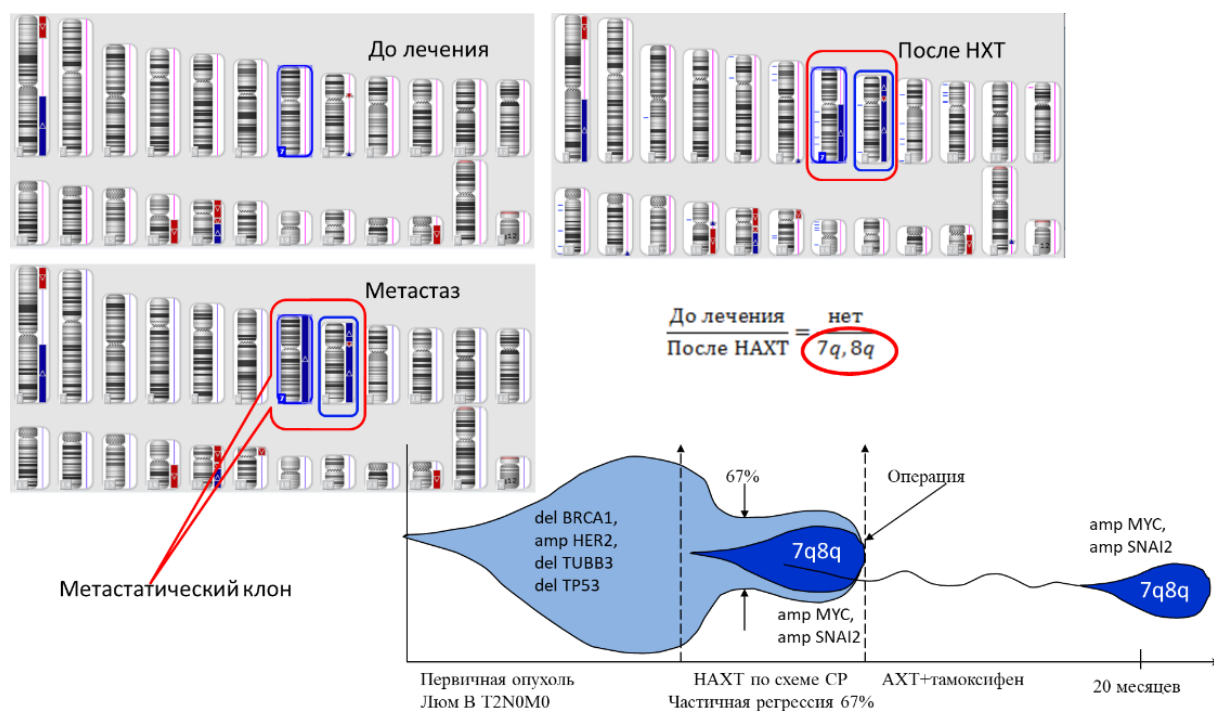


Рис. 21. CNA-генетический ландшафт опухоли до лечения, после проведения НХТ и метастаза в печени пациента К1

Примечание: Больная К1 47 лет люминальный В рак левой молочной железы T2N0M0, перед операцией получила 4 курса по схеме СР с эффектом частичная регрессия 75%, операция без осложнений, проведена АХТ и гормональная терапия, через 28 месяцев обнаружен метастаз в печени.

Аналогичные нашему клиническому случаю данные приводит Charlotte K.Y. Ng, et al. (2017), в работе которой на были представлены 9 случаев исследования CNA-генетического ландшафта первичных опухолей и их метастазов. Наблюдается значительная гетерогенность между первичной опухолью и метастазами, но во всех метастазах есть 2 и более амплификации идентифицированных нами хромосомных регионов, которые есть и в первичной опухоли [Ng С.К., Bidard F.-С. 2017]. Это дает возможность предположить, что все эти опухоли обладали способностью к метастазированию, за счет амплификаций, и именно клоны с амплификациями давали начало процессу метастазирования.

Согласно данным литературных источников, изучение значимости изменения состава амплификаций в опухоли в процессе лечения, является актуальным вопросом на сегодняшний день. В исследовании Karen Page и соавторов было проведено секвенирование следующего поколения для оценки мутаций и амплификаций генов до и после проведения лечения у 42 пациенток с метастатическим раком молочной железы. Было показано, что в здоровых контролях (n=9) не было обнаружено мутаций, в то время как ровно половина пациентов с метастатическим раком молочной железы имела по крайней мере одну мутацию или амплификацию (среднее значение 2, диапазон 1–6) в

общей сложности в 13 генах. Также было показано динамическое изменение мутаций и амплификаций генов в процессе проведения терапии, что указывает на клональный и субклональный ответ на лечение. Интересно отметить, что 9 из 42 пациентов (21%) имели мутационные или амплификационные изменения в процессе проведения терапии, которые могли предвещать изменение в исходе лечения [Page K.et al 2017].

Таким образом, в этой части работы показано, что в процессе НХТ могут элиминироваться опухолевые клоны и появляться новые клоны, несущие CNA и для гематогенного метастазирования ключевое значение, имеют амплификации. Появление амплификаций ассоциировано со 100% гематогенным метастазированием, а элиминация клонов с амплификациями приводит к благоприятному исходу. Установлены хромосомные регионы, которые появлялись в процессе НХТ и были связаны с развитием метастазов: 3q(26.31-27.1), 5p(15.33-15.2), 6p(25.2-24.2; 21.2-12.2), 7q(11.1-36.3), 8q(11.21-24.3), 9p(24.2-21.2), 10p(15.3-11.1), 10q(21.3-22.2; 25.1-25.2), 12p(13.33-11.22) 13q(12.3-34), 16p(13.3-11.2), 18q(11.1-23) 19p(13.3-12). Показано, что у всех пациентов с метастазами в резидуальной опухоли наблюдается минимум 2 амплификации из обозначенных регионов. При 1 амплификации или их отсутствии опухоли не метастазировали. Клинический пример показал, в первичной опухоли больной К не было амплификаций, они появились под действием НХТ в резидуальной опухоли и клоны именно с этими амплификациями были и в метастазах. По-видимому, генные системы, локализованные в этих регионах, отвечают за реализацию механизмов метастазирования. В дальнейших частях работы будет показана универсальная значимость амплификаций 3q(26.31-27.1), 5p(15.33-15.2), 6p(25.2-24.2; 21.2-12.2), 7q(11.1-36.3), 8q(11.21-24.3), 9p(24.2-21.2), 10p(15.3-11.1), 10q(21.3-22.2; 25.1-25.2), 12p(13.33-11.22) 13q(12.3-34), 16p(13.3-11.2), 18q(11.1-23) 19p(13.3-12) для метастазирования опухолей разных локализаций, проведен биоинформатический анализ и выявлена ключевая генная система, определяющая способность к метастазированию, выдвинута гипотеза механизмов метастазирования с участием этой системы и приведены ее доказательства.

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

Архитектура возникающих генетических aberrаций, таких как соматические мутации, вариации числа копий, измененные профили экспрессии генов и различные эпигенетические изменения, уникальны для каждого типа рака. Последние достижения в технологическом развитии геномного секвенирования и биоинформатики пролили новый свет на геном рака [Samur M.K.et al 2013, Stratton M.R.et al 2009].

Исследования, изучающие ландшафт геномных изменений при онкологических заболеваниях, становятся все более сложными и используют массивные наборы данных, полученные на платформах секвенирования следующего поколения (NGS) [Mardis E.R. 2013, Van Dijk E.L. et al 2014]. Одними из таких проектов являются Проект Атласа Генома Рака (Cancer Genome Atlas, TCGA) (<https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga>), разработанный в 2005 году [<http://cancergenome.nih.gov/>], и Международный консорциум по геному рака (ICGC) (<https://icgc.org/>), разработанный в 2008 году, были запущены в качестве двух основных проектов, которые ускоряют всестороннее понимание генетики рака с использованием инновационных технологий анализа генома.

Проект Cancer Genome Atlas финансируется Национальным Институтом Рака (NCI), цель которого - профилировать не менее 500 случаев 30 различных типов опухолей с использованием геномных платформ и сделать эти данные, как необработанные, так и обработанные, доступными для всех исследователей. Данные TCGA в настоящее время имеют размер более 1,2 ПБ (петабайт) и включают полную последовательность генома (WGS), полную последовательность экзома (WXS), данные по метилированию, данные по экспрессии РНК, а также протеомные и клинические наборы данных. Широкий доступ к этому набору данных предназначен для того, чтобы независимые исследовательские группы могли одновременно анализировать эти данные и ускорять обнаружение биомаркеров, связанных с возникновением, прогрессированием опухолевого процесса или ответа на определенную терапию.

Все данные TCGA состоят из защищенных и общедоступных: первые включают данные секвенирования, в то время как последние представляют собой необработанные файлы с платформ, которые не производят данные последовательности, и обработанные файлы с небольших платформ; например, общедоступные данные включают значения экспрессии генов и соматические варианты для каждого образца. Общедоступные данные TCGA, в настоящее время публикуются через публичные порталы, в том числе портал данных TCGA [<https://tcgadata.nci.nih.gov/tcga/>], cBIO [<http://www.cbioportal.org/>]. Результаты анализа данных также могут быть напрямую загружены из FIREHOSE, размещенного в Broad Institute [<http://gdac.broadinstitute.org/>] или в хранилище SAGE BIONETWORKS SYNAPSE [<https://www.synapse.org/#!/Synapse:syn2468297/wiki/64259>]. Кроме того, анализ данных может быть выполнен с использованием ряда инструментов, включая графические интерфейсы портала или сложные R-пакеты, такие как TCGABioLinks [Colaprico A. et al 2016].

Уже более 10 лет база TCGA активно используется во всем мире как платформа для проведения огромного спектра молекулярно-генетических (транскрипционных, протеомных и др.) исследований, позволяя ученым постоянно получать доступ к массиву данных и ускорять достижения в области изучения биологии рака и связанных с ним технологий.

Благодаря наличию вышеуказанной платформы TCGA, в мировой литературе активно появляются все новые данные в области молекулярно-генетических исследований онкопатологий различных локализаций. Так, например, проводится поиск новых терапевтических мишеней при ЗНО. В исследовании Liu Yanna и соавторов был проведен биоинформатический анализ для изучения регуляторных механизмов метилирования микроРНК и ДНК при экспрессии генов аденокарциномы эндометрия. Было показано, что гены *ZEB1*, *ZEB2*, *TIMP2*, *TCF4*, *CYP1B1*, *PITX1*, *PITX2*, *ZNF154* и *TSPYL5* могут участвовать в дифференцировке опухолей эндометриоидной аденокарциномы эндометрия и могут использоваться в качестве потенциальных терапевтических мишеней для заболевания [Liu Y. et al 2018]. Опубликованы исследования, направленные на поиск новых прогностических критериев. В работе Guo Feng и соавторов проводился анализ диагностических и прогностических показателей *CASP12* при раке шейки матки на основе базы данных TCGA. Были показаны статистически значимые различия между группами с высокой и низкой экспрессией *CASP12* с точки зрения дифференциации, метастазирования в лимфатические узлы, размера опухоли, стадии FIGO и отдаленных клинических результатов ($P < 0,05$), но не с точки зрения возраста, типов вируса папилломы человека (ВПЧ) и гистологического типа ($P > 0,05$). Трехлетняя выживаемость в группе с низкой экспрессией *CASP12* была значительно хуже, чем в группе с высокой экспрессией *CASP12* ($P = 0,028$). В заключении авторы предлагают использовать уровень экспрессии *CASP12* в качестве диагностического и прогностического биомаркера для пациентов с цервикальными карциномами [Feng G. et al 2019]. В работе Chundi Gao и соавторов были изучены SNPs генов для мониторинга и прогнозирования исхода пациентов с диагнозом рак молочной железы. Построена сеть PPI из 517 мутантных генов и проведен корреляционный анализ экспрессии генов. Корреляционный анализ выявил связь между мутацией и экспрессией шести генов (*NCOR1*, *GATA3*, *CDH1*, *ATM*, *AKT1* и *PTEN*). Среди них уровни экспрессии *CDH1*, *NCOR1*, *ATM* и *PTEN* в мутантных образцах были снижены, в то время как экспрессия *GATA3* и *AKT1* увеличилась. И далее оценена безрецидивная (БВ) и общая выживаемость (ОВ) пациентов в зависимости от экспрессии выделенных генов. Пациенты были разделены на группу с высокой экспрессией и группу с низкой экспрессией. Кривые ОВ и БВ для шести связанных с экспрессией мутантных

генов были построены. Используя $P < 0,05$ в качестве уровня значимости, было обнаружено, что экспрессия четырех генов (*NCOR1*, *GATA3*, *CDH1* и *ATM*) тесно связана с безрецидивной и общей выживаемостью пациентов. Также было показано, что высокая экспрессия *NCOR1*, *ATM* и *GATA3* была связана с более высокими показателями и ОБ, и БВ, в то время как высокая экспрессия *CHD1* была связана с плохим прогнозом [Gao S. et al 2019].

В настоящем разделе работы была проведена аналитическая работа и по данным проекта TCGA. Изучена связь смертности при различных локализациях и частоты 2-х и более фокальных амплификаций регионов 3q(26.31-27.1), 5p(15.33-15.2), 6p(25.2-24.2; 21.2-12.2), 7q(11.1-36.3), 8q(11.21-24.3), 9p(24.2-21.2), 10p(15.3-11.1), 10q(21.3-22.2; 25.1-25.2), 12p(13.33-11.22) 13q(12.3-34), 16p(13.3-11.2), 18q(11.1-23) 19p(13.3-12), которые были идентифицированы в предыдущем параграфе и появление амплификаций в этих областях при проведении НХТ, приводит к почти 100% метастазированию. В базе данных TCGA собрана информация о фокальных амплификациях в опухоли более чем 9 тыс. пациентов. Данные по смертности пациентов от ЗНО различных локализаций взяты из открытых эпидемиологических данных, представленных в ежегодном отчете ВОЗ [<https://www.who.int/topics/mortality/en/>].

В Таблице 7 представлена частота больных с наличием 2-х и более амплификаций идентифицированных регионов при опухолях различных типов, (цитировано по [Taylor A.M. et al 2018], а также по данным GLOBOCAN 18), а также показана смертность при различных локализациях, которая вычислялась как доля (в %) умерших к заболевшим при каждой локализации. Данные построены в порядке убывания частоты, приведены также и количество больных, проанализированных при каждой опухолевой локализации по данным TCGA. В анализ включены данные только по солидным опухолям, из которых исключены опухоли мозга (мультиформная глиобластома, глиомы низкой степени) и уротелиальный рак мочевого пузыря, поскольку по этим конкретным локализациям нет данных по смертности, а также локализации, по которым в базе TCGA менее 100 больных.

Наибольшая частота больных с 2-мя и более амплификациями идентифицированных регионов наблюдается при плоскоклеточной раке легкого – 72% и при этой локализации отмечается один из самых высоких уровней смертности 89%. Наименьшая частота – при раке щитовидной железы и смертность при этой локализации составила 11%. Отмечается высокий уровень корреляции ($R=0.842$ при высоком уровне статистической значимости $p=0.000011$) между частотой 2-х и более амплификаций идентифицированных регионов в опухоли и смертностью при различных локализациях.

Таблица 7. Смертность от злокачественных новообразований различных локализаций и частота больных с 2-мя и более амплификациями идентифицированных регионов в опухоли

Опухолевая локализация	Частота встречаемости 2-х и более амплификаций идентифицированных регионов (Ч), %	Смертность, %	Количество пациентов в TCGA
Все ЗНО	50	54	8356
Плоскоклеточный рак легкого (ПРЛ)	72	89	985
Аденокарцинома желудка (РЖ)	69	84	324
Рак прямой кишки (РПК)	69	64	388
Плоскоклеточный рак головы и шеи (ОГШ)	68	79	512
Рак мочевого пузыря (РМП)	64	46	401
Аденокарцинома толстой кишки (РТК)	61	63	433
Рак пищевода (РПщ)	60	89	163
Серозная цистаденокарцинома яичников (РЯ)	60	58	552
Аденокарцинома легких (АКЛ)	60	60	503
Меланома	56	39	461
Плоскоклеточный рак шейки матки (РШМ)	55	42	296
Рак молочной железы (РМЖ)	51	38	1048
Саркома	42	54	248
Рак почки (РП)	29	40	763
Рак тела матки (РТМ)	26	30	336
Аденокарцинома простаты (РПЖ)	12	35	472
Рак щитовидной железы (РЩЖ)	3	11	471
Примечание: Spearman Rank Order Correlations R = 0.842, p-level=0.000011 Смертность=11,8946+0,8423*х; х – Частота больных с 2-мя и более амплификациями идентифицированных регионов в опухоли			

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

При этом, важно отметить, что при некоторых локализациях частота 2-х и более амплификаций идентифицированных регионов в опухоли ниже смертности. Это отмечается для рака легкого, желудка, пищевода, рака толстой кишки, опухолей головы и шеи, рака предстательной железы и некоторых других (Рис. 22). Это означает, что в процессе лечения происходит стимуляция образования амплификаций, больше чем их элиминация под действием лечения. Иначе говоря, методы лечения этих локализаций мягко говоря несовершенны. При других локализациях, таких как рак молочной железы, меланома, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, частота 2-х и более амплификаций

идентифицированных регионов в первичных опухолях значительно выше частоты смертности. Это свидетельствует о том, что в процессе лечения этих локализаций в большей степени происходит элиминация клонов с амплификациями, чем их появление de novo. Методы лечения данных локализаций значительно лучше, чем опухоли обозначенных выше.

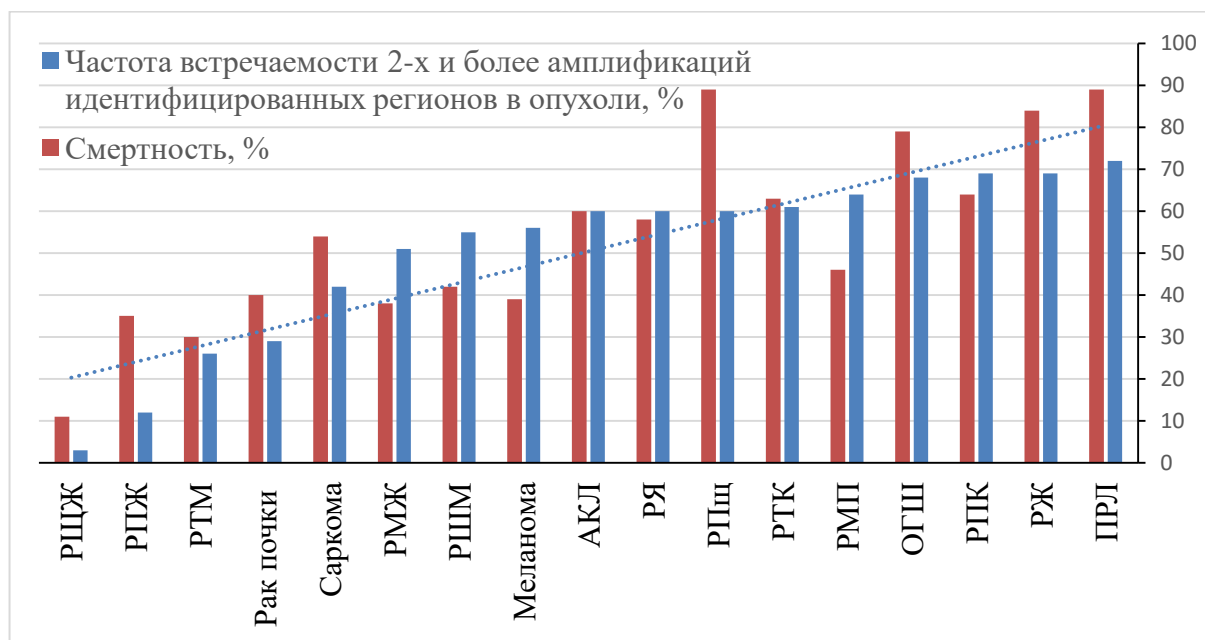


Рис. 22. Корреляция частоты встречаемости 2-х и более амплификаций идентифицированных регионов в опухоли и смертности, с линией тренда

Таким образом, анализ связи частоты 2-х и более амплификаций 3q(26.31-27.1), 5p(15.33-15.2), 6p(25.2-24.2; 21.2-12.2), 7q(11.1-36.3), 8q(11.21-24.3), 9p(24.2-21.2), 10p(15.3-11.1), 10q(21.3-22.2; 25.1-25.2), 12p(13.33-11.22) 13q(12.3-34), 16p(13.3-11.2), 18q(11.1-23) 19p(13.3-12) со смертностью при различных локализациях показал исключительно высокий уровень корреляции, что свидетельствует об универсальности наличия/отсутствия 2-х и более амплификаций идентифицированных регионов как маркера исхода заболевания. Это показывает его прямую связь с механизмами метастазирования, которые универсальны, а метастатическая болезнь является основной причиной смерти от онкологических заболеваний.

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

Следующим этапом работы было аннотирование генов, находящихся в регионах локализации амплификаций, возникающих под действием неoadъювантной химиотерапии: 3q(26.31-27.1), 5p(15.33-15.2), 6p(25.2-24.2; 21.2-12.2), 7q(11.1-36.3),

8q(11.21-24.3), 9p(24.2-21.2), 10p(15.3-11.1), 10q(21.3-22.2; 25.1-25.2), 12p(13.33-11.22)
13q(12.3-34), 16p(13.3-11.2), 18q(11.1-23) 19p(13.3-12).

Аннотирование генов, находящихся в представленных регионах, показало, что часто встречающимися генами в данных локусах являются гены трех функциональных систем. Первую группу составили гены, обуславливающие способность клеток слипаться друг с другом и с различными субстратами, т.е., гены системы адгезии. Во вторую группу генов составили гены регуляции клеточного цикла. И третью группу генов составили гены иммунной системы. В Таблице 8 представлены гены данных 3-х функциональных систем.

Таблица 8. Гены трех систем, локализованные в регионах 3q, 5p, 6p, 7q, 8q, 9chr, 10p, 10q22.1, 12p, 13q, 16p, 18chr, 19p

Хромосомный регион	Гены системы адгезии	Гены регуляции клеточного цикла	Гены иммунной системы
3q	<i>PVRL3</i> (3q13); <i>ALCAM</i> (3q13.1); <i>CD47</i> (3q13.1-q13.2); <i>TIGIT</i> (3q13.31); <i>CD80</i> (3q13.3-q21); <i>CD86</i> (3q21); <i>GP9</i> (3q21.3); <i>COL6A6/COL6A5</i> (3q22.1); <i>CLDN18</i> (3q22.3); <i>CLDN11</i> (3q26.2-q26.3); <i>NLGN1</i> (3q26.31); <i>CLDN16</i> (3q28); <i>CLDN1</i> (3q28-q29); <i>GP5</i> (3q29)	<i>GSK3B</i> (3q13.3); <i>MCM2</i> (3q21); <i>ANAPC13</i> (3q22.2); <i>STAG1</i> (3q22.3); <i>TFDP2</i> и <i>ATR</i> (3q23)	<i>IL20RB</i> (3q22.3); <i>IL12A</i> (3q25.33); <i>TNFSF10</i> (3q26); <i>THPO</i> (3q27); <i>IL1RAP</i> (3q28)
5p	-	<i>SKP2</i> (5p13)	<i>CCL28</i> (5p12); <i>IL7R</i> (5p13); <i>OSMR</i> (5p13.1); <i>PRLR</i> (5p13.2); <i>GHR</i> (5p13-p12)
6p	<i>CSNK2B</i> ; <i>HLA</i> ; <i>COL11A2</i> ; <i>TNXB</i> (6p21.3)	<i>MCM3</i> (6p12); <i>CCND3</i> (6p21); <i>CDKN1A</i> (6p21.2); <i>E2F3</i> (6p22)	<i>VEGFA</i> и <i>IL17A</i> (6p12); <i>TNFRSF21</i> (6p21.1); <i>TNF</i> (6p21.3); <i>LTA</i> и <i>LTB</i> (6p21.3); <i>PRL</i> (6p22.3)
7q	<i>CD36</i> (7q11.2); <i>CLDN15</i> (7q11.22); <i>CLDN4</i> и <i>CLDN3</i> (7q11.23); <i>LAMB1</i> и <i>RELN</i> (7q22); <i>COL1A2</i> (7q22.1); <i>MET</i> , <i>NRCAM</i> и <i>LAMB4</i> (7q31); <i>WASL</i> и <i>LRRC4</i> (7q31.3); <i>CNTNAP2</i> (7q35)	<i>YWHAG</i> (7q11.23); <i>DBF4</i> (7q21.3); <i>MCM7</i> (7q21.3-q22.1); <i>CDK6</i> (7q21-q22); <i>ORC5</i> (7q22.1); <i>WEE2</i> (7q32); <i>CUL1</i> (7q36.1)	<i>CCL24</i> и <i>CCL26</i> (7q11.23); <i>HGF</i> (7q21.1); <i>EPO</i> (7q22); <i>MET</i> (7q31); <i>LEP</i> (7q31.3)
8q	<i>SDC2</i> (8q22-q23)	<i>PRKDC</i> (8q11); <i>MCM4</i> (8q11.2); <i>E2F5</i> (8q21.2); <i>CCNE2</i> (8q22.1); <i>YWHAZ</i> (8q23.1); <i>RAD21</i> (8q24)	<i>IL7</i> (8q12-q13); <i>TNFRSF11B</i> (8q24)
9chr	<i>CD274</i> (9p24);	<i>CDKN2A/B</i> (9p21);	<i>CCL19/21/27</i> и <i>IL11RA</i>

	<i>PDCD1LG2</i> (9p24.2); <i>COL27A1</i> (9q32); <i>TNC</i> (9q33); <i>NTNG2</i> (9q34); <i>LAMC3</i> (9q34.12); <i>COL5A1</i> (9q34.2-q34.3)	<i>GADD45G</i> (9q22.1- q22.2); <i>CDC14B</i> (9q22.3); <i>CDC26</i> (9q32); <i>ABL1</i> (9q34.1); <i>ANAPC2</i> (9q34.3)	(9p13); <i>CNTFR</i> (9p13); <i>IFNB1</i> (9p21); <i>IFNE</i> (9p21.3); <i>IFNA1/2/4/</i> <i>5/6/7/8/10/13/14/16/17/21</i> u <i>IFNWI</i> (9p22); <i>TNFSF15</i> (9q32); <i>TNFSF8</i> (9q33)
10p	<i>PARD3</i> (10p11.21); <i>ITGA8</i> (10p13)	-	<i>IL15RA</i> (10p15.1); <i>IL2RA</i> (10p15-p14)
10q22.1	-	-	-
12p	<i>PTPN6</i> (12p13); <i>VWF</i> (12p13.3); <i>CD4</i> (12p13.31)	<i>CCND2</i> (12p13); <i>CDKN1B</i> (12p13.1-p12)	<i>LTBR</i> u <i>CD27</i> (12p13); <i>TNFRSF1A</i> (12p13.2)
13q	<i>WASF3</i> (13q12); <i>LMO7</i> (13q22.2); <i>CLDN10</i> (13q31-q34); <i>COL4A1/2</i> (13q34)	<i>CCNA1</i> (13q12.3-q13); <i>RBI</i> (13q14.2); <i>TFDP1</i> u <i>CDC16</i> (13q34)	<i>TNFRSF19</i> (13q12.11- q12.3); <i>TNFSF11</i> (13q14); <i>TNFSF13B</i> (13q32-q34)
16p	<i>MAPK3</i> (16p11.2); <i>ITGAL</i> u <i>SPN</i> (16p11.2); <i>ITGAM</i> (16p11.2); <i>CREBBP</i> u <i>CLDN6/9</i> (16p13.3)	<i>PLK1</i> (16p12.2); <i>PKMYT1</i> (16p13.3)	<i>IL21R</i> (16p11); <i>CTF1</i> (16p11.2); <i>IL4R</i> (16p12.1- p11.2); <i>TNFRSF17</i> (16p13.1); <i>TNFRSF12A</i> (16p13.3)
18chr	<i>PTPRM</i> u <i>PTPRM</i> (18p11.2); <i>LAMA1</i> (18p11.3); <i>YES1</i> (18p11.31-p11.21); <i>CDH2</i> u <i>LAMA3</i> (18q11.2); <i>CD226</i> (18q22)	-	-
19p	<i>COMP</i> (19p13.1); <i>COL5A3</i> (19p13.2); <i>MADCAM1</i> (19p13.3); <i>INSR</i> u <i>ICAM1</i> (19p13.3- p13.2); <i>ICAM3</i> (19p13.3- p13.2)	<i>CDKN2D</i> (19p13); <i>FZR1</i> u <i>GADD45B</i> (19p13.3)	<i>CD70</i> (19p13); <i>IL12RB1</i> (19p13.1); <i>CCL25</i> (19p13.2); <i>TNFSF14</i> , <i>TNFSF9</i> u <i>AMH</i> (19p13.3); <i>EPOR</i> (19p13.3-p13.2)

Однако, подробное аннотирование генов в этих локусах показало, что единственной системой, гены которой представлены во всех этих регионах являются гены системы индукции и поддержания стволового фенотипа клеток и самообновления или гены стволовости. В Таблице 9 представлены 48 генов стволовости, расположенные в регионах локализации новых амплификаций.

Таблица 9. Гены стволовости, расположенные в регионах локализации новых амплификаций

Гены	Локус	Функция
<i>SOX2</i>	3q26.33	Ключевой регулятор фактор транскрипции, который контролирует плюрипотентность и самообновление в эмбриональных стволовых клетках, участвует в индукции плюрипотентности, входит в состав коктейля Яманаки [Sarkar A. and Hochedlinger K. 2013, Tam W.L. and Ng H.H. 2014].

<i>DPPA2</i>	3q13.13	Ген плюрипотентности, который специфически экспрессируется в эмбриональных стволовых клетках [Monk M., Hitchens M. 2008].
<i>DPPA4</i>	3q13.13	Кодирует ядерный фактор, который участвует в поддержании плюрипотентности в стволовых клетках и необходим для эмбриогенеза. Является одним из генов, который высоко экспрессируется в эмбриональных стволовых клетках [Chakravarthy H., Boer B. 2008].
<i>GSK3B</i>	3q13.33	<i>SNAIL1</i> и <i>NANOG</i> одни из ключевых генов стволовости. Показано, что <i>SNAIL1</i> активирует <i>NANOG</i> через путь <i>SMAD1/AKT/GSK3B</i> в опухоли легкого [Liu C.-W. et al 2014].
<i>TERT</i>	5p15.33	<i>TERT</i> служит для поддержания функции теломер путем добавления de novo теломерных повторов на концах хромосом. В нормальных тканях экспрессируется в стволовых клетках и в прогениторных клетках. Практически всегда активен в опухолевых клетках [Vinagre J., Pinto V. 2014].
<i>BMP6</i>	6p24.3	Принадлежит к суперсемейству трансформирующих факторов роста β (<i>TGF-β</i>). Недавние исследования показали, что <i>BMP6</i> играет решающую роль в контроле за самообновлением и дифференцировкой стволовых клеток, в том числе мезенхимальных стволовых клеток (MSC), стволовых клеток зародышевой линии (GSC), гемопоэтических стволовых клеток (HSC) и нервных стволовых клеток (NSCs) [Shen R. et al 2015].
<i>OCT4</i> (<i>POU5F1</i>)	6p21.33	Специфически экспрессирован в тотипотентных эмбриональных стволовых клетках млекопитающих и зародышевых клетках, играя ключевую роль в индукции и поддержании плюрипотентности. Входит в состав коктейля Яманаки [Cho Y. et al 2018b].
<i>SOX4</i>	6p22.3	Эктопическая сверхэкспрессия <i>SOX4</i> в иммортализованных эпителиальных клетках молочной железы человека является достаточной для приобретения мезенхимальных признаков, повышенной инвазии, индукции стволовых клеток, определяемыми присутствием субпопуляции CD44 ^{high} /CD24 ^{low} клеток. <i>SOX4</i> индуцируется <i>TGF-β</i> в эпителиальных клетках молочной железы и был необходим для <i>TGF-β</i> -индуцированного ЭМП [Zhang J. et al 2012].
<i>NOTCH4</i>	6p21.32	Показано, что усиленная экспрессия данного онкопротеина в культивируемых эпителиальных клетках молочной железы вызывает независимый от прикрепления рост, инвазию и потерю контактного ингибирования и индукцию стволовых клеток опухоли молочной железы [Kim S.-H. and Singh S.V. 2015, Soriano J.V., Uyttendaele H. 2000] Участвует в регуляции иерархии стволовых и прогениторных клеток в нормальных и опухолевых тканях [Harrison H., Farnie G. 2010a].
<i>PIM1</i>	6p21.2	В раковых клетках <i>PIM1</i> играет важную роль в регуляции клеточного цикла, пролиферации клеток, выживании клеток и множественной лекарственной устойчивости. В стволовых клетках киназа <i>PIM1</i> играет важную роль в пролиферации, самообновлении и экспансии стволовых клеток [Xie Y. and Bayakhmetov S. 2016].
<i>FZD9</i>	7q11.23	Экспрессируется преимущественно в мышцах, почках, костях, яичках и головном мозге и играет важную роль в поддержании

		популяций стволовых клеток в крови, коже и кишечнике [Kolben T., Peröbner I. 2012].
<i>FZD1</i>	7q21.13	Экспрессия лигандов Wnt, таких как <i>FZD1</i> , <i>FZD10</i> , <i>LRP5</i> и <i>LRP6</i> , была значительно увеличена в OCT4 + опухолевых клетках [Zhang X.et al 2015]. Модулирует чувствительность различных видов рака человека к химиотерапевтическим лекарственным средствам и связан с плохим прогнозом [Wang Y.-H.et al 2018].
<i>WNT2</i>	7q31.2	Циркулирующие опухолевые клетки, высвобождаемые опухолями, экспрессируют ген <i>WNT2</i> , что увеличивает их стволовые свойства и метастазирование [Chen J., Li Y. 2012]. Опухоли продуцируют высокие уровни <i>WNT2</i> , <i>CXCL12</i> и <i>IL6</i> , что, в свою очередь, стимулирует самообновление иницирующих опухоль клеток, которые затем продуцируют больше мезенхимальных клеток. <i>WNT2</i> генерируется либо ЭМП-подобными CSC, либо другими более дифференцированными фиксированными ЭМП-подобными опухолевыми клетками [Brooks M.D. and Wicha M.S. 2015]
<i>SMO</i>	7q32.1	Гиперэкспрессия <i>SMO</i> в модельной клеточной линии CML мыши увеличивала частоту стволовых опухолевых клеток в 4 раза и способствовала дальнейшей прогрессии. Генетический нокадаун <i>SMO</i> в стволовых опухолевых клетках приводил к полной элиминации опухолевых стволовых клеток in vivo [Matsui W.H. 2016].
<i>CDK6</i>	7q21.2	Аберрантная экспрессия <i>CDK6</i> была обнаружена при многих опухолевых локализациях. <i>CDK6</i> важный регулятор активации опухолевых и гемопоэтических стволовых клеток [Scheicher R.et al 2015, Tadesse S.et al 2015]. Ингибитор <i>CDK6</i> паблотициклб значительно снижает долю опухолевых стволовых клеток в различных клеточных линиях опухоли молочной железы [Kishino E.et al 2019].
<i>EPHA1</i>	7q34-q35	При изучении профиля метилирования ДНК человека и экспрессионного профиля в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (ИПСК), были идентифицированы 8 генов, которые можно использовать в качестве новых эпигенетических маркеров при оценке ИПСК. В частности, ген <i>EPHA1</i> , гипометилирован и высоко экспрессируется в ИПСК [Nishino K. and Umezawa A. 2016].
<i>SHH</i>	7q36.3	Сигнальный путь <i>SHH</i> способствует самообновлению стволовых и/или прогениторных в различных органах, а up-regulation этого пути может способствовать онкогенезу и поддержанию стволового фенотипа [Cazet A.S.et al 2018, Czerwinska P. and Kaminska B. 2015].
<i>SNAI2</i>	8q11.21	транскрипционный репрессор, задействованный в ЭМП нормальных и опухолевых клеток. Для последних это происходит при инвазии и интравазации сосудов, в процессе гематогенного метастазирования. мРНК <i>SNAI2</i> экспрессируется в плаценте, меланоцитах, эмбриональных стволовых клетках, лейомиосаркоме, нейробластоме и глиобластоме. <i>SNAI2</i> ключевой регулятор ядерной транскрипции в стволовых клетках опухоли молочной железы [Salgado B.S., Rocha R.M. 2014, Shankar J. and Nabi I.R. 2015].
<i>MYC</i>	8q24.21	Протоонкоген, кодирующий белок, который является ключевым

		транскрипционным фактором роста нормальных и опухолевых стволовых клеток. Входит в состав коктейля Яманаки [Schoenhals M.et al 2009].
<i>ALDH1A1</i>	9q21.13	Является одним из основных маркеров опухолевых стволовых клеток рака молочной железы и других локализаций [Charafe-Jauffret E.et al 2013a, Ginestier C., Hur M.H. 2007].
<i>TGFBR1</i>	9q22.33	Является прототипом большого семейства секретируемых полипептидных факторов роста, включая костные морфогенетические белки (BMPs), которые регулируют множество клеточных процессов, влияющих на пролиферацию, дифференцировку, миграцию, апоптоз, а также поддержание плюрипотентного стволового состояния клеток [Lin F.et al 2018].
<i>KLF4</i>	9q31.2	Играет важную роль в росте клеток, пролиферации, дифференцировке, а также в самообновлении стволовых клеток и поддержании плюрипотентности. Входит в состав коктейля Яманаки [Le Magnen C.et al 2013, Oyinlade O.et al 2018].
<i>NOTCH1</i>	9q34.3	Сигнальный путь <i>NOTCH</i> является важной формой межклеточной коммуникации, которая играет ключевую роль как в управлении клеточного цикла, так и в дифференцировке и формировании потенциала стволовых клеток. Семейство генов <i>NOTCH</i> состоит из трансмембранных рецепторов - <i>NOTCH1</i> , 2, 3, 4 [Roy M., Pear W.S. 2007].
<i>VIM</i>	10p13	Экспрессия виментина связана с эпителиально-мезенхимным переходом, инвазией, миграцией и метастазированием. Было показано, что экспрессия <i>VIM</i> повышает инвазию и миграцию клеток при РМЖ [37]. <i>VIM</i> повышает количество <i>ALDH1+</i> стволовых клеток молочной железы, их туморогенность и образование маммосфер [Fu C.et al 2014, Kotiyal S. and Bhattacharya S. 2014]
<i>BM11</i>	10p12.2	Является членом семейства Polycomb 1 (PcG). Hedgehog путь и <i>BM11</i> участвует в эмбриональном развитии и самообновлении в тканевых стволовых клетках и опухолевых клетках разных локализаций, в том числе и опухоли молочной железы [Cazet A.S., Hui M.N. 2018, Liu S., Dontu G. 2006].
<i>ITGB1</i>	10p11.22	Сообщается, что <i>ITGB1</i> задействован в регуляции актинового цитоскелета, а также тесно связан с миграцией и ростом клеток. <i>ITGB1</i> является ключевым регулятором перехода от состояния покоя к активной пролиферации опухолевых клеток [Barkan D. and Chambers A.F. 2011, Klahan S.et al 2014]. Показано, что нокдаун длинной некодирующей РНК <i>linc-ITGB1</i> , активирующей экспрессию <i>ITGB1</i> , ингибирует образование ОСК и экспрессию генов стволовости, таких как <i>SOX2</i> , <i>NANOG</i> , <i>OCT4</i> , <i>MYC</i> и <i>CD133</i> [Guo L.et al 2019].
<i>ZEB1</i>	10p11.22	<i>ZEB1</i> является регулятором транскрипции, участвующим в эмбриональном развитии и прогрессировании рака. <i>ZEB1</i> индуцирует эпителиально-мезенхимальный переход. Трансфекция <i>ZEB1</i> приводит к стволовому переходу опухолевых клеток молочной железы. Связывают ЭМП с образованием стволового фенотипа [Chaffer C.L., Marjanovic N.D. 2013, Krebs A.M., Mitschke J. 2017].
<i>GATA3</i>	10p14	<i>GATA3</i> может облегчать успешное перепрограммирование в плюрипотентные стволовые клетки и необходим для

		поддержания плюрипотентности. <i>GATA3</i> высоко экспрессируется в стволовых клетках рака яичника по сравнению с прогениторными клетками и ассоциируется с плохим прогнозом [Chen H.J.et al 2018, Shu J.et al 2013a].
<i>NODAL</i>	10q22.1	Член суперсемейства трансформирующего фактора роста бета (<i>TGFβ</i>) <i>NODAL</i> является установленным регулятором раннего эмбрионального развития. <i>NODAL</i> также является важным фактором в поддержании плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток посредством регуляции основных транскрипционных программ [Bodenstine Thomas Met al 2016].
<i>NANOG</i>	12p13.31	<i>NANOG</i> является белком, впервые обнаруженным в эмбриональных стволовых клетках, регулирующим функции транскрипционной регуляции, самообновления и плюрипотентности. Вместе с <i>SOX2</i> и <i>OCT4</i> , <i>NANOG</i> играет ключевую роль в поддержании свойств эмбриональных стволовых клеток [Chambers I.et al 2003].
<i>DPPA3</i>	12p13.31	Играет роль в делении клеток и поддержании плюрипотентности клеток. Сверхэкспрессия <i>DPPA3</i> увеличивает скорость пролиферации опухолевых клеток и маммосферообразование, а также миграцию и инвазию [Waghra A., Saiz N. 2015]. <i>DPPA3</i> является нижестоящей мишени для <i>Lin28a</i> в индукции плюрипотентного состояния клеток [Sang H.et al 2019].
<i>CCND2</i>	12p13.32	Высокая экспрессия <i>CCND2</i> наблюдается в ALDHhigh опухолевых стволовых клетках. [Hoyt A.et al 2019]
<i>SOX1</i>	13q34	<i>SOX1</i> и <i>SOX2</i> являются двумя тесно связанными факторами транскрипции, относящимися к подгруппе семейства <i>SOXB1</i> , которые в значительной степени участвуют в регуляции плюрипотентных стволовых клеток и нервных стволовых клеток [Zhang S. and Cui W. 2014].
<i>ZIC2</i>	13q32.3	Показано, что <i>ZIC2</i> высоко экспрессируется в стволовых опухолевых клетках печени, и в целом, что <i>ZIC2</i> играет решающую роль в поддержании и выживании как нормальных стволовых клеток, так и стволовых опухолевых клеток [Zhu P.et al 2015].
<i>KLF5</i>	13q21.3	При подавлении экспрессии <i>KLF5</i> снижается процент опухолевых стволовых клеток трижды негативного рака молочной железы [Shi P.et al 2017]. <i>KLF5</i> осуществляет эпигенетический и транскрипционный контроль над генами пути Wnt и Notch, имеет решающее значение для поддержания в стволовом состоянии интестинальных стволовых клеток [Kim C.-K.et al 2019].
<i>FLT3</i>	13q12.2	<i>FLT3</i> является рецепторной тирозинкиназой, экспрессируемой незрелыми гемопоэтическими клетками, и важен для нормального развития стволовых клеток многих органов, иммунной системы и опухолевых стволовых клеток гемобластозов [Gilliland D.G. and Griffin J.D. 2002, Kiyoi H. 2017].
<i>CCNA1</i>	13q.13.3	Нарушение регуляции <i>CCNA1</i> участвует в канцерогенезе, прогрессировании и метастазировании многих видов солидных опухолей [He X.et al 2019]. Повышенная экспрессия наблюдается в опухолевых стволовых клетках многих локализаций [Zhang G.et al 2012].

<i>SOX8</i>	16p13.3	Одновременная активация <i>SOX8</i> и <i>ZEB1</i> при раке молочной железы связана с такими биологическими характеристиками, как размер опухоли, инфильтрацией лимфатических узлов и стадией TNM, более того, способствует росту и миграции опухолевых клеток и регулирует свойства опухолевых стволовых клеток [Tang H., Chen B. 2019].
<i>CCNF</i>	16p13.3	Повышенная экспрессия обнаружена при исследовании сигнальных путей, связанных со стволовыми клетками трижды негативного рака молочной железы Hs578T, в ответ на лечение доксорубицином. <i>OCT4</i> стимулирует экспрессию <i>NANOG</i> и циклина F, оба являются ингибиторами протеинфосфатазы 1 (PP1), предотвращая дефосфорилирование Rb и повышая скорость пролиферации клеток [Loh Y.-H. et al 2006, Tudoran O., Soritau O. 2015].
<i>ZSCAN10</i>	16p13.3	Необходим для поддержания плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) через взаимодействие с <i>OCT4</i> и <i>SOX2</i> , которые являются маркерами плюрипотентности для ЭСК [Kraus P. et al 2014].
<i>SMAD4</i>	18q21.2	<i>SMAD4</i> транслоцируется в ядро в виде гетеротримерного комплекса <i>SMAD2/SMAD3-SMAD4</i> после активации рецепторов семейства TGF β . Нокдаун <i>SMAD4</i> эффективно ингибирует TGF- β -индуцированный эпителиально-мезенхимальный переход клеток опухоли молочной железы. Человеческие эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) остаются недифференцированными после нокдауна <i>SMAD4</i> . <i>SMAD4</i> требуется для стабилизации недифференцированного состояния ЭСК [Avery S., Zafarana G. 2010, Deckers M., van Dinther M. 2006].
<i>SMAD2</i>	18q21.1	<i>SMAD2</i> -позитивные клетки считают опухолевыми стволовыми клетками при раке толстой кишки [Suzuki R., Fukui T. 2015]. Передача сигналов <i>NODAL</i> усиливает экспрессию <i>ALDH1</i> , <i>CD44</i> , <i>CD133</i> , <i>SOX2</i> , <i>OCT4</i> и <i>NANOG</i> путем активации пути <i>SMAD2/3</i> , тем самым повышая туморогенность и способность к маммосферообразованию клетками опухоли молочной железы [Gong W., Sun B. 2017].
<i>SALL3</i>	18q23	Недавние исследования показали связь между уровнем экспрессии <i>SALL3</i> и канцерогенезом. Экспрессия <i>SALL3</i> значительно повышена в CD133+ стволовых клетках рака толстой кишки, по сравнению с CD133 негативными клетками опухоли [Kim S.T. et al 2014]
<i>KLF1</i>	19p13.13	<i>KLF1</i> способен активировать промотор CD44, являющийся основным маркером стволовых клеток. <i>KLF1</i> выступает в качестве транскрипционного активатора. Также он является регулятором многих компонентов механизма клеточного цикла [Tallack M.R. and Perkins A.C. 2013].
<i>KLF2</i>	19p13.11	MYC позитивно регулирует экспрессию <i>KLF2</i> , <i>KLF4</i> , <i>LIF</i> и <i>LIN28B</i> в нейробластоме человека. Поддержание уровня экспрессии <i>KLF2</i> , <i>KLF4</i> и <i>LIN28B</i> , являются независимым механизмами, с помощью которого MYC способствует плюрипотентности, генезу нейробластомы, а также биологии ESC и iPSC [Cotterman R. and Knoepfler P.S. 2009].
<i>INSR</i>	19p13.2	Эктопическая сверхэкспрессия <i>INSR</i> способствует росту, миграции, инвазии, онкогенезу и метастазированию

		плоскоклеточных опухолей. <i>MYC</i> непосредственно связывается с промоторами <i>INSR</i> [Sun J.et al 2018]. Повышенная экспрессия <i>INSR</i> наблюдается в CD133+ опухолевых стволовых клетках глиобластомы по сравнению с CD133- клетками [Bal M.G.et al 2016].
<i>TGFBI</i>	19q13.2	<i>TGFβ</i> способствует эпителиально-мезенхимному переходу (EMT), инвазии и увеличению метастатического потенциала [72]. <i>TGFβ</i> может приводить к индукции ОСК из не-ОСК [Pirozzi G.et al 2011]. Воздействие <i>TGFβ</i> и <i>TNFα</i> на опухолевые клетки молочной железы индуцирует опухолевые стволовые клетки с увеличенной способностью к самообновлению, туморогенности и увеличенной устойчивости к оксалиплатину, эпопозиду и паклитакселу [Asiedu M.K.et al 2011].

Все аннотированные гены, помимо участия в индукции стволового фенотипа и роли в самообновлении стволовых клеток, имеют прямое отношение к канцерогенезу и прогрессии опухолей, причем важно то, что up-регуляция всех этих генов приводит к усилению метастазирования опухолей, при клинических исследованиях, в системах *in vivo* и к усилению туморогенности и маммосферообразования в системах *in vitro*.

3.5 Исследование экспрессии генов стволовости в опухоли молочной железы

Следующим этапом работы была оценка экспрессии генов стволовости, находящихся в регионах локализации амплификаций, возникающих под действием неoadьювантной химиотерапии.

Для выполнения данной задачи были выбраны 13 генов – *TERT* (5p15.33); *OCT3* (6p21.33); *SMO* (7q32.1); *SNAI2* (8q11.21); *MYC* (8q24.21); *TGFBR1* (9q22.33); *KLF4* (9q31.2); *BM11* (10p12.2); *VIM* (10p13); *FLT3* (13q12.2); *SMAD2* (18q21.1); *KLF1* (19p13.13), *TGFBI* (19q13.2).

На первом этапе была оценена связь экспрессии генов стволовости в опухоли молочной железы до лечения и после НХТ у больных РМЖ люминального В HER2-негативного подтипа с основными клинико-морфологическими показателями заболевания, такими как молекулярный подтип опухоли, размер опухоли, лимфогенное метастазирование, возраст, менструальный статус, эффект предоперационной терапии и т.п.

В таблицах 1-8 Приложения 2 представлен подробный анализ уровня экспрессии генов стволовости в зависимости от различных клинико-морфологических показателей и ответа на НХТ. В Таблице 10 представлены сводные данные по статистически значимым различиям экспрессии изученных генов с различными клинико-морфологическими показателями заболевания.

Таблица 10. Статистически значимые различия уровня экспрессии генов стволовости в зависимости от различных клинико-морфологических показателей.

Показатель	Гены	<45 лет (N=24)	>45 лет (N=36)	p value
Возраст	FLT3 до лечения	4,062±1,105	2,329±0,751	0,047
	TGFB1 до лечения	0,739±0,181	1,303±0,194	0,034
Лимфогенное метастазирование		N0 (N=29)	N1-3 (N=31)	
	OCT3 до лечения	9,310±6,950	1,238±0,582	0,008
	TERT после НХТ	0,243±0,063	1,027±0,349	0,050
Эстрогеновый рецептор ER		ER+ (N=47)	ER- (N=13)	
	SMO до лечения	0,838±0,272	1,946±0,740	0,028
	SMAD2 до лечения	0,297±0,051	0,000±0,000	0,054
	KLF1 до лечения	0,713±0,406	0,000±0,000	0,035
	TERT до лечения	1,141±0,532	0,000±0,000	0,023
Прогестероновый рецептор PR		PR+ (N= 49)	PR- (N=11)	
	SMAD2 до лечения	0,235±0,045	0,663±0,079	0,016
Гистологическая форма		Уни-центрическая (N= 41)	Мульти-центрическая (N=19)	
	KLF4 после НХТ	1,510±0,352	4,021±1,171	0,036
Менструальный статус		Pre (N= 33)	Post (N= 27)	
	VIM до лечения	0,259±0,047	0,454±0,076	0,035
	TGFBR1 после НХТ	0,968±0,182	2,810±1,104	0,029
Ответ на НХТ		CR+PR (N=42)	SD+P (N=18)	
	KLF1 после НХТ	0,853±0,489	0,126±0,073	0,045
	TERT после НХТ	0,519±0,271	1,125±0,300	0,016

Примечание: T1-2 размер опухоли до 2 см, T3-4 размер опухоли 2-7 см; N0 - отсутствие лимфогенных метастазов, N1-3 - наличие лимфогенных метастазов; CR+PR – полная и частичная регрессия в процессе НХТ, SD+P – стабилизация и прогрессирование; ER+ по данным ИГХ более 1% опухолевых клеток экспрессируют рецептор эстрогена. ER- по данным ИГХ менее 1% опухолевых клеток экспрессируют рецептор эстрогена; PR+ по данным ИГХ более 1% опухолевых клеток экспрессируют рецептор эстрогена. PR- по данным ИГХ менее 1% опухолевых клеток экспрессируют рецептор эстрогена; Pre – пременопауза, Post – постменопауза.

Было установлено, что некоторые неблагоприятные клинико-морфологические факторы прогноза ассоциированы с повышенной экспрессией генов стволовости в

опухоли. При возрасте менее 45 лет выше экспрессия гена *FLT3* до лечения, чем у пациенток старше 45 лет, при этом у пациенток возраста более 45 лет выше экспрессия гена *TGFBI* до лечения, чем у пациенток возраста менее 45 лет. При отсутствии лимфогенного метастазирования в опухоли до лечения статистически значимо выше экспрессия гена *OCT3*, а при наличии лимфогенных метастазов в опухоли до лечения статистически значимо выше экспрессия гена теломеразы *TERT*, чем при их отсутствии. При отрицательном статусе рецепторов прогестерона гены стволовости *SMAD2*, *KLF1* и *TERT* до лечения показали пониженную экспрессию, и только ген *SMO* до лечения имел статистически значимо более высокую экспрессию при PR-. Увеличение экспрессии гена *KLF4* после НХТ зарегистрировано при мультицентрической гистологической форме опухоли. Также увеличение экспрессии генов *VIM* до лечения и *TGFBR1* после НХТ показано в постменопаузальном периоде у пациенток исследуемой выборки.

При сравнении уровня экспрессии генов стволовости в опухоли молочной железы до лечения и после НХТ у больных с частичной/полной регрессией опухоли и у пациентов со стабилизацией/прогрессированием опухолевого процесса было установлено, что с высоким уровнем достоверности в опухоли после НХТ повышен уровень экспрессии гена *TERT* при стабилизации/прогрессировании опухоли, при этом уровень экспрессии гена *KLF1* в опухоли после НХТ снижается в данной группе больных.

Далее было изучено изменение экспрессии генов стволовости в опухоли молочной железы в процессе НХТ. При помощи критерия Стьюдента для зависимых групп было проведено сравнение уровней экспрессии генов стволовости до лечения и после НХТ (Таблица 11). Установлено, что НХТ статистически значимо повышает экспрессию 4/13 генов стволовости *SNAI2*; *KLF4*; *VIM*; и *SMAD2*.

Таблица 11. Уровень экспрессии генов стволовости в опухоли до лечения и после НХТ

Гены	До лечения	После НХТ	p-value
<i>OCT3</i>	5,106±3,357	3,635±1,084	0,165
<i>SMO</i>	0,797±0,210	1,032±0,266	0,127
<i>MYC</i>	0,537±0,095	1,236±0,515	0,127
<i>SNAI2</i>	0,601±0,107	1,824±0,455	0,033
<i>KLF4</i>	1,108±0,203	2,477±0,447	0,002
<i>BMI1</i>	2,743±0,462	54,881±47,856	0,109
<i>VIM</i>	0,348±0,045	1,104±0,234	0,003
<i>FLT3</i>	3,010±0,639	2,982±0,965	0,499
<i>SMAD2</i>	0,256±0,041	0,422±0,085	0,030
<i>KLF1</i>	0,566±0,298	0,611±0,325	1,000
<i>TERT</i>	0,900±0,391	0,670±0,200	1,000
<i>TGFBI</i>	1,076±0,143	1,985±0,625	0,127

<i>TGFBR1</i>	1,117±0,170	1,889±0,571	1,000
---------------	-------------	-------------	-------

Далее была оценена связь уровня экспрессии генов стволовости с безметастатической выживаемостью группы больных, включенных в исследование. В группе больных РМЖ из 60 обследованных пациенток отдаленные метастазы развились у 15 (25,0%) больных в среднем за 34±0,21 месяца от момента постановки диагноза. Общий срок наблюдения составил 19-131 (в среднем 73±0,8 мес.) месяцев. Были получены результаты анализа о гипо-, и гиперэкспрессии изученных генов в 2 точках – до и после проведения предоперационной терапии в группах больных с наличием и отсутствием гематогенного метастазирования. Было показано, что до лечения у больных без метастазов гиперэкспрессированы (уровень экспрессии более 1) 3 гена стволовости - *OCT3*, *BMI1* и *FLT3*, при этом у больных с возникшим впоследствии гематогенным метастазированием гиперэкспрессированы 7 генов стволовости – *OCT3*, *BMI1*, *SNAI2*, *TERT*, *TGFBR1*, *TGFB1* и *FLT3*. После проведения НХТ у больных без метастазов гиперэкспрессированы 6 генов стволовости - *OCT3*, *BMI1*, *KLF4*, *TGFBR1*, *TGFB1* и *FLT3*, в группе больных с возникшим впоследствии гематогенным метастазированием гиперэкспрессированы 11 из 13 генов стволовости – кроме *SMAD2* и *KLF1* (Рис. 23).

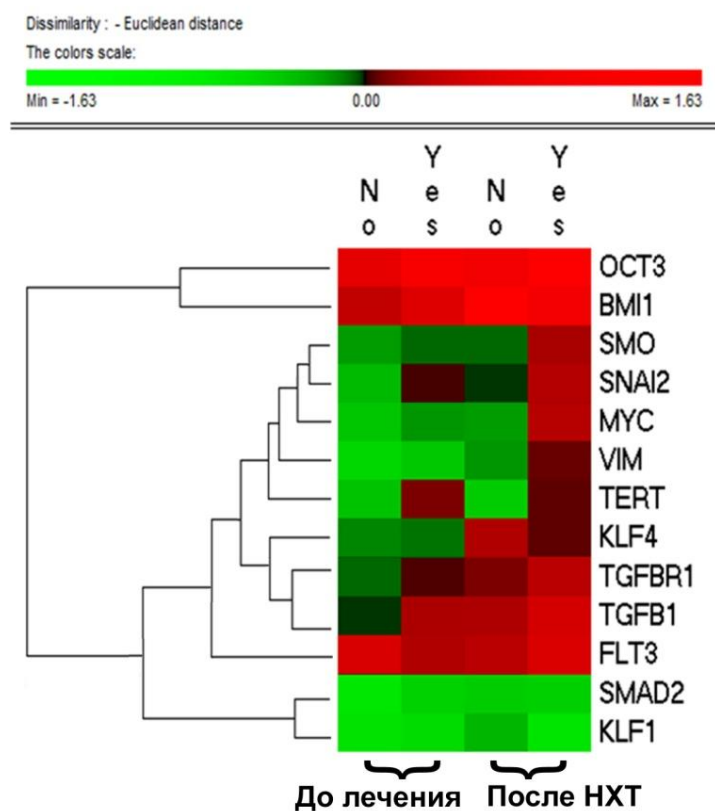


Рис. 23. Экспрессия генов стволовости в опухоли молочной железы до лечения и после НХТ у больных с возникшими впоследствии гематогенными метастазами (Yes) и без метастазов (No).

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

В соответствии с иерархической моделью развития опухоли считается, что только опухолевые стволовые клетки (ОСК), но не дифференцированные опухолевые клетки способны к образованию метастазов, при этом потомки ОСК дифференцируются в прогениторные клетки, способные к органичному симметричному делению и далее происходит образование дифференцированных опухолевых клеток, образующих основную массу опухоли и не способных к размножению [Beck V. and Blanpain C. 2013, Okamoto A. et al 2009, Schepers A.G. et al 2012].

Относительно недавно рядом авторов был показан феномен дедифференцировки нестволовых опухолевых клеток в стволовые опухолевые клетки. Это было показано для нестволовых опухолевых клеток молочной железы под действием эктопической экспрессии гена стволовости *ZEB1* [Chaffer C.L., Marjanovic N.D. 2013]. Нестволовые клетки глиобластомы дедифференцировались в стволовые опухолевые клетки под действием фактора гипоксии HIF [Wang L.N. et al 2018]. На различных других клеточных линиях *in vitro* было показано фазовые переходы между дифференцированными и клетками со стволоподобным фенотипом [Van Geldermalsen M. 2018]. В соответствии с этими данными китайские исследователи [Foster C.R. et al 2010] считают, что опухолевые стволовые клетки являются не стационарной популяцией клеток, а находятся в динамическом гомеостазе с дифференцированными клетками. С одной стороны, опухолевые стволовые клетки при несимметричном делении постоянно самообновляются и образуют дифференцированные опухолевые клетки. С другой стороны, дифференцированные опухолевые клетки непрерывно дедифференцируются в стволовые для роста опухоли и прогрессии. По мнению авторов, это полностью отменяет стратегии терапии, направленные на уничтожение ОСК.

В 2013 году Cristine Chaffer с коллегами высказала мнение о том, что разные опухоли существенно различаются по частоте образования стволовых опухолевых клеток из нестволовых и этим определяется их злокачественный потенциал. Она показала, что в наиболее злокачественном молекулярном подтипе рака молочной железы – трижды негативном РМЖ частота дедифференцировки нестволовых опухолевых клеток в стволовые значительно выше, чем в люминальном А и В подтипах [Chaffer C.L., Marjanovic N.D. 2013].

В настоящее время показано, что цитокины TGF- β , IL-6 и HIF могут индуцировать дедифференцировку нестволовых опухолевых клеток в стволовые [Fang S.et al 2016, Gong J.et al 2012, Grimshaw M.J.et al 2008, Nazari F.et al 2018, Xu J.et al 2018]. В тоже время IL-1 β , продуцируемый макрофагами микроокружения ингибирует дедифференцировку [Bray F.et al 2018]. Наибольший интерес представляют широкий спектр исследований, в которых показано, что сверхэкспрессия генов стволовости, определяющих индукцию стволовых свойств и их поддержание, таких как *OCT3*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC*, *NOTCH*, *NANOG*, *LIN28*, *ZEB1*, *SNAIL*, *VIM*, *TWIST* и др. приводит к индукции стволового фенотипа [Ben-David U.et al 2019, Chang Y.S.et al 2017, Cho Y., Kang H.G. 2018b, Daenen L.G.et al 2011, Fang S., Yu L. 2016, Gerwing M.et al 2019, Herreros-Villanueva M.et al 2013]. Эти данные хорошо соотносятся с полученными нами результатами о гиперэкспрессии изученных генов стволовости и их связи с метастазированием опухоли молочной железы.

3.6. Полнотранскриптомный анализ опухоли молочной железы в процессе НХТ

Далее провели сравнение экспрессионного профиля пациенток с РМЖ люминального В HER2-негативного подтипа в зависимости от наличия/отсутствия гематогенного метастазирования до и после проведения предоперационной химиотерапии. Было показано, что количество ДЭГ в опухоли до лечения у больных с наличием и без гематогенного метастазирования составило 24 гена (19 Up-regulated, 5 Down-regulated). После проведения НХТ резидуальные опухоли больных с наличием и без гематогенного метастазирования различались более существенно, по 154 ДЭГ (36 Up-regulated, 118 Down-regulated) (Рис. 24а,б).

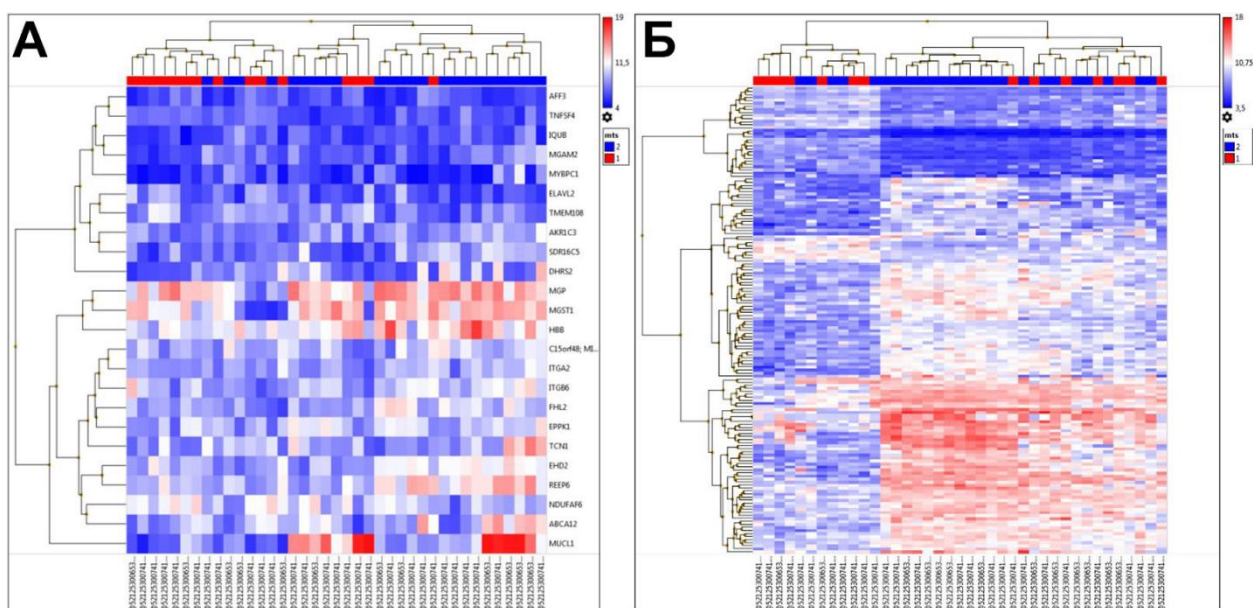


Рис. 24. Тепловая карта ДЭГ в опухоли больных РМЖ: а - до лечения с наличием гематогенного метастазирования (есть - 1) и отсутствием гематогенного метастазирования (нет - 2), б - после НХТ с наличием гематогенного метастазирования (есть - 1) и отсутствием гематогенного метастазирования (нет - 2)

Построение диаграммы Венна показало, что ДЭГ у пациентов с наличием/отсутствием гематогенного метастазирования до лечения и после НХТ пересекаются всего по 1 гену - *EHD2* (19q13.33). Согласно данным литературы, повышение экспрессии *EHD2* наблюдается в образцах злокачественного серозного рака яичников по сравнению с нормальными образцами эпителия яичника [Bignotti E. et al 2006]. *EHD2* был идентифицирован в качестве гена-супрессора в образцах опухоли головного мозга [Smith J.S. et al 2000]. Также *EHD2* был признан прогностическим параметром для плоскоклеточного рака пищевода (пРП), показано, что экспрессия данного гена была вовлечена в патогенез пРП [Li M. et al 2013]. В недавнем исследовании X. Yang и соавторов было показано, что *EHD2* может иметь важное значение в качестве фактора прогрессирования для пациентов с раком молочной железы. Авторы указывают на то, что *EHD2* является негативным регулятором миграции и инвазии в клетках рака молочной железы [Yang X. et al 2015].

Согласно базе www.progenetix.org по частоте встречаемости при опухолях всех локализаций (177 типов опухолей) амплификация длинного плеча 8 хромосомы, в частности 8q24, оказалась наиболее распространенной абберацией числа копий (CNA) и встречалась более чем в 30% всех образцов [Cai H., Kumar N. 2012]. При этом, наиболее значимым геном в этом локусе по данным COSMIC является протоонкоген *MYC*, который участвует во многих сигнальных путях [Jönsson G., Staaf J. 2010]. Частота распространения амплификаций 8q, включающих ген *MYC*, варьирует при различных локализациях. Было показано, что при раке легкого частота амплификаций 8q очень высока и составляет 84,14% (69 из 82). При этом, частота амплификаций *MYC* в 8 хромосоме была обнаружена только в 32,9% опухолей легкого [Bauckara O. et al 2015]. Даже при ранней карциноме желудка амплификации 8q, определяемые при помощи микроматричного анализа наблюдались в 77% (17/22) случаях, при этом частота амплификаций локуса гена *MYC*, не превышала 18.2% [Kang J.U. 2014]. У других авторов на значительно большей выборке больных раком желудка была показана частота амплификаций 8q24 более 30% и наличие амплификаций гена *MYC* было связано с неблагоприятным исходом [Wang Xiaohong et al 2016]. Интересной является работа Gaëlle Fromont и коллег – проанализировали на большой выборке больных (n=242) раком предстательной железы связь статуса амплификации локуса 8q24 в ткани опухоли со

стадией заболевания, агрессивностью течения и рецидивом после лечения. Амплификация *MYC* наблюдалась в 29% случаев рака простаты и была тесно связана с прогрессированием заболевания ($p=0,001$). Статус амплификации *MYC* также был независимым предиктором возникновения рецидива после простатэктомии [Fromont G. et al 2013].

В исследовании Letessier et al (2006) на примере 547 образцов опухоли молочной железы с использованием микроматричного анализа было показано, что амплификации локуса гена *MYC* встречались только в 6.1% случаев [Letessier A. et al 2006]. Другое исследование показало частоту амплификации длинного плеча 8 хромосомы, включающей ген *MYC* у 48,3% (29/60) опухолей молочной железы [Ioannidis P. et al 2003]. При инвазивной дольковой карциноме молочной железы частота амплификаций 8q24 локуса *MYC* составила 17% (24/70) [Cao L. et al 2019]. Последнее исследование показало, что частота CNA локуса гена *MYC* при инвазивной протоковой карциноме молочной железы неспецифического типа, основной гистологической форме рака молочной железы, составила 54% (64/119), при этом высокая частота CNA гена *MYC* была ассоциирована с неблагоприятным исходом, а при хорошем ответе на предоперационную терапию происходила элиминация клонов с амплификацией 8q24 [Chung Y.R. et al 2018]. Такая высокая распространенность амплификации длинного плеча 8 хромосомы, в котором локализован один из ключевых генов стволовости *MYC*, в опухолях различных локализаций и при раке молочной железы, связь амплификации 8q24 с неблагоприятным прогнозом и химиорезистентностью показывает значимость копийности этого хромосомного региона для прогрессии опухоли и актуальность исследований в этом направлении. Мы изучили изменение транскриптома опухоли молочной железы и статуса амплификации длинного плеча 8 хромосомы (с локусом 8q24) и в процессе предоперационной химиотерапии.

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

Количество ДЭГ в опухоли до лечения у больных с наличием амплификации 8q и без амплификации составило 105 генов (41 Up-regulated, 64 Down-regulated) (Таблица 1 Приложения 3). После проведения НХТ резидуальные опухоли больных с амплификацией 8q и без амплификации различались очень существенно, почти по 2137 ДЭГ (1394 Up-

regulated, 780 Down-regulated) (Рис. 25а,б). В топ-10 сигнальных путей ДЭГ в опухоли больных РМЖ до лечения включены: *Metapathway biotransformation phase I and II; Glucuronidation; PodNet: protein- protein interaction in the podocy; PI3K-Akt signaling pathway; MAPK signaling pathway; Head and Neck Squamous Cell Carcinoma; RNA polymerase III transcription; Amino acid metabolism; Pathways affected in Adenoid cystic carcinoma; Circadian rhythm related*. В Топ 10 сигнальных путей ДЭГ в опухоли больных РМЖ после НХТ включены: *Olfactory receptor activity; miR-targeted genes in lymphocytes; Nonalcoholic fatty liver disease; Cytoplasmic ribosomal proteins; miR-targeted genes in muscle cell; VEGFA-VEGFR2 signaling pathway; EGF/EGFR signaling pathway; Nuclear receptor meta-pathway; MAPK Signaling Pathway; Circadian rhythm related genes*. Общими сигнальными путями для больных до лечения и после НХТ стали: *MAPK Signaling Pathway* и *Circadian rhythm related genes*.

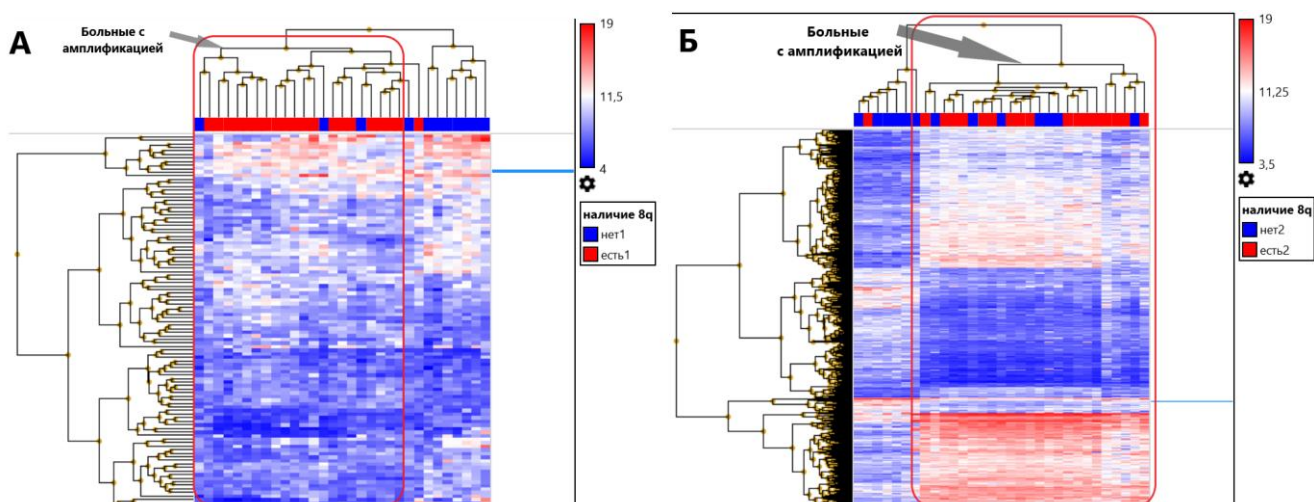


Рис. 25. Тепловая карта ДЭГ в опухоли больных РМЖ: а - до лечения с наличием амплификации 8q (есть1) и без амплификации (нет1), б - после НХТ с наличием амплификации 8q (есть2) и без амплификации (нет2)

Построение диаграммы Венна показало, что ДЭГ пациентов с различным статусом амплификации 8q (с регионом 8q24) до лечения и после НХТ пересекаются всего по 8 генам (Таблица 12).

Таблица 12. Пересечение по ДЭГ у пациентов с наличием/отсутствием амплификации 8q до лечения и после НХТ

Ген	Полное название	Описание функции*	Локализация
<i>NBPF4</i>	neuroblastoma breakpoint family,	Является членом семейства <i>NBPF</i> , которое состоит из десятков дублированных генов, в основном расположенных на 1 хромосоме человека. Члены этого семейства характеризуются тандемно	1p13.3

	member 4	повторяющимися копиями доменов белка DUF1220. Изменения числа копий генов в хромосомной области 1q21.1, где расположено большинство доменов DUF1220, вовлечены в ряд заболеваний развития и нейрогенеза, таких как аутизм, шизофрения, врожденный порок сердца, нейробластома, врожденные аномалии почек и мочевыводящих путей. Измененная экспрессия некоторых членов семейства генов связана с несколькими типами рака.	
<i>PI4KB</i>	phosphatidylinositol 4-kinase, catalytic, beta	Представляет собой белок, кодирующий ген. Среди его родственных путей - суперпуть инозитолфосфатных соединений и метаболизм. Аннотация генной онтологии, связанная с этим геном, включает трансферазную активность, перенос фосфорсодержащих групп и активность 1-фосфатидилинозитол-4-киназы. Важным паралогом этого гена является <i>PI4KA</i> .	1q21.3
<i>UGT2B11</i>	UDP Glucuronosyltransferase Family 2 Member B11	Представляет собой белок, кодирующий ген. Среди его родственных путей - метаболизм лекарств - цитохром P450 и метаболизм порфиринов и хлорофилла. Аннотация генной онтологии, относящаяся к этому гену, включает в себя связывание углеводов и глюкуронозилтрансферазную активность. Важным паралогом этого гена является <i>UGT2B28</i> .	4q13.2
<i>UGT2B28</i>	UDP Glucuronosyltransferase Family 2 Member B28	Кодирует член семейства белков уридиндифосфоглюкуронозилтрансферазы. Кодируемый фермент катализирует перенос глюкуроновой кислоты от уридиндифосфоглюкуроновой кислоты к разнообразным субстратам, включая стероидные гормоны и жирорастворимые лекарственные средства. Этот процесс, известный как глюкуронидация, является промежуточной стадией метаболизма стероидов.	4q13.2
<i>PLAT</i>	plasminogen activator, tissue	Кодирует активатор плазминогена тканевого типа и секретируемую сериновую протеазу, которая превращает профермент плазминоген в плазмин. Играет роль в миграции клеток и ремоделировании тканей.	8p11.21
<i>MYBPC1</i>	myosin binding protein C, slow type	Кодирует членов семейства миозин-связывающего протеина C (ассоциированные с миозином белки, обнаруживаемые в поперечно-мостиковой зоне). Кодируемый белок представляет собой медленную изоформу скелетных мышц миозин-связывающего протеина C и играет важную роль в сокращении мышц, привлекая креатинкиназу мышечного типа к нитям миозина. Мутации в этом гене связаны с дистальным артрогрипозом типа I.	12q23.2
<i>SETBP1</i>	SET binding	Кодирует белок области связывания SET. Было показано, что кодируемый белок связывает	18q12.3

	protein 1	ядерный онкоген SET, который участвует в репликации ДНК.	
<i>ZNF223</i>	zinc finger protein 223	Кодирует белок, содержащий несколько доменов цинкового пальца. Функцию этого белка еще предстоит определить.	19q13.31

Примечание: * - данные взяты с источника <https://www.genecards.org/>

Далее было показано, что при частичной регрессии количество ДЭГ в резидуальной опухоли после НХТ с наличием/отсутствием амплификации 8q составило 879 (601 Up-regulated, 278 Down-regulated). На фоне стабилизации количество ДЭГ в резидуальной опухоли больных после НХТ с наличием/отсутствием амплификации 8q составило 1321 (652 Up-regulated, 669 Down-regulated) (Рис. 26а,б). При стабилизации усиливается гетерогенность транскриптома между опухолями с наличием и отсутствием амплификации 8q. Топ 10 ДЭГ с Up и Down регуляцией у больных со стабилизацией и частичной регрессией в зависимости от статуса амплификации 8q представлен в Таблице 2 Приложения 3.

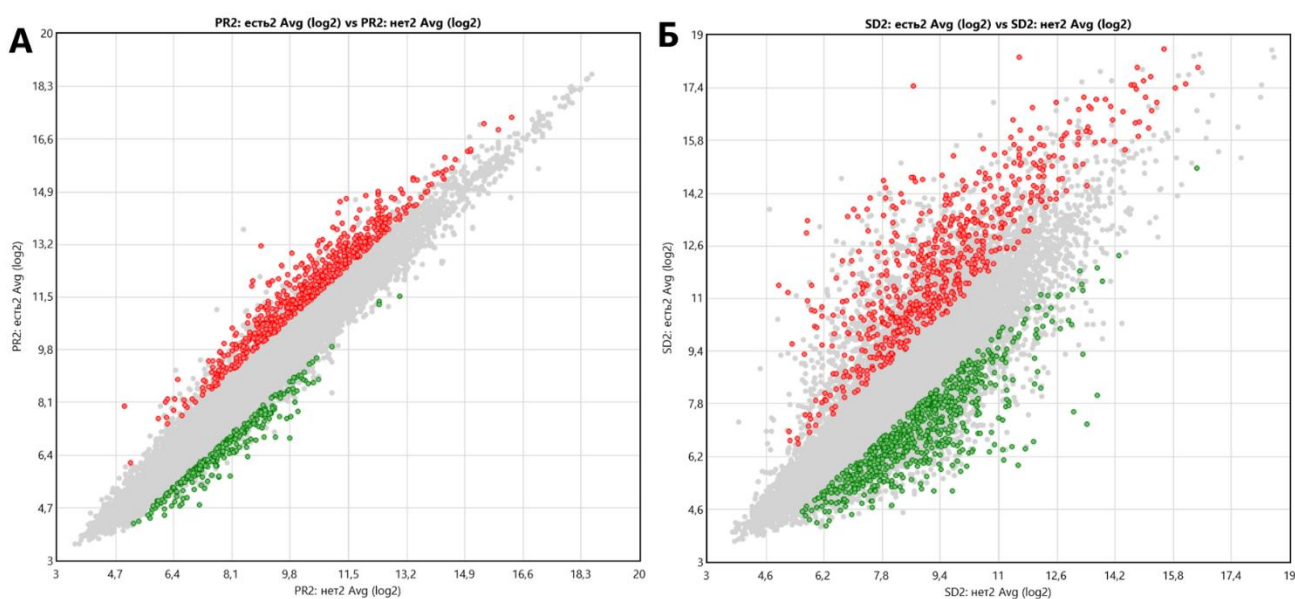


Рис. 26. Количество ДЭГ в резидуальной опухоли после НХТ с наличием/отсутствием амплификации 8q: а - на фоне частичной регрессией, б - на фоне стабилизации.

Построение диаграммы Венна показало, что ДЭГ у пациентов с наличием и отсутствием амплификации 8q после НХТ на фоне частичной регрессии и стабилизации пересекаются по 145 генам (Таблица 3 Приложения 3).

Ранее нами было показано, что гены, функции которых связаны с индукцией и поддержанием стволового состояния клеток – гены стволовости, имеют значимую роль в механизмах метастазирования опухоли молочной железы. По базам данных было отобрано 48 таких генов, в число которых вошел и ген *MYC*, локализованный в 8q24. Было

показано, что амплификации генов стволовости давали возможность опухолевым клеткам приобрести способность к non-Cancer Stem Cells (CSC) to-CSC plasticity и осуществлять метастазирование. Повышенная экспрессия генов стволовости наблюдалась в резидуальной опухоли у больных с развившимися впоследствии метастазами [глава 5]. В настоящем исследовании, по данным диаграммы Венна, было установлено пересечение 8/48 генов стволовости (*GSK3B*, *TERT*, *BMP6*, *MYC*, *GATA3*, *NANOG*, *SMAD4*, *SMAD2*) и ДЭГ у пациентов с наличием/отсутствием амплификации 8q после НХТ (Рис. 27). При этом, у больных с амплификацией 8q экспрессия *GSK3B*, *MYC*, *GATA3*, *SMAD4*, *SMAD2* повышена в 2.1-3.8 раза, а экспрессия *TERT*, *BMP6*, *NANOG* снижена в 2,1-2.3 раза. Таким образом, амплификация региона локализации гена *MYC* в резидуальной опухоли приводит в повышенной экспрессии комплекса генов, которые также принимают участие в WNT- и TGFb-сигналинге.

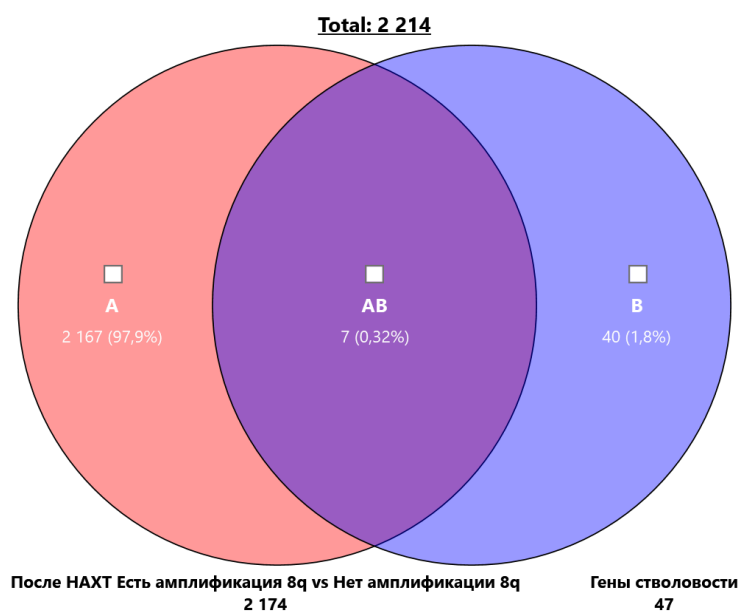


Рис. 27. Диаграмма Венна по пересечению ДЭГ у пациентов с наличием/отсутствием амплификации 8q после НХТ и генов стволовости.

По результатам исследования показано, что проведение НХТ значительно усиливает гетерогенность транскриптома между опухолями с наличием и отсутствием амплификации 8q. При этом, число Up-regulated генов повышается, по сравнению с больными до лечения, и превышает число Down-regulated генов почти в два раза. На рисунке 25б хорошо видно, что ДЭГ можно разделить на три кластера, первый и третий кластеры гиперэкспрессированы у больных с амплификацией 8q, по сравнению с больными без амплификации, второй кластер, наоборот, гипоекспрессирован. Особенно сильно у больных с амплификацией 8q увеличивается экспрессия рибосомальных белков (в начале

3 кластера на рисунке 25б): *RPS21, RPS29, RPS30, RPS23, RPS28, RPL37A, RPS14, RPS8, RPL27, RPL35A, RPS20, RPL7A, RPS12*, что может свидетельствовать о резком увеличении белкового синтеза после воздействия НХТ.

Из гипоекспрессируемых генов имеет смысл отметить 84/380 генов Olfactory receptor activity (активности обонятельных рецепторов) в зоне среднего кластера генов. Активация лигандом этого сигнального пути ингибирует пролиферацию клеток рака простаты [Neuhaus E.M.et al 2009], усиливает апоптоз и ингибирует пролиферацию клеточных линий немелкоклеточного рака легкого [Kalbe B.et al 2017]. В тоже время отдельные гены и белки этого сигнального пути могут быть тканеспецифичными опухолевыми маркерами, способствовать опухолевой прогрессии, например, *OR7C1* коррелирует с более плохим прогнозом у пациентов с колоректальным раком [Morita R.et al 2016]. Экспрессия *OR2B6* была обнаружена в тканях карциномы молочной железы; здесь транскрипты *OR2B6* были обнаружены в 73% всех клеточных линий рака молочной железы и более чем в 80% всех проанализированных тканей рака молочной железы [Weber L.et al 2018]. В нашем исследовании экспрессия *OR2B6* не отличалась у больных с различным статусом амплификации 8q.

В исследовании В. Salhia и соавторов проведен комплексный геномный и эпигеномный анализ опухоли молочной железы с наличием метастазирования в головной мозг (n=23). Часто амплифицированные и сверхэкспрессированные гены включали *ATAD2, BRAF, DERL1, DNMT3B* и *NEK2A*. Авторами сделан вывод о том, что гены *ATAD2* и *DERL1* могут играть важную роль в метастазировании в головной мозг при раке молочной железы. При этом, *ATAD2* является транскрипционным коактиватором *ESR1*, необходимым для индукции экспрессии генов-мишеней эстрадиола, таких как *CCND1, MYC* и *E2F1* [Salhia V.et al 2014b]. В нашем исследовании в опухоли после НХТ у больных с амплификацией гиперэкспрессирован ген *ATAD1* и *DERL1*.

Несмотря на то, что состав ДЭГ до лечения и после НХТ у больных с разным статусом амплификации 8q меняется, есть и общие дифференциально экспрессируемые 8 генов (*NBPF4, PI4KB, UGT2B11, UGT2B28, PLAT, MYBPC1, SETBP1, ZNF223*). Ряд исследований показывают их значение для прогрессии опухолей. Ген *NBPF4* может играть роль потенциального биомаркера при раке легкого и претендует на роль онкогена [AL Zeyadi M.et al 2015, Rousseaux S.et al 2013]. Порядка 85/852 (10%) образцов опухоли молочной показали амплификацию гена *PI4KB* [Waugh M.G. 2014]. Ген *UGT2B11* в числе других генов, вовлечённых в метаболизм липидов/жирных кисло/стероидов и биосинтез липидов показал дифференциальную экспрессию в опухоли молочной железы по сравнению со нормальной тканью и в ER- клеточных линиях, по сравнению с ER-

клеточными линиями, наряду с геном *UGT2B28* [Wang J.et al 2013, Wang J.et al 2017]. Последний ген, связан также с прогрессией рака простаты [Belledant A.et al 2016]. Промотор гена *PLAT* активировался при сверхэкспрессии *PRRX2*, которая усиливала миграцию, инвазию и индуцировала частичный эпителиально-мезенхимальный переход клеток молочной железы MCF10A [Juang Y.L.et al 2016]. В числе других генов, *MYBPC1*, *PLAT* и *SETBP1* показали низкую экспрессию в трижды негативной опухоли молочной железы (n=163), по сравнению с нормальной тканью (n=60) [Chuan T.et al 2020]. С другой стороны, ингибирование экспрессии *SETBP1* при помощи микроРНК приводила к снижению пролиферации и метастазирования клеток трижды негативного РМЖ [Chen L.-l.et al 2017]. При секвенировании ДНК опухоли молочной железы, в гене *SETBP1*, в числе других генов, выявляли несинонимичные мутации [Wang Y.et al 2014]. Ген *ZNF223* входит в топ-40 наиболее значимых ДЭГ в образцах клеток лимфомы, обработанных дексаметазоном, по сравнению с необработанными клетками [Jiang D.et al 2020].

В резидуальной опухоли у больных с амплификацией 8q было установлено повышение экспрессии генов стволовости *GSK3B*, *MYC*, *GATA3*, *SMAD4*, *SMAD2*, принимающих участие в WNT- и TGFb-сингналинге. Роль этих двух сигнальных систем в прогрессии опухоли очень хорошо известна. По утверждению R. Weinberg TGFb-сингналинг играет ключевую роль в индукции ЭМП опухолевых клеток и приобретении ими стволового фенотипа, что определяет способность к инвазии и образованию вторичных метастатических колоний [Shibue T. and Weinberg R.A. 2017]. WNT-сингналинг определяет выход опухолевых клеток из репликативного старения после лекарственной терапии. Как показал Milanovic M.et al после отмены химиотерапии в опухолевых клетках значительно возрастает активность WNT-сигнального пути и резко увеличивается количество стволовых опухолевых клеток. Начинается рост опухоли еще более активный, чем был до химиотерапии [Milanovic M.et al 2018].

Таким образом, проведенное исследование показывает большое влияние амплификации длинного плеча 8 хромосомы на опухолевый транскриптом, независимо от других молекулярно-генетических признаков. Амплификация 8q с участием региона 8q24 приводит к значительному сдвигу уровня транскрипции большого количества генов именно после воздействия химиотерапии. Для многих из этих генов показана роль в прогрессии опухоли. Этим может быть обусловлена известная связь амплификации 8q с прогрессией опухолей, показанная при многих локализациях. Амплификация 8q с участием региона 8q24, в котором локализован ген *MYC*, приводит не только к повышению его экспрессии в резидуальной опухоли, но и к повышению факторов WNT- и TGFb-сингналинг, играющих ключевую роль в эпителиально-мезенхимальном переходе и

выходе опухолевых клеток из репликативного старения, обусловленного воздействием химиотерапии.

3.7 Значение амплификаций генов стволовости для стволового перехода опухолевых клеток *in vitro*

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

В настоящее время хорошо известны многие поверхностные антигены, которые определяют на поверхности опухолевых стволовых клеток (ОСК) молочной железы. На поверхности этих клеток выявлена высокая экспрессия эпителиального специфического антигена ЕрСам (ESA⁺ или CD326⁺) и маркера CD44 (CD44⁺). При этом CD24 не выявлялся или интенсивность его экспрессии на низком уровне (CD24^{-low}). Клетки с таким иммунофенотипом – характеризуются профилем генной экспрессии, во многом сходным с таковым у стволовых клеток нормальных тканей, способны к колониеобразованию и образованию опухолей в ксенографтах [Xu J., Liao K. 2018]. Многие исследования указывают на то, что общая фракция ОСК молочной железы значительно более гетерогенна, чем это было принято считать ранее. Различные, и, в том числе, на сегодняшний день не идентифицированные популяции ОСК, определяют ее гетерогенность. В составе ОСК опухоли молочной железы также выделяют ALDH⁺ субпопуляции. Для глиобластомы характерна CD133⁺, а для колоректального LGR5⁺ субпопуляции ОСК. С этими популяциями ОСК при разных локализациях связывают высокую пластичность опухолевых стволовых, прогениторных и дифференцированных клеток, а также механизмы развития метастатической болезни [Cole A.J. et al 2020, Xu J., Liao K. 2018].

В свою очередь, опухолевые стволовые клетки (ОСК) и циркулирующие опухолевые клетки оказывают большое влияние не только на фенотип опухоли, но и являются прогностическими факторами, влияющими на выбор и терапевтических и, соответственно, хирургических подходов к лечению. Роль ОСК в развитии, поддержании

и метастазировании опухоли подтверждены на примере солидных опухолей: молочной железы, толстой кишки, простаты, поджелудочной железы, а также лейкозов [Müller M. et al 2016]. Показано, что ОСК участвуют в процессах туморогенеза, метастазирования и развития устойчивости к лекарственным препаратам [Al-Youzbaki W.B. et al 2014, Liu Y. et al 2015]. ОСК влияют не только на фенотипические характеристики опухоли, но и важны для выбора стратегии и прогнозирования результатов лечения. Последние достижения в области изучения стволовых клеток привели к развитию технологии селективного культивирования таких клеток, выделенных из ткани пациента в лабораторных условиях. Опухолевые стволовые клетки молочных желез существуют в виде очень небольшой доли клеток в молочной железе, которые недифференцированы и могут продуцировать новые ОСК посредством самообновления. Предполагается, что их асимметричные деления приводят к появлению прогениторных клеток [Aragona M., Dekoninck S. 2017, Lloyd-Lewis B., Harris O.B. 2017, Soteriou D. and Fuchs Y. 2018]. Учитывая, что ОСК это очень небольшая группа клеток, это существенно снижает вероятность их метастазирования и наоборот, высокая частота дифференцированных и прогениторных опухолевых клеток [Litviakov N.V., Burchkov V.A. 2020] делает их прекрасными кандидатами для диссеминации, резко увеличивая образования метастазов. При этом необходима программа их дедифференцировки до ОСК. Было показано, что метастазирующие клетки происходят из субпопуляций первичной опухоли и обладают генетическими изменениями, необходимыми для роста как первичной, так и метастатической опухоли [Riggi N., Aguet M. 2018].

Еще в 2003 году Al-Hajj и соавторы проанализировали образцы клеток первичного рака молочной железы и определили, что клетки с фенотипом $CD44^+CD24^{low/-}$ являются функциональными опухолевыми стволовыми клетками [Al-Hajj M., Wicha M.S. 2003]. Известно, что CD44 представляет собой поверхностный гликопротеид, являющийся рецептором для гиалуронана (ГА) – главного компонента внеклеточного матрикса. При связывании ГА и CD44 происходит активация рецепторных тирозинкиназ, включая EGFR и ERBB2. Важно, что CD44 также играет существенную роль в инвазии опухолевых клеток молочной железы, он задействован в процессах пролиферации и ангиогенеза [Senbanjo L.T. and Chellaiah M.A. 2017]. В литературе также сообщается, что в случае низкой ко-экспрессии поверхностного гликопротеида CD24 увеличивается способность опухоли к росту и метастазированию [Schabath H. et al 2006].

Интерлейкин-6 (ИЛ-6) - плеiotропный цитокин, играющий важную роль при многих хронических воспалительных заболеваниях. Исследования влияния ИЛ-6 показало, что этот цитокин играет важнейшую роль в патофизиологии онкологических заболеваний

[Hodge D.R.et al 2005, Rose-John S.et al 2006]. При этом показано, что при злокачественных опухолях молочной железы опухолевая ткань демонстрирует высокие уровни экспрессии ИЛ-6 по сравнению с образцами нормальной ткани [Dethlefsen C.et al 2013]. Более того, существуют данные о том, что повышенные уровни ИЛ-6 в сыворотке коррелируют как увеличением стадии опухоли молочной железы [Kozłowski L.et al 2003], так и с увеличением количества метастазов [Bachelot T.et al 2003], низким уровнем выживаемости и развитием резистентности к химиотерапии [Al-Youzbaki W.B., Al-Youzbaki N.B. 2014].

В работе Sullivan и соавторов показано, что ИЛ-6 способен индуцировать фенотип эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) в клетках злокачественных опухолей молочной железы [Sullivan N.et al 2009]. Более того, индукция ЭМП в иммортализованных эпителиальных клетках молочной железы человека (HMLE) приводит к генерации клеток со свойствами стволовых клеток [Mani S.A., Guo W. 2008]. Было показано, что ИЛ-6 способствует образованию опухолевых клеток со стволовыми с формированием маммосфер [Xie G.et al 2012].

В работу были включены следующие культуры клеток опухоли молочной железы: **BT-474, BT-549, MDA-MB-231, MDA-MD-468, MCF7, SK-BR-3 и T47D.**

На первом этапе работы проводили культивирование представленных клеточных линий и изучили CNA-генетический ландшафт. Во всех клеточных культурах определяли наличие амплификаций генов стволовости. На Рис. 28 представлен CNA-генетический ландшафт изученных опухолевых линий.

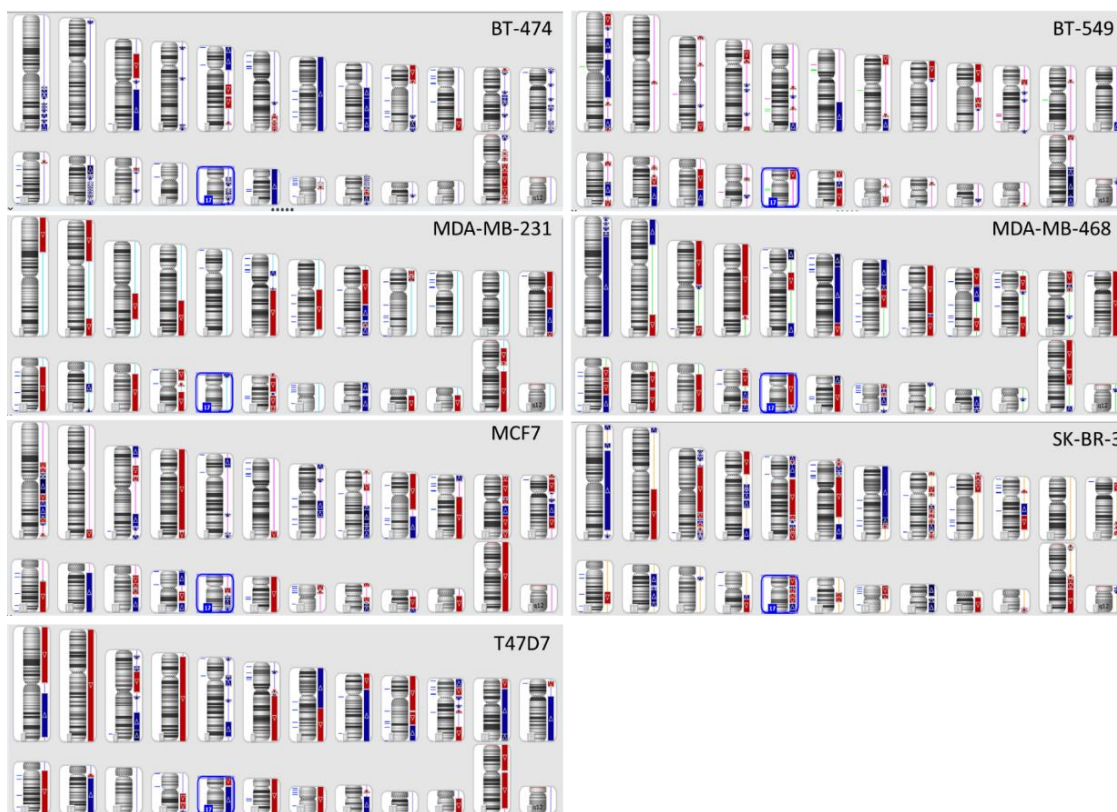


Рис. 28. CNA-генетический ландшафт опухолевых клеток линий BT-474, BT-549, MDA-MB-231, MDA-MD-468, MCF7, SK-BR-3 и T47D

В Таблице 13 представлен список амплификаций генов стволовости, которые были определены в клеточных линиях.

Таблица 13. Амплификации генов стволовости в клеточных линиях рака молочной железы

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

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

Далее определяли содержание стволовых опухолевых клеток в интактных культурах молочной железы

Первоначально с помощью метода проточной цитометрии с использованием моноклональных антител к специфическим поверхностным белкам был проведен анализ маркеров CD44 и CD24 в клетках культур молочной железы. Это необходимо для выбора культур для проведения эксперимента. Культура должна иметь достаточное количество дифференцированных или прогениторных опухолевых клеток, для возможности их сортировки и постановки эксперимента. Результаты анализа представлены в Таблице 14.

Таблица 14. Содержание клеток с маркерами ОСК CD44 и CD24 в культурах молочной железы

Клеточная линия	CD44-/CD24-	CD44-/CD24+	CD44+/CD24-	CD44+/CD24+
MCF-7	1,96%	13%	1,25%	83,8%
SK-BR-3	47,4%	3%	13,6%	36%
BT-549	83,9%	0,24%	14,4%	1,46%
MDA-MB-231	0,52%	0%	87,2%	12,2%

В Таблице 14 хорошо показано, что у линии MCF7 основную массу (84%) составляет популяция прогениторных опухолевых клеток CD44⁺/CD24⁺, которые способны к ограниченному делению. Для SK-BR-3 и BT-549 основную массу составляют дифференцированные опухолевые клетки 2-го порядка CD44⁻CD24⁻ (47 и 84%, соответственно), которые неспособны к размножению. Основную клеточную популяцию линии MDA-MB-231 составляют опухолевые стволовые клетки CD44⁺CD24⁻ (87%). Это является причиной, по которой многие исследователи говорят о том, что клетки линии MDA-MB-231 являются самыми злокачественными из всех исследованных линий.

Согласно нашему предположению, дифференцированные (CD44^{-low}/CD24^{-low}) клетки будут дедифференцироваться под действием ИЛ-6 с образованием сфероидов, для дальнейших исследований были выбраны именно эти популяции (Таблица 14). Наше предположение подтверждают данные Vikram R. и коллег, которые показали, что в клеточных линиях рака молочной железы клетки с фенотипом CD44^{-low}/CD24^{-low} могут проявлять особенности, обычно связанные с клетками с онкогенными и метастатическими свойствами. Исходя из этого, чтобы определить влияние ИЛ-6 на дедифференцировку

клеток с помощью клеточной сортировки на основе экспрессии CD44 и CD24 были выделены специфические клеточные популяции CD44⁻/CD24⁻ для линии клеток BT-549 и SK-BR-3, а также популяция CD44⁻/CD24⁺ для линии клеток MCF-7 (Рис. 29).

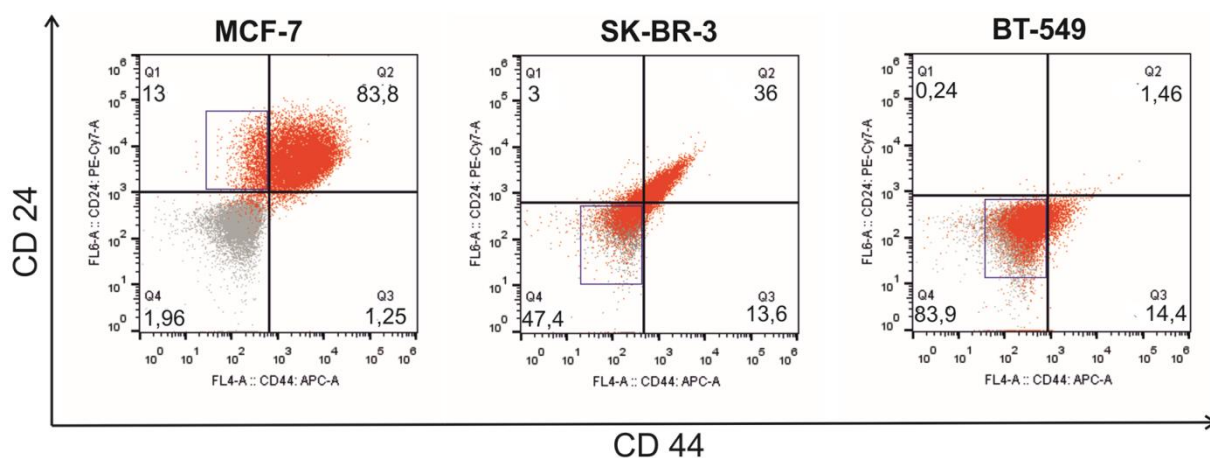


Рис. 29. Содержание клеток с маркерами ОСК CD44 и CD24 в клеточных линиях молочной железы. Гейтирование проводили таким образом, чтобы CD44⁻/CD24⁻ – негативная популяция клеток находилась в нижнем левом квадрате. Клетки из правого верхнего квадрата были учтены как двойная положительная CD44⁺/CD24⁺ популяция. Неокрашенный контроль изображен серым цветом. Сортированная популяция клеток CD44⁻/CD24⁻ выделена, синим гейтом.

Сортировка популяции клеток CD44⁻/CD24⁻ и клеток дикого типа проводилась в лунку (10² клеток на лунку) 24-луночного культурального планшета, содержащего 500 мкл питательной среды. Для оценки влияния ИЛ-6 на формирования маммосфер клеточные популяции CD44⁻/CD24⁻ культивировали в среде DMEM:F12 в присутствии 20 нг/мл EGF, 20 нг/мл bFGF, 5 мкг/мл инсулина, 2% B27, 0.4% BSA в стандартных условиях с добавлением с добавлением 50 нг/мл ИЛ-6 сразу после проведения сортировки и через 24 часа. В качестве контроля клетки MCF-7 (Рис. 30) культивировали в среде IMDM, клетки SK-BR-3 (Рис. 31) культивировали в среде DMEM:F12, клетки BT-549 (Рис. 32) культивировали в среде DMEM в присутствии 10% FBS, 2 мМ L-глутамин, раствор антибиотиков-антимикотиков (100 ед/мл пенициллин, 0.1 мг/мл стрептомицин и 0.25 мкг/мл амфотерицин) с добавлением 50 нг/мл ИЛ-6 сразу после проведения сортировки и через 24 часа.

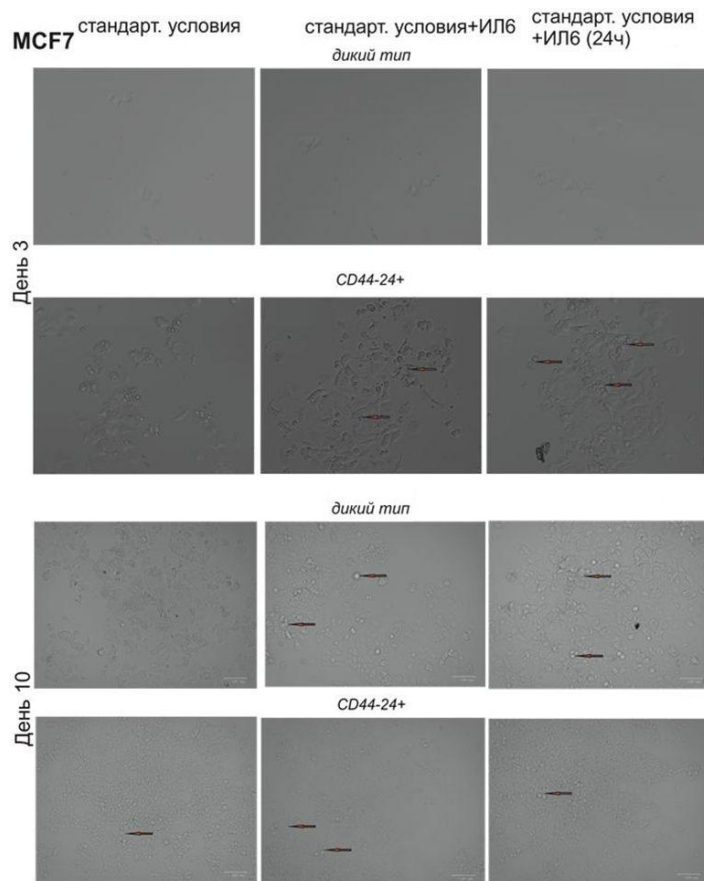


Рис. 30. Влияние ИЛ-6 на формирование маммосфер в культуре клеток молочной железы MCF-7. ИЛ-6 (50 нг/мл) добавляли сразу и через 24 ч после клеточной сортировки. Фазово-контрастная микроскопия на 3 и 10 день инкубации с ИЛ-6. Стрелкой отмечено формирование сфероидов в стандартных условиях культивирования.

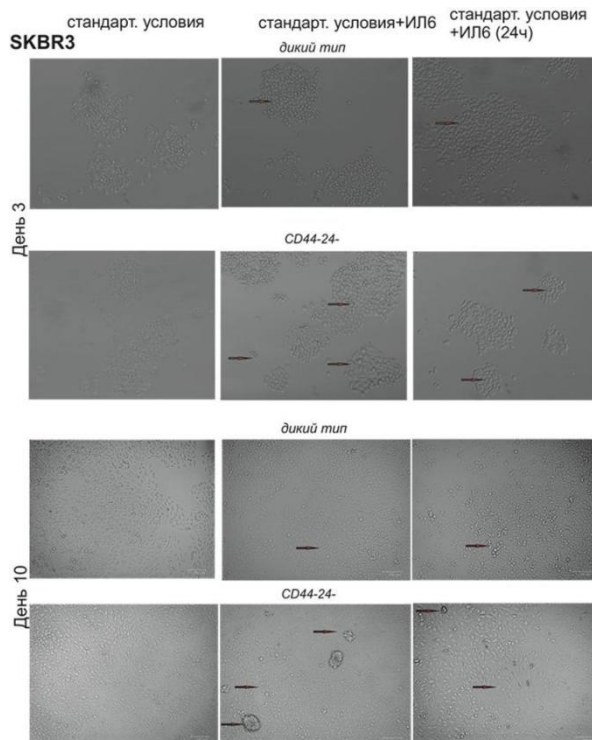


Рис. 31. Влияние ИЛ-6 на формирование маммосфер в культуре клеток молочной железы SK-BR-3. ИЛ-6 (50 нг/мл) добавляли сразу и через 24 ч после клеточной сортировки.

Фазово-контрастная микроскопия на 3 и 10 день инкубации с ИЛ-6. Стрелкой отмечено формирование сфероида в стандартных условиях культивирования.

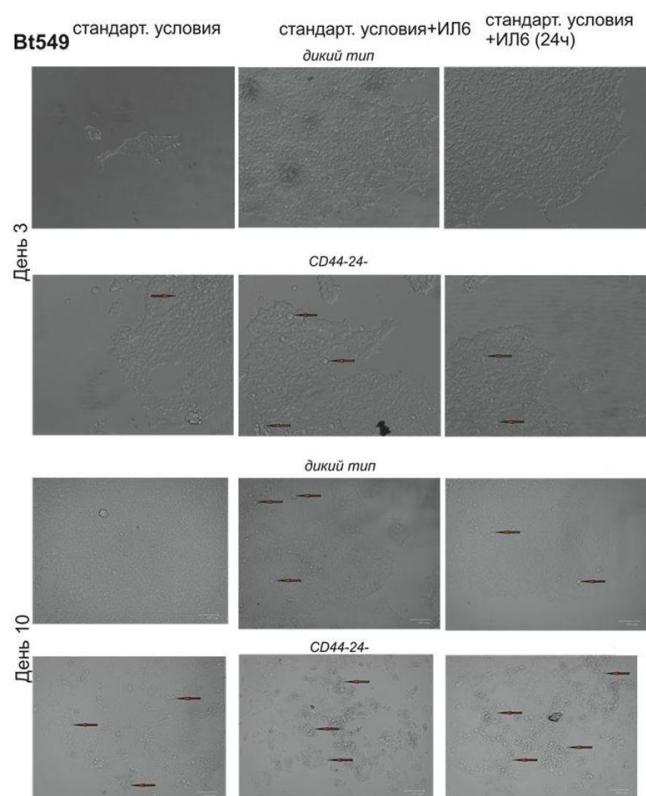


Рис. 32. Влияние ИЛ-6 на формирование маммосфер в культуре клеток молочной железы BT-549. ИЛ-6 (50 нг/мл) добавляли сразу и через 24 ч после клеточной сортировки. Фазово-контрастная микроскопия на 3 и 10 день инкубации с ИЛ-6. Стрелкой отмечено формирование сфероида в стандартных условиях культивирования.

Было показано, что дифференцированные клетки культуры BT-549 под действием ИЛ6 на 3 сутки формируют максимум 2-3 сфероида в лунке, которые растут, увеличиваясь в диаметре до 10 суток и новые сфероиды не образуются. Можно полагать, что в культуре BT-549 сфероиды образуют оставшиеся после сортировки ОСК CD44⁺CD24⁻ (сортировка не бывает идеально чистой) этой культуры, а множество сортированных дифференцированных CD44⁻CD24⁻ клеток не дедифференцируются. В культурах SK-BR-3 и MCF-7 ситуация другая. Уже на 3 сутки после сортировки и воздействия ИЛ6 клетки этих культур формируют множество мелких сфероидов. Множество мелких сфероидов культур SK-BR-3 и MCF-7 свидетельствуют о том, что дифференцированные клетки этих культур прошли стволовой переход и образовали множество ОСК, которые дали начало маммосферам. Следует также отметить также формирование мелких округлых клеток в культурах культур SK-BR-3 и MCF-7 с фенотипом CD44⁻/24⁻ на 3 день культивирования в стандартных условиях с добавлением ИЛ-6 и отсутствие мелких клеток, тогда как которые характерны для дифференцированных CD44⁻CD24⁻ клеток этих культур без добавления ИЛ6. Даже на 10 сутки клетки дикого типа (без сортировки) и клетки с фенотипом CD44-

CD24- культур SK-BR-3 и MCF-7 без добавления ИЛ6 практически не дают сфероидов. При добавлении ИЛ6 на 10 сутки количество сфероидов и их размер в культурах с фенотипом CD44-CD24- даже больше, чем в культурах дикого типа.

Таким образом, на клеточных культурах опухоли молочной железы SK-BR-3, MCF-7 и BT-549 было показано, что отсортированные дифференцированные опухолевые клетки CD44-CD24- культур SK-BR-3 и MCF-7, содержащие амплификации генов стволовости были способны к дедифференцировки под действием ИЛ6 до опухолевых стволовых клеток с образованием маммосфер. Дифференцированные (CD44-CD24-) опухолевые клетки культуры BT-549, которые не имели амплификаций генов стволовости и под действием ИЛ6 не образовывали ОСК и маммосфер. Эти результаты показали, что способность дифференцированных опухолевых клеток к стволовой пластичности и потенциальной возможности формирования метастатических колоний, определяется наличием в их геноме амплификаций локусов генов стволовости

На следующем этапе был изучен транскриптом опухолевых клеток двух пациентов: St, которая имела 2 и более амплификации генов стволовости и пациентки Ti, в опухолевых клетках которой не было амплификаций генов стволовости (Рис.33).

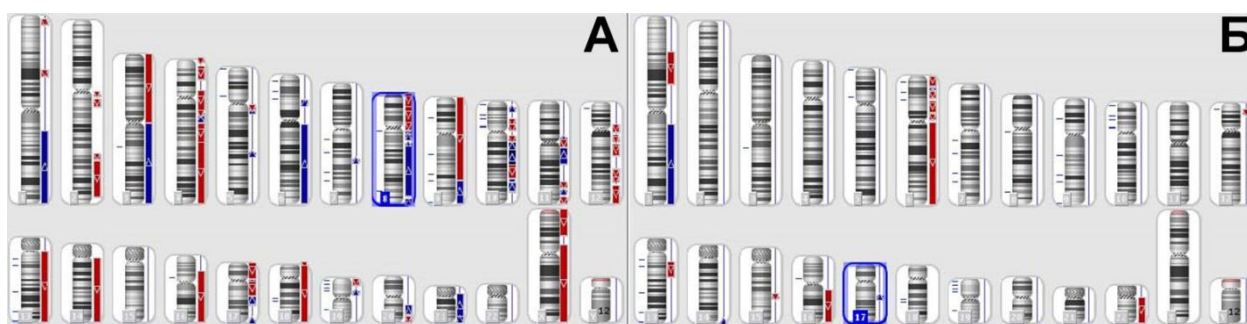


Рис. 33. CNA-генетический ландшафт опухолей больных St (а) и Ti (б).

Примечание: у больной St в опухоли амплификации локусов 3q, 6q, 8q, 9q, 10q22.1 (амплифицированы гены стволовости SOX2, MYC, KLF4, NOTCH1, NODAL). У больной Ti нет амплификаций генов стволовости.

Для проведения транскриптомного микроматричного анализа, были выделены строго опухолевые EpCam+ клетки, без примеси клеток стромы, при помощи 6-ти кратной магнитной иммуносепарации. Часть нативных опухолевых клеток забирали для проведения полнотранскриптомного микроматричного анализа. Остальные клетки, культивировали 3 суток с добавлением ИЛ6, после чего клетки также забирали для транскриптомного анализа. Таким образом, на каждую пациентку были две точки до и после добавления ИЛ6.

В результате микроматричного анализа было установлено, что под действием ИЛ6 у пациентки St с амплификациями генов стволовости более чем в 2 раза (Change Fold >2)

меняется экспрессия 11887 генов, причем экспрессия 9294 генов повышается (максимально в 70 раз), а экспрессия 2593 генов снижается максимум в 12 тыс раз (Рис. 34а). Топ-10 наиболее изменяемых сигнальных путей представлен на Рис. 35а. У пациентки Тi без амплификаций генов стволовости под действием ИЛ6 более чем в 2 раза меняется экспрессия 11587 генов, повышается (максимум в 239 раз) экспрессия 7179 генов, снижается (максимум в 17 тыс. раз) экспрессия 4397 генов (Рис. 34б). Топ-10 наиболее изменяемых сигнальных путей представлен на Рис. 35б.

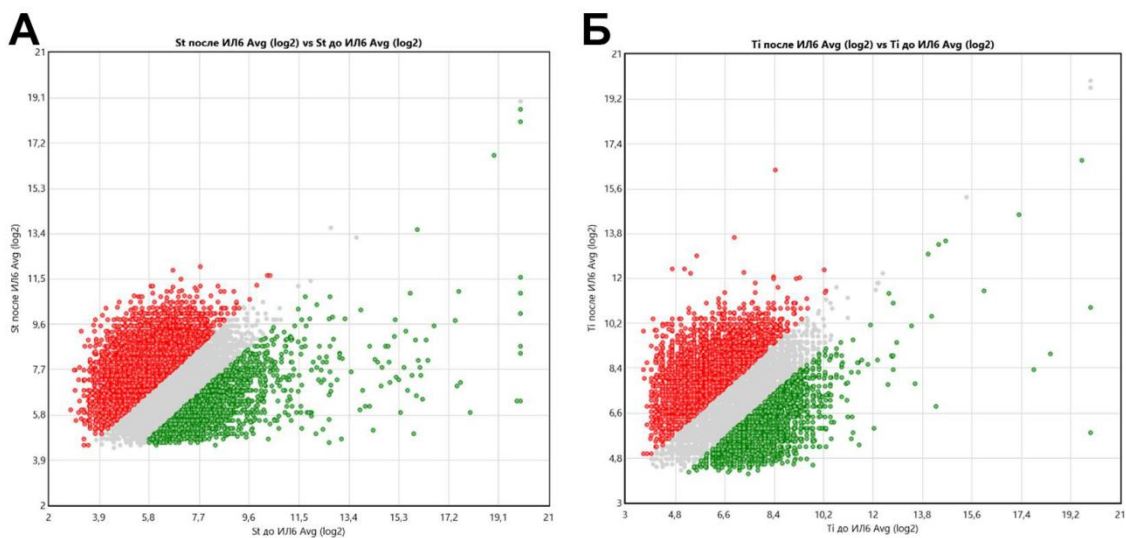


Рис. 34. Scatter-plot дифференциально экспрессируемых генов в ЕрСам+ опухолевых клетках больных St (а) и Ti (б) до и после воздействия ИЛ6.

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



Рис. 35. Топ-10 наиболее изменяемых под действием ИЛ6 сигнальных в ЕрСам+ опухолевых клетках больных St (а) и Ti (б) и диаграмма Венна пересечения по ДЭГ (в)

Следует отметить, что Топ-10 сигнальных у обеих пациенток практически одинаков, что свидетельствует о схожем общем эффекте ИЛ6 на опухолевые клетки этих больных, тем не менее, есть и существенные отличия. Согласно диаграмме Венна (рис. 35в), изменение экспрессии в опухолевых клетках этих больных пересекаются по 6424 ДЭГ, а изменение экспрессии 5463 для St и 5152 для Ti генов является уникальным. Что касается генов стволовости, то у больной St с амплификациями, повышается более чем в 2 раза экспрессия 25 генов стволовости, а снижается экспрессия 6 генов стволовости. У больной Ti без амплификаций, повышается экспрессия 19 генов стволовости и снижается экспрессия 9 генов стволовости (Таблица 15, Рис. 36).

Таблица 15. Уровни экспрессии генов стволовости в EpCam+ опухолевых клетках больных St (а) и Ti (б) до и после воздействия ИЛ6

St после ИЛ6 Avg (log2)	St до ИЛ6 Avg (log2)	Fold Change	Gene Symbol	Ti после ИЛ6 Avg (log2)	Ti до ИЛ6 Avg (log2)	Fold Change	Gene Symbol
5,15	8,79	-12,43	DPPA3	4,95	8,88	-15,24	ZEB1
6,37	9,74	-10,33	ITGB1	5,26	7,71	-5,46	LIFR
6,02	8,9	-7,33	ZSCAN10	5,26	7,49	-4,69	NOTCH1
5,91	8,64	-6,62	CCND2	6,23	8,09	-3,64	CCND2
6,38	7,82	-2,71	GATA3	7,03	8,88	-3,59	VIM
6,02	7,08	-2,09	KLF4	6,88	8,42	-2,91	SNAI2
7,02	5,85	2,26	FZD9	8,03	9,55	-2,86	DPPA4
6,83	5,57	2,39	FZD1	6,44	7,87	-2,69	BMP6
7,6	6,34	2,39	BMI1	5,5	6,79	-2,45	VIM
7,25	5,94	2,48	MYC	9,73	8,63	2,14	DPPA3
9,79	8,43	2,57	SNAI2	7,83	6,59	2,36	NODAL
7,03	5,63	2,63	CDX2	7,98	6,71	2,41	BMI1
7,8	6,39	2,66	GSK3B	7,24	5,92	2,48	CDK6
8,03	6,6	2,69	WNT2	8,03	6,71	2,51	WNT2
8,37	6,83	2,92	TERT	9,1	7,49	3,04	ZSCAN10
6,83	5,24	3,01	SOX8	7,78	6,17	3,06	ALDH1A1
6,56	4,83	3,32	KLF5	8,34	6,71	3,09	SMAD4
6,37	4,45	3,79	SHH	9,16	7,49	3,19	CCNF
7,02	5	4,05	INSR	8,03	6,36	3,19	SMO
7,68	5,63	4,12	ZEB1	8,03	6,36	3,19	KLF2
6,79	4,68	4,32	NOTCH1	7,68	5,92	3,37	TGFB1
9,21	7,04	4,5	TGFB1	7,32	5,47	3,61	POU5F1
9,84	7,64	4,58	BMP6	7,03	5,01	4,07	FZD1
8,03	5,63	5,25	SALL3	7,24	5,13	4,31	CDX2
7,6	5,08	5,75	CDK6	8,99	6,25	6,68	DPPA2
8,03	5,45	5,96	POU5F1	7,78	4,28	11,31	TGFBR1
8,95	6,22	6,66	DPPA4	9,44	5,92	11,41	SOX8
10,29	7,54	6,73	SMAD9	9,1	5,35	13,41	FZD9
7,6	4,68	7,57	SOX4				

9,79	6,22	11,9	DPPA2				
9,54	5,24	19,72	SOX1				

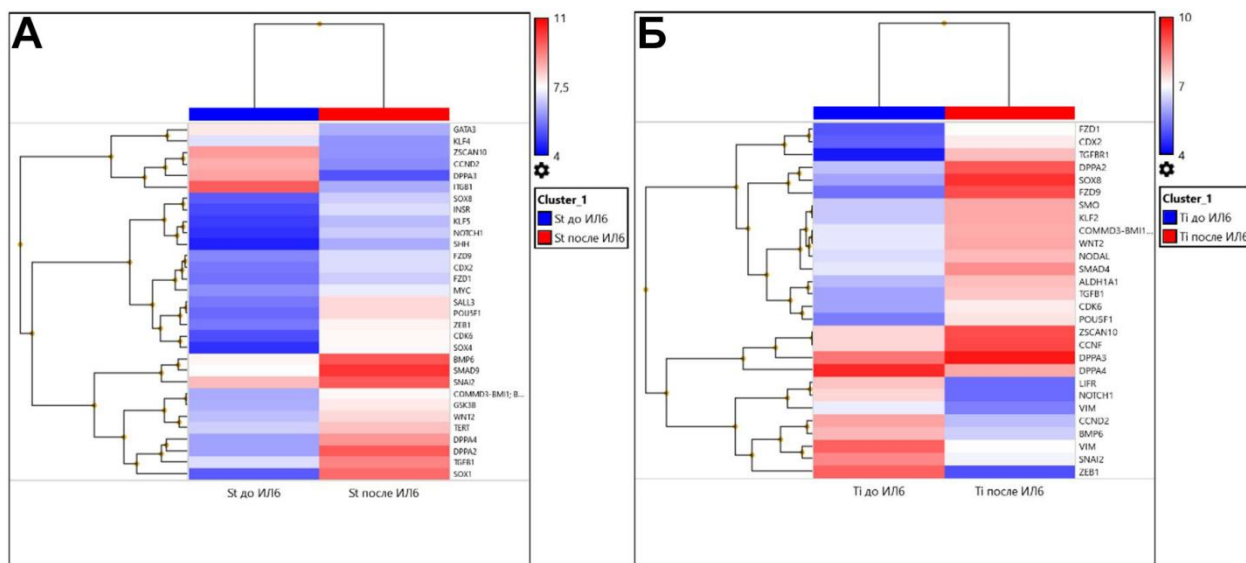


Рис. 36. Тепловая карта экспрессии генов стволовости в ЕрСам+ опухолевых клетках больных St (а) и Ti (б) до и после воздействия ИЛ6

Общее пересечение по генам стволовости - 18 генов (*DPPA3*, *ZSCAN10*, *DPPA4*, *ZEB1*, *NOTCH1*, *SNAI2*, *BMP6*, *CCND2*, *DPPA2*, *POU5F1*, *FZD9*, *FZD1*, *CDK6*, *WNT2*, *BMI1*, *CDX2*, *SOX8*, *TGFB1*). При этом, характер экспрессии даже у этих генов различается. Экспрессия *DPPA3*, *ZSCAN10* снижается у St и повышается у Ti, экспрессия *DPPA4*, *ZEB1*, *NOTCH1*, *SNAI2*, *BMP6* повышается у St и снижается у Ti. Изменение экспрессии остальных генов однонаправлено у пациентов. Кроме этого, у больной St дифференциально изменяется экспрессия 13 генов стволовости (*GSK3B*, *TERT*, *SOX4*, *SHH*, *MYC*, *KLF4*, *GATA3*, *ITGB1*, *KLF5*, *SOX1*, *SMAD9*, *SALL3*, *INSR*) и они не меняются у больной Ti. В тоже время у больной Ti дифференциально изменяется экспрессия 10 генов стволовости (*LIFR*, *SMO*, *TGFB1*, *ALDH1A1*, *VIM*, *VIM*, *NODAL*, *CCNF*, *SMAD4*, *KLF2*), которых нет у больной St.

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

ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При выполнении первой задачи, было проведено описание CNA-генетического ландшафта опухоли молочной железы люминального В HER2-негативного молекулярного подтипа до лечения, в том числе описана его связь с ответом на НХТ и основными клинико-морфологическими параметрами. Для исследуемой выборки пациенток с люминальным В РМЖ был описан CNA-ландшафт опухоли до проведения лечения - выявлены частоты встречаемости амплификаций и делеций для каждой хромосомы, установлены локусы с наибольшей частотой амплификаций и делеций в общей группе пациенток, обнаружены локусы с полным отсутствием CNA, подсчитаны числовые хромосомные aberrации. Также была изучена ассоциация ответа на НХТ с частотой встречаемости хромосомных аномалий до лечения, что позволило выявить несколько регионов со статистически значимо большим количеством амплификаций, которые обнаружены у пациенток с наличием объективного ответа на НХТ (частичная и полная регрессия). Потенциально эти локусы могут выступать в качестве предиктивных маркеров хорошего ответа на НХТ у больных люминальным В РМЖ. Однако это требует дальнейшей валидации в проспективных исследованиях. Частота CNA не показала связи с наличием/отсутствием лимфогенного метастазирования (N). Показана ассоциация с возрастом больных и менструальным статусом и выявлено увеличение частоты CNA некоторых регионов в постменопаузальном периоде. В обсуждении показаны отличительные особенности CNA ландшафта опухолей люминального В РМЖ по сравнению с трижды негативным подтипом.

Далее, согласно дизайну исследования, были оценены изменения CNA-генетического ландшафта опухоли молочной железы в процессе неoadьювантной химиотерапии и связь этих изменений с метастазированием. В первую очередь проведено сравнение частот встречаемости амплификаций и делеций у больных до и после предоперационной химиотерапии. Выявлено статистически значимое снижение частоты встречаемости амплификаций и делеций после проведения НХТ. Также проанализирована связь индивидуальных изменений CNA в опухоли больных в ответ на проводимую предоперационную терапию с безметастатической выживаемостью, благодаря чему выделено 3 качественных изменения CNA опухоли в процессе неoadьювантной химиотерапии (3 типа ответа). Уменьшение количества делеций и/или амплификаций (вплоть до полной элиминации), отсутствие изменений числа CNA и появление de novo делеций и/или амплификаций. Дополнительно проведено сравнение клинико-

морфологических параметров и оценена общая 5-летняя выживаемость при распределении пациенток по 3 типом генетического ответа на НХТ. Показано, что группы статистически достоверно не отличаются по основным клинко-морфологическим параметрам. Отдельно проанализирована связь изменения делеций и амплификаций в процессе НХТ с метастазированием. Показано, что изменение амплификаций в большей степени ассоциированы с метастазированием, чем изменение делеций. Показано, что у 100% пациенток, у которых появлялись de novo амплификации развивались метастазы, в тоже время при элиминации амплификаций в процессе НХТ метастазы не развивались. Было высказано предположение, что появляться, под действием НХТ, амплификации будут в тех регионах, которые непосредственно отвечают за механизмы метастазирования и, определив хромосомные регионы, в которых появляются амплификации под действием НХТ, можно определить генные системы, участвующие в реализации процесса метастазирования. Поэтому на следующем этапе были установлено, в каких именно хромосомных регионах появлялись амплификации у больных после проведения НХТ. Это локусы: 3q(26.31-27.1), 5p(15.33-15.2), 6p(25.2-24.2; 21.2-12.2), 7q(11.1-36.3), 8q(11.21-24.3), 9p(24.2-21.2), 10p(15.3-11.1), 10q(21.3-22.2; 25.1-25.2), 12p(13.33-11.22) 13q(12.3-34), 16p(13.3-11.2), 18q(11.1-23) 19p(13.3-12). Показано, что у всех пациентов с метастазами в резидуальной опухоли наблюдается минимум 2 амплификации из обозначенных регионов. По-видимому, генные системы, локализованные в этих регионах, отвечают за реализацию механизмов метастазирования. В то время как 1 амплификация или их отсутствие не приводит к метастазированию. Кроме того, элиминация обозначенных амплификаций под действием НХТ приводит к 100% безметастатической выживаемости, напротив, индукция новых амплификаций сочетается почти со 100% метастазированием. Это подтвердилось данными литературы о том, что фокальные амплификации из выявленного списка, часто встречаются в опухоли и ассоциированы с неблагоприятным исходом. Следующий этап работы включал валидацию этих связей и оценку механизмов, как амплификации 3q(26.31-27.1), 5p(15.33-15.2), 6p(25.2-24.2; 21.2-12.2), 7q(11.1-36.3), 8q(11.21-24.3), 9p(24.2-21.2), 10p(15.3-11.1), 10q(21.3-22.2; 25.1-25.2), 12p(13.33-11.22) 13q(12.3-34), 16p(13.3-11.2), 18q(11.1-23) 19p(13.3-12) могут влиять на процесс метастазирования. Прежде всего, необходимо было проверить ассоциацию связи 2-х и более фокальных амплификаций обозначенных регионов на независимой выборке. В качестве такой выборки была использована база данных проекта TCGA (The Cancer Genome Atlas), в которой есть данные по CNA-генетическому ландшафту опухолей более 8 тыс онкологических больных всех основных локализаций. Анализ связи частоты 2-х и более амплификаций идентифицированных регионов со смертностью (по данным ВОЗ) при

различных локализациях показал исключительно высокий уровень корреляции (более 80%), что свидетельствует об универсальности определения наличия/отсутствия 2-х и более амплификаций идентифицированных регионов как важного маркера исхода заболевания. Это показывает его прямую связь с механизмами метастазирования, которые универсальны.

Получив подтверждение важности определения наличия/отсутствия 2-х и более амплификаций идентифицированных регионов как маркера исхода заболевания при различных онкопатологиях, возник вопрос о подробном анализе содержания множества генов в изучаемых регионах возникновения амплификаций. В рамках 4 задачи была проведена аннотирование генов, находящихся в регионах локализации амплификаций, возникающих под действием неоадьювантной химиотерапии.

Согласно анализу частоты встречаемости генов в данных локусах, были выделены группы генов трех функциональных систем, в группу генов системы адгезии включено 69 генов, в группу генов регуляции клеточного цикла – 42 гена, в группу генов иммунной системы – 66 генов. Однако, подробное аннотирование генов в этих локусах также показало, что единственной системой, гены которой представлены во всех этих регионах являются гены системы индукции и поддержания стволового фенотипа клеток и самообновления или гены стволовости. Было выделено 48 генов данной группы, расположенные в регионах локализации новых амплификаций (3q(26.31-27.1), 5p(15.33-15.2), 6p(25.2-24.2; 21.2-12.2), 7q(11.1-36.3), 8q(11.21-24.3), 9p(24.2-21.2), 10p(15.3-11.1), 10q(21.3-22.2; 25.1-25.2), 12p(13.33-11.22) 13q(12.3-34), 16p(13.3-11.2), 18q(11.1-23) 19p(13.3-12), описаны их функции и известные литературные данные о связи данных генов с поддержанием стволового фенотипа клеток, их самообновления. Важно отметить, что, согласно данным литературы, все аннотированные гены стволовости, помимо участия в индукции стволового фенотипа и роли в самообновлении стволовых клеток, имеют прямое отношение к канцерогенезу и прогрессии опухолей, причем up-регуляция всех этих генов приводит к усилению метастазирования опухолей, при клинических исследованиях, в системах *in vivo* и к усилению туморогенности и маммосферообразования в системах *in vitro*.

После аннотирования генов, находящихся в регионах локализации амплификаций, возникающих под действием неоадьювантной химиотерапии, возник закономерный вопрос о роли экспрессии данных генов стволовости в процессе проведения НХТ. Учитывая связь с метастазированием амплификаций локусов этих генов, у больных с метастазами должна быть повышена экспрессия этих генов. В рамках реализации 5 задачи, был проведен анализ экспрессии отдельных 13 генов стволовости из каждого

хромосомного региона в опухоли молочной железы до лечения и после НХТ и оценена связь уровня их экспрессии с метастазированием. Было показано, что от 1 до 3-х генов из выбранного списка были статистически связаны с отдельными клинико-морфологическими показателями. Было установлено, что некоторые неблагоприятные клинико-морфологические факторы прогноза ассоциированы с повышенной экспрессией генов стволовости в опухоли, а НХТ статистически значимо повышает экспрессию 4/12 генов стволовости. Было показано, что до лечения у больных без метастазов гиперэкспрессированы 3 гена стволовости, при этом у больных с возникшим впоследствии гематогенным метастазированием гиперэкспрессированы 7 генов стволовости. После проведения НХТ у больных без метастазов гиперэкспрессированы 6 генов стволовости, в группе с метастазами гиперэкспрессированы 11 из 12 генов стволовости.

Таким образом, было показано, что как в опухоли до лечения, так и особенно в остаточной резидуальной опухоли после НХТ больных с возникшим впоследствии гематогенным метастазированием отмечается гиперэкспрессия почти всех исследованных генов стволовости.

Полученные результаты легли в основу проведения задачи №6, в рамках которой был уже проведен полнотранскриптомный анализ опухоли молочной железы в процессе предоперационной химиотерапии. Сравнение экспрессионного профиля пациенток в зависимости от наличия/отсутствия гематогенного метастазирования до и после НХТ, показало, что количество ДЭГ в опухоли после проведения НХТ увеличивается в 6,4 раза (154 против 24) по сравнению с количеством ДЭГ до лечения. Выделены *up-regulated/down-regulated*-гены для каждого случая, построена тепловая карта ДЭГ в опухоли больных РМЖ до/после лечения с наличием/отсутствием гематогенного метастазирования. При этом, после построения диаграммы Венна было выяснено, что ДЭГ у пациентов с наличием/отсутствием гематогенного метастазирования до лечения и после НХТ пересекаются всего по 1 гену *EHD2*.

Используя данные литературы, было выявлено, что по частоте встречаемости при опухолях всех локализаций (177 типов опухолей) амплификация длинного плеча 8 хромосомы, в частности 8q24, где локализован ген стволовости *MYC*, оказалась наиболее распространенной аберрацией числа копий (CNA) и встречалась более чем в 30% всех образцов. В нашей работе частота амплификации 8q с регионом 8q24 в опухоли больных до лечения составила 62% (37/60 случаев). Из 37 больных амплификация 8q в резидуальной опухоли после проведения НХТ сохранилась у 24/37 пациентов (65%), кроме этого еще у 3 пациентов амплификации 8q в опухоли возникли *de novo* под

действием предоперационной терапии, что показывает относительную химиорезистентность опухолевых клонов с амплификацией 8q. Нами было изучено изменение транскриптома опухоли молочной железы и статуса амплификации длинного плеча 8 хромосомы (с локусом 8q24) и в процессе предоперационной химиотерапии.

Количество ДЭГ в опухоли до лечения у больных с наличием амплификации 8q и без амплификации составило 105 генов (41 Up-regulated, 64 Down-regulated) (Приложение 3). После проведения НХТ резидуальные опухоли больных с амплификацией 8q и без амплификации различались очень существенно, почти по 2137 ДЭГ (1394 Up-regulated, 780 Down-regulated). Выделены up-regulated/down-regulated-гены и топ-10 сигнальных путей ДЭГ для каждого случая. При этом, после построения диаграммы Венна было выяснено, что ДЭГ у пациентов с различным статусом амплификации 8q (с регионом 8q24) до лечения и после НХТ пересекаются всего по 8 генам, для которых описаны локализация и их функциональное назначение.

По результатам исследования показано, что проведение НХТ значительно усиливает гетерогенность транскриптома между опухолями с наличием и отсутствием амплификации 8q. При этом, число Up-regulated генов повышается, по сравнению с больными до лечения, и превышает число Down-regulated генов почти в два раза. Особенно сильно у больных с амплификацией 8q увеличивается экспрессия рибосомальных белков, что может свидетельствовать о резком увеличении белкового синтеза после воздействия НХТ. Из гипохеппрессируемых генов имеет смысл отметить 84/380 генов Olfactory receptor activity в зоне среднего кластера генов. Таким образом, проведенное исследование показывает большое влияние амплификации длинного плеча 8 хромосомы на опухолевый транскриптом, независимо от других молекулярно-генетических признаков. Амплификация 8q с участием региона 8q24 приводит к значительному сдвигу уровня транскрипции большого количества генов именно после воздействия химиотерапии. Для многих из этих генов показана роль в прогрессии опухоли. Этим может быть обусловлена известная связь амплификации 8q с прогрессией опухолей, показанная при многих локализациях. Что касается генов стволовости, то амплификация 8q после НХТ повышает, по сравнению с пациентами без амплификации 8q, экспрессию *GSK3B*, *MYC*, *GATA3*, *SMAD4*, *SMAD2* в 2.1-3.8 раза и в 2,1-2.3 раза снижает экспрессию *TERT*, *BMP6*, *NANOG*, т.е. 8/48 генов стволовости. Таким образом, амплификация региона локализации гена *MYC* 8q в резидуальной опухоли приводит к повышенной экспрессии комплекса генов стволовости, которые также принимают участие в WNT- и TGFb-сигналинге.

В финальной части настоящего исследования (задача №7) был проведен эксперимент по индукции дедифференцировки до ОСК в популяции нестволовых

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

В результате проведенного эксперимента на клеточных культурах опухоли молочной железы SK-BR-3, MCF-7 и BT-549 было показано, что отсортированные дифференцированные опухолевые клетки CD44-CD24- культур SK-BR-3 и MCF-7, содержащие 2-е и более ампликации генов стволовости были способны к дедифференцировке под действием ИЛ6 до опухолевых стволовых клеток с образованием маммосфер. Дифференцированные (CD44-CD24-) опухолевые клетки культуры BT-549, которые не имели амплификаций генов стволовости и под действием ИЛ6 не образовывали ОСК и маммосфер. Эти результаты показали, что способность дифференцированных опухолевых клеток к стволовой пластичности и потенциальной возможности формирования метастатических колоний, определяется наличием в их геноме амплификаций локусов генов стволовости. Этот эксперимент подтверждает 3 положение, выносимое на защиту

Кроме этого, был изучен транскриптом опухолевых клеток двух пациентов: St, которая имела 2 и более ампликации генов стволовости и пациентки Ti, в опухолевых клетках которой не было амплификаций генов стволовости. Было показано существенное влияние CNA-генетического ландшафта опухоли и, в частности, амплификаций генов стволовости, на реакцию транскриптома клеток на ИЛ6.

Полученные нами результаты позволили сформулировать гипотезу о роли амплификаций генов стволовости в реализации механизмов метастазирования опухолей, которая схематично представлена на Рис. 37.

На определенном этапе канцерогенеза под действием внутренних факторов и микроокружения или в процессе химио-индуцированной клональной эволюции опухолью приобретает способность к метастазированию. Это происходит благодаря эктопической экспрессии генов стволовости (индукции и поддержания плюрипотентного состояния клеток), которая обусловлена, прежде всего, амплификацией хромосомных регионов их локализации, хотя не исключаются и другие механизмы (эпигенетические, мутации, микроРНК и т.д.). В результате эктопической экспрессии генов стволовости

дифференцированными или прогениторными опухолевыми клетками приобретает способность к дедифференцировке обратно в стволовые опухолевые клетки. Мы назвали этот процесс стволовой пластичностью или дедифференцировкой.

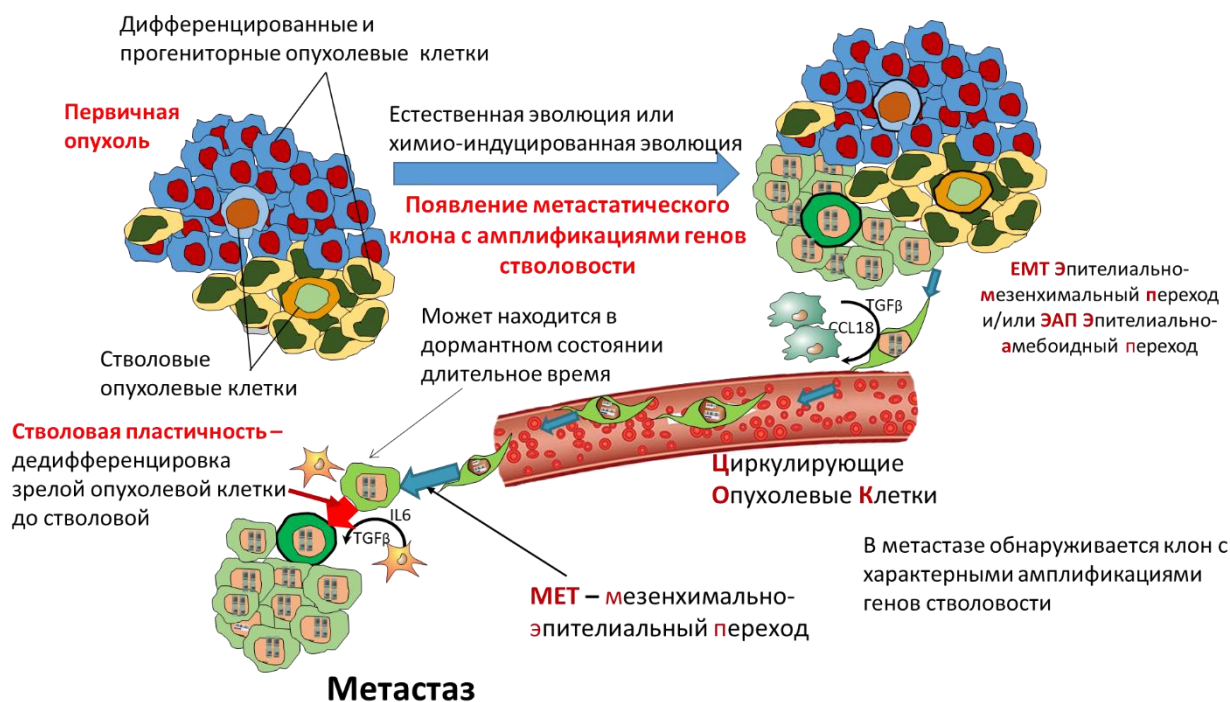


Рис. 37. Схема, показывающая место стволовой пластичности, обусловленной эктопической экспрессией генов стволовости за счет 2-х и более амплификаций их локусов, в метастатическом каскаде

Предполагается, что приобретение такой способности к стволовому переходу, за счет амплификаций локусов генов стволовости приводит к формированию в первичной опухоли метастатических клонов, которые осуществляют метастазирование во вторичные органы. Когда опухолевая дифференцированная (неспособная к делению) или прогениторная (способная только к ограниченному количеству делений) клетка, имеющая амплификации генов стволовости, из кровотока попадает во внутренние органы, то там под действием сигналов микроокружения (прежде всего провоспалительных цитокинов, таких как IL6 и TGFβ) она может дедифференцироваться в стволовую опухолевую клетку, которая и даст начало метастазу. В отсутствие эктопической экспрессии генов стволовости за счет амплификаций, опухоль будет давать циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК), но отсутствие способности к стволовой пластичности во внутренних органах не даст возможности такой опухоли метастазировать, даже если все остальные звенья (инвазия, интравазация, циркуляция в кровотоке, экстравазация, адаптация) будут в порядке. Суть представленного процесса заключается в том, что клоны, несущие

амплификации в 3q(26.31-27.1), 5p(15.33-15.2), 6p(25.2-24.2; 21.2-12.2), 7q(11.1-36.3), 8q(11.21-24.3), 9p(24.2-21.2), 10p(15.3-11.1), 10q(21.3-22.2; 25.1-25.2), 12p(13.33-11.22) 13q(12.3-34), 16p(13.3-11.2), 18q(11.1-23) 19p(13.3-12) локусах являются потенциальными метастатическими клонами. В них локализованы гены, за счет которых соматическими опухолевыми клетками приобретает способность к обратной дедифференцировке в опухолевые стволовые клетки (стволовой пластичности), а амплификация значительно усиливает их экспрессию. Такие соматические опухолевые клетки с амплификацией генов стволовости и образуют метастазы, в то время как клетки без амплификаций генов стволовости метастазы образовать не могут. По итогам работы мы внесли определенные изменения в известный метастатический каскад и определили в нем место стволловоу переходу (Рис. 37)

В настоящее время исследования по этой тематике продолжаются. В резидуальной опухоли после неoadьювантной химиотерапии *in situ* были идентифицированы дифференцированные опухолевые клетки EpCam+CK7+CD44- с экспрессией белков стволовости Myc и Oct4, и их высокая частота была именно у пациентов, у которых, впоследствии, развились метастазы [Litviakov N.V. et al., Breast tumour cell subpopulations with expression of the Myc and Oct4 proteins //Journal of Molecular Histology.- 2020].

ВЫВОДЫ

1. Объективный ответ на НХТ (частичная и полная регрессия) наблюдался при наличии амплификаций в опухоли молочной железы люминального В HER2-негативного молекулярного подтипа до лечения в 9p22.1 и 9p21.3 хромосомных регионах у 42,8% (15/35) и 40,0% (14/35) больных, при отсутствии амплификаций в этих регионах у пациенток со стабилизацией и прогрессированием ($p=0,007$ и $p=0,008$ по критерию Фишера). С основными клинико-морфологическими параметрами CNA-генетический ландшафт опухоли до лечения показал слабую ассоциацию.
2. Показано статистически значимое снижение частоты встречаемости амплификаций ($p=0,00028$) и делеций после проведения предоперационной химиотерапии ($p=0,0003$). Выявлено 3 качественных изменения CNA опухоли в процессе НХТ: уменьшение количества делеций и/или амплификаций (вплоть до полной элиминации), отсутствие изменений числа CNA и появление de novo делеций и/или амплификаций. Безметастатическая выживаемость у больных с уменьшением частоты амплификаций в процессе предоперационного лечения составила 100% (у 0/33 пациентов развились метастазы). У пациенток с отсутствием изменений частоты амплификаций показаны промежуточные показатели выживаемости 79% (у 3/14 пациентов развились метастазы). Группа пациенток с увеличением частоты амплификаций в процессе НХТ безметастатическая выживаемость составила 8% (у 12/13 пациентов развились метастазы) ($p=0,00000$).
3. Установлены хромосомные регионы, в которых появлялись de novo ампликации под действием НХТ: 3q(26.31-27.1), 5p(15.33-15.2), 6p(25.2-24.2; 21.2-12.2), 7q(11.1-36.3), 8q(11.21-24.3), 9p(24.2-21.2), 10p(15.3-11.1), 10q(21.3-22.2; 25.1-25.2), 12p(13.33-11.22) 13q(12.3-34), 16p(13.3-11.2), 18q(11.1-23) 19p(13.3-12). У всех пациентов с метастазами в резидуальной опухоли наблюдалось минимум 2 ампликации из обозначенных хромосомных регионов. В то время как 1 амплификация или их отсутствие не приводила к метастазированию.
4. По результатам анализа корреляции частоты больных с 2-мя и более амплификациями 3q(26.31-27.1), 5p(15.33-15.2), 6p(25.2-24.2; 21.2-12.2), 7q(11.1-36.3), 8q(11.21-24.3), 9p(24.2-21.2), 10p(15.3-11.1), 10q(21.3-22.2; 25.1-25.2), 12p(13.33-11.22) 13q(12.3-34), 16p(13.3-11.2), 18q(11.1-23) 19p(13.3-12) в опухолях 17 различных локализаций 8456 больных из базы данных TCGA со смертностью при данных локализациях (по ВОЗ) установлен высокий уровень корреляции ($R=0,842$ при $p=0,000011$), свидетельствующий

об универсальности наличия в опухоли 2-х и более амплификаций этих регионов как прогностического маркера неблагоприятного исхода.

5. Аннотирование генов, локализованных в амплифицированных регионах показало, что единственной системой, гены которой представлены во всех регионах амплификации являются гены системы индукции и поддержания стволового фенотипа клеток и самообновления или гены стволовости: SOX2, DPPA2, DPPA4, GSK3B, TERT, BMP6, OCT4, SOX4, NOTCH4, PIM1, FZD9, FZD1, WNT2, SMO, CDK6, EPHA1, SHH, SNAI2, MYC, ALDH1A1, TGFBR1, KLF4, NOTCH1, VIM, BMI1, ITGB1, ZEB1, GATA3, NODAL, NANOG, DPPA3, CCND2, SOX1, ZIC2, KLF5, FLT3, CCNA1, SOX8, CCNF, ZSCAN10, SMAD4, SMAD2, SALL3, KLF1, KLF2, INSR, TGFB1.

6. До лечения у больных без метастазов гиперэкспрессированы 3 из 13 изученных генов стволовости - OCT3, BMI1 и FLT3, при этом у больных с наличием гематогенного метастазирования гиперэкспрессированы 7/13 генов стволовости – OCT3, BMI1, SNAI2, TERT, TGFB1, TGFBR1 и FLT3. После проведения НХТ у больных без метастазов гиперэкспрессированы 6/13 генов стволовости - OCT3, BMI1, KLF4, TGFBR1, TGFB1 и FLT3, в группе с метастазами гиперэкспрессированы 11 из 13 генов стволовости ($p=0,034$).

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

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

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ДАННОЙ ТЕМЫ

Полученные в итоге проведенного исследования результаты позволили понять узкое место («бутылочное горлышко» bottleneck) процесса метастазирования – стволовая пластичность. Приобретение способности к стволовой пластичности – маркер готовности опухоли к метастазированию. Предотвращать развитие метастатической болезни нужно именно ингибируя механизмы стволовой пластичности опухолевых клеток во вторичных органах. Для предотвращения метастазирования, ингибируя процесс стволовой пластичности, есть несколько существенных преимуществ. Во-первых, стволовая пластичность, в отличие от ЕМТ (нормальном процессе многих эпителиальных клеток) это новоприобретенный опухолью механизм, поскольку в нормальных клетках этот механизм блокирован. Кроме того, не все опухоли способны к стволовой пластичности. Если опухоль не способна к стволовой пластичности, то она не метастазирует. Следовательно, не все опухоли надо будет подвергать такому лечению. Во-вторых, даже в случае способности к стволовой пластичности далеко не все опухолевые клетки в пределах одной и той же опухоли обладают способностью к дедифференцировке в стволовые, следовательно, воздействовать нужно будет не на все опухолевые клетки (мы предполагаем только на те, которые пришли во вторичные органы). В-третьих, нами установлен ключевой механизм приобретения способности к стволовой пластичности и снятия блока дедифференцировки - эктопическая экспрессия генов стволовости за счет амплификации регионов их локализации. Теперь нужно понять, будет ли ингибирование эктопической экспрессии генов стволовости приводить к ингибированию способности к стволовой пластичности и метастазирования, и эффективность такого подхода для предотвращения развития метастатической болезни. На этой основе можно будет разработать принципиально новую линейку персонализированных противометастатических препаратов, основанных на оригинальном подходе – ингибированию способности к стволовой пластичности, который еще не используется в мире. Внедрение таких лекарственных препаратов полностью изменит подходы к лечению опухолей.

СОКРАЩЕНИЯ И УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

ACTB – actin beta

CNA – Copy Number Aberrations (абберации числа копий)

ER – рецептора эстрогена

GAPDH – Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

HER2 – рецептор эпидермального фактора роста человека

IL6, ИЛ6 – интерлейкин 6

PR – рецептора прогестерона

RT-qPCR, Real-time PCR – ПЦР в режиме реального времени

TCGA – The Cancer Genome Atlas

TCGA – The Cancer Genome Atlas, Атлас генома рака

АФК – активные формы кислорода

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДЭГ – дифференциально экспрессируемые гены

ЗНО – злокачественное новообразование

ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

НХТ – неoadъювантная химиотерапия

ОСК – опухолевые стволовые клетки

ОСКм – опухолевые стволовые клетки молочных желез

ОТ-ПЦР – обратнo-транскриптазная полимеразная цепная реакция

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РМЖ – рак молочной железы

РНК – рибонуклеиновая кислота

СК – стволовые клетки

УЗИ – ультразвуковое исследование

ЦОК – циркулирующие опухолевые клетки

ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abeshouse A., Ahn J., Akbani R., Ally A., Amin S., Andry C.D., Annala M., Aprikian A., Armenia J., Arora A. The molecular taxonomy of primary prostate cancer// *Cell*.- 2015.- 163(4).- P.1011-25.
2. Adachi H., Tsujimoto M. FEEL-1, a novel scavenger receptor with in vitro bacteria-binding and angiogenesis-modulating activities// *Journal of Biological Chemistry*.- 2002.- 277(37).- P.34264-70.
3. Ahmad A., Strohbuecker S., Tufarelli C., Sottile V. Expression of a SOX1 overlapping transcript in neural differentiation and cancer models// *Cellular and Molecular Life Sciences*.- 2017.- 74(22).- P.4245-58.
4. Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A., Morrison S.J., Clarke M.F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells// *Proceedings of the National Academy of Sciences*.- 2003.- 100(7).- P.3983-8.
5. Al-Youzbaki W.B., Al-Youzbaki N.B., Telfah M.M. Tissue polypeptide antigen & interleukin-6: Are their serum levels a predictor for response to chemotherapy in breast cancer?// *Pakistan journal of medical sciences*.- 2014.- 30(5).- P.1108.
6. AL Zeyadi M., Dimova I., Ranchich V., Rukova B., Nesheva D., Hamude Z., Georgiev S., Petrov D., Toncheva D. Whole genome microarray analysis in non-small cell lung cancer// *Biotechnology & Biotechnological Equipment*.- 2015.- 29(1).- P.111-8.
7. Ali A., Ielciu I., Alkreathy H.M., Khan A.A. KLF17 attenuates estrogen receptor α -mediated signaling by impeding ER α function on chromatin and determines response to endocrine therapy// *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*.- 2016.- 1859(7).- P.883-95.
8. Andersen C.L., Christensen L.L., Thorsen K., Schepeler T., Sørensen F.B., Verspaget H.W., Simon R., Kruhøffer M., Aaltonen L.A., Laurberg S. Dysregulation of the transcription factors SOX4, CBFB and SMARCC1 correlates with outcome of colorectal cancer// *British Journal of Cancer*.- 2009.- 100(3).- P.511-23.
9. Aragona M., Dekoninck S., Rulands S., Lenglez S., Mascré G., Simons B.D., Blanpain C. Defining stem cell dynamics and migration during wound healing in mouse skin epidermis// *Nature communications*.- 2017.- 8(1).- P.1-14.
10. Archer T.C., Jin J., Casey E.S. Interaction of Sox1, Sox2, Sox3 and Oct4 during primary neurogenesis// *Developmental biology*.- 2011.- 350(2).- P.429-40.
11. Asiedu M.K., Ingle J.N., Behrens M.D., Radisky D.C., Knutson K.L. TGF β /TNF α -mediated epithelial-mesenchymal transition generates breast cancer stem cells with a claudin-low phenotype// *Cancer Research*.- 2011.- 71(13).- P.4707-19.
12. Avery S., Zafarana G., Gokhale P.J., Andrews P.W. The role of SMAD4 in human embryonic stem cell self-renewal and stem cell fate// *Stem Cells*.- 2010.- 28(5).- P.863-73.
13. Azim H.A., Michiels S., Bedard P.L., Singhal S.K., Criscitiello C., Ignatiadis M., Haibe-Kains B., Piccart M.J., Sotiriou C., Loi S. Elucidating prognosis and biology of breast cancer arising in young women using gene expression profiling// *Clinical Cancer Research*.- 2012.- 18(5).- P.1341-51.
14. Baccelli I., Schneeweiss A., Riethdorf S., Stenzinger A., Schillert A., Vogel V., Klein C., Saini M., Bäuerle T., Wallwiener M. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay// *Nature biotechnology*.- 2013.- 31(6).- P.539-44.
15. Bachelot T., Ray-Coquard I., Menetrier-Caux C., Rastkha M., Duc A., Blay J. Prognostic value of serum levels of interleukin 6 and of serum and plasma levels of vascular endothelial growth factor in hormone-refractory metastatic breast cancer patients// *British Journal of Cancer*.- 2003.- 88(11).- P.1721-6.

16. Bafico A., Liu G., Goldin L., Harris V., Aaronson S.A. An autocrine mechanism for constitutive Wnt pathway activation in human cancer cells// *Cancer Cell*.- 2004.- 6(5).- P.497-506.
17. Bai X., Chen Y., Hou X., Huang M., Jin J. Emerging role of NRF2 in chemoresistance by regulating drug-metabolizing enzymes and efflux transporters// *Drug metabolism reviews*.- 2016.- 48(4).- P.541-67.
18. Bal M.G., Yukselten Y., Ozkanca S., Akgün E., Ugur H.C., Sunguroğlu A. Status of INSR, LRP1 and VCL transcripts on CD133+ Glioblastoma Multiforme Stem Cells// *The FASEB Journal*.- 2016.- 30(1_supplement).- P.lb443-lb.
19. Balic M., Lin H., Young L., Hawes D., Giuliano A., McNamara G., Datar R.H., Cote R.J. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype// *Clinical Cancer Research*.- 2006.- 12(19).- P.5615-21.
20. Balko J.M., Giltane J.M., Wang K., Schwarz L.J., Young C.D., Cook R.S., Owens P., Sanders M.E., Kuba M.G., Sánchez V. Molecular profiling of the residual disease of triple-negative breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies actionable therapeutic targets// *Cancer discovery*.- 2014.- 4(2).- P.232-45.
21. Bar E.E., Chaudhry A., Lin A., Fan X., Schreck K., Matsui W., Piccirillo S., Vescovi A.L., DiMeco F., Olivi A. Cycloamine-mediated hedgehog pathway inhibition depletes stem-like cancer cells in glioblastoma// *Stem Cells*.- 2007.- 25(10).- P.2524-33.
22. Barkan D., Chambers A.F. β 1-integrin: a potential therapeutic target in the battle against cancer recurrence// *Clinical Cancer Research*.- 2011.- 17(23).- P.7219-23.
23. Baykara O., Bakir B., Buyru N., Kaynak K., Dalay N. Amplification of chromosome 8 genes in lung cancer// *Journal of cancer*.- 2015.- 6(3).- P.270.
24. Beck B., Blanpain C. Unravelling cancer stem cell potential// *Nature Reviews Cancer*.- 2013.- 13(10).- P.727-38.
25. Belledant A., Hovington H., Garcia L., Caron P., Brisson H., Villeneuve L., Simonyan D., Têtu B., Fradet Y., Lacombe L. The UGT2B28 sex-steroid inactivation pathway is a regulator of steroidogenesis and modifies the risk of prostate cancer progression// *European urology*.- 2016.- 69(4).- P.601-9.
26. Ben-David U., Beroukhim R., Golub T.R. Genomic evolution of cancer models: perils and opportunities// *Nature Reviews Cancer*.- 2019.- 19(2).- P.97-109.
27. Ben-Porath I., Thomson M.W., Carey V.J., Ge R., Bell G.W., Regev A., Weinberg R.A. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors// *Nature Genetics*.- 2008.- 40(5).- P.499.
28. Berenjano I.M., Piñeiro R., Castillo S.D., Pearce W., McGranahan N., Dewhurst S.M., Meniel V., Birkbak N.J., Lau E., Sansregret L. Oncogenic PIK3CA induces centrosome amplification and tolerance to genome doubling// *Nature communications*.- 2017.- 8(1).- P.1-15.
29. Bergamaschi A., Kim Y.H., Wang P., Sørli T., Hernandez-Boussard T., Lonning P.E., Tibshirani R., Børresen-Dale A.L., Pollack J.R. Distinct patterns of DNA copy number alteration are associated with different clinicopathological features and gene-expression subtypes of breast cancer// *Genes, Chromosomes and Cancer*.- 2006.- 45(11).- P.1033-40.
30. Bertucci F., Finetti P., Guille A., Adélaïde J., Garnier S., Carbuccia N., Monneur A., Charafe-Jauffret E., Goncalves A., Viens P. Comparative genomic analysis of primary tumors and metastases in breast cancer// *Oncotarget*.- 2016.- 7(19).- P.27208.
31. Bholá N.E., Jansen V.M., Koch J.P., Li H., Formisano L., Williams J.A., Grandis J.R., Arteaga C.L. Treatment of triple-negative breast cancer with TORC1/2 inhibitors sustains a drug-resistant and notch-dependent cancer stem cell population// *Cancer Research*.- 2016.- 76(2).- P.440-52.
32. Bignotti E., Tassi R.A., Calza S., Ravaggi A., Romani C., Rossi E., Falchetti M., Odicino F.E., Pecorelli S., Santin A.D. Differential gene expression profiles between tumor biopsies and

- short-term primary cultures of ovarian serous carcinomas: identification of novel molecular biomarkers for early diagnosis and therapy// *Gynecologic oncology*.- 2006.- 103(2).- P.405-16.
33. Bodenstine T.M., Chandler G.S., Seftor R.E., Seftor E.A., Hendrix M.J. Plasticity underlies tumor progression: role of Nodal signaling// *Cancer and Metastasis Reviews*.- 2016.- 35(1).- P.21-39.
 34. Bodenstine T.M., Chandler G.S., Seftor R.E.B., Seftor E.A., Hendrix M.J.C. Plasticity underlies tumor progression: role of Nodal signaling// *Cancer metastasis reviews*.- 2016.- 35(1).- P.21-39.
 35. Borovski T., Felipe De Sousa E.M., Vermeulen L., Medema J.P. Cancer stem cell niche: the place to be// *Cancer Research*.- 2011.- 71(3).- P.634-9.
 36. Bourguignon L.Y., Spevak C.C., Wong G., Xia W., Gilad E. Hyaluronan-CD44 interaction with protein kinase C ϵ promotes oncogenic signaling by the stem cell marker Nanog and the production of microRNA-21, leading to down-regulation of the tumor suppressor protein PDCD4, anti-apoptosis, and chemotherapy resistance in breast tumor cells// *Journal of Biological Chemistry*.- 2009.- 284(39).- P.26533-46.
 37. Bourguignon L.Y., Wong G., Earle C., Krueger K., Spevak C.C. Hyaluronan-CD44 interaction promotes c-Src-mediated twist signaling, microRNA-10b expression, and RhoA/RhoC up-regulation, leading to Rho-kinase-associated cytoskeleton activation and breast tumor cell invasion// *Journal of Biological Chemistry*.- 2010.- 285(47).- P.36721-35.
 38. Bourillot P.-Y., Savatier P. Krüppel-like transcription factors and control of pluripotency// *BMC biology*.- 2010.- 8(1).- P.125.
 39. Brasó-Maristany F., Filosto S., Catchpole S., Marlow R., Quist J., Francesch-Domenech E., Plumb D.A., Zakka L., Gazinska P., Lippardi G. PIM1 kinase regulates cell death, tumor growth and chemotherapy response in triple-negative breast cancer// *Nature medicine*.- 2016.- 22(11).- P.1303-13.
 40. Brastianos P.K., Carter S.L., Santagata S., Cahill D.P., Taylor-Weiner A., Jones R.T., Van Allen E.M., Lawrence M.S., Horowitz P.M., Cibulskis K. Genomic characterization of brain metastases reveals branched evolution and potential therapeutic targets// *Cancer discovery*.- 2015.- 5(11).- P.1164-77.
 41. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries// *CA: a cancer journal for clinicians*.- 2018.- 68(6).- P.394-424.
 42. Brooks M.D., Wicha M.S. Tumor twitter: cellular communication in the breast cancer stem cell niche// *Cancer discovery*.- 2015.- 5(5).- P.469-71.
 43. Burstein M.D., Tsimelzon A., Poage G.M., Covington K.R., Contreras A., Fuqua S.A., Savage M.I., Osborne C.K., Hilsenbeck S.G., Chang J.C. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer// *Clinical Cancer Research*.- 2015.- 21(7).- P.1688-98.
 44. Cabrera M.C., Hollingsworth R.E., Hurt E.M. Cancer stem cell plasticity and tumor hierarchy// *World journal of stem cells*.- 2015.- 7(1).- P.27.
 45. Cai H., Kumar N., Baudis M. arraymap: A reference resource for genomic copy number imbalances in human malignancies// *PLoS ONE*.- 2012.- 7(5).- P.e36944.
 46. Cai S., Geng S., Jin F., Liu J., Qu C., Chen B. POU5F1/Oct-4 expression in breast cancer tissue is significantly associated with non-sentinel lymph node metastasis// *BMC Cancer*.- 2016.- 16(1).- P.1-8.
 47. Cailleau R., Olive M., Cruciger Q.V. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization// *In Vitro*.- 1978.- 14(11).- P.911-5.
 48. Camarda R., Zhou A.Y., Kohnz R.A., Balakrishnan S., Mahieu C., Anderton B., Eyob H., Kajimura S., Tward A., Krings G., Nomura D.K., Goga A. Inhibition of fatty acid oxidation as a therapy for MYC-overexpressing triple-negative breast cancer// *Nature medicine*.- 2016.- 22(4).- P.427-32.

49. Campbell J.D., Alexandrov A., Kim J., Wala J., Berger A.H., Pedamallu C.S., Shukla S.A., Guo G., Brooks A.N., Murray B.A. Distinct patterns of somatic genome alterations in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas// *Nature Genetics*.- 2016.- 48(6).- P.607.
50. Cao L., Basudan A., Sikora M.J., Bahreini A., Tasdemir N., Levine K.M., Jankowitz R.C., McAuliffe P.F., Dabbs D., Haupt S. Frequent amplifications of ESR1, ERBB2 and MDM4 in primary invasive lobular breast carcinoma// *Cancer Letters*.- 2019.- 461P.21-30.
51. Cariati M., Naderi A., Brown J.P., Smalley M.J., Pinder S.E., Caldas C., Purushotham A.D. Alpha-6 integrin is necessary for the tumorigenicity of a stem cell-like subpopulation within the MCF7 breast cancer cell line// *International Journal of Cancer*.- 2008.- 122(2).- P.298-304.
52. Cazet A.S., Hui M.N., Elsworth B.L., Wu S.Z., Roden D., Chan C.-L., Skhinas J.N., Collot R., Yang J., Harvey K. Targeting stromal remodeling and cancer stem cell plasticity overcomes chemoresistance in triple negative breast cancer// *Nature communications*.- 2018.- 9P.
53. Celià-Terrassa T., Kang Y. Distinctive properties of metastasis-initiating cells// *Genes & development*.- 2016.- 30(8).- P.892-908.
54. Chaffer C.L., Brueckmann I., Scheel C., Kaestli A.J., Wiggins P.A., Rodrigues L.O., Brooks M., Reinhardt F., Su Y., Polyak K. Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state// *Proceedings of the National Academy of Sciences*.- 2011.- 108(19).- P.7950-5.
55. Chaffer C.L., Marjanovic N.D., Lee T., Bell G., Kleer C.G., Reinhardt F., D'Alessio A.C., Young R.A., Weinberg R.A. Poised chromatin at the ZEB1 promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity// *Cell*.- 2013.- 154(1).- P.61-74.
56. Chakravarthy H., Boer B., Desler M., Mallanna S.K., McKeithan T.W., Rizzino A. Identification of DPPA4 and other genes as putative Sox2: Oct-3/4 target genes using a combination of in silico analysis and transcription-based assays// *Journal of Cellular Physiology*.- 2008.- 216(3).- P.651-62.
57. Chambers I., Colby D., Robertson M., Nichols J., Lee S., Tweedie S., Smith A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells// *Cell*.- 2003.- 113(5).- P.643-55.
58. Chang L., Graham P., Hao J., Ni J., Bucci J., Cozzi P., Kearsley J., Li Y. Acquisition of epithelial–mesenchymal transition and cancer stem cell phenotypes is associated with activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in prostate cancer radioresistance// *Cell death & disease*.- 2013.- 4(10).- P.e875-e.
59. Chang Y.S., Jalgaonkar S.P., Middleton J.D., Hai T. Stress-inducible gene Atf3 in the noncancer host cells contributes to chemotherapy-exacerbated breast cancer metastasis// *Proceedings of the National Academy of Sciences*.- 2017.- 114(34).- P.E7159-E68.
60. Charafe-Jauffret E., Ginestier C., Bertucci F., Cabaud O., Wicinski J., Finetti P., Josselin E., Adelaide J., Nguyen T.-T., Monville F. ALDH1-positive cancer stem cells predict engraftment of primary breast tumors and are governed by a common stem cell program// *Cancer Research*.- 2013a.- 73(24).- P.7290-300.
61. Charafe-Jauffret E., Ginestier C., Bertucci F., Cabaud O., Wicinski J., Finetti P., Josselin E., Adelaide J., Nguyen T.-T., Monville F., Jacquemier J., Thomassin-Piana J., Pinna G., Jalaguier A., Lambaudie E., Houvenaeghel G., Xerri L., Harel-Bellan A., Chaffanet M., Viens P., Birnbaum D. ALDH1-Positive Cancer Stem Cells Predict Engraftment of Primary Breast Tumors and Are Governed by a Common Stem Cell Program// *Cancer Research*.- 2013b.- 73(24).- P.7290-300.
62. Chavez K.J., Garimella S.V., Lipkowitz S. Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer// *Breast disease*.- 2010.- 32(1-2).- P.35.

63. Chen C., Zhang Z., Li J., Sun Y. SNHG8 is identified as a key regulator in non-small-cell lung cancer progression sponging to miR-542-3p by targeting CCND1/CDK6// *OncoTargets and therapy*.- 2018.- 11P.6081.
64. Chen D., Bhat-Nakshatri P., Goswami C., Badve S., Nakshatri H. ANTXR1, a stem cell-enriched functional biomarker, connects collagen signaling to cancer stem-like cells and metastasis in breast cancer// *Cancer Research*.- 2013.- 73(18).- P.5821-33.
65. Chen H., Singh R.R., Lu X., Huo L., Yao H., Aldape K., Abraham R., Virani S., Mehrotra M., Mishra B.M. Genome-wide copy number aberrations and HER2 and FGFR1 alterations in primary breast cancer by molecular inversion probe microarray// *Oncotarget*.- 2017.- 8(7).- P.10845.
66. Chen H.J., Huang R.L., Liew P.L., Su P.H., Chen L.Y., Weng Y.C., Chang C.C., Wang Y.C., Chan M.W.Y., Lai H.C. GATA3 as a master regulator and therapeutic target in ovarian high-grade serous carcinoma stem cells// *International Journal of Cancer*.- 2018.- 143(12).- P.3106-19.
67. Chen J., Li Y., Yu T.S., McKay R.M., Burns D.K., Kernie S.G., Parada L.F. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy// *Nature*.- 2012.- 488(7412).- P.522-6.
68. Chen L.-l., Zhang Z.-j., Yi Z.-b., Li J.-j. MicroRNA-211-5p suppresses tumour cell proliferation, invasion, migration and metastasis in triple-negative breast cancer by directly targeting SETBP1// *British Journal of Cancer*.- 2017.- 117(1).- P.78-88.
69. Chen P.-S., Su J.-L., Hung M.-C. Dysregulation of microRNAs in cancer// *Journal of biomedical science*.- 2012.- 19(1).- P.1-8.
70. Chen W., Dong J., Haiech J., Kilhoffer M.-C., Zeniou M. Cancer stem cell quiescence and plasticity as major challenges in cancer therapy// *Stem Cells International*.- 2016.- 2016P.
71. Chen W., Hoffmann A.D., Liu H., Liu X. Organotropism: new insights into molecular mechanisms of breast cancer metastasis// *NPJ precision oncology*.- 2018.- 2(1).- P.1-12.
72. Cheung S.K., Chuang P.-K., Huang H.-W., Hwang-Verslues W.W., Cho C.H.-H., Yang W.-B., Shen C.-N., Hsiao M., Hsu T.-L., Chang C.-F. Stage-specific embryonic antigen-3 (SSEA-3) and β 3GalT5 are cancer specific and significant markers for breast cancer stem cells// *Proceedings of the National Academy of Sciences*.- 2016.- 113(4).- P.960-5.
73. Chi C., Murphy L.C., Hu P. Recurrent copy number alterations in young women with breast cancer// *Oncotarget*.- 2018.- 9(14).- P.11541.
74. Chiotaki R., Polioudaki H., Theodoropoulos P.A. Stem cell technology in breast cancer: current status and potential applications// *Stem cells and cloning: advances and applications*.- 2016.- 9P.17.
75. Cho Y., Kang H.G., Kim S.-J., Lee S., Jee S., Ahn S.G., Kang M.J., Song J.S., Chung J.-Y., Eugene C.Y. Post-translational modification of OCT4 in breast cancer tumorigenesis// *Cell Death & Differentiation*.- 2018a.- 25(10).- P.1781-95.
76. Cho Y., Kang H.G., Kim S.-J., Lee S., Jee S., Ahn S.G., Kang M.J., Song J.S., Chung J.-Y., Eugene C.Y. Post-translational modification of OCT4 in breast cancer tumorigenesis// *Cell Death & Differentiation*.- 2018b.- 25(10).- P.1781.
77. Chuan T., Li T., Yi C. Identification of CXCR4 and CXCL10 as Potential Predictive Biomarkers in Triple Negative Breast Cancer (TNBC)// *Medical Science Monitor*.- 2020.- 26P.
78. Chung Y.R., Kim H.J., Kim M., Ahn S., Park S.Y. Clinical implications of changes in the diversity of c-MYC copy number variation after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer// *Scientific reports*.- 2018.- 8(1).- P.1-10.
79. Cicalese A., Bonizzi G., Pasi C.E., Faretta M., Ronzoni S., Giulini B., Brisken C., Minucci S., Di Fiore P.P., Pelicci P.G. The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells// *Cell*.- 2009.- 138(6).- P.1083-95.
80. Cidado J., Park B.H. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway for breast cancer therapy// *Journal of mammary gland biology and neoplasia*.- 2012.- 17(3-4).- P.205-16.

81. Climent J., Dimitrow P., Fridlyand J., Palacios J., Siebert R., Albertson D.G., Gray J.W., Pinkel D., Lluch A., Martinez-Climent J.A. Deletion of chromosome 11q predicts response to anthracycline-based chemotherapy in early breast cancer// *Cancer Research*.- 2007.- 67(2).- P.818-26.
82. Colaprico A., Silva T.C., Olsen C., Garofano L., Cava C., Garolini D., Sabedot T.S., Malta T.M., Pagnotta S.M., Castiglioni I. TCGAbiolinks: an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data// *Nucleic Acids Research*.- 2016.- 44(8).- P.e71-e.
83. Cole A.J., Fayomi A.P., Anyaeche V.I., Bai S., Buckanovich R.J. An evolving paradigm of cancer stem cell hierarchies: therapeutic implications// *Theranostics*.- 2020.- 10(7).- P.3083-98.
84. Comisso E., Scarola M., Rosso M., Piazza S., Marzinotto S., Ciani Y., Orsaria M., Mariuzzi L., Schneider C., Schoeftner S. OCT4 controls mitotic stability and inactivates the RB tumor suppressor pathway to enhance ovarian cancer aggressiveness// *Oncogene*.- 2017.- 36(30).- P.4253-66.
85. Costello J.F., Plass C., Arap W., Chapman V.M., Held W.A., Berger M.S., Huang H.S., Cavenee W.K. Cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) amplification in human gliomas identified using two-dimensional separation of genomic DNA// *Cancer Research*.- 1997.- 57(7).- P.1250-4.
86. Cotterman R., Knoepfler P.S. N-Myc regulates expression of pluripotency genes in neuroblastoma including *lif*, *klf2*, *klf4*, and *lin28b*// *PLoS ONE*.- 2009.- 4(6).- P.
87. Croker A.K., Goodale D., Chu J., Postenka C., Hedley B.D., Hess D.A., Allan A.L. High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability// *Journal of cellular and molecular medicine*.- 2009.- 13(8b).- P.2236-52.
88. Curtis C., Shah S.P., Chin S.-F., Turashvili G., Rueda O.M., Dunning M.J., Speed D., Lynch A.G., Samarajiwa S., Yuan Y. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups// *Nature*.- 2012.- 486(7403).- P.346-52.
89. Czerwinska P., Kaminska B. Regulation of breast cancer stem cell features// *Contemporary oncology*.- 2015.- 19(1A).- P.A7.
90. D'Angelo R.C., Ouzounova M., Davis A., Choi D., Tchienkam S.M., Kim G., Luther T., Quraishi A.A., Senbabaoglu Y., Conley S.J. Notch reporter activity in breast cancer cell lines identifies a subset of cells with stem cell activity// *Molecular Cancer Therapeutics*.- 2015.- 14(3).- P.779-87.
91. Daenen L.G., Roodhart J.M., van Amersfoort M., Dehnad M., Roessingh W., Ulfman L.H., Derksen P.W., Voest E.E. Chemotherapy enhances metastasis formation via VEGFR-1-expressing endothelial cells// *Cancer Research*.- 2011.- 71(22).- P.6976-85.
92. Daniel M.G., Pereira C.-F., Lemischka I.R., Moore K.A. Making a hematopoietic stem cell// *Trends in cell biology*.- 2016.- 26(3).- P.202-14.
93. Darr H., Mayshar Y., Benvenisty N. Overexpression of *NANOG* in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features// *Development*.- 2006.- 133(6).- P.1193-201.
94. Deckers M., van Dinther M., Buijs J., Que I., Löwik C., van der Pluijm G., ten Dijke P. The tumor suppressor *Smad4* is required for transforming growth factor β -induced epithelial to mesenchymal transition and bone metastasis of breast cancer cells// *Cancer Research*.- 2006.- 66(4).- P.2202-9.
95. Deng N., Goh L.K., Wang H., Das K., Tao J., Tan I.B., Zhang S., Lee M., Wu J., Lim K.H. A comprehensive survey of genomic alterations in gastric cancer reveals systematic patterns of molecular exclusivity and co-occurrence among distinct therapeutic targets// *Gut*.- 2012.- 61(5).- P.673-84.
96. Desmedt C., Zoppoli G., Gundem G., Pruneri G., Larsimont D., Fornili M., Fumagalli D., Brown D., Rothé F., Vincent D. Genomic characterization of primary invasive lobular breast cancer// *Journal of Clinical Oncology*.- 2016.- 34(16).- P.1872-81.

97. Dethlefsen C., Højfeldt G., Hojman P. The role of intratumoral and systemic IL-6 in breast cancer// *Breast Cancer Research and Treatment*.- 2013.- 138(3).- P.657-64.
98. Dickson B.C., Mulligan A.M., Zhang H., Lockwood G., O'Malley F.P., Egan S.E., Reedijk M. High-level JAG1 mRNA and protein predict poor outcome in breast cancer// *Modern Pathology*.- 2007.- 20(6).- P.685-93.
99. Drabsch Y., Ten Dijke P. TGF- β signaling in breast cancer cell invasion and bone metastasis// *Journal of mammary gland biology and neoplasia*.- 2011.- 16(2).- P.97-108.
100. Drake J.M., Strohbehn G., Bair T.B., Moreland J.G., Henry M.D. ZEB1 enhances transendothelial migration and represses the epithelial phenotype of prostate cancer cells// *Molecular Biology of the Cell*.- 2009.- 20(8).- P.2207-17.
101. e Melo F.d.S., Kurtova A.V., Harnoss J.M., Kljavin N., Hoeck J.D., Hung J., Anderson J.E., Storm E.E., Modrusan Z., Koeppen H. A distinct role for Lgr5+ stem cells in primary and metastatic colon cancer// *Nature*.- 2017.- 543(7647).- P.676-80.
102. Eger A., Aigner K., Sonderegger S., Dampier B., Oehler S., Schreiber M., Berx G., Cano A., Beug H., Foisner R. DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells// *Oncogene*.- 2005.- 24(14).- P.2375-85.
103. Fan H.-X., Wang S., Zhao H., Liu N., Chen D., Sun M., Zheng J.-H. Sonic hedgehog signaling may promote invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma by activating MMP-9 and E-cadherin expression// *Medical Oncology*.- 2014.- 31(7).- P.41.
104. Fang S., Yu L., Mei H., Yang J., Gao T., Cheng A., Guo W., Xia K., Liu G. Cisplatin promotes mesenchymal-like characteristics in osteosarcoma through Snail// *Oncology letters*.- 2016.- 12(6).- P.5007-14.
105. Feng G., Beilei Z., Caizhi C., Wen Z. Analysis of CASP12 diagnostic and prognostic values in cervical cancer based on TCGA database// *Bioscience Reports*.- 2019.- 39(12).- P.
106. Findlay J.M., Castro-Giner F., Makino S., Rayner E., Kartsonaki C., Cross W., Kovac M., Ulahannan D., Palles C., Gillies R.S. Differential clonal evolution in oesophageal cancers in response to neo-adjuvant chemotherapy// *Nature communications*.- 2016.- 7P.
107. Fischer K.M., Cottage C.T., Wu W., Din S., Gude N.A., Avitable D., Quijada P., Collins B.L., Fransioli J., Sussman M.A. Enhancement of myocardial regeneration through genetic engineering of cardiac progenitor cells expressing Pim-1 kinase: Fischer: Pim-1 kinase enhances myocardial regeneration// *Circulation*.- 2009.- 120(21).- P.2077.
108. Fischer K.R., Durrans A., Lee S., Sheng J., Li F., Wong S.T., Choi H., El Rayes T., Ryu S., Troeger J. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance// *Nature*.- 2015.- 527(7579).- P.472.
109. Fisher B., Slack N.H., Bross I.D., Investigators C. Cancer of the breast: size of neoplasm and prognosis// *Cancer*.- 1969.- 24(5).- P.1071-80.
110. Foster C.R., Przyborski S.A., Wilson R.G., Hutchison C.J. Lamins as cancer biomarkers. Portland Press Limited// *Biochem Soc Trans*.- 2010.- 38(1).- P.297–300.
111. Fridlyand J., Snijders A.M., Ylstra B., Li H., Olshen A., Segraves R., Dairkee S., Tokuyasu T., Ljung B.M., Jain A.N. Breast tumor copy number aberration phenotypes and genomic instability// *BMC Cancer*.- 2006.- 6(1).- P.96.
112. Fromont G., Godet J., Peyret A., Irani J., Celhay O., Rozet F., Cathelineau X., Cussenot O. 8q24 amplification is associated with Myc expression and prostate cancer progression and is an independent predictor of recurrence after radical prostatectomy// *Human pathology*.- 2013.- 44(8).- P.1617-23.
113. Fu C., Lin R., Yu J., Chang W., Liao G., Chang W., Tseng L., Tsai Y., Yu J., Yu A. A novel oncogenic role of inositol phosphatase SHIP2 in ER-negative breast cancer stem cells: involvement of JNK/vimentin activation// *Stem cells (Dayton, Ohio)*.- 2014.- 32(8).- P.2048-60.
114. Fujimoto T., Tomizawa M., Yokosuka O. siRNA of frizzled-9 suppresses proliferation and motility of hepatoma cells// *International journal of oncology*.- 2009.- 35(4).- P.861-6.
115. Fung F., Cornacchi S.D., Vanniyasingam T., Dao D., Thabane L., Simunovic M., Hodgson N., O'Brien M.A., Reid S., Heller B. Predictors of 5-year local, regional, and distant

- recurrent events in a population-based cohort of breast cancer patients// *The American Journal of Surgery*.- 2017.- 213(2).- P.418-25.
116. Gao C., Zhuang J., Zhou C., Li H., Liu C., Liu L., Feng F., Liu R., Sun C. SNP mutation-related genes in breast cancer for monitoring and prognosis of patients: A study based on the TCGA database// *Cancer medicine*.- 2019.- 8(5).- P.2303-12.
117. Gao R., Davis A., McDonald T.O., Sei E., Shi X., Wang Y., Tsai P.-C., Casasent A., Waters J., Zhang H. Punctuated copy number evolution and clonal stasis in triple-negative breast cancer// *Nature Genetics*.- 2016.- 48(10).- P.1119.
118. García-Zaragoza E., Pérez-Tavarez R., Ballester A., Lafarga V., Jiménez-Reinoso A., Ramírez Á., Murillas R., Gallego M.I. Intraepithelial paracrine Hedgehog signaling induces the expansion of ciliated cells that express diverse progenitor cell markers in the basal epithelium of the mouse mammary gland// *Developmental biology*.- 2012.- 372(1).- P.28-44.
119. Garraway L.A., Lander E.S. Lessons from the cancer genome// *Cell*.- 2013.- 153(1).- P.17-37.
120. Gedye C., Sirskyj D., Lobo N.C., Meens J., Hyatt E., Robinette M., Fleshner N., Hamilton R.J., Kulkarni G., Zlotta A. Cancer stem cells are underestimated by standard experimental methods in clear cell renal cell carcinoma// *Scientific reports*.- 2016.- 6P.25220.
121. Gergely J.E., Dorsey A.E., Dimri G.P., Dimri M. Timosaponin A-III inhibits oncogenic phenotype via regulation of PcG protein BMI1 in breast cancer cells// *Molecular Carcinogenesis*.- 2018.- 57(7).- P.831-41.
122. Gerwing M., Herrmann K., Helfen A., Schliemann C., Berdel W.E., Eisenblätter M., Wildgruber M. The beginning of the end for conventional RECIST—novel therapies require novel imaging approaches// *Nature reviews Clinical oncology*.- 2019.- 16(7).- P.442-58.
123. Gest C., Joimel U., Huang L., Pritchard L.-L., Petit A., Dulong C., Buquet C., Hu C.-Q., Mirshahi P., Laurent M. Rac3 induces a molecular pathway triggering breast cancer cell aggressiveness: differences in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines// *BMC Cancer*.- 2013.- 13(1).- P.1-14.
124. Ghatak S., Misra S., Toole B.P. Hyaluronan oligosaccharides inhibit anchorage-independent growth of tumor cells by suppressing the phosphoinositide 3-kinase/Akt cell survival pathway// *Journal of Biological Chemistry*.- 2002.- 277(41).- P.38013-20.
125. Giannakis M., Mu X.J., Shukla S.A., Qian Z.R., Cohen O., Nishihara R., Bahl S., Cao Y., Amin-Mansour A., Yamauchi M. Genomic correlates of immune-cell infiltrates in colorectal carcinoma// *Cell reports*.- 2016.- 15(4).- P.857-65.
126. Gilliland D.G., Griffin J.D. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia// *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*.- 2002.- 100(5).- P.1532-42.
127. Ginestier C., Hur M.H., Charafe-Jauffret E., Monville F., Dutcher J., Brown M., Jacquemier J., Viens P., Kleer C.G., Liu S. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome// *Cell stem cell*.- 2007.- 1(5).- P.555-67.
128. Ginestier C., Wicinski J., Cervera N., Monville F., Finetti P., Bertucci F., Wicha M.S., Birnbaum D., Charafe-Jauffret E. Retinoid signaling regulates breast cancer stem cell differentiation// *Cell Cycle*.- 2009.- 8(20).- P.3297-302.
129. Gómez-Miragaya J., Díaz-Navarro A., Tonda R., Beltran S., Palomero L., Palafox M., Dobrolecki L.E., Huang C., Vasaiakar S., Zhang B. Chromosome 12p amplification in triple-negative/BRCA1-mutated breast cancer associates with emergence of docetaxel resistance and carboplatin sensitivity// *Cancer Research*.- 2019.- P.canres. 3835.2018.
130. Gong J., Jaiswal R., Mathys J.M., Combes V., Grau G., Bebawy M. Microparticles and their emerging role in cancer multidrug resistance// *Cancer treatment reviews*.- 2012.- 38(3).- P.226-34.
131. Gong W., Sun B., Sun H., Zhao X., Zhang D., Liu T., Zhao N., Gu Q., Dong X., Liu F. Nodal signaling activates the Smad2/3 pathway to regulate stem cell-like properties in breast cancer cells// *American journal of cancer research*.- 2017.- 7(3).- P.503.

132. Grimshaw M.J., Cooper L., Papazisis K., Coleman J.A., Bohnenkamp H.R., Chiapero-Stanke L., Taylor-Papadimitriou J., Burchell J.M. Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells// *Breast Cancer Research*.- 2008.- 10(3).- P.R52.
133. Gujral T.S., Chan M., Peshkin L., Sorger P.K., Kirschner M.W., MacBeath G. A noncanonical Frizzled2 pathway regulates epithelial-mesenchymal transition and metastasis// *Cell*.- 2014.- 159(4).- P.844-56.
134. Guo G., von Meyenn F., Santos F., Chen Y., Reik W., Bertone P., Smith A., Nichols J. Naive pluripotent stem cells derived directly from isolated cells of the human inner cell mass// *Stem cell reports*.- 2016.- 6(4).- P.437-46.
135. Guo L., Sun C., Xu S., Xu Y., Dong Q., Zhang L., Li W., Wang X., Ying G., Guo F. Knockdown of long non-coding RNA linc-ITGB1 inhibits cancer stemness and epithelial-mesenchymal transition by reducing the expression of Snail in non-small cell lung cancer// *Thoracic cancer*.- 2019.- 10(2).- P.128-36.
136. Guo W., Keckesova Z., Donaher J.L., Shibue T., Tischler V., Reinhardt F., Itzkovitz S., Noske A., Zürcher-Härdi U., Bell G. Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state// *Cell*.- 2012.- 148(5).- P.1015-28.
137. Gupta G.P., Massagué J. Cancer metastasis: building a framework// *Cell*.- 2006.- 127(4).- P.679-95.
138. Gupta P.B., Fillmore C.M., Jiang G., Shapira S.D., Tao K., Kuperwasser C., Lander E.S. Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells// *Cell*.- 2011.- 146(4).- P.633-44.
139. Han B., Qu Y., Jin Y., Yu Y., Deng N., Wawrowsky K., Zhang X., Li N., Bose S., Wang Q. FOXC1 activates smoothed-independent hedgehog signaling in basal-like breast cancer// *Cell reports*.- 2015.- 13(5).- P.1046-58.
140. Han J., Hendzel M.J., Allalunis-Turner J. Notch signaling as a therapeutic target for breast cancer treatment?// *Breast Cancer Research*.- 2011.- 13(3).- P.1-8.
141. Harris L.N., Ismaila N., McShane L.M., Andre F., Collyar D.E., Gonzalez-Angulo A.M., Hammond E.H., Kuderer N.M., Liu M.C., Mennel R.G. Use of biomarkers to guide decisions on adjuvant systemic therapy for women with early-stage invasive breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline// *Journal of Clinical Oncology*.- 2016.- P.JCO652289.
142. Harrison H., Farnie G., Brennan K.R., Clarke R.B. Breast cancer stem cells: something out of notching?// *Cancer Research*.- 2010a.- 70(22).- P.8973-6.
143. Harrison H., Farnie G., Howell S.J., Rock R.E., Stylianou S., Brennan K.R., Bundred N.J., Clarke R.B. Regulation of breast cancer stem cell activity by signaling through the Notch4 receptor// *Cancer Research*.- 2010b.- 70(2).- P.709-18.
144. Hartkopf A.D., Stefanescu D., Wallwiener M., Hahn M., Becker S., Solomayer E.-F., Fehm T.N., Brucker S.Y., Taran F.-A. Tumor cell dissemination to the bone marrow and blood is associated with poor outcome in patients with metastatic breast cancer// *Breast Cancer Research and Treatment*.- 2014.- 147(2).- P.345-51.
145. Hayward J., Carbone P., Heusen J., Kumaoka S., Segaloff A., Rubens R. Assessment of response to therapy in advanced breast cancer// *British Journal of Cancer*.- 1977.- 35(3).- P.292.
146. He X., Li S., Shi W., Lin Q., Ma J., Liu Y., Feng T., Cao X. Cyclin A1 is associated with poor prognosis in oesophageal squamous cell carcinoma// *Oncology letters*.- 2019.- 18(1).- P.706-12.
147. Herreros-Villanueva M., Zhang J., Koenig A., Abel E., Smyrk T., Bamlet W., De Narvajas A.A., Gomez T., Simeone D., Bujanda L. SOX2 promotes dedifferentiation and imparts stem cell-like features to pancreatic cancer cells// *Oncogenesis*.- 2013.- 2(8).- P.e61.
148. Hodge D.R., Hurt E.M., Farrar W.L. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer// *Eur J Cancer*.- 2005.- 41(16).- P.2502-12.

149. Holliday D.L., Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research// *Breast Cancer Research*.- 2011.- 13(4).- P.1-7.
150. Horlings H.M., Lai C., Nuyten D.S., Halfwerk H., Kristel P., van Beers E., Joosse S.A., Klijn C., Nederlof P.M., Reinders M.J. Integration of DNA copy number alterations and prognostic gene expression signatures in breast cancer patients// *Clinical Cancer Research*.- 2010.- 16(2).- P.651-63.
151. Horn S., Figl A., Rachakonda P.S., Fischer C., Sucker A., Gast A., Kadel S., Moll I., Nagore E., Hemminki K. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma// *Science*.- 2013.- 339(6122).- P.959-61.
152. Horwitz K.B., Mockus M.B., Lessey B.A. Variant T47D human breast cancer cells with high progesterone-receptor levels despite estrogen and antiestrogen resistance// *Cell*.- 1982.- 28(3).- P.633-42.
153. Hosseini H., Obradović M.M., Hoffmann M., Harper K.L., Sosa M.S., Werner-Klein M., Nanduri L.K., Werno C., Ehrl C., Maneck M. Early dissemination seeds metastasis in breast cancer// *Nature*.- 2016.- 540(7634).- P.552-8.
154. Hoyt A., Moran A., Granger C., Sedani A., Saigh S., Brown J., Galoian K. PRP-1 significantly decreases the ALDH^{high} cancer stem cell population and regulates the aberrant Wnt/ β -catenin pathway in human chondrosarcoma JJ012 cells// *Oncology reports*.- 2019.- 42(1).- P.103-14.
155. Huang F.W., Hodis E., Xu M.J., Kryukov G.V., Chin L., Garraway L.A. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma// *Science*.- 2013.- 339(6122).- P.957-9.
156. Huang M., Li Y., Zhang H., Nan F. Breast cancer stromal fibroblasts promote the generation of CD44⁺ CD24⁻ cells through SDF-1/CXCR4 interaction// *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*.- 2010.- 29(1).- P.1-10.
157. Huang N., Shah P.K., Li C. Lessons from a decade of integrating cancer copy number alterations with gene expression profiles// *Briefings in bioinformatics*.- 2012.- 13(3).- P.305-16.
158. Hwang-Verslues W.W., Kuo W.-H., Chang P.-H., Pan C.-C., Wang H.-H., Tsai S.-T., Jeng Y.-M., Shew J.-Y., Kung J.T., Chen C.-H. Multiple lineages of human breast cancer stem/progenitor cells identified by profiling with stem cell markers// *PLoS ONE*.- 2009.- 4(12).- P.e8377.
159. Hwang S.S., Kim L.K., Lee G.R., Flavell R.A. Role of OCT-1 and partner proteins in T cell differentiation// *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*.- 2016.- 1859(6).- P.825-31.
160. Ioannidis P., Mahaira L., Papadopoulou A., Teixeira M.R., Heim S., Andersen J.A., Evangelou E., Dafni U., Pandis N., Trangas T. 8q24 Copy number gains and expression of the c-myc mRNA stabilizing protein CRD-BP in primary breast carcinomas// *International Journal of Cancer*.- 2003.- 104(1).- P.54-9.
161. Jafari N., Nazeri S., Enferadi S.T. Parthenolide reduces metastasis by inhibition of vimentin expression and induces apoptosis by suppression elongation factor α -1 expression// *Phytomedicine*.- 2018.- 41P.67-73.
162. Jang G.-B., Kim J.-Y., Cho S.-D., Park K.-S., Jung J.-Y., Lee H.-Y., Hong I.-S., Nam J.-S. Blockade of Wnt/ β -catenin signaling suppresses breast cancer metastasis by inhibiting CSC-like phenotype// *Scientific reports*.- 2015.- 5P.12465.
163. Javle M., Li Y., Tan D., Dong X., Chang P., Kar S., Li D. Biomarkers of TGF- β signaling pathway and prognosis of pancreatic cancer// *PLoS ONE*.- 2014.- 9(1).- P.e85942.
164. Jeng K.-S., Sheen I.-S., Jeng W.-J., Yu M.-C., Hsiau H.-I., Chang F.-Y. High expression of Sonic Hedgehog signaling pathway genes indicates a risk of recurrence of breast carcinoma// *OncoTargets and therapy*.- 2014.- 7P.79.
165. Jia Y., Zhou J., Luo X., Chen M., Chen Y., Wang J., Xiong H., Ying X., Hu W., Zhao W. KLF4 overcomes tamoxifen resistance by suppressing MAPK signaling pathway and predicts good prognosis in breast cancer// *Cellular signalling*.- 2018.- 42P.165-75.

166. Jiang D., Jin H., Zuo J., Kong Y., Zhang X., Dong Q., Xu Z., Li Y. Potential biomarkers screening to predict side effects of dexamethasone in different cancers// *Molecular Genetics & Genomic Medicine*.- 2020.- P.e1160.
167. Jiang J., Hui C.-c. Hedgehog signaling in development and cancer// *Developmental cell*.- 2008.- 15(6).- P.801-12.
168. John T., Caballero O.L., Svobodová S.J., Kong A., Chua R., Browning J., Fortunato S., Deb S., Hsu M., Gedye C.A. ECSA/DPPA2 is an Embryo-Cancer Antigen that Is Coexpressed with Cancer-Testis Antigens in Non-Small Cell Lung Cancer// *Clinical Cancer Research*.- 2008.- 14(11).- P.3291-8.
169. Johnson R.H., Hu P., Fan C., Anders C.K. Gene expression in “young adult type” breast cancer: a retrospective analysis// *Oncotarget*.- 2015.- 6(15).- P.13688.
170. Jönsson G., Staaf J., Vallon-Christersson J., Ringnér M., Holm K., Hegardt C., Gunnarsson H., Fagerholm R., Strand C., Agnarsson B.A. Genomic subtypes of breast cancer identified by array-comparative genomic hybridization display distinct molecular and clinical characteristics// *Breast Cancer Research*.- 2010.- 12, Article number: R42.- P.1-14.
171. Juang Y.L., Jeng Y.M., Chen C.L., Lien H.C. PRRX2 as a novel TGF- β -induced factor enhances invasion and migration in mammary epithelial cell and correlates with poor prognosis in breast cancer// *Molecular Carcinogenesis*.- 2016.- 55(12).- P.2247-59.
172. Kaczynski J., Cook T., Urrutia R. Sp1-and Krüppel-like transcription factors// *Genome biology*.- 2003.- 4(2).- P.206.
173. Kakarala M., Wicha M.S. Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy// *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*.- 2008.- 26(17).- P.2813.
174. Kalbe B., Schulz V.M., Schlimm M., Philippou S., Jovancevic N., Jansen F., Scholz P., Lübbert H., Jarocki M., Faissner A. Helional-induced activation of human olfactory receptor 2J3 promotes apoptosis and inhibits proliferation in a non-small-cell lung cancer cell line// *European journal of cell biology*.- 2017.- 96(1).- P.34-46.
175. Kan L., Israsena N., Zhang Z., Hu M., Zhao L.-R., Jalali A., Sahni V., Kessler J.A. Sox1 acts through multiple independent pathways to promote neurogenesis// *Developmental biology*.- 2004.- 269(2).- P.580-94.
176. Kang J.U. Chromosome 8q as the most frequent target for amplification in early gastric carcinoma// *Oncology letters*.- 2014.- 7(4).- P.1139-43.
177. Kang R., Zhou Y., Tan S., Zhou G., Aagaard L., Xie L., Bünger C., Bolund L., Luo Y. Mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells retain adequate osteogenicity and chondrogenicity but less adipogenicity// *Stem cell research & therapy*.- 2015.- 6(1).- P.1-14.
178. Kaplan E.L., Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations// *Journal of the American statistical association*.- 1958.- 53(282).- P.457-81.
179. Karagiannis G.S., Pastoriza J.M., Wang Y., Harney A.S., Entenberg D., Pignatelli J., Sharma V.P., Xue E.A., Cheng E., D’Alfonso T.M. Neoadjuvant chemotherapy induces breast cancer metastasis through a TMEM-mediated mechanism// *Science Translational Medicine*.- 2017.- 9(397).- P.eaan0026.
180. Kaseb H.O., Fohrer-Ting H., Lewis D.W., Lagasse E., Gollin S.M. Identification, expansion and characterization of cancer cells with stem cell properties from head and neck squamous cell carcinomas// *Experimental cell research*.- 2016.- 348(1).- P.75-86.
181. Kaufmann M., von Minckwitz G., Mamounas E.P., Cameron D., Carey L.A., Cristofanilli M., Denkert C., Eiermann W., Gnant M., Harris J.R. Recommendations from an international consensus conference on the current status and future of neoadjuvant systemic therapy in primary breast cancer// *Annals of surgical oncology*.- 2012.- 19(5).- P.1508-16.
182. Kaufmann M., von Minckwitz G., Mamounas E.P., Cameron D., Carey L.A., Cristofanilli M., Denkert C., Eiermann W., Gnant M., Harris J.R. Recommendations from an international

- consensus conference on the current status and future of neoadjuvant systemic therapy in primary breast cancer// *Annals of surgical oncology*.- 2012.- P.1-9.
183. Ke Z., Caiping S., Qing Z., Xiaojing W. Sonic hedgehog–Gli1 signals promote epithelial–mesenchymal transition in ovarian cancer by mediating PI3K/AKT pathway// *Medical Oncology*.- 2015.- 32(1).- P.368.
184. Keeton E.K., McEachern K., Dillman K.S., Palakurthi S., Cao Y., Grondine M.R., Kaur S., Wang S., Chen Y., Wu A. AZD1208, a potent and selective pan-Pim kinase inhibitor, demonstrates efficacy in preclinical models of acute myeloid leukemia// *Blood*.- 2014.- 123(6).- P.905-13.
185. Khramtsov A.I., Khramtsova G.F., Tretiakova M., Huo D., Olopade O.I., Goss K.H. Wnt/ β -catenin pathway activation is enriched in basal-like breast cancers and predicts poor outcome// *The American journal of pathology*.- 2010.- 176(6).- P.2911-20.
186. Killela P.J., Reitman Z.J., Jiao Y., Bettegowda C., Agrawal N., Diaz L.A., Friedman A.H., Friedman H., Gallia G.L., Giovannella B.C. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal// *Proceedings of the National Academy of Sciences*.- 2013.- 110(15).- P.6021-6.
187. Kim C.-K., Saxena M., Maharjan K., Song J.J., Shroyer K.R., Bialkowska A.B., Shivdasani R.A., Yang V.W. Krüppel-like Factor 5 Regulates Stemness, Lineage Specification, and Regeneration of Intestinal Epithelial Stem Cells// *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*.- 2020.- 9(4).- P. 587-609
188. Kim C., Gao R., Sei E., Brandt R., Hartman J., Hatschek T., Crosetto N., Foukakis T., Navin N.E. Chemoresistance evolution in triple-negative breast cancer delineated by single-cell sequencing// *Cell*.- 2018.- 173(4).- P.879-93. e13.
189. Kim d.Y., Park E.Y., Chang E., Kang H.-G., Koo Y., Lee E.J., Ko J.Y., Kong H.K., Chun K.-H., Park J.H. A novel miR-34a target, protein kinase D1, stimulates cancer stemness and drug resistance through GSK3/ β -catenin signaling in breast cancer// *Oncotarget*.- 2016.- 7(12).- P.14791.
190. Kim S.-H., Singh S.V. The role of polycomb group protein Bmi-1 and Notch4 in breast cancer stem cell inhibition by benzyl isothiocyanate// *Breast Cancer Research and Treatment*.- 2015.- 149(3).- P.681-92.
191. Kim S.T., Sohn I., Do I.-G., Jang J., Kim S.H., JUNG S.H., Park J.O., Park Y.S., Talasaz A., Lee J. Transcriptome analysis of CD133-positive stem cells and prognostic value of survivin in colorectal cancer// *Cancer Genomics-Proteomics*.- 2014.- 11(5).- P.259-66.
192. Kim T.-M., Xi R., Luquette L.J., Park R.W., Johnson M.D., Park P.J. Functional genomic analysis of chromosomal aberrations in a compendium of 8000 cancer genomes// *Genome research*.- 2013.- 23(2).- P.217-27.
193. Kishino E., Ogata R., Saitoh W., Koike Y., Ohta Y., Kanomata N., Kurebayashi J. Anti-cell growth and anti-cancer stem cell activity of the CDK4/6 inhibitor palbociclib in breast cancer cells// *Breast Cancer*.- 2019.- P.1-11.
194. Kiyoi H. FLT3 Inhibitors. *Chemotherapy for Leukemia*: Springer; 2017. p. 167-79.
195. Klahan S., Wu M.-S., Hsi E., Huang C.-C., Hou M.-F., Chang W.-C. Computational analysis of mRNA expression profiles identifies the ITG family and PIK3R3 as crucial genes for regulating triple negative breast cancer cell migration// *BioMed Research International*.- 2014.- 2014P.
196. Kolben T., Peröbner I., Fernsebner K., Lechner F., Geissler C., Ruiz-Heinrich L., Capovilla S., Jochum M., Neth P. Dissecting the impact of frizzled receptors in Wnt/ β -catenin signaling of human mesenchymal stem cells// *Biological chemistry*.- 2012.- 393(12).- P.1433-47.
197. Koren S., Reavie L., Couto J.P., De Silva D., Stadler M.B., Roloff T., Britschgi A., Eichlisberger T., Kohler H., Aina O. PIK3CA H1047R induces multipotency and multi-lineage mammary tumours// *Nature*.- 2015.- 525(7567).- P.114-8.
198. Kotiyal S., Bhattacharya S. Breast cancer stem cells, EMT and therapeutic targets// *Biochemical and biophysical research communications*.- 2014.- 453(1).- P.112-6.

199. Kozłowski L., Zakrzewska I., Tokajuk P., Wojtukiewicz M. Concentration of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) in blood serum of breast cancer patients// *Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku* (1995).- 2003.- 48P.82-4.
200. Kraus P., Sivakamasundari V., Yu H.B., Xing X., Lim S.L., Adler T., Pimentel J.A.A., Becker L., Bohla A., Garrett L. Pleiotropic functions for transcription factor zscan10// *PLoS ONE*.- 2014.- 9(8).- e104568.- P.1-14.
201. Krebs A.M., Mitschke J., Losada M.L., Schmalhofer O., Boerries M., Busch H., Boettcher M., Mougiakakos D., Reichardt W., Bronsert P. The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer// *Nature Cell Biology*.- 2017.- 19(5).- P.518-29.
202. Kreso A., O'Brien C.A., van Galen P., Gan O.I., Notta F., Brown A.M., Ng K., Ma J., Wienholds E., Dunant C. Variable clonal repopulation dynamics influence chemotherapy response in colorectal cancer// *Science*.- 2013.- 339(6119).- P.543-8.
203. Krishnamurthy N., Kurzrock R. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors// *Cancer treatment reviews*.- 2018.- 62P.50-60.
204. Labelle M., Begum S., Hynes R.O. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis// *Cancer Cell*.- 2011.- 20(5).- P.576-90.
205. Lamouille S., Xu J., Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition// *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.- 2014.- 15(3).- P.178-96.
206. Landau D.A., Tausch E., Böttcher S., Stewart C., Bozic I., Leischner I., Rosebrock D., Taylor-Weiner A., Mertens D., Sougnez C. Quantitative clonal dynamics define mechanisms of CLL evolution in response to combination chemotherapy// *Blood*.- 2015.- 126(23).- P.362.
207. Lasfargues E., Coutinho W., Dion A. A human breast tumor cell line (BT-474) that supports mouse mammary tumor virus replication// *In Vitro*.- 1979.- 15(9).- P.723-9.
208. Lasfargues E.Y., Coutinho W.G., Redfield E.S. Isolation of two human tumor epithelial cell lines from solid breast carcinomas// *Journal of the National Cancer Institute*.- 1978.- 61(4).- P.967-78.
209. Le Magnen C., Bubendorf L., Ruiz C., Zlobec I., Bachmann A., Heberer M., Spagnoli G.C., Wyler S., Mengus C. Klf4 transcription factor is expressed in the cytoplasm of prostate cancer cells// *Eur J Cancer*.- 2013.- 49(4).- P.955-63.
210. Leccia F., Del Vecchio L., Mariotti E., Di Noto R., Morel A.-P., Puisieux A., Salvatore F., Ansieau S. ABCG2, a novel antigen to sort luminal progenitors of BRCA1-breast cancer cells// *Molecular cancer*.- 2014.- 13(1).- P.213.
211. Lee K.-H., Lotterman C., Karikari C., Omura N., Feldmann G., Habbe N., Goggins M.G., Mendell J.T., Maitra A. Epigenetic silencing of MicroRNA miR-107 regulates cyclin-dependent kinase 6 expression in pancreatic cancer// *Pancreatology*.- 2009.- 9(3).- P.293-301.
212. Lee S.H., Do S.I., Lee H.J., Kang H.J., Koo B.S., Lim Y.C. Notch1 signaling contributes to stemness in head and neck squamous cell carcinoma// *Laboratory Investigation*.- 2016.- 96(5).- P.508-16.
213. Lefort K., Ostano G.P., Mello-Grand M., Calpini V., Scatolini M., Farsetti A., Dotto G.P., Chiorino G. Dual tumor suppressing and promoting function of Notch1 signaling in human prostate cancer// *Oncotarget*.- 2016.- 7(30).- P.48011.
214. Letessier A., Sircoulomb F., Ginestier C., Cervera N., Monville F., Gelsi-Boyer V., Esterni B., Geneix J., Finetti P., Zemmour C. Frequency, prognostic impact, and subtype association of 8p12, 8q24, 11q13, 12p13, 17q12, and 20q13 amplifications in breast cancers// *BMC Cancer*.- 2006.- 6(1).- P.245.
215. Li J., Ying Y., Xie H., Jin K., Yan H., Wang S., Xu M., Xu X., Wang X., Yang K. Dual regulatory role of CCNA2 in modulating CDK6 and MET-mediated cell-cycle pathway and EMT progression is blocked by miR-381-3p in bladder cancer// *The FASEB Journal*.- 2019.- 33(1).- P.1374-88.

216. Li M., Han Y., Zhou H., Li X., Lin C., Zhang E., Chi X., Hu J., Xu H. Transmembrane protein 170B is a novel breast tumorigenesis suppressor gene that inhibits the Wnt/ β -catenin pathway// *Cell death & disease*.- 2018.- 9(2).- P.1-15.
217. Li M., Yang X., Zhang J., Shi H., Hang Q., Huang X., Liu G., Zhu J., He S., Wang H. Effects of EHD2 interference on migration of esophageal squamous cell carcinoma// *Medical Oncology*.- 2013.- 30(1).- P.396.
218. Li R., Liang J., Ni S., Zhou T., Qing X., Li H., He W., Chen J., Li F., Zhuang Q. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts// *Cell stem cell*.- 2010.- 7(1).- P.51-63.
219. Liang Y.-J., Wang C.-Y., Wang I.-A., Chen Y.-W., Li L.-T., Lin C.-Y., Ho M.-Y., Chou T.-L., Wang Y.-H., Chiou S.-P. Interaction of glycosphingolipids GD3 and GD2 with growth factor receptors maintains breast cancer stem cell phenotype// *Oncotarget*.- 2017.- 8(29).- P.47454.
220. Lim E., Vaillant F., Wu D., Forrest N.C., Pal B., Hart A.H., Asselin-Labat M.-L., Gyorki D.E., Ward T., Partanen A. Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers// *Nature medicine*.- 2009.- 15(8).- P.907-13.
221. Lin F., Zhang H., Huang J., Xiong C. Substrate stiffness coupling TGF- β 1 modulates migration and traction force of MDA-MB-231 human breast cancer cells in vitro// *ACS Biomaterials Science & Engineering*.- 2018.- 4(4).- P.1337-45.
222. Lin T., Ding Y.Q., Li J.M. Overexpression of Nanog protein is associated with poor prognosis in gastric adenocarcinoma// *Med Oncol*.- 2012.- 29(2).- P.878-85.
223. Lin Y., Zhong Y., Guan H., Zhang X., Sun Q. CD44+/CD24-phenotype contributes to malignant relapse following surgical resection and chemotherapy in patients with invasive ductal carcinoma// *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*.- 2012.- 31(1).- P.59.
224. Litviakov N.V., Bychkov V.A., Stakheeva M.N., Ibragimova M.K., Nebova Y.A., Tsyganov M.M., Tashireva L.A., Bondar L.N., Garbukov E.Y., Slonimskaya E.M. Breast tumor cell subpopulation with expression of Myc and Oct4 proteins// *Journal of Molecular Histology*.- 2020.- 25P.
225. Liu C.-W., Li C.-H., Yi-Jen P., Cheng Y.-W., Chen H.-W., Liao P.-L., Kang J.-J., Yeng M.-H. Snail regulates Nanog status during the epithelial–mesenchymal transition via the Smad1/Akt/GSK3 β signaling pathway in non-small-cell lung cancer// *Oncotarget*.- 2014.- 5(11).- P.3880.
226. Liu H., Patel M.R., Prescher J.A., Patsialou A., Qian D., Lin J., Wen S., Chang Y.-F., Bachmann M.H., Shimono Y. Cancer stem cells from human breast tumors are involved in spontaneous metastases in orthotopic mouse models// *Proceedings of the National Academy of Sciences*.- 2010.- 107(42).- P.18115-20.
227. Liu L., Zhu H., Liao Y., Wu W., Liu L., Liu L., Wu Y., Sun F., Lin H.-w. Inhibition of Wnt/ β -catenin pathway reverses multi-drug resistance and EMT in Oct4+/Nanog+ NSCLC cells// *Biomedicine & Pharmacotherapy*.- 2020.- 127P.110225.
228. Liu R., Wang X., Chen G.Y., Dalerba P., Gurney A., Hoey T., Sherlock G., Lewicki J., Shedden K., Clarke M.F. The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells// *New England Journal of Medicine*.- 2007.- 356(3).- P.217-26.
229. Liu S., Dontu G., Mantle I.D., Patel S., Ahn N.-s., Jackson K.W., Suri P., Wicha M.S. Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells// *Cancer Research*.- 2006.- 66(12).- P.6063-71.
230. Liu T., Sun B., Zhao X., Zhao X., Sun T., Gu Q., Yao Z., Dong X., Zhao N., Liu N. CD133+ cells with cancer stem cell characteristics associates with vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer// *Oncogene*.- 2013.- 32(5).- P.544-53.
231. Liu T., Zhang X., Shang M., Zhang Y., Xia B., Niu M., Liu Y., Pang D. Dysregulated expression of Slug, vimentin, and E-cadherin correlates with poor clinical outcome in patients with basal-like breast cancer// *Journal of Surgical Oncology*.- 2013.- 107(2).- P.188-94.

232. Liu Y., Cai Q., Bao P.-P., Su Y., Cai H., Wu J., Ye F., Guo X., Zheng W., Zheng Y. Tumor tissue microRNA expression in association with triple-negative breast cancer outcomes// *Breast Cancer Research and Treatment*.- 2015.- 152(1).- P.183-91.
233. Liu Y., Nan F., Lu K., Wang Y., Liu Y., Wei S., Wu R., Wang Y. Identification of key genes in endometrioid endometrial adenocarcinoma via TCGA database// *Cancer Biomarkers*.- 2018.- 21(1).- P.11-21.
234. Lloyd-Lewis B., Harris O.B., Watson C.J., Davis F.M. Mammary stem cells: premise, properties, and perspectives// *Trends in cell biology*.- 2017.- 27(8).- P.556-67.
235. Lo P.-K., Kanojia D., Liu X., Singh U.P., Berger F.G., Wang Q., Chen H. CD49f and CD61 identify Her2/neu-induced mammary tumor-initiating cells that are potentially derived from luminal progenitors and maintained by the integrin-TGF β signaling// *Oncogene*.- 2012.- 31(21).- P.2614-26.
236. Loh Y.-H., Wu Q., Chew J.-L., Vega V.B., Zhang W., Chen X., Bourque G., George J., Leong B., Liu J. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells// *Nature Genetics*.- 2006.- 38(4).- P.431-40.
237. Loibl S., Treue D., Budczies J., Weber K., Stenzinger A., Schmitt W.D., Weichert W., Jank P., Furlanetto J., Klauschen F. Mutational diversity and therapy response in breast cancer-a sequencing analysis in the neoadjuvant GeparSepto trial// *Clinical Cancer Research*.- 2019.- P.clincanres. 3258.2018.
238. Lv X., Wang Y., Song Y., Pang X., Li H. Association between ALDH1+/CD133+ stem-like cells and tumor angiogenesis in invasive ductal breast carcinoma// *Oncology letters*.- 2016.- 11(3).- P.1750-6.
239. MacDonald J.R., Ziman R., Yuen R.K., Feuk L., Scherer S.W. The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome// *Nucleic Acids Research*.- 2014.- 42(D1).- P.D986-D92.
240. Magbanua M.J.M., Sosa E.V., Roy R., Eisenbud L.E., Scott J.H., Olshen A., Pinkel D., Rugo H.S., Park J.W. Genomic profiling of isolated circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients// *Cancer Research*.- 2013.- 73(1).- P.30-40.
241. Malladi S., Macalinao D.G., Jin X., He L., Basnet H., Zou Y., de Stanchina E., Massagué J. Metastatic latency and immune evasion through autocrine inhibition of WNT// *Cell*.- 2016.- 165(1).- P.45-60.
242. Mandal G., Biswas S., Chowdhury S.R., Chatterjee A., Purohit S., Khamaru P., Chakraborty S., Mandal P.K., Gupta A., de la Mare J.-A. Heterodimer formation by Oct4 and Smad3 differentially regulates epithelial-to-mesenchymal transition-associated factors in breast cancer progression// *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*.- 2018.- 1864(6).- P.2053-66.
243. Mani S.A., Guo W., Liao M.-J., Eaton E.N., Ayyanan A., Zhou A.Y., Brooks M., Reinhard F., Zhang C.C., Shipitsin M. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells// *Cell*.- 2008.- 133(4).- P.704-15.
244. Mardis E.R. Next-generation sequencing platforms// *Annual review of analytical chemistry*.- 2013.- 6P.287-303.
245. Mascré G., Dekoninck S., Drogat B., Youssef K.K., Brohée S., Sotiropoulou P.A., Simons B.D., Blanpain C. Distinct contribution of stem and progenitor cells to epidermal maintenance// *Nature*.- 2012.- 489(7415).- P.257-62.
246. Matsui W.H. Cancer stem cell signaling pathways// *Medicine*.- 2016.- 95(Suppl 1).- P.8-19.
247. McGranahan N., Burrell R.A., Endesfelder D., Novelli M.R., Swanton C. Cancer chromosomal instability: therapeutic and diagnostic challenges// *EMBO reports*.- 2012.- 13(6).- P.528-38.
248. Medina P.P., Castillo S.D., Blanco S., Sanz-Garcia M., Largo C., Alvarez S., Yokota J., Gonzalez-Neira A., Benitez J., Clevers H.C. The SRY-HMG box gene, SOX4, is a target of gene

- amplification at chromosome 6p in lung cancer// *Human Molecular Genetics*.- 2009.- 18(7).- P.1343-52.
249. Meidhof S., Brabletz S., Lehmann W., Preca B.T., Mock K., Ruh M., Schüler J., Berthold M., Weber A., Burk U. ZEB 1-associated drug resistance in cancer cells is reversed by the class I HDAC inhibitor mocetinostat// *EMBO molecular medicine*.- 2015.- 7(6).- P.831-47.
250. Mendrzyk F., Radlwimmer B., Joos S., Kokocinski F., Benner A., Stange D.E., Neben K., Fiegler H., Carter N.P., Reifenberger G. Genomic and protein expression profiling identifies CDK6 as novel independent prognostic marker in medulloblastoma// *Journal of Clinical Oncology*.- 2005.- 23(34).- P.8853-62.
251. Merino D., Best S.A., Asselin-Labat M.-L., Vaillant F., Pal B., Dickins R.A., Anderson R.L., Strasser A., Bouillet P., Lindeman G.J. Pro-apoptotic Bim suppresses breast tumor cell metastasis and is a target gene of SNAI2// *Oncogene*.- 2015.- 34(30).- P.3926-34.
252. Mermelshtein A., Gerson A., Walfisch S., Delgado B., Shechter-Maor G., Delgado J., Fich A., Gheber L. Expression of D-type cyclins in colon cancer and in cell lines from colon carcinomas// *British Journal of Cancer*.- 2005.- 93(3).- P.338-45.
253. Meyer M.J., Fleming J.M., Lin A.F., Hussnain S.A., Ginsburg E., Vonderhaar B.K. CD44posCD49fhiCD133/2hi defines xenograft-initiating cells in estrogen receptor–negative breast cancer// *Cancer Research*.- 2010.- 70(11).- P.4624-33.
254. Milanovic M., Fan D.N., Belenki D., Däbritz J.H.M., Zhao Z., Yu Y., Dörr J.R., Dimitrova L., Lenze D., Barbosa I.A.M. Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness// *Nature*.- 2018.- 553(7686).- P.96-100.
255. Mitsuishi Y., Taguchi K., Kawatani Y., Shibata T., Nukiwa T., Aburatani H., Yamamoto M., Motohashi H. Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming// *Cancer Cell*.- 2012.- 22(1).- P.66-79.
256. Moelans C.B., van Maldegem C.M., van der Wall E., van Diest P.J. Copy number changes at 8p11-12 predict adverse clinical outcome and chemo-and radiotherapy response in breast cancer// *Oncotarget*.- 2018.- 9(24).- P.17078.
257. Mohammed M.K., Shao C., Wang J., Wei Q., Wang X., Collier Z., Tang S., Liu H., Zhang F., Huang J. Wnt/ β -catenin signaling plays an ever-expanding role in stem cell self-renewal, tumorigenesis and cancer chemoresistance// *Genes & Diseases*.- 2016.- 3(1).- P.11-40.
258. Monk M., Hitchins M., Hawes S. Differential expression of the embryo/cancer gene ECS A (DPPA 2), the cancer/testis gene BORIS and the pluripotency structural gene OCT 4, in human preimplantation development// *MHR: Basic science of reproductive medicine*.- 2008.- 14(6).- P.347-55.
259. Morel A.-P., Lièvre M., Thomas C., Hinkal G., Ansieau S., Puisieux A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition// *PLoS ONE*.- 2008.- 3(8).- P.e2888.
260. Morita R., Hirohashi Y., Torigoe T., Ito-Inoda S., Takahashi A., Mariya T., Asanuma H., Tamura Y., Tsukahara T., Kanaseki T. Olfactory Receptor Family 7 Subfamily C Member 1 Is a Novel Marker of Colon Cancer–Initiating Cells and Is a Potent Target of Immunotherapy// *Clinical Cancer Research*.- 2016.- 22(13).- P.3298-309.
261. Mukherjee S., Manna A., Bhattacharjee P., Mazumdar M., Saha S., Chakraborty S., Guha D., Adhikary A., Jana D., Gorain M. Non-migratory tumorigenic intrinsic cancer stem cells ensure breast cancer metastasis by generation of CXCR4+ migrating cancer stem cells// *Oncogene*.- 2016.- 35(37).- P.4937-48.
262. Müller A., Homey B., Soto H., Ge N., Catron D., Buchanan M.E., McClanahan T., Murphy E., Yuan W., Wagner S.N. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis// *Nature*.- 2001.- 410(6824).- P.50-6.
263. Müller M., Hermann P.C., Liebau S., Weidgang C., Seufferlein T., Kleger A., Perkhof L. The role of pluripotency factors to drive stemness in gastrointestinal cancer// *Stem cell research*.- 2016.- 16(2).- P.349-57.

264. Muntimadugu E., Kumar R., Saladi S., Rafeeqi T.A., Khan W. CD44 targeted chemotherapy for co-eradication of breast cancer stem cells and cancer cells using polymeric nanoparticles of salinomycin and paclitaxel// *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*.- 2016.- 143P.532-46.
265. Murria R., Palanca S., de Juan I., Egoavil C., Alenda C., García-Casado Z., Juan M.J., Sánchez A.B., Santaballa A., Chirivella I. Methylation of tumor suppressor genes is related with copy number aberrations in breast cancer// *American journal of cancer research*.- 2015.- 5(1).- P.375.
266. Murugaesu N., Wilson G.A., Birkbak N.J., Watkins T., McGranahan N., Kumar S., Abbassi-Ghadi N., Salm M., Mitter R., Horswell S. Tracking the genomic evolution of esophageal adenocarcinoma through neoadjuvant chemotherapy// *Cancer discovery*.- 2015.- P.CD-15-0412.
267. Musgrove E.A., Caldon C.E., Barraclough J., Stone A., Sutherland R.L. Cyclin D as a therapeutic target in cancer// *Nature Reviews Cancer*.- 2011.- 11(8).- P.558-72.
268. Nagahata T., Shimada T., Harada A., Nagai H., Onda M., Yokoyama S., Shiba T., Jin E., Kawanami O., Emi M. Amplification, up-regulation and over-expression of DVL-1, the human counterpart of the Drosophila disheveled gene, in primary breast cancers// *Cancer Science*.- 2003.- 94(6).- P.515-8.
269. Navin N., Kendall J., Troge J., Andrews P., Rodgers L., McIndoo J., Cook K., Stepansky A., Levy D., Esposito D. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing// *Nature*.- 2011.- 472(7341).- P.90-4.
270. Naxerova K., Jain R.K. Using tumour phylogenetics to identify the roots of metastasis in humans// *Nature reviews Clinical oncology*.- 2015.- 12(5).- P.258.
271. Naylor T.L., Greshock J., Wang Y., Colligon T., Yu Q., Clemmer V., Zaks T.Z., Weber B.L. High resolution genomic analysis of sporadic breast cancer using array-based comparative genomic hybridization// *Breast Cancer Res*.- 2005.- 7(6).- P.R1186-98.
272. Nazari F., Pearson A.T., Nör J.E., Jackson T.L. A mathematical model for IL-6-mediated, stem cell driven tumor growth and targeted treatment// *PLoS computational biology*.- 2018.- 14(1).- P.e1005920.
273. Neelakantan D., Zhou H., Oliphant M.U., Zhang X., Simon L.M., Henke D.M., Shaw C.A., Wu M.-F., Hilsenbeck S.G., White L.D. EMT cells increase breast cancer metastasis via paracrine GLI activation in neighbouring tumour cells// *Nature communications*.- 2017.- 8P.15773.
274. Nettersheim D., Jostes S., Sharma R., Schneider S., Hofmann A., Ferreira H.J., Hoffmann P., Kristiansen G., Esteller M.B., Schorle H. BMP inhibition in seminomas initiates acquisition of pluripotency via NODAL signaling resulting in reprogramming to an embryonal carcinoma// *PLoS Genet*.- 2015.- 11(7).- P.e1005415.
275. Network C.G.A. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours// *Nature*.- 2012.- 490(7418).- P.61.
276. Neuhaus E.M., Zhang W., Gelis L., Deng Y., Noldus J., Hatt H. Activation of an olfactory receptor inhibits proliferation of prostate cancer cells// *Journal of Biological Chemistry*.- 2009.- 284(24).- P.16218-25.
277. Ng C.K., Bidard F.-C., Piscuoglio S., Geyer F.C., Lim R.S., De Bruijn I., Shen R., Pareja F., Berman S.H., Wang L. Genetic Heterogeneity in Therapy-Naïve Synchronous Primary Breast Cancers and Their Metastases// *Clinical Cancer Research*.- 2017.- 23(15).-P.4402-4416.
278. Ng C.K., Pemberton H.N., Reis-Filho J.S. Breast cancer intratumor genetic heterogeneity: causes and implications//.- 2012.- 8.-P. 1021-1032.
279. Nieto M.A., Huang R.Y.-J., Jackson R.A., Thiery J.P. EMT: 2016// *Cell*.- 2016.- 166(1).- P.21-45.
280. Nigam A. Breast cancer stem cells, pathways and therapeutic perspectives 2011// *Indian Journal of Surgery*.- 2013.- 75(3).- P.170-80.

281. Nishino K., Umezawa A. DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells// *Human cell*.- 2016.- 29(3).- P.97-100.
282. Nusse R., Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities// *Cell*.- 2017.- 169(6).- P.985-99.
283. O'Brien C.A., Kreso A., Jamieson C.H. Cancer stem cells and self-renewal// *Clinical Cancer Research*.- 2010.- 16(12).- P.3113-20.
284. Ojo D., Lin X., Wu Y., Cockburn J., Bane A., Tang D. Polycomb complex protein BMI1 confers resistance to tamoxifen in estrogen receptor positive breast cancer// *Cancer Letters*.- 2018.- 426P.4-13.
285. Okamoto A., Chikamatsu K., Sakakura K., Hatsushika K., Takahashi G., Masuyama K. Expansion and characterization of cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck// *Oral oncology*.- 2009.- 45(7).- P.633-9.
286. Omata Y., Nakamura S., Koyama T., Yasui T., Hirose J., Izawa N., Matsumoto T., Imai Y., Seo S., Kurokawa M. Identification of Nedd9 as a TGF- β -Smad2/3 target gene involved in RANKL-induced osteoclastogenesis by comprehensive analysis// *PLoS ONE*.- 2016.- 11(6).- P.e0157992.
287. Oshima K., Khiabani H., da Silva-Almeida A.C., Tzoneva G., Abate F., Ambesi-Impiombato A., Sanchez-Martin M., Carpenter Z., Penson A., Perez-Garcia A. Mutational landscape, clonal evolution patterns, and role of RAS mutations in relapsed acute lymphoblastic leukemia// *Proceedings of the National Academy of Sciences*.- 2016.- P.201608420.
288. Oskarsson T., Batlle E., Massagué J. Metastatic stem cells: sources, niches, and vital pathways// *Cell stem cell*.- 2014.- 14(3).- P.306-21.
289. Ota I., Li X.-Y., Hu Y., Weiss S.J. Induction of a MT1-MMP and MT2-MMP-dependent basement membrane transmigration program in cancer cells by Snail1// *Proceedings of the National Academy of Sciences*.- 2009.- 106(48).- P.20318-23.
290. Ouspenskaia T., Matos I., Mertz A.F., Fiore V.F., Fuchs E. WNT-SHH antagonism specifies and expands stem cells prior to niche formation// *Cell*.- 2016.- 164(1-2).- P.156-69.
291. Oyinlade O., Wei S., Kammers K., Liu S., Wang S., Ma D., Huang Z.-y., Qian J., Zhu H., Wan J. Analysis of KLF4 regulated genes in cancer cells reveals a role of DNA methylation in promoter-enhancer interactions// *Epigenetics*.- 2018.- 13(7).- P.751-68.
292. Page K., Guttery D.S., Fernandez-Garcia D., Hills A., Hastings R.K., Luo J., Goddard K., Shahin V., Woodley-Barker L., Rosales B.M. Next generation sequencing of circulating cell-free DNA for evaluating mutations and gene amplification in metastatic breast cancer// *Clinical Chemistry*.- 2017.- 63(2).- P.532-41.
293. Pandolfi P.P. Breast cancer—loss of PTEN predicts resistance to treatment// *N Engl J Med*.- 2004.- 351(22).- P.2337-8.
294. Paranjape A.N., Balaji S.A., Mandal T., Krushik E.V., Nagaraj P., Mukherjee G., Rangarajan A. Bmi1 regulates self-renewal and epithelial to mesenchymal transition in breast cancer cells through Nanog// *BMC Cancer*.- 2014.- 14(1).- P.785.
295. Park S.-Y., Lee C.-J., Choi J.-H., Kim J.-H., Kim J.-W., Kim J.-Y., Nam J.-S. The JAK2/STAT3/CCND2 Axis promotes colorectal Cancer stem cell persistence and radioresistance// *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*.- 2019.- 38(1).- P.1-18.
296. Patel N., Garikapati K.R., Makani V.K.K., Nair A.D., Vangara N., Bhadra U., Pal Bhadra M. Regulating BMI1 expression via miRNAs promote mesenchymal to epithelial transition (MET) and sensitizes breast cancer cell to chemotherapeutic drug// *PLoS ONE*.- 2018.- 13(2).- P.e0190245.
297. Patel S.A., Ramkissoon S.H., Bryan M., Pliner L.F., Dontu G., Patel P.S., Amiri S., Pine S.R., Rameshwar P. Delineation of breast cancer cell hierarchy identifies the subset responsible for dormancy// *Scientific reports*.- 2012.- 2P.906.
298. Peitzsch C., Tyutyunnykova A., Pantel K., Dubrovskaya A., editors. Cancer stem cells: the root of tumor recurrence and metastases// *Seminars in cancer biology*.- 2017.- 44.- P.10-24.

299. Pérez-Caro M., Bermejo-Rodríguez C., González-Herrero I., Sánchez-Beato M., Piris M., Sánchez-García I. Transcriptomal profiling of the cellular response to DNA damage mediated by Slug (Snai2)// *British Journal of Cancer*.- 2008.- 98(2).- P.480-8.
300. Perou C.M., Sørlie T., Eisen M.B., van de Rijn M., Jeffrey S.S., Rees C.A., Pollack J.R., Ross D.T., Johnsen H., Akslen L.A. Molecular portraits of human breast tumours// *Nature*.- 2000.- 406(6797).- P.747-52.
301. Petersen M., Pardali E., van der Horst G., Cheung H., Van Den Hoogen C., Van Der Pluijm G., Ten Dijke P. Smad2 and Smad3 have opposing roles in breast cancer bone metastasis by differentially affecting tumor angiogenesis// *Oncogene*.- 2010.- 29(9).- P.1351-61.
302. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR// *Nucleic Acids Res*.- 2001.- 29(9).- P.e45.
303. Phung T.L., Du W., Xue Q., Ayyaswamy S., Gerald D., Antonello Z., Nhek S., Perruzzi C.A., Acevedo I., Ramanna-Valmiki R. Akt1 and akt3 exert opposing roles in the regulation of vascular tumor growth// *Cancer Research*.- 2015.- 75(1).- P.40-50.
304. Pirozzi G., Tirino V., Camerlingo R., Franco R., La Rocca A., Liguori E., Martucci N., Paino F., Normanno N., Rocco G. Epithelial to mesenchymal transition by TGFβ-1 induction increases stemness characteristics in primary non small cell lung cancer cell line// *PLoS ONE*.- 2011.- 6(6).- P.e21548.
305. Plaks V., Kong N., Werb Z. The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells?// *Cell stem cell*.- 2015.- 16(3).- P.225-38.
306. Polyak K., Weinberg R.A. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits// *Nature Reviews Cancer*.- 2009.- 9(4).- P.265-73.
307. Posada I.M., Lectez B., Sharma M., Oetken-Lindholm C., Yetukuri L., Zhou Y., Aittokallio T., Abankwa D. Rapalogs can promote cancer cell stemness in vitro in a Galectin-1 and H-ras-dependent manner// *Oncotarget*.- 2017.- 8(27).- P.44550.
308. Prowell T.M., Pazdur R. Pathological complete response and accelerated drug approval in early breast cancer// *New England Journal of Medicine*.- 2012.- 366(26).- P.2438-41.
309. Quail D.F., Walsh L.A., Zhang G., Findlay S.D., Moreno J., Fung L., Ablack A., Lewis J.D., Done S.J., Hess D.A., Postovit L.-M. Embryonic Protein Nodal Promotes Breast Cancer Vascularization// *Cancer Research*.- 2012a.- 72(15).- P.3851-63.
310. Quail D.F., Zhang G., Walsh L.A., Siegers G.M., Dieters-Castator D.Z., Findlay S.D., Broughton H., Putman D.M., Hess D.A., Postovit L.-M. Embryonic morphogen nodal promotes breast cancer growth and progression// *PLoS ONE*.- 2012b.- 7(11).- P.e48237-e.
311. Quan Q., Wang X., Lu C., Ma W., Wang Y., Xia G., Wang C., Yang G. Cancer stem-like cells with hybrid epithelial/mesenchymal phenotype leading the collective invasion// *Cancer Science*.- 2020.- 111(2).- P.467.
312. Quist S., Eckardt M., Kriesche A., Gollnick H. Expression of epidermal stem cell markers in skin and adnexal malignancies// *British Journal of Dermatology*.- 2016.- 175(3).- P.520-30.
313. Radtke F., Raj K. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor?// *Nature Reviews Cancer*.- 2003.- 3(10).- P.756-67.
314. Rahal O.M., Machado H.L., Montales M.T.E., Pabona J.M.P., Heard M.E., Nagarajan S., Simmen R.C. Dietary suppression of the mammary CD29hiCD24+ epithelial subpopulation and its cytokine/chemokine transcriptional signatures modifies mammary tumor risk in MMTV-Wnt1 transgenic mice// *Stem cell research*.- 2013.- 11(3).- P.1149-62.
315. Rahman M.M., Hazan A., Selway J.L., Herath D.S., Harwood C.A., Pirzado M.S., Atkar R., Kelsell D.P., Linton K.J., Philpott M.P. A novel mechanism for activation of GLI1 by nuclear SMO that escapes anti-SMO inhibitors// *Cancer Research*.- 2018.- 78(10).- P.2577-88.
316. Ramaswamy B., Lu Y., Teng K.-y., Nuovo G., Li X., Shapiro C.L., Majumder S. Hedgehog signaling is a novel therapeutic target in tamoxifen-resistant breast cancer aberrantly activated by PI3K/AKT pathway// *Cancer Research*.- 2012.- 72(19).- P.5048-59.

317. Reedijk M., Pinnaduwege D., Dickson B.C., Mulligan A.M., Zhang H., Bull S.B., O'Malley F.P., Egan S.E., Andrulis I.L. JAG1 expression is associated with a basal phenotype and recurrence in lymph node-negative breast cancer// *Breast Cancer Research and Treatment.*- 2008.- 111(3).- P.439-48.
318. Rettori M.M., de Carvalho A.C., Bomfim Longo A.L., de Oliveira C.Z., Kowalski L.P., Carvalho A.L., Vettore A.L. Prognostic significance of TIMP3 hypermethylation in post-treatment salivary rinse from head and neck squamous cell carcinoma patients// *Carcinogenesis.*- 2013.- 34(1).- P.20-7.
319. Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells// *Nature.*- 2001.- 414(6859).- P.105-11.
320. Rhim A.D., Mirek E.T., Aiello N.M., Maitra A., Bailey J.M., McAllister F., Reichert M., Beatty G.L., Rustgi A.K., Vonderheide R.H. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation// *Cell.*- 2012.- 148(1-2).- P.349-61.
321. Rhodes D.R., Yu J., Shanker K., Deshpande N., Varambally R., Ghosh D., Barrette T., Pandey A., Chinnaiyan A.M. Large-scale meta-analysis of cancer microarray data identifies common transcriptional profiles of neoplastic transformation and progression// *Proceedings of the National Academy of Sciences.*- 2004.- 101(25).- P.9309-14.
322. Riggi N., Aguet M., Stamenkovic I. Cancer metastasis: a reappraisal of its underlying mechanisms and their relevance to treatment// *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease.*- 2018.- 13P.117-40.
323. Rogeri C.D., Silveira H.C.S., Causin R.L., Villa L.L., Stein M.D., de Carvalho A.C., Arantes L.M.R.B., Scapulatempo-Neto C., Possati-Resende J.C., Antoniazzi M. Methylation of the hsa-miR-124, SOX1, TERT, and LMX1A genes as biomarkers for precursor lesions in cervical cancer// *Gynecologic oncology.*- 2018.- 150(3).- P.545-51.
324. Rose-John S., Scheller J., Elson G., Jones S.A. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer// *Journal of leukocyte biology.*- 2006.- 80(2).- P.227-36.
325. Rousseaux S., Debernardi A., Jacquiau B., Vitte A.-L., Vesin A., Nagy-Mignotte H., Moro-Sibilot D., Brichon P.-Y., Lantuejoul S., Hainaut P. Ectopic activation of germline and placental genes identifies aggressive metastasis-prone lung cancers// *Science Translational Medicine.*- 2013.- 5(186).- P.186ra66-ra66.
326. Roy M., Pear W.S., Aster J.C. The multifaceted role of Notch in cancer// *Current opinion in genetics & development.*- 2007.- 17(1).- P.52-9.
327. Roychoudhury S., Ghuwalewala S., Ghatak D., Das S., Das P., Butti R., Gorain M., Kundu G.C. MiR-146a-dependent regulation of CD24/AKT/ β -catenin axis drives stem cell phenotype in oral cancer// *bioRxiv.*- 2018.- P.429068.
328. Ryoo I.-g., Choi B.-h., Kwak M.-K. Activation of NRF2 by p62 and proteasome reduction in sphere-forming breast carcinoma cells// *Oncotarget.*- 2015.- 6(10).- P.8167.
329. Saha S., Choi H., Kim B., Dayem A., Yang G., Kim K., Yin Y., Cho S. KRT19 directly interacts with β -catenin/RAC1 complex to regulate NUMB-dependent NOTCH signaling pathway and breast cancer properties// *Oncogene.*- 2017.- 36(3).- P.332-49.
330. Sahasrabudhe A.A. BMI1: A Biomarker of Hematologic Malignancies// *Biomarkers in cancer.*- 2016.- 8P.65.
331. Salgado B.S., Rocha R.M., Soares F.A., Gärtner F., Rocha N.S. Snai-1 and Epithelial-Mesenchymal Transition-Related Protein Immunoexpression in Canine Mammary Carcinomas// *Advances in Breast Cancer Research.*- 2014.- 3(04).- P.111.
332. Salhia B., Kiefer J., Ross J.T., Metapally R., Martinez R.A., Johnson K.N., DiPerna D.M., Paquette K.M., Jung S., Nasser S. Integrated genomic and epigenomic analysis of breast cancer brain metastasis// *PLoS ONE.*- 2014a.- 9(1).- P.e85448.
333. Salhia B., Kiefer J., Ross J.T., Metapally R., Martinez R.A., Johnson K.N., DiPerna D.M., Paquette K.M., Jung S., Nasser S. Integrated genomic and epigenomic analysis of breast cancer brain metastasis// *PLoS ONE.*- 2014b.- 9(1).- P.

334. Samur M.K., Yan Z., Wang X., Cao Q., Munshi N.C., Li C., Shah P.K. canEvolve: a web portal for integrative oncogenomics// *PLoS ONE*.- 2013.- 8(2).- e56228.- P.1-10.
335. Sánchez-Tilló E., Liu Y., de Barrios O., Siles L., Fanlo L., Cuatrecasas M., Darling D.S., Dean D.C., Castells A., Postigo A. EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness// *Cellular and Molecular Life Sciences*.- 2012.- 69(20).- P.3429-56.
336. Sang H., Wang D., Zhao S., Zhang J., Zhang Y., Xu J., Chen X., Nie Y., Zhang K., Zhang S. Dppa3 is critical for Lin28a-regulated ES cells naïve–primed state conversion// *Journal of molecular cell biology*.- 2019.- 11(6).- P.474-88.
337. Sansone P., Berishaj M., Rajasekhar V.K., Ceccarelli C., Chang Q., Strillacci A., Savini C., Shapiro L., Bowman R.L., Mastroleo C. Evolution of cancer stem-like cells in endocrine-resistant metastatic breast cancers is mediated by stromal microvesicles// *Cancer Research*.- 2017.- 77(8).- P.1927-41.
338. Sansone P., Ceccarelli C., Berishaj M., Chang Q., Rajasekhar V.K., Perna F., Bowman R.L., Vidone M., Daly L., Nnoli J. Self-renewal of CD133 hi cells by IL6/Notch3 signalling regulates endocrine resistance in metastatic breast cancer// *Nature communications*.- 2016.- 7(1).- P.1-10.
339. Sansone P., Storci G., Giovannini C., Pandolfi S., Pianetti S., Taffurelli M., Santini D., Ceccarelli C., Chieco P., Bonafe M. p66Shc/Notch-3 interplay controls self-renewal and hypoxia survival in human stem/progenitor cells of the mammary gland expanded in vitro as mammospheres// *Stem Cells*.- 2007.- 25(3).- P.807-15.
340. Santa-Maria C.A., Gradishar W.J. Changing treatment paradigms in metastatic breast cancer: lessons learned// *JAMA oncology*.- 2015.- 1(4).- P.528-34.
341. Sarkar A., Hochedlinger K. The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate// *Cell stem cell*.- 2013.- 12(1).- P.15-30.
342. Sarkar R., Hunter I., Rajaganeshan R., Perry S., Guillou P., Jayne D. Expression of cyclin D2 is an independent predictor of the development of hepatic metastasis in colorectal cancer// *Colorectal Disease*.- 2010.- 12(4).- P.316-23.
343. Sarkar T.R., Battula V.L., Werden S.J., Vijay G.V., Ramirez-Peña E.Q., Taube J.H., Chang J.T., Miura N., Porter W., Sphyris N. GD3 synthase regulates epithelial–mesenchymal transition and metastasis in breast cancer// *Oncogene*.- 2015.- 34(23).- P.2958-67.
344. Sato R., Semba T., Saya H., Arima Y. Concise review: stem cells and epithelial-mesenchymal transition in cancer: biological implications and therapeutic targets// *Stem Cells*.- 2016.- 34(8).- P.1997-2007.
345. Schabath H., Runz S., Joumaa S., Altevogt P. CD24 affects CXCR4 function in pre-B lymphocytes and breast carcinoma cells// *Journal of cell science*.- 2006.- 119(2).- P.314-25.
346. Schade B., Lesurf R., Sanguin-Gendreau V., Bui T., Deblois G., O'Toole S.A., Millar E.K., Zardawi S.J., Lopez-Knowles E., Sutherland R.L. β -Catenin signaling is a critical event in ErbB2-mediated mammary tumor progression// *Cancer Research*.- 2013.- 73(14).- P.4474-87.
347. Schaffner F., Yokota N., Carneiro-Lobo T., Kitano M., Schaffer M., Anderson G.M., Mueller B.M., Esmen C.T., Ruf W. Endothelial protein C receptor function in murine and human breast cancer development// *PLoS ONE*.- 2013.- 8(4).- P.e61071.
348. Scheicher R., Hoelbl-Kovacic A., Bellutti F., Tigan A.-S., Prchal-Murphy M., Heller G., Schneckleithner C., Salazar-Roa M., Zöschbauer-Müller S., Zuber J. CDK6 as a key regulator of hematopoietic and leukemic stem cell activation// *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*.- 2015.- 125(1).- P.90-101.
349. Schepers A.G., Snippert H.J., Stange D.E., van den Born M., van Es J.H., van de Wetering M., Clevers H. Lineage tracing reveals Lgr5+ stem cell activity in mouse intestinal adenomas// *Science Signalling*.- 2012.- 337(6095).- P.730.
350. Schmidt K., Schinke T., Haberland M., Priemel M., Schilling A.F., Mueldner C., Rueger J.M., Sock E., Wegner M., Amling M. The high mobility group transcription factor Sox8 is a negative regulator of osteoblast differentiation// *The Journal of cell biology*.- 2005.- 168(6).- P.899-910.

351. Schoeftner S., Scarola M., Comisso E., Schneider C., Benetti R. An Oct4-pRb axis, controlled by MiR-335, integrates stem cell self-renewal and cell cycle control// *Stem Cells*.- 2013.- 31(4).- P.717-28.
352. Schoenhals M., Kassambara A., De Vos J., Hose D., Moreaux J., Klein B. Embryonic stem cell markers expression in cancers// *Biochemical and biophysical research communications*.- 2009.- 383(2).- P.157-62.
353. Schwartz G.F., Hortobagyi G.N. Proceedings of the consensus conference on neoadjuvant chemotherapy in carcinoma of the breast, April 26–28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania// *The Breast Journal*.- 2004.- 10(4).- P.273-94.
354. Scully O.J., Bay B.-H., Yip G., Yu Y. Breast cancer metastasis// *Cancer Genomics-Proteomics*.- 2012.- 9(5).- P.311-20.
355. Senbanjo L.T., Chellaiiah M.A. CD44: a multifunctional cell surface adhesion receptor is a regulator of progression and metastasis of cancer cells// *Frontiers in cell and developmental biology*.- 2017.- 5P.18.
356. Sethi N., Kang Y. Notch signalling in cancer progression and bone metastasis// *British Journal of Cancer*.- 2011.- 105(12).- P.1805-10.
357. Shah S.P., Roth A., Goya R., Oloumi A., Ha G., Zhao Y., Turashvili G., Ding J., Tse K., Haffari G. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers// *Nature*.- 2012.- 486(7403).- P.395-9.
358. Shan J., Shen J., Liu L., Xia F., Xu C., Duan G., Xu Y., Ma Q., Yang Z., Zhang Q., Ma L., Liu J., Xu S., Yan X., Bie P., Cui Y., Bian X.-w., Qian C. Nanog regulates self-renewal of cancer stem cells through the insulin-like growth factor pathway in human hepatocellular carcinoma// *Hepatology*.- 2012.- 56(3).- P.1004-14.
359. Shankar J., Nabi I.R. Actin cytoskeleton regulation of epithelial mesenchymal transition in metastatic cancer cells// *PLoS ONE*.- 2015.- 10(7).- e0132759.- P.1-12.
360. Shao J., Fan W., Ma B., Wu Y. Breast cancer stem cells expressing different stem cell markers exhibit distinct biological characteristics// *Molecular medicine reports*.- 2016.- 14(6).- P.4991-8.
361. Shen R., Jia R., Liu W., Lin Q., Hai Y., He Z. The function and regulation of BMP6 in various kinds of stem cells// *Current pharmaceutical design*.- 2015.- 21(25).- P.3634-43.
362. Shi P., Liu W., Wang H., Li F., Zhang H., Wu Y., Kong Y., Zhou Z., Wang C., Chen W. Metformin suppresses triple-negative breast cancer stem cells by targeting KLF5 for degradation// *Cell discovery*.- 2017.- 3(1).- P.1-13.
363. Shibue T., Weinberg R.A. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications// *Nature reviews Clinical oncology*.- 2017.- 14.- P.611-629.
364. Shu J., Wu C., Wu Y., Li Z., Shao S., Zhao W., Tang X., Yang H., Shen L., Zuo X. Induction of pluripotency in mouse somatic cells with lineage specifiers// *Cell*.- 2013a.- 153(5).- P.963-75.
365. Shu J., Wu C., Wu Y., Li Z., Shao S., Zhao W., Tang X., Yang H., Shen L., Zuo X., Yang W., Shi Y., Chi X., Zhang H., Gao G., Shu Y., Yuan K., He W., Tang C., Zhao Y., Deng H. Induction of Pluripotency in Mouse Somatic Cells with Lineage Specifiers// *Cell*.- 2013b.- 153(5).- P.963-75.
366. Sigurdsson V., Hilmarsdottir B., Sigmundsdottir H., Fridriksdottir A.J., Ringnér M., Villadsen R., Borg A., Agnarsson B.A., Petersen O.W., Magnusson M.K. Endothelial induced EMT in breast epithelial cells with stem cell properties// *PLoS ONE*.- 2011.- 6(9).- P.e23833.
367. Silva G.O., He X., Parker J.S., Gatz M.L., Carey L.A., Hou J.P., Moulder S.L., Marcom P.K., Ma J., Rosen J.M. Cross-species DNA copy number analyses identifies multiple 1q21-q23 subtype-specific driver genes for breast cancer// *Breast Cancer Research and Treatment*.- 2015.- 152(2).- P.347-56.
368. Simões B.M., O'Brien C.S., Eyre R., Silva A., Yu L., Sarmiento-Castro A., Alférez D.G., Spence K., Santiago-Gómez A., Chemi F. Anti-estrogen resistance in human breast tumors is

- driven by JAG1-NOTCH4-dependent cancer stem cell activity// *Cell reports*.- 2015.- 12(12).- P.1968-77.
369. Smid M., Hoes M., Sieuwerts A.M., Sleijfer S., Zhang Y., Wang Y., Foekens J.A., Martens J.W. Patterns and incidence of chromosomal instability and their prognostic relevance in breast cancer subtypes// *Breast Cancer Research and Treatment*.- 2011.- 128(1).- P.23-30.
370. Smith J.S., Tachibana I., Pohl U., Lee H.K., Thanarajasingam U., Portier B.P., Ueki K., Ramaswamy S., Billings S.J., Mohrenweiser H.W. A transcript map of the chromosome 19q-arm glioma tumor suppressor region// *Genomics*.- 2000.- 64(1).- P.44-50.
371. Solzak J.P., Atale R.V., Hancock B.A., Sinn A.L., Pollok K.E., Jones D.R., Radovich M. Dual PI3K and Wnt pathway inhibition is a synergistic combination against triple negative breast cancer// *NPJ breast cancer*.- 2017.- 3(1).- P.1-8.
372. Song S., Ajani J.A., Honjo S., Maru D.M., Chen Q., Scott A.W., Heallen T.R., Xiao L., Hofstetter W.L., Weston B. Hippo coactivator YAP1 upregulates SOX9 and endows esophageal cancer cells with stem-like properties// *Cancer Research*.- 2014.- 74(15).- P.4170-82.
373. Sopik V., Narod S.A. The relationship between tumour size, nodal status and distant metastases: on the origins of breast cancer// *Breast Cancer Research and Treatment*.- 2018.- 170(3).- P.647-56.
374. Soriano J.V., Uyttendaele H., Kitajewski J., Montesano R. Expression of an activated Notch4 (int-3) oncoprotein disrupts morphogenesis and induces an invasive phenotype in mammary epithelial cells in vitro// *International Journal of Cancer*.- 2000.- 86(5).- P.652-9.
375. Soteriou D., Fuchs Y. A matter of life and death: stem cell survival in tissue regeneration and tumour formation// *Nature Reviews Cancer*.- 2018.- 18(3).- P.187.
376. Sotiriou C., Rothé F., Maetens M.M., Fumagalli D., Brown D.N., Salgado R., Bradbury I., Puztai L., Harbeck N., Ignatiadis M., editors. Copy number aberration analysis to predict response to neoadjuvant anti-HER2 therapy: results from the NeoALTTO phase III trial. SABCS Abstracts2View™ Portal; 2017.
377. Sotiriou C., Wirapati P., Loi S., Harris A., Fox S., Smeds J., Nordgren H., Farmer P., Praz V., Haibe-Kains B. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis// *Journal of the National Cancer Institute*.- 2006.- 98(4).- P.262-72.
378. Soule H., Vazquez J., Long A., Albert S., Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma// *Journal of the National Cancer Institute*.- 1973.- 51(5).- P.1409-16.
379. Sprouffske K., Kerr G., Li C., Prahallad A., Rebmann R., Waehle V., Naumann U., Bitter H., Jensen M.R., Hofmann F. Genetic heterogeneity and clonal evolution during metastasis in breast cancer patient-derived tumor xenograft models// *Computational and structural biotechnology journal*.- 2020.- 18P.323-31.
380. Sreekumar A., Roarty K., Rosen J.M. The mammary stem cell hierarchy: a looking glass into heterogeneous breast cancer landscapes// *Endocrine-related cancer*.- 2015.- 22(6).- P.T161.
381. Steinway S.N., Zañudo J.G., Ding W., Rountree C.B., Feith D.J., Loughran T.P., Albert R. Network modeling of TGF β signaling in hepatocellular carcinoma epithelial-to-mesenchymal transition reveals joint sonic hedgehog and Wnt pathway activation// *Cancer Research*.- 2014.- 74(21).- P.5963-77.
382. Stoletov K., Kato H., Zardoujian E., Kelber J., Yang J., Shattil S., Klemke R. Visualizing extravasation dynamics of metastatic tumor cells// *Journal of cell science*.- 2010.- 123(13).- P.2332-41.
383. Stratton M.R., Campbell P.J., Futreal P.A. The cancer genome// *Nature*.- 2009.- 458(7239).- P.719-24.
384. Strizzi L., Hardy K.M., Margaryan N.V., Hillman D.W., Seftor E.A., Chen B., Geiger X.J., Thompson E.A., Lingle W.L., Andorfer C.A., Perez E.A., Hendrix M.J.C. Potential for the embryonic morphogen Nodal as a prognostic and predictive biomarker in breast cancer// *Breast Cancer Research*.- 2012.- 14(3).- P.R75.

385. Sullivan N., Sasser A., Axel A.E., Vesuna F., Raman V., Ramirez N., Oberyshyn T., Hall B. Interleukin-6 induces an epithelial–mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells// *Oncogene*.- 2009.- 28(33).- P.2940-7.
386. Sun J., Lu Z., Deng Y., Wang W., He Q., Yan W., Wang A. Up-regulation of INSR/IGF1R by C-myc promotes TSCC tumorigenesis and metastasis through the NF- κ B pathway// *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*.- 2018.- 1864(5).- P.1873-82.
387. Sun M., Yang C., Zheng J., Wang M., Chen M., Le D.Q.S., Kjemis J., Bunger C.E. Enhanced efficacy of chemotherapy for breast cancer stem cells by simultaneous suppression of multidrug resistance and antiapoptotic cellular defense// *Acta biomaterialia*.- 2015.- 28P.171-82.
388. Suva M.L., Rheinbay E., Gillespie S.M., Patel A.P., Wakimoto H., Rabkin S.D., Riggi N., Chi A.S., Cahill D.P., Nahed B.V. Reconstructing and reprogramming the tumor-propagating potential of glioblastoma stem-like cells// *Cell*.- 2014.- 157(3).- P.580-94.
389. Suzuki R., Fukui T., Kishimoto M., Miyamoto S., Takahashi Y., Takeo M., Mitsuyama T., Sakaguchi Y., Uchida K., Nishio A. Smad2/3 linker phosphorylation is a possible marker of cancer stem cells and correlates with carcinogenesis in a mouse model of colitis-associated colorectal cancer// *Journal of Crohn's and Colitis*.- 2015.- 9(7).- P.565-74.
390. Sweeney E.E., McDaniel R.E., Maximov P.Y., Fan P., Jordan V.C. Models and mechanisms of acquired antihormone resistance in breast cancer: significant clinical progress despite limitations// *Hormone molecular biology and clinical investigation*.- 2012.- 9(2).- P.143-63.
391. Tabarestani S., Ghaderian S.M.H., Rezvani H., Mirfakhraie R., Ebrahimi A., Attarian H., Rafat J., Ghadyani M., Alavi H.A., Kamalian N. Prognostic and predictive value of copy number alterations in invasive breast cancer as determined by multiplex ligation-dependent probe amplification// *Cellular Oncology*.- 2014.- 37(2).- P.107-18.
392. Tadesse S., Yu M., Kumarasiri M., Le B.T., Wang S. Targeting CDK6 in cancer: State of the art and new insights// *Cell Cycle*.- 2015.- 14(20).- P.3220-30.
393. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors// *Cell*.- 2006.- 126(4).- P.663-76.
394. Tallack M.R., Perkins A.C. Three fingers on the switch: Kruppel-like factor 1 regulation of γ -globin to β -globin gene switching// *Current opinion in hematology*.- 2013.- 20(3).- P.193-200.
395. Talora C., Sgroi D.C., Crum C.P., Dotto G.P. Specific down-modulation of Notch1 signaling in cervical cancer cells is required for sustained HPV-E6/E7 expression and late steps of malignant transformation// *Genes & development*.- 2002.- 16(17).- P.2252-63.
396. Tam W.L., Ng H.H. Sox2: masterminding the root of cancer// *Cancer Cell*.- 2014.- 26(1).- P.3-5.
397. Tanaka Y., Kulkeaw K., Inoue T., Tan K.S., Nakanishi Y., Shirasawa S., Sugiyama D. Dok2 likely down-regulates Klf1 in mouse erythroleukemia cells// *Anticancer research*.- 2014.- 34(8).- P.4561-7.
398. Tang H., Chen B., Liu P., Xie X., He R., Zhang L., Huang X., Xiao X., Xie X. SOX8 acts as a prognostic factor and mediator to regulate the progression of triple-negative breast cancer// *Carcinogenesis*.- 2019.- 40(10).- P.1278-87.
399. Tang X.-R., Dong Z.Y., Wu D. Prognostic and predictive role of tumor mutation burden and copy number alterations across metastatic cancer: Immunotherapeutic implications. *AACR*.- 2019.- 79(13).- nr 4065.
400. Taylor A.M., Shih J., Ha G., Gao G.F., Zhang X., Berger A.C., Schumacher S.E., Wang C., Hu H., Liu J. Genomic and functional approaches to understanding cancer aneuploidy// *Cancer Cell*.- 2018.- 33(4).- P.676-89. e3.
401. Teodorczyk M., Schmidt M.H. Notching on cancer's door: Notch signaling in brain tumors// *Frontiers in oncology*.- 2015.- 4P.341.

402. Tian J., Hachim M.Y., Hachim I.Y., Dai M., Lo C., Al Raffa F., Ali S., Lebrun J.J. Cyclooxygenase-2 regulates TGF β -induced cancer stemness in triple-negative breast cancer// *Scientific reports*.- 2017.- 7(1).- P.1-16.
403. Trempe G. Human breast cancer in culture. *Breast Cancer*: Springer; 1976. p. 33-41.
404. Tsai J.H., Donaher J.L., Murphy D.A., Chau S., Yang J. Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis// *Cancer Cell*.- 2012.- 22(6).- P.725-36.
405. Tsai J.H., Yang J. Epithelial–mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis// *Genes & development*.- 2013.- 27(20).- P.2192-206.
406. Tsukamoto S., Mizuta T., Fujimoto M., Ohte S., Osawa K., Miyamoto A., Yoneyama K., Murata E., Machiya A., Jimi E. Smad9 is a new type of transcriptional regulator in bone morphogenetic protein signaling// *Scientific reports*.- 2014.- 4P.7596.
407. Tudoran O., Soritau O., Balacescu L., Visan S., Barbos O., Cojocneanu-Petric R., Balacescu O., Berindan-Neagoe I. Regulation of stem cells-related signaling pathways in response to doxorubicin treatment in Hs578T triple-negative breast cancer cells// *Molecular and cellular biochemistry*.- 2015.- 409(1-2).- P.163-76.
408. Tung P.Y., Varlakhanova N.V., Knoepfler P.S. Identification of DPPA4 and DPPA2 as a novel family of pluripotency-related oncogenes// *Stem Cells*.- 2013.- 31(11).- P.2330-42.
409. Vaillant F., Asselin-Labat M.-L., Shackleton M., Forrest N.C., Lindeman G.J., Visvader J.E. The mammary progenitor marker CD61/ β 3 integrin identifies cancer stem cells in mouse models of mammary tumorigenesis// *Cancer Research*.- 2008.- 68(19).- P.7711-7.
410. Van Dijk E.L., Auger H., Jaszczyszyn Y., Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology// *Trends in Genetics*.- 2014.- 30(9).- P.418-26.
411. Van Geldermalsen M. Targeting ASCT2/SLC1A5 for inhibition of cellular growth and metabolism in triple-negative breast cancer//.- 2018.- P.
412. Vassilopoulos A., Wang R.-H., Petrovas C., Ambrozak D., Koup R., Deng C.-X. Identification and characterization of cancer initiating cells from BRCA1 related mammary tumors using markers for normal mammary stem cells// *International journal of biological sciences*.- 2008.- 4(3).- P.133.
413. Veeck J., Geisler C., Noetzel E., Alkaya S., Hartmann A., Knüchel R., Dahl E. Epigenetic inactivation of the secreted frizzled-related protein-5 (SFRP5) gene in human breast cancer is associated with unfavorable prognosis// *Carcinogenesis*.- 2008.- 29(5).- P.991-8.
414. Vinagre J., Pinto V., Celestino R., Reis M., Pópulo H., Boaventura P., Melo M., Catarino T., Lima J., Lopes J.M. Telomerase promoter mutations in cancer: an emerging molecular biomarker?// *Virchows Archiv*.- 2014.- 465(2).- P.119-33.
415. Visvader J.E., Clevers H. Tissue-specific designs of stem cell hierarchies// *Nature Cell Biology*.- 2016.- 18(4).- P.349-55.
416. Vogelstein B., Papadopoulos N., Velculescu V.E., Zhou S., Diaz L.A., Kinzler K.W. Cancer genome landscapes// *Science*.- 2013.- 339(6127).- P.1546-58.
417. Waghray A., Saiz N., Jayaprakash A.D., Freire A.G., Papatsenko D., Pereira C.-F., Lee D.-F., Brosh R., Chang B., Darr H. Tbx3 controls Dppa3 levels and exit from pluripotency toward mesoderm// *Stem cell reports*.- 2015.- 5(1).- P.97-110.
418. Wahlster L., Daley G.Q. Progress towards generation of human haematopoietic stem cells// *Nature Cell Biology*.- 2016.- 18(11).- P.1111-7.
419. Wang H., Yan W., Zhang S., Gu Y., Wang Y., Wei Y., Liu H., Wang F., Wu Q., Zhang Y. Survival differences of CIMP subtypes integrated with CNA information in human breast cancer// *Oncotarget*.- 2017.- 8(30).- P.48807.
420. Wang J., Scholtens D., Holko M., Ivancic D., Lee O., Hu H., Chatterton R.T., Sullivan M.E., Hansen N., Bethke K. Lipid metabolism genes in contralateral unaffected breast and estrogen receptor status of breast cancer// *Cancer Prevention Research*.- 2013.- 6(4).- P.321-30.
421. Wang J., Shidfar A., Ivancic D., Ranjan M., Liu L., Choi M.R., Parimi V., Gursel D.B., Sullivan M.E., Najor M.S. Overexpression of lipid metabolism genes and PBX1 in the

- contralateral breasts of women with estrogen receptor-negative breast cancer// *International Journal of Cancer*.- 2017.- 140(11).- P.2484-97.
422. Wang L.N., Gao M.H., Wang B., Cong B.B., Zhang S.C. A role for GPI-CD59 in promoting T-cell signal transduction via LAT// *Oncology letters*.- 2018.- 15(4).- P.4873-81.
423. Wang Q., Liu H., Wang Q., Zhou F., Liu Y., Zhang Y., Ding H., Yuan M., Li F., Chen Y. Involvement of c-Fos in cell proliferation, migration, and invasion in osteosarcoma cells accompanied by altered expression of Wnt2 and Fzd9// *PLoS ONE*.- 2017.- 12(6).- P.e0180558.
424. Wang X., Jung Y.-S., Jun S., Lee S., Wang W., Schneider A., Oh Y.S., Lin S.H., Park B.-J., Chen J. PAF-Wnt signaling-induced cell plasticity is required for maintenance of breast cancer cell stemness// *Nature communications*.- 2016.- 7(1).- P.1-13.
425. Wang X., Liu Y., Shao D., Qian Z., Dong Z., Sun Y., Xing X., Cheng X., Du H., Hu Y. Recurrent amplification of MYC and TNFRSF11B in 8q24 is associated with poor survival in patients with gastric cancer// *Gastric cancer*.- 2016.- 19(1).- P.116-27.
426. Wang Y.-H., Imai Y., Shiseki M., Tanaka J., Motoji T. Knockdown of the Wnt receptor Frizzled-1 (FZD1) reduces MDR1/P-glycoprotein expression in multidrug resistant leukemic cells and inhibits leukemic cell proliferation// *Leukemia research*.- 2018.- 67P.99-108.
427. Wang Y., Waters J., Leung M.L., Unruh A., Roh W., Shi X., Chen K., Scheet P., Vattathil S., Liang H. Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing// *Nature*.- 2014.- 512(7513).- P.155-60.
428. Wang Z., Jensen M.A., Zenklusen J.C. A practical guide to the cancer genome atlas (TCGA). *Statistical Genomics*: Springer; 2016. p. 111-41.
429. Watabe T. Roles of Dppa2 in the regulation of the present status and future of pluripotent stem cells// *The Journal of Biochemistry*.- 2012.- 152(1).- P.1-3.
430. Waugh M.G. Amplification of chromosome 1q genes encoding the phosphoinositide signalling enzymes PI4KB, AKT3, PIP5K1A and PI3KC2B in breast cancer// *Journal of cancer*.- 2014.- 5(9).- P.790.
431. Weber L., Maßberg D., Becker C., Altmüller J., Ubrig B., Bonatz G., Wölk G., Philippou S., Tannapfel A., Hatt H. Olfactory receptors as biomarkers in human breast carcinoma tissues// *Frontiers in oncology*.- 2018.- 8P.33.
432. Weigelt B., Baehner F.L., Reis-Filho J.S. The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade// *The Journal of pathology*.- 2010.- 220(2).- P.263-80.
433. Weigman V.J., Chao H.-H., Shabalín A.A., He X., Parker J.S., Nordgard S.H., Grushko T., Huo D., Nwachukwu C., Nobel A. Basal-like Breast cancer DNA copy number losses identify genes involved in genomic instability, response to therapy, and patient survival// *Breast Cancer Research and Treatment*.- 2012.- 133(3).- P.865-80.
434. Weinberger L., Ayyash M., Novershtern N., Hanna J.H. Dynamic stem cell states: naive to primed pluripotency in rodents and humans// *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.- 2016.- P.
435. Wellner U., Schubert J., Burk U.C., Schmalhofer O., Zhu F., Sonntag A., Waldvogel B., Vannier C., Darling D., Zur Hausen A. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs// *Nature Cell Biology*.- 2009.- 11(12).- P.1487.
436. Wikman H., Lamszus K., Detels N., Uslar L., Wrage M., Benner C., Hohensee I., Ylstra B., Eylmann K., Zapatka M. Relevance of PTEN loss in brain metastasis formation in breast cancer patients// *Breast Cancer Res*.- 2012.- 14(2).- P.R49.
437. Wolff A.C., Hammond M.E., Schwartz J.N., Hagerty K.L., Allred D.C., Cote R.J., Dowsett M., Fitzgibbons P.L., Hanna W.M., Langer A., McShane L.M., Paik S., Pegram M.D., Perez E.A., Press M.F., Rhodes A., Sturgeon C., Taube S.E., Tubbs R., Vance G.H., van de Vijver M., Wheeler T.M., Hayes D.F. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer// *Arch Pathol Lab Med*.- 2007.- 131(1).- P.18-43.

438. Wolff A.C., Hammond M.E.H., Schwartz J.N., Hagerty K.L., Allred D.C., Cote R.J., Dowsett M., Fitzgibbons P.L., Hanna W.M., Langer A. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer// *Archives of pathology & laboratory medicine*.- 2007.- 131(1).- P.18-43.
439. Wright M.H., Calcagno A.M., Salcido C.D., Carlson M.D., Ambudkar S.V., Varticovski L. Brcal breast tumors contain distinct CD44+/CD24-and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics// *Breast Cancer Research*.- 2008.- 10(1).- P.R10.
440. Wu J., Belmonte J.C.I. Stem cells: a renaissance in human biology research// *Cell*.- 2016.- 165(7).- P.1572-85.
441. Xie G., Yao Q., Liu Y., Du S., Liu A., Guo Z., Sun A., Ruan J., Chen L., Ye C. IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition promotes the generation of breast cancer stem-like cells analogous to mammosphere cultures// *International journal of oncology*.- 2012.- 40(4).- P.1171-9.
442. Xie Y., Bayakhmetov S. PIM1 kinase as a promise of targeted therapy in prostate cancer stem cells// *Molecular and clinical oncology*.- 2016.- 4(1).- P.13-7.
443. Xu J., Liao K., Zhou W. Exosomes Regulate the Transformation of Cancer Cells in Cancer Stem Cell Homeostasis// *Stem Cells International*.- 2018.- 2018P.
444. Xu Y., Duanmu H., Chang Z., Zhang S., Li Z., Li Z., Liu Y., Li K., Qiu F., Li X. The application of gene co-expression network reconstruction based on CNVs and gene expression microarray data in breast cancer// *Molecular biology reports*.- 2012.- 39(2).- P.1627-37.
445. Yamashita N., Tokunaga E., Kitao H., Hisamatsu Y., Taketani K., Akiyoshi S., Okada S., Aishima S., Morita M., Maehara Y. Vimentin as a poor prognostic factor for triple-negative breast cancer// *Journal of cancer research and clinical oncology*.- 2013.- 139(5).- P.739-46.
446. Yan Q., Zhang Y., Yu D., Kam N.W., Guan X.-Y. Characterization of the role of DPPA3 in stemness regulation in hepatocellular carcinoma by DNA methylation. *AACR*; 2018.
447. Yang J., Antin P., Berx G., Blanpain C., Brabletz T., Bronner M., Campbell K., Cano A., Casanova J., Christofori G. EMT International Association (TEMTIA), Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition// *Nat Rev Mol Cell Biol*.- 2020.- 21P.341-52.
448. Yang K., Wang X., Zhang H., Wang Z., Nan G., Li Y., Zhang F., Mohammed M.K., Haydon R.C., Luu H.H. The evolving roles of canonical WNT signaling in stem cells and tumorigenesis: implications in targeted cancer therapies// *Laboratory Investigation*.- 2016.- 96(2).- P.116-36.
449. Yang L., Xie G., Fan Q., Xie J. Activation of the hedgehog-signaling pathway in human cancer and the clinical implications// *Oncogene*.- 2010.- 29(4).- P.469-81.
450. Yang S., Du J., Wang Z., Yuan W., Qiao Y., Zhang M., Zhang J., Gao S., Yin J., Sun B. BMP-6 promotes E-cadherin expression through repressing δ EF1 in breast cancer cells// *BMC Cancer*.- 2007.- 7(1).- P.1-13.
451. Yang X., Ren H., Yao L., Chen X., He A. Role of EHD2 in migration and invasion of human breast cancer cells// *Tumor Biology*.- 2015.- 36(5).- P.3717-26.
452. Yates L.R., Knappskog S., Wedge D., Farmery J.H., Gonzalez S., Martincorena I., Alexandrov L.B., Van Loo P., Haugland H.K., Lilleng P.K. Genomic evolution of breast cancer metastasis and relapse// *Cancer Cell*.- 2017.- 32(2).- P.169-84. e7.
453. Ye F., Qiu Y., Li L., Yang L., Cheng F., Zhang H., Wei B., Zhang Z., Sun L., Bu H. The presence of EpCAM-/CD49f+ cells in breast cancer is associated with a poor clinical outcome// *Journal of breast cancer*.- 2015.- 18(3).- P.242-8.
454. Ye X., Brabletz T., Kang Y., Longmore G.D., Nieto M.A., Stanger B.Z., Yang J., Weinberg R.A. Upholding a role for EMT in breast cancer metastasis// *Nature*.- 2017.- 547(7661).- P.E1-E3.
455. Yi T., Zhai B., Yu Y., Kiyotsugu Y., Raschle T., Etzkorn M., Seo H.-C., Nagiec M., Luna R.E., Reinherz E.L. Quantitative phosphoproteomic analysis reveals system-wide signaling

- pathways downstream of SDF-1/CXCR4 in breast cancer stem cells// *Proceedings of the National Academy of Sciences*.- 2014.- 111(21).- P.E2182-E90.
456. Yin S., Cheriyan V.T., Rishi A.K., Reddy K.B. c-Myc and Frizzled 8 play a major role in the regulation of cancer stem cells and drug resistance in triple-negative breast cancer// *Cancer Research*.- 2015.- 75(15 Supplement).- P.2225-.
457. Yin X., Xiang T., Li L., Su X., Shu X., Luo X., Huang J., Yuan Y., Peng W., Oberst M. DACT1, an antagonist to Wnt/ β -catenin signaling, suppresses tumor cell growth and is frequently silenced in breast cancer// *Breast Cancer Research*.- 2013.- 15(2).- P.1-12.
458. Yu K.-D., Jiang Y.-Z., Shao Z.-M. Difference between observed and expected number of involved lymph nodes reflects the metastatic potential of breast cancer independent to intrinsic subtype// *Oncotarget*.- 2015.- 6(18).- P.16686.
459. Zhang G., Shang B., Yang P., Cao Z., Pan Y., Zhou Q. Induced pluripotent stem cell consensus genes: implication for the risk of tumorigenesis and cancers in induced pluripotent stem cell therapy// *Stem cells and development*.- 2012.- 21(6).- P.955-64.
460. Zhang J., Liang Q., Lei Y., Yao M., Li L., Gao X., Feng J., Zhang Y., Gao H., Liu D.-X. SOX4 induces epithelial–mesenchymal transition and contributes to breast cancer progression// *Cancer Research*.- 2012.- 72(17).- P.4597-608.
461. Zhang J., Shao X., Sun H., Liu K., Ding Z., Chen J., Fang L., Su W., Hong Y., Li H. NUMB negatively regulates the epithelial-mesenchymal transition of triple-negative breast cancer by antagonizing Notch signaling// *Oncotarget*.- 2016.- 7(38).- P.61036.
462. Zhang L., Feizi N., Chi C., Hu P. Association Analysis of Somatic Copy Number Alteration Burden With Breast Cancer Survival// *Frontiers in genetics*.- 2018.- 9P.421.
463. Zhang M., Wang Q., Yuan W., Yang S., Wang X., Yan J.-D., Du J., Yin J., Gao S.-Y., Sun B.-C. Epigenetic regulation of bone morphogenetic protein-6 gene expression in breast cancer cells// *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*.- 2007.- 105(1-5).- P.91-7.
464. Zhang P., Wei Y., Wang L., Debeb B.G., Yuan Y., Zhang J., Yuan J., Wang M., Chen D., Sun Y. ATM-mediated stabilization of ZEB1 promotes DNA damage response and radioresistance through CHK1// *Nature Cell Biology*.- 2014.- 16(9).- P.864-75.
465. Zhang S., Cui W. Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation// *World journal of stem cells*.- 2014.- 6(3).- P.305.
466. Zhang X., Choi P.S., Francis J.M., Gao G.F., Campbell J.D., Ramachandran A., Mitsuishi Y., Ha G., Shih J., Vazquez F. Somatic superenhancer duplications and hotspot mutations lead to oncogenic activation of the KLF5 transcription factor// *Cancer discovery*.- 2018.- 8(1).- P.108-25.
467. Zhang X., Choi P.S., Francis J.M., Imielinski M., Watanabe H., Cherniack A.D., Meyerson M. Identification of focally amplified lineage-specific super-enhancers in human epithelial cancers// *Nature Genetics*.- 2016.- 48(2).- P.176-82.
468. Zhang X., Lou Y., Wang H., Zheng X., Dong Q., Sun J., Han B. Wnt signaling regulates the stemness of lung cancer stem cells and its inhibitors exert anticancer effect on lung cancer SPC-A1 cells// *Medical Oncology*.- 2015.- 32(4).- P.95.
469. Zhang Y., Martens J.W., Jack X.Y., Jiang J., Sieuwerts A.M., Smid M., Klijn J.G., Wang Y., Foekens J.A. Copy number alterations that predict metastatic capability of human breast cancer// *Cancer Research*.- 2009.- 69(9).- P.3795-801.
470. Zheng X., Carstens J.L., Kim J., Scheible M., Kaye J., Sugimoto H., Wu C.-C., LeBleu V.S., Kalluri R. Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer// *Nature*.- 2015.- 527(7579).- P.525-30.
471. Zhong Y., Lin Y., Shen S., Zhou Y., Mao F., Guan J., Sun Q. Expression of ALDH1 in breast invasive ductal carcinoma: an independent predictor of early tumor relapse// *Cancer cell international*.- 2013.- 13(1).- P.60.

472. Zhong Y., Shen S., Zhou Y., Mao F., Guan J., Lin Y., Xu Y., Sun Q. ALDH1 is a better clinical indicator for relapse of invasive ductal breast cancer than the CD44+/CD24- phenotype// *Medical oncology* (Northwood, London, England).- 2014.- 31(3).- P.864.
473. Zhou X.-l., Qin X.-r., Zhang X.-d., Ye L.-h. Downregulation of Dickkopf-1 is responsible for high proliferation of breast cancer cells via losing control of Wnt/ β -catenin signaling// *Acta Pharmacologica Sinica*.- 2010.- 31(2).- P.202-10.
474. Zhou X., Zhou Y.-P., Huang G.-R., Gong B.-L., Yang B., Zhang D.-X., Hu P., Xu S.-R. Expression of the stem cell marker, Nanog, in human endometrial adenocarcinoma// *Int J Gynecol Pathol*.- 2011.- 30(3).- P.262-70.
475. Zhu P., Wang Y., He L., Huang G., Du Y., Zhang G., Yan X., Xia P., Ye B., Wang S. ZIC2-dependent OCT4 activation drives self-renewal of human liver cancer stem cells// *The Journal of clinical investigation*.- 2015.- 125(10).- P.3795-808.
476. Алферова М. Отдаленные результаты лечения рака молочной железы// *Вопр онкол*.- 1977.- (8).- P.10-7.
477. Казанцева П.В., Цыганов М.М., Слонимская Е.М., Литвяков Н.В., Чердынцева Н.В., Ибрагимова М.К., Дорошенко А.В., Тарабановская Н.А., Паталяк С.В. Молекулярно-генетические маркеры эффективности неoadьювантной химиотерапии с применением антрациклинов у больных раком молочной железы// *Сибирский онкологический журнал*.- 2016.- 15(2).- P.

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ 1.

Таблица 1. Отсутствие амплификаций в представленных группах пациенток

Параметр	Группы	
Ответ	Стабилизация+Прогрессирование	Частичная+полная регрессия
опухоли на НХТ	1p36.33, 1p36.32, 1p36.22, 1p36.21, 1p36.13-1p36.11, 1p35.3-1p35.1, 1p34.3-1p34.1, 1p33, 1p32.3-1p32.1, 1p31.3-1p31.1, 1p22.3-1p22.1, 1p21.3-1p21.1, 1p13.3-1p13.1, 1p12, 1p11.2, 1p11.1, 1q11, 1q12, 2p25.3- 2p25.1, 2p24.3-2p24.1, 2p23.3- 2p23.1, 2p16.3, 2p16.2, 2p11.1, 2q11.1, 2q11.2, 2q12.1-2q12.3, 2q13, 2q14.1-2q14.3, 2q21.1-2q21.3, 2q22.1-2q22.3, 2q23.1-2q23.3, 2q24.1-2q24.3, 2q31.1-2q31.3, 2q32.1-2q32.3, 2q33.1-2q33.3, 2q34, 2q35, 2q36.1-2q36.3, 3p26.3-3p26.1, 3p25.3-3p25.1, 3p24.3-3p24.1, 3p23, 3p22.3-3p22.1, 3p21.33-3p21.31, 3p21.2, 3p21.1, 3p14.3-3p14.1, 3p12.3, 3p12.2, 3q13.32, 3q13.33, 3q21.1-3q21.3, 3q22.1-3q22.3, 3q23, 3q25.2, 3q25.31, 3q25.32, 6p25.3, 6p25.2, 6p11.2, 6p11.1, 6q11.1, 6q11.2, 6q12, 6q13, 6q26, 8p22, 8p21.3, 8p21.2, 8p21.1, 8p12, 10q11.1, 10q11.21, 10q11.23, 10q21.1-10q21.3, 10q22.1-10q23.1, 10q23.2, 10q23.31-10q23.33, 10q24.1, 10q24.2, 10q24.31- 10q24.33, 10q25.1- 10q25.3, 10q26.11-10q26.13, 10q26.2, 11p14.2, 11p14.1, 11p13, 11p12, 11p11.2, 11p11.12, 11p11.11, 11q21, 11q22.1-11q22.3, 11q23.1, 11q23.2, 12p13.33, 12p11.23-12p11.21, 12p11.1, 12q11, 12q12, 12q13.11- 12q13.13, 12q13.2, 12q13.3, 12q14.1-12q14.3, 12q15, 12q21.1, 12q21.2, 12q21.31-12q21.33, 12q22, 12q23.1-12q23.3, 12q24.11- 12q24.13, 12q24.21-12q24.23, 12q24.31-12q24.33, 13p13, 13p12, 13p11.2, 13p11.1, 13q11, 13q12.11- 13q12.13, 13q12.2, 13q12.3, 13q13.1-13q13.3, 13q14.11- 13q14.13, 13q14.2, 13q14.3,	1p22.2, 4p15.1, 4p14, 4p13, 4p12, 4p11, 4q11, 10q23.31-10q23.33, 10q24.1, 10q24.2, 10q24.31-10q24.33, 10q25.1- 10q25.3, 10q26.11, 11q14.2, 11q23.1- 11q23.3, 11q24.1-11q24.3, 12q11, 13p13, 13p12, 13p11.2, 13p11.1, 13q13.2, 13q13.3, 13q14.11-13q14.13, 13q14.2, 13q14.3, 14p13, 14p12, 14p11.2, 14p11.1, 14q11.1, 15p13, 15p12, 15p11.2, 15p11.1, 15q11.1, 17p13.3, 17p13.1, 17p12, 19p13.3, 21p13, 21p12, 21p11.2, 21p11.1, 21q11.1, 22p13, 22p12, 22p11.2, 22p11.1, Xp21.2, Xp21.1, Xp11.3, Xp11.21, Xp11.1, Xq12, Xq13.2, Xq21.2, Xq21.31-Xq21.33.

	13q21.1, 13q21.2, 13q21.31-13q21.33, 13q22.1-13q22.3, 13q31.1-13q31.3, 14p13, 14p12, 14p11.2, 14p11.1, 14q11.1, 14q13.1-14q13.3, 14q21.1-14q21.3, 14q22.1-14q22.3, 14q23.1-14q23.3, 14q24.1-14q24.3, 14q31.1-14q31.3, 14q32.11-14q32.13, 14q32.2, 14q32.31, 14q32.32, 15p13, 15p12, 15p11.2, 15p11.1, 15q11.1, 15q11.2, 15q12, 15q13.1-15q13.3, 15q14, 15q15.1-15q15.3, 15q21.1, 15q21.2, 16q11.1, 16q11.2, 16q13, 16q22.1-16q22.3, 16q23.1-16q23.3, 16q24.1-16q24.3, 17p13.3-17p13.1, 17p12, 17p11.2, 17p11.1, 17q11.1, 18p11.1, 18q11.1, 18q21.31-18q21.33, 18q22.1-18q22.3, 18q23, 19p13.3, 19p12, 19p11, 19q13.13, 19q13.2, 19q13.31-19q13.33, 19q13.41-19q13.43, 20p11.1, 20q11.1, 21p13, 21p12, 21p11.2, 21p11.1, 21q11.1, 22p13, 22p12, 22p11.2, 22p11.1, 22q11.23, 22q12.1-22q12.3, 22q13.1, 22q13.2, 22q13.31-22q13.33, Xp22.33-Xp22.31, Xp22.2, Xp22.13-Xp22.11, Xp21.3-Xp21.1, Xp11.4, Xp11.3, Xp11.23-Xp11.21, Xp11.1, Xq11.1, Xq11.2, Xq12, Xq13.1- Xq13.3, Xq21.1, Xq21.2, Xq21.31- Xq21.33, Xq22.1-Xq22.3, Xq23.	
Лимфогенное метастазирование (N)	N0	N1-3
	1p22.2, 4p15.1, 4p14-4p11, 4q11, 10q23.31-10q23.33, 10q24.1, 10q24.2, 10q24.31-10q24.33, 10q25.1-10q25.3, 10q26.11, 11q14.2, 11q23.1-11q23.3, 11q24.1-11q24.3, 12q11, 13p13, 13p12, 13p11.2, 13p11.1, 13q13.2, 13q13.3, 13q14.11-13q14.13, 13q14.2, 13q14.3, 14p13, 14p12, 14p11.2, 14p11.1, 14q11.1, 15p13, 15p12, 15p11.2, 15p11.1, 15q11.1, 17p13.3, 17p13.1, 17p12, 19p13.3, 21p13, 21p12, 21p11.2, 21p11.1, 21q11.1, 22p13, 22p12, 22p11.2, 22p11.1, Xp21.2, Xp21.1, Xp11.3, Xp11.21, Xp11.1, Xq12, Xq13.2, Xq21.2, Xq21.31-Xq21.33.	1p36.13-1p36.11, 1p35.3- 1p35.1, 1p34.3-1p34.1, 1p33, 1p32.3-1p32.1, 1p31.3-1p31.1, 1p22.3-1p22.1, 1p21.2, 1p21.1, 1p13.3, 1p13.2, 3p12.3, 3p12.2, 4p15.1, 4p14, 4p13-4p11, 4q32.3, 4q33, 4q34.1-4q34.3, 4q35.1, 6p11.2, 6p11.1, 6q11.1, 6q11.2, 6q12, 6q13, 6q26, 8p22, 8p21.3-8p21.1, 8p12, 10q11.1, 10q23.31-10q23.33, 10q24.1, 10q24.2, 10q24.31-10q24.33, 10q25.1-10q25.3, 10q26.11, 11p15.5-11p15.3, 11p15.2, 11p15.1, 11p14.3, 11p14.2, 11p12, 11p11.2, 11p11.12, 11q21, 11q23.1, 11q23.2, 12p13.33-12p13.31, 12p13.2, 12p13.1, 12p12.3-12p12.1, 12p11.23-12p11.21, 12p11.1, 12q11, 13p13, 13p12, 13p11.2, 13p11.1, 13q11, 13q12.11-13q12.13, 13q12.2, 13q12.3, 13q13.1-13q13.3, 13q14.11-13q14.13, 13q14.2, 13q14.3,

		13q32.3, 13q33.1-13q33.3, 13q34, 14p13, 14p12, 14p11.2, 14p11.1, 14q11.1, 15p13, 15p12, 15p11.2, 15p11.1, 15q11.1, 17p13.3, 17p13.1, 17p12, 17p11.2, 19p13.3, 21p13, 21p12, 21p11.2, 21p11.1, 21q11.1, 22p13, 22p12, 22p11.2, 22p11.1, 22q12.1-22q12.3, 22q13.1, 22q13.2, 22q13.31-22q13.33, Xp22.32, Xp22.31, Xp22.2, Xp22.13-Xp22.11, Xp21.3-Xp21.1, Xp11.3, Xp11.23-Xp11.21, Xp11.1, Xq12, Xq13.2, Xq21.1, Xq21.2, Xq21.31-Xq21.33, Xq22.1-Xq22.3, Xq23, Xq24.
Возраст	До 45 лет включительно	Старше 45 лет
	1p35.2, 1p35.1, 1p34.3-1p34.1, 1p32.3-1p32.1, 1p31.2, 1p22.3, 1p22.2, 4p15.2, 4p15.1, 4p14-4p12, 4p11, 4q21.23, 4q25, 4q28.3, 4q31.1, 4q31.21-4q31.23, 8p22, 8p21.3-8p21.1, 8p12, 9p13.1, 9p12, 9p11.2, 9p11.1, 9q11- 9q13, 10q11.1, 10q11.21, 10q11.23, 10q21.2, 10q22.1, 10q23.2, 10q23.31-10q23.33, 10q24.1, 10q24.2, 10q24.31-10q24.33, 10q25.1-10q25.3, 10q26.11, 10q26.12, 11p15.5, 11p15.4, 11q23.1-11q23.3, 11q24.1-11q24.3, 11q25, 12p13.33, 12q11, 13p13, 13p12, 13p11.2, 13p11.1, 13q13.2, 13q13.3, 13q14.11-13q14.13, 13q14.2, 13q14.3, 14p13, 14p12, 14p11.2, 14p11.1, 14q11.1, 15p13, 15p12, 15p11.2, 15p11.1, 15q11.1, 17p13.3, 17p13.1, 17p12, 19p13.3, 21p13, 21p12, 21p11.2, 21p11.1, 21q11.1, 22p13, 22p12, 22p11.2, 22p11.1, 22q12.1, 22q12.2, 22q13.2, 22q13.31-22q13.33, Xp22.32, Xp22.31, Xp22.2, Xp22.13-Xp22.11, Xp21.3-Xp21.1, Xp11.3, Xp11.23-Xp11.21, Xp11.1, Xq12, Xq13.2, Xq21.2, Xq21.31-Xq21.33.	1p22.2, 2p24.1, 2p23.3-2p23.1, 2p22.2, 2p22.1, 2p21, 2p16.3-2p16.1, 2p15, 2p14, 2p13.3, 2p13.1, 2p12, 2q33.3, 2q34, 6q13, 6q14.1-6q14.3, 6q15, 6q16.2, 10q23.31-10q23.33, 10q24.1, 10q24.2, 10q24.31-10q24.33, 10q25.1-10q25.3, 10q26.11, 11q23.1, 11q23.2, 12p11.23, 12p11.22, 12p11.21, 12p11.1, 12q11, 12q13.13, 12q13.2, 12q21.32, 12q22, 12q23.1, 12q23.2, 12q24.11-12q24.13, 13p13, 13p12, 13p11.2, 13p11.1, 13q11, 13q12.11-13q12.13, 13q12.2, 13q12.3, 13q13.1-13q13.3, 13q14.11-13q14.13, 13q14.2, 13q14.3, 13q21.1, 13q21.2, 13q21.31, 13q21.32, 14p13, 14p12, 14p11.2, 14p11.1, 14q11.1, 14q23.2, 14q23.3, 14q24.1-14q24.3, 14q31.1, 14q31.2, 15p13, 15p12, 15p11.2, 15p11.1, 15q11.1, 15q11.2, 15q12, 15q13.1-15q13.3, 15q14, 15q15.1-15q15.3, 15q21.1-15q21.3, 15q22.1, 15q22.2, 15q24.1-15q24.3, 15q25.1-15q25.3, 16q11.1, 16q11.2, 16q22.1-16q22.3, 16q23.1-16q23.3, 16q24.1, 17p13.3-17p13.1, 17p12, 17p11.2, 17p11.1, 19p13.3, 19p11, 19q13.13, 19q13.2, 19q13.31-19q13.33, 21p13, 21p12, 21p11.2, 21p11.1, 21q11.1, 22p13, 22p12, 22p11.2, 22p11.1, 22q11.1, Xp21.2, Xp21.1, Xp11.4, Xp11.3, Xp11.21, Xp11.1, Xq11.2, Xq12, Xq13.1-Xq13.3, Xq21.1, Xq21.2, Xq21.31- Xq21.33, Xq22.1-Xq22.3, Xq23.
Менструальный статус	Пременопауза	Постменопауза
	1p36.13-1p36.11, 1p35.3-1p35.1, 1p34.3-1p34.1, 1p33, 1p32.3-1p32.1,	1p22.2, 2p15, 2p14, 2p13.3, 2p13.1, 2p12, 2q33.3, 2q34, 4q28.3, 4q31.1,

<p>1p31.2, 1p22.3-1p22.1, 1p21.2, 6q13, 8p22, 8p21.3-8p21.1, 8p12, 9p13.1, 9p12, 9p11.2, 9p11.1, 9q11-9q13, 9q21.33, 9q22.31-9q22.33, 9q31.1-9q31.3, 9q32, 9q34.11, 9q34.12, 10q11.1, 10q11.21, 10q11.23, 10q21.2, 10q22.1, 10q23.2, 10q23.31-10q23.33, 10q24.1, 10q24.2, 10q24.31-10q24.33, 10q25.1-10q25.3, 10q26.11, 10q26.12, 11p14.2, 11q21, 11q22.1-11q22.3, 11q23.1-11q23.3, 12p13.33, 12p11.23-12p11.21, 12p11.1, 12q11, 13p13, 13p12, 13p11.2, 13p11.1, 13q13.2, 13q13.3, 13q14.11-13q14.13, 13q14.2, 13q14.3, 14p13, 14p12, 14p11.2, 14p11.1, 14q11.1, 15p13, 15p12, 15p11.2, 15p11.1, 15q11.1, 17p13.3, 17p13.1, 17p12, 19p13.3, 21p13, 21p12, 21p11.2, 21p11.1, 21q11.1, 22p13, 22p12, 22p11.2, 22p11.1, 22q12.1-22q13.2, 22q13.31-22q13.33, Xp22.32, Xp22.31, Xp22.2, Xp22.13-Xp22.11, Xp21.3-Xp21.1, Xp11.3, Xp11.23-Xp11.21, Xp11.1, Xq12, Xq13.2, Xq21.2, Xq21.31-Xq21.33</p>	<p>5q12.1, 5q12.2, 10q23.31-10q23.33, 10q24.1, 10q24.2, 10q24.31-10q24.33, 10q25.1-10q25.3, 10q26.11, 11q23.1, 11q23.2, 12q11, 12q13.13, 12q13.2, 12q21.32, 12q22, 12q23.1, 12q23.2, 12q24.11-12q24.13, 13p13, 13p12, 13p11.2, 13p11.1, 13q11, 13q12.11, 13q12.12, 13q12.13, 13q12.2, 13q12.3, 13q13.1-13q13.3, 13q14.11-13q14.13, 13q14.2, 13q14.3, 13q21.1, 13q21.2, 13q21.31, 13q21.32, 14p13, 14p12, 14p11.2, 14p11.1, 14q11.1, 14q23.2, 14q23.3, 14q24.1-14q24.3, 14q31.1, 14q31.2, 15p13, 15p12, 15p11.2, 15p11.1, 15q11.1, 15q11.2, 15q12, 15q13.1-15q13.3, 15q14, 15q15.1-15q15.3, 15q21.1-15q21.3, 15q22.1, 15q22.2, 15q24.1-15q24.3, 15q25.1-15q25.3, 16q11.1, 16q22.3, 16q23.1-16q23.3, 16q24.1, 17p13.3-17p13.1, 17p12, 17p11.2, 17p11.1, 19p13.3, 19p13.13, 19p13.11, 19p12, 19p11, 19q13.13, 19q13.2, 19q13.31-19q13.33, 21p13, 21p12, 21p11.2, 21p11.1, 21q11.1, 21q21.2, 21q21.3, 21q22.11, 21q22.12, 22p13, 22p12, 22p11.2, 22p11.1, 22q11.1, 22q11.2, Xp21.2, Xp21.1, Xp11.4, Xp11.3, Xp11.21, Xp11.1, Xq11.2, Xq12, Xq13.1-Xq13.3, Xq21.1, Xq21.2, Xq21.31-Xq21.33, Xq22.1-Xq22.3, Xq23-Xq25, Xq26.1-Xq26.3, Xq27.1-Xq27.3, Xq28.</p>
---	--

Таблица 2. Отсутствие делеций в представленных группах пациенток

Параметр	Группы	
	Стабилизация+Прогрессирование	Частичная+полная регрессия
<p>Ответ опухоли на НХТ</p>	<p>5p13.1, 5p12, 5p11, 6p25.1, 6p24.3-6p24.1, 6p23, 6p22.3, 6p22.2, 6p12.2, 6p12.1, 7p21.2, 7p21.1, 7p15.3-7p15.1, 7p14.3-7p14.1, 7p13, 7p11.1, 7q11.1, 7q11.21, 7q11.23, 7q21.11-7q21.13, 7q21.2, 7q21.3, 7q22.1-7q22.3, 7q31.1, 7q31.2, 7q31.31-7q31.33, 7q32.1-7q32.3, 7q33- 7q35, 7q36.1-7q36.3, 8q11.1, 8q11.21-8q11.23, 8q12.1-8q12.3, 8q13.1-8q13.3, 8q21.11-8q21.13, 8q21.2, 8q21.3, 8q22.1-8q22.3, 8q23.1-8q23.3, 8q24.11, 8q24.12, 8q24.21-8q24.23, 8q24.3, 10p15.2, 10p15.1, 10p14, 10p13, 10p12.33-</p>	<p>1q11, 1q12, 1q21.1-1q21.3, 1q22, 1q23.1-1q23.3, 1q24.1-1q24.3, 1q25.3, 1q31.1-1q31.3, 1q32.1-1q32.3, 1q41, 1q42.11-1q42.13, 1q42.2, 1q42.3, 7p12.3, 8q12.1-8q12.3, 8q13.1, 8q13.2, 8q21.11, 8q22.2, 8q22.3, 8q23.1-8q23.3, 8q24.11-8q24.13, 8q24.21, 13p13, 13p12, 13p11.2, 13p11.1, 14p13, 14p12, 14p11.2, 14p11.1, 14q11.1, 15p13, 15p12, 15p11.2, 15p11.1, 15q11.1, 21p13, 21p12, 21p11.2, 21p11.1, 21q11.1, 22p13, 22p12, 22p11.2.</p>

	10p12.31, 10p12.2, 10p12.1, 10p11.23-10p11.21, 10p11.1, 10q11.1, 13p13, 13p12, 13p11.2, 13p11.1, 14p13, 14p12, 14p11.2, 14p11.1, 14q11.1, 15p13, 15p12, 15p11.2, 15p11.1, 15q11.1, 18p11.31, 18p11.23-18p11.21, 18p11.1, 19q11, 19q12, 19q13.11-19q13.13, 20q11.1, 20q11.23, 20q12, 20q13.11-20q13.13, 20q13.2, 20q13.31-20q13.33, 21p13, 21p12, 21p11.2, 21p11.1, 21q11.1, 22p13, 22p12, 22p11.2, 22p11.1.	
Лимфогенное метастазирование (N)	N0	N1-3
	1q11, 1q12, 1q21.1-1q21.3, 1q22, 1q23.1-1q23.3, 1q24.1-1q24.3, 1q25.3, 1q31.1-1q31.3, 1q32.1-1q32.3, 1q41, 1q42.11-1q42.13, 1q42.2, 1q42.3, 7p12.3, 8q12.1-8q12.3, 8q13.1, 8q13.2, 8q21.11, 8q22.2, 8q22.3, 8q23.1-8q23.3, 8q24.11-8q24.13, 8q24.21, 13p13, 13p12, 13p11.2, 13p11.1, 14p13, 14p12, 14p11.2, 14p11.1, 14q11.1, 15p13, 15p12, 15p11.2, 15p11.1, 15q11.1, 21p13, 21p12, 21p11.2, 21p11.1, 21q11.1, 22p13, 22p12, 22p11.2.	8q11.21-8q11.23, 8q12.1-8q12.3, 8q13.1-8q13.3, 8q21.11-8q21.13, 8q21.2, 8q21.3, 8q22.1-8q22.3, 8q23.1-8q23.3, 8q24.11, 8q24.12, 8q24.21, 8q24.22, 13p13, 13p12, 13p11.2, 13p11.1, 14p13, 14p12, 14p11.2, 14p11.1, 14q11.1, 15p13, 15p12, 15p11.2, 15p11.1, 15q11.1, 20q11.23, 20q12, 20q13.11-20q13.13, 20q13.2, 20q13.31-20q13.33, 21p13, 21p12, 21p11.2, 21p11.1, 21q11.1, 22p13, 22p12, 22p11.2.
Возраст	До 45 лет включительно	Старше 45 лет
	1p12, 1p11.2, 1p11.1, 1q11, 1q12, 1q21.1-1q21.3, 1q22, 1q23.1-1q23.3, 1q24.1-1q24.3, 1q25.3, 1q32.1-1q32.3, 1q42.12, 1q42.13, 1q42.2, 1q42.3, 1q43, 1q44, 8q12.1-8q12.3, 8q13.1-8q13.3, 8q21.11-8q22.3, 8q23.1-8q23.3, 8q24.11, 8q24.12, 8q24.21, 8q24.22, 9p12, 9p11.2, 9p11.1, 9q11, 9q12, 11p11.11, 13p13, 13p12, 13p11.2, 13p11.1, 14p13, 14p12, 14p11.2, 14p11.1, 14q11.1, 15p13, 15p12, 15p11.2, 15p11.1, 15q11.1, 21p13, 21p12, 21p11.2, 21p11.1, 21q11.1, 22p13, 22p12, 22p11.2.	8q11.21-8q11.23, 8q12.1-8q12.3, 8q13.1, 8q13.2, 8q21.11-8q21.13, 8q21.2, 8q21.3, 8q22.1-8q22.3, 8q23.1-8q23.3, 8q24.11-8q24.13, 8q24.21, 8q24.23, 8q24.3, 13p13, 13p12, 13p11.2, 13p11.1, 14p13, 14p12, 14p11.2, 14p11.1, 14q11.1, 15p13, 15p12, 15p11.2, 15p11.1, 15q11.1, 16p13.2, 16p13.13-16p13.11, 16p12.3-16p12.1, 20q11.1, 20q11.23, 20q12, 20q13.11, 20q13.12, 20q13.13, 20q13.2, 20q13.31-20q13.33, 21p13, 21p12, 21p11.2, 21p11.1, 21q11.1, 22p13, 22p12, 22p11.2, 22p11.1.
Менструальный статус	Пременопауза	Постменопауза
	1p11.1, 1q11, 1q12, 1q21.1-1q21.3, 1q22, 1q23.1-1q23.3, 1q24.1-1q24.3, 1q25.1-1q25.3, 8q12.1, 8q12.2, 8q12.3, 8q13.1-8q13.3, 8q21.11, 8q22.2, 8q22.3, 8q23.1-8q23.3,	8q11.21-8q11.23, 8q12.1-8q12.3, 8q13.1, 8q13.2, 8q21.11-8q21.13, 8q21.2, 8q21.3, 8q22.1-8q22.3, 8q23.1-8q23.3, 8q24.11-8q24.13, 8q24.21, 8q24.23, 8q24.3, 13p13, 13p12, 13p11.2, 13p11.1,

	8q24.11, 8q24.12, 8q24.21, 8q24.22, 9p12, 9p11.2, 9p11.1, 9q11, 9q12, 13p13, 13p12, 13p11.2, 13p11.1, 14p13, 14p12, 14p11.2, 14p11.1, 14q11.1, 15p13, 15p12, 15p11.2, 15p11.1, 15q11.1, 20q11.1, 21p13, 21p12, 21p11.2, 21p11.1, 21q11.1, 22p13, 22p12, 22p11.2, 22p11.1.
--	---

Таблица 3. Локусы с одновременным отсутствием амплификаций и делеций в представленных группах пациенток

Параметр	Группы	
Ответ опухоли на НХТ	Стабилизация+Прогрессирование	Частичная+полная регрессия
	10q11.1, 13p13, 13p12, 13p11.2, 13p11.1, 14p13, 14p12, 14p11.2, 14p11.1, 14q11.1, 15p13, 15p12, 15p11.2, 15p11.1, 15q11.1, 18p11.1, 19q13.13, 20q11.1, 21p13, 21p12, 21p11.2, 21p11.1, 21q11.1, 22p13, 22p12, 22p11.2, 22p11.1.	13p13, 13p12, 13p11.2, 13p11.1, 14p13, 14p12, 14p11.2, 14p11.1, 14q11.1, 15p13, 15p12, 15p11.2, 15p11.1, 15q11.1, 21p13, 21p12, 21p11.2, 21p11.1, 21q11.1, 22p13, 22p12, 22p11.2.
Лимфогенное метастазирование (N)	N0	N1-3
	13p13, 13p12, 13p11.2, 13p11.1, 14p13, 14p12, 14p11.2, 14p11.1, 14q11.1, 15p13, 15p12, 15p11.2, 15p11.1, 15q11.1, 21p13, 21p12, 21p11.2, 21p11.1, 21q11.1, 22p13, 22p12, 22p11.2.	13p13, 13p12, 13p11.2, 13p11.1, 14p13, 14p12, 14p11.2, 14p11.1, 14q11.1, 15p13, 15p12, 15p11.2, 15p11.1, 15q11.1, 21p13, 21p12, 21p11.2, 21p11.1, 21q11.1, 22p13, 22p12, 22p11.2.
Возраст	До 45 лет включительно	Старше 45 лет
	9p12, 9p11.2, 9p11.1, 9q11, 9q12, 13p13, 13p12, 13p11.2, 13p11.1, 14p13, 14p12, 14p11.2, 14p11.1, 14q11.1, 15p13, 15p12, 15p11.2, 15p11.1, 15q11.1, 21p13, 21p12, 21p11.2, 21p11.1, 21q11.1, 22p13, 22p12, 22p11.2.	13p13, 13p12, 13p11.2, 13p11.1, 14p13, 14p12, 14p11.2, 14p11.1, 14q11.1, 15p13, 15p12, 15p11.2, 15p11.1, 15q11.1, 21p13, 21p12, 21p11.2, 21p11.1, 21q11.1, 22p13, 22p12, 22p11.2, 22p11.1.
Менструальный статус	Пременопауза	Постменопауза
	9p12, 9p11.2, 9p11.1, 9q11, 9q12, 13p13, 13p12, 13p11.2, 13p11.1, 14p13, 14p12, 14p11.2, 14p11.1, 14q11.1, 15p13, 15p12, 15p11.2, 15p11.1, 15q11.1, 21p13, 21p12, 21p11.2, 21p11.1, 21q11.1, 22p13, 22p12, 22p11.2.	13p13, 13p12, 13p11.2, 13p11.1, 14p13, 14p12, 14p11.2, 14p11.1, 14q11.1, 15p13, 15p12, 15p11.2, 15p11.1, 15q11.1, 21p13, 21p12, 21p11.2, 21p11.1, 21q11.1, 22p13, 22p12, 22p11.2, 22p11.1.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2.

Таблица 1. Уровень экспрессии генов стволовости в зависимости от возраста пациентов

Возраст	<45 лет	>45 лет	p value
ОСТ3 до лечения	1,951±1,124	7,165±5,517	0,393
SMO до лечения	1,082±0,498	0,601±0,137	0,460
MYC до лечения	0,414±0,072	0,612±0,152	0,326
SNAI2 до лечения	0,448±0,085	0,704±0,163	0,635
KLF4 до лечения	1,145±0,309	1,086±0,276	0,907
BMI1 до лечения	2,538±0,544	2,876±0,682	0,833
VIM до лечения	0,256±0,045	0,408±0,061	0,268
FLT3 до лечения	4,062±1,105	2,329±0,751	0,047
SMAD2 до лечения	0,209±0,046	0,292±0,067	0,473
KLF1 до лечения	0,157±0,048	0,838±0,485	0,081
TERT до лечения	0,586±0,142	1,104±0,645	0,441
TGFBI до лечения	0,739±0,181	1,303±0,194	0,034
TGFBR1 до лечения	0,824±0,158	1,308±0,253	0,429
ОСТ3 после НХТ	2,531±0,823	4,330±1,689	0,621
SMO после НХТ	0,500±0,098	1,366±0,419	0,096
MYC после НХТ	1,828±1,280	0,863±0,254	0,673
SNAI2 после НХТ	2,320±1,071	1,510±0,323	0,587
KLF4 после НХТ	3,146±0,992	2,054±0,372	0,522
BMI1 после НХТ	12,389±6,139	81,634±78,017	0,311
VIM после НХТ	0,827±0,194	1,279±0,359	0,587
FLT3 после НХТ	2,472±0,667	3,302±1,525	0,188
SMAD2 после НХТ	0,336±0,081	0,476±0,128	0,735
KLF1 после НХТ	0,261±0,082	0,830±0,526	0,522
TERT после НХТ	0,471±0,123	0,795±0,316	0,538
TGFBI после НХТ	2,016±1,235	1,965±0,680	0,232
TGFBR1 после НХТ	1,046±0,234	2,419±0,909	0,125

Примечание: p value – уровень доверительной вероятности по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни, полужирным курсивом выделены статистически значимые различия (p<0,05).

Таблица 2. Уровень экспрессии генов стволовости в зависимости от размера опухоли

Лимфогенное метастазирование	T1-2	T3-4	p value
ОСТ3 до лечения	5,492±3,745	2,040±1,771	0,911
SMO до лечения	0,620±0,113	3,625±2,884	0,095
MYC до лечения	0,538±0,105	0,563±0,269	0,640
SNAI2 до лечения	0,639±0,118	0,246±0,111	0,275
KLF4 до лечения	1,044±0,209	1,467±1,403	0,608
BMI1 до лечения	2,583±0,492	3,850±2,250	0,593
VIM до лечения	0,362±0,048	0,213±0,169	0,385
FLT3 до лечения	2,722±0,659	2,544±1,650	0,640
SMAD2 до лечения	0,250±0,042	0,129±0,100	0,688

KLF1 до лечения	0,531±0,325	0,269±0,094	0,410
TERT до лечения	0,919±0,435	1,028±0,554	0,423
TGFB1 до лечения	1,125±0,155	0,699±0,532	0,338
TGFBR1 до лечения	1,166±0,186	0,688±0,514	0,490
OCT3 после НХТ	3,767±1,188	1,772±1,702	0,767
SMO после НХТ	1,079±0,291	0,422±0,182	0,595
MYC после НХТ	1,283±0,565	0,431±0,298	0,636
SNAI2 после НХТ	1,572±0,332	0,314±0,243	0,139
KLF4 после НХТ	2,216±0,360	1,425±1,406	0,515
BMI1 после НХТ	59,810±52,638	4,725±3,999	0,767
VIM после НХТ	1,106±0,250	0,391±0,359	0,375
FLT3 после НХТ	3,050±1,059	1,568±1,568	0,882
SMAD2 после НХТ	0,425±0,092	0,201±0,138	0,723
KLF1 после НХТ	0,660±0,356	0,224±0,139	0,723
TERT после НХТ	0,649±0,215	0,257±0,163	0,905
TGFB1 после НХТ	2,128±0,684	0,352±0,270	0,214
TGFBR1 после НХТ	1,940±0,626	0,905±0,829	0,723

Примечание: N0 - отсутствие лимфогенных метастазов, N1-3 - наличие лимфогенных метастазов, p value – уровень достоверной вероятности по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни (p<0,05).

Таблица 3. Уровень экспрессии генов стволовости в зависимости от лимфогенного метастазирования

Лимфогенное метастазирование	N0	N1-3	p value
<i>OCT3 до лечения</i>	<i>9,310±6,950</i>	<i>1,238±0,582</i>	<i>0,008</i>
SMO до лечения	1,017±0,408	0,594±0,147	0,710
MYC до лечения	0,443±0,073	0,624±0,171	0,828
SNAI2 до лечения	0,781±0,197	0,435±0,090	0,248
KLF4 до лечения	1,271±0,319	0,958±0,261	0,235
BMI1 до лечения	2,422±0,670	3,038±0,646	0,496
VIM до лечения	0,386±0,067	0,313±0,061	0,403
FLT3 до лечения	2,256±0,400	3,705±1,165	0,483
SMAD2 до лечения	0,318±0,065	0,199±0,049	0,167
KLF1 до лечения	0,825±0,606	0,327±0,138	0,975
TERT до лечения	0,550±0,226	1,221±0,723	0,861
TGFB1 до лечения	0,976±0,207	1,169±0,201	0,464
TGFBR1 до лечения	1,333±0,273	0,920±0,206	0,219
OCT3 после НХТ	4,193±2,209	3,170±0,805	0,430
SMO после НХТ	0,700±0,162	1,308±0,466	0,311
MYC после НХТ	0,515±0,097	1,837±0,931	0,172
SNAI2 после НХТ	0,974±0,224	2,532±0,793	0,179
KLF4 после НХТ	2,043±0,457	2,838±0,727	0,814
BMI1 после НХТ	109,487±105,293	9,376±4,444	0,689
VIM после НХТ	0,978±0,227	1,210±0,388	0,850
FLT3 после НХТ	3,956±2,015	2,170±0,578	0,646

SMAD2 после НХТ	0,306±0,062	0,520±0,146	0,517
KLF1 после НХТ	0,384±0,216	0,799±0,571	0,540
TERT после НХТ	0,243±0,063	1,027±0,349	0,050
TGFB1 после НХТ	0,954±0,219	2,845±1,112	0,179
TGFBR1 после НХТ	1,355±0,279	2,334±1,021	0,637
<i>Примечание: N0 - отсутствие лимфогенных метастазов, N1-3 - наличие лимфогенных метастазов, p value – уровень достоверной вероятности по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни (p<0,05).</i>			

Таблица 4. Уровень экспрессии генов стволовости в зависимости от наличия эстрогеновых рецепторов в опухоли молочной железы

Эстрогеновый рецептор	ER+ (ER-	p value
ОСТ3 до лечения	6,173±4,572	0,931±0,695	0,725
SMO до лечения	0,838±0,272	1,946±0,740	0,028
MYC до лечения	0,598±0,127	0,529±0,288	0,892
SNAI2 до лечения	0,692±0,141	0,607±0,392	0,957
KLF4 до лечения	1,293±0,266	0,158±0,158	0,088
BMI1 до лечения	3,174±0,587	1,268±1,268	0,291
VIM до лечения	0,393±0,057	0,310±0,154	0,892
FLT3 до лечения	2,925±0,751	1,242±1,242	0,432
SMAD2 до лечения	0,297±0,051	0,000±0,000	0,054
KLF1 до лечения	0,713±0,406	0,000±0,000	0,035
TERT до лечения	1,141±0,532	0,000±0,000	0,023
TGFB1 до лечения	1,198±0,169	0,627±0,324	0,465
TGFBR1 до лечения	1,284±0,217	0,380±0,380	0,123
ОСТ3 после НХТ	4,293±1,458	3,235±2,246	0,637
SMO после НХТ	1,195±0,355	1,029±0,780	0,724
MYC после НХТ	1,448±0,705	0,712±0,262	0,596
SNAI2 после НХТ	1,619±0,523	2,049±1,481	0,768
KLF4 после НХТ	2,688±0,563	0,533±0,215	0,141
BMI1 после НХТ	74,182±65,757	2,996±1,498	0,556
VIM после НХТ	1,245±0,313	0,698±0,493	0,556
FLT3 после НХТ	3,238±1,313	2,813±1,674	0,409
SMAD2 после НХТ	0,410±0,078	1,062±1,000	0,906
KLF1 после НХТ	0,798±0,444	0,166±0,098	0,837
TERT после НХТ	0,771±0,268	0,377±0,170	0,860
TGFB1 после НХТ	2,435±0,847	0,979±0,400	0,860
TGFBR1 после НХТ	2,192±0,775	0,678±0,544	0,263
<i>Примечание: ER+ по данным ИГХ более 1% опухолевых клеток экспрессируют рецептор эстрогена. ER- по данным ИГХ менее 1% опухолевых клеток экспрессируют рецептор эстрогена, p value – уровень достоверной вероятности по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни, полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия (p<0,05).</i>			

Таблица 5. Уровень экспрессии генов стволовости в зависимости от наличия или отсутствия прогестеронового рецептора у пациентов

Прогестероновый	PR+	PR-	p value
-----------------	-----	-----	---------

рецептор			
OCT3 до лечения	5,552±4,107	1,508±0,613	0,231
SMO до лечения	0,841±0,250	1,118±0,770	0,678
MYC до лечения	0,545±0,112	0,790±0,489	0,608
SNAI2 до лечения	0,658±0,129	0,444±0,270	0,732
KLF4 до лечения	1,049±0,224	2,149±1,460	0,294
BMI1 до лечения	2,776±0,509	5,528±2,938	0,231
VIM до лечения	0,349±0,050	0,639±0,206	0,112
FLT3 до лечения	3,239±0,769	0,891±0,475	0,449
SMAD2 до лечения	0,235±0,045	0,663±0,079	0,016
KLF1 до лечения	0,289±0,094	4,834±4,626	0,341
TERT до лечения	0,880±0,467	2,297±1,523	0,060
TGFB1 до лечения	1,086±0,161	0,788±0,222	0,981
TGFBR1 до лечения	1,123±0,194	1,828±0,795	0,272
OCT3 после НХТ	3,988±1,305	2,522±2,223	0,833
SMO после НХТ	1,158±0,321	0,317±0,171	0,155
MYC после НХТ	1,373±0,627	0,260±0,089	0,188
SNAI2 после НХТ	1,656±0,475	0,417±0,271	0,171
KLF4 после НХТ	2,616±0,514	1,392±0,867	0,598
BMI1 после НХТ	66,203±58,470	6,312±3,224	0,598
VIM после НХТ	1,177±0,281	0,873±0,490	0,916
FLT3 после НХТ	3,395±1,170	1,038±0,520	0,429
SMAD2 после НХТ	0,466±0,102	0,202±0,105	0,598
KLF1 после НХТ	0,693±0,396	0,435±0,303	0,399
TERT после НХТ	0,706±0,240	0,399±0,197	0,635
TGFB1 после НХТ	2,246±0,757	0,483±0,321	0,155
TGFBR1 после НХТ	1,983±0,693	1,406±0,840	0,874
<i>Примечание: PR+ по данным ИГХ более 1% опухолевых клеток экспрессируют рецептор эстрогена. PR- по данным ИГХ менее 1% опухолевых клеток экспрессируют рецептор эстрогена, p value – уровень доверительной вероятности по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни, полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия (p<0,05)</i>			

Таблица 6. Уровень экспрессии генов стволовости в зависимости от гистологической формы опухоли

Гистологическая форма	Уни-центрическая	Мульти-центрическая	p value
OCT3 до лечения	8,307±6,661	1,298±0,417	0,908
SMO до лечения	1,138±0,386	0,602±0,217	0,214
MYC до лечения	0,479±0,079	0,777±0,271	0,326
SNAI2 до лечения	0,754±0,192	0,564±0,135	0,988
KLF4 до лечения	0,994±0,318	1,492±0,379	0,209
BMI1 до лечения	2,588±0,657	3,544±0,949	0,371
VIM до лечения	0,352±0,063	0,420±0,093	0,544
FLT3 до лечения	1,463±0,360	4,732±1,583	0,157
SMAD2 до лечения	0,260±0,067	0,278±0,067	0,729

KLF1 до лечения	0,793±0,580	0,417±0,227	0,977
TERT до лечения	0,581±0,232	1,744±1,192	0,444
TGFB1 до лечения	1,149±0,204	1,180±0,247	0,729
TGFBR1 до лечения	1,113±0,273	1,311±0,297	0,292
OCT3 после НХТ	4,097±1,871	4,208±1,217	0,083
SMO после НХТ	1,234±0,458	1,006±0,302	0,738
MYC после НХТ	0,822±0,286	2,421±1,658	0,086
SNAI2 после НХТ	1,892±0,534	2,254±1,199	0,799
KLF4 после НХТ	1,510±0,352	4,021±1,171	0,036
BMI1 после НХТ	91,356±87,771	14,664±7,961	0,332
VIM после НХТ	1,131±0,406	1,205±0,254	0,152
FLT3 после НХТ	3,524±1,702	2,211±0,896	0,949
SMAD2 после НХТ	0,432±0,132	0,479±0,158	0,656
KLF1 после НХТ	0,329±0,180	1,411±1,043	0,075
TERT после НХТ	0,662±0,331	0,918±0,283	0,105
TGFB1 после НХТ	1,839±0,761	3,097±1,575	0,181
TGFBR1 после НХТ	2,133±1,032	1,709±0,351	0,215
<i>Примечание: p value – уровень достоверной вероятности по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни, полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия (p<0,05)</i>			

Таблица 7. Уровень экспрессии генов стволовости в зависимости от менструального статуса пациентов

Менструальный статус	Pre	Post	p value
OCT3 до лечения	1,657±0,825	9,181±7,253	0,363
SMO до лечения	0,959±0,371	0,605±0,133	0,918
MYC до лечения	0,429±0,077	0,664±0,186	0,172
SNAI2 до лечения	0,448±0,087	0,781±0,207	0,374
KLF4 до лечения	0,900±0,235	1,354±0,345	0,131
BMI1 до лечения	2,525±0,534	3,000±0,797	0,804
VIM до лечения	0,259±0,047	0,454±0,076	0,035
FLT3 до лечения	3,885±1,038	1,977±0,618	0,277
SMAD2 до лечения	0,230±0,044	0,288±0,073	0,788
KLF1 до лечения	0,162±0,038	1,043±0,641	0,072
TERT до лечения	0,659±0,218	1,184±0,820	0,725
TGFB1 до лечения	0,807±0,146	1,395±0,247	0,098
TGFBR1 до лечения	0,832±0,130	1,455±0,328	0,301
OCT3 после НХТ	4,813±2,006	2,457±0,811	0,418
SMO после НХТ	0,822±0,177	1,241±0,504	0,897
MYC после НХТ	1,621±0,988	0,852±0,308	0,398
SNAI2 после НХТ	2,206±0,842	1,441±0,356	0,907
KLF4 после НХТ	2,708±0,804	2,245±0,407	0,542
BMI1 после НХТ	9,824±4,825	99,938±95,721	0,725
VIM после НХТ	0,851±0,163	1,358±0,437	0,707
FLT3 после НХТ	4,242±1,847	1,721±0,503	0,185

SMAD2 после НХТ	0,498±0,158	0,347±0,064	0,916
KLF1 после НХТ	0,817±0,625	0,404±0,195	0,425
TERT после НХТ	0,520±0,135	0,820±0,378	0,557
TGFB1 после НХТ	2,104±0,956	1,867±0,829	0,851
TGFBR1 после НХТ	0,968±0,182	2,810±1,104	0,029
Примечание: <i>p value</i> – уровень доверительной вероятности по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни, полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия ($p < 0,05$)			

Таблица 8. Уровень экспрессии генов стволовости в зависимости от ответа на НХТ

Ответ на НХТ	CR+PR	SD+P	p value
ОСТ3 до лечения	6,811±4,869	1,582±0,757	0,878
SMO до лечения	0,898±0,288	0,702±0,267	0,464
MYC до лечения	0,445±0,049	0,873±0,348	0,383
SNAI2 до лечения	0,511±0,079	0,954±0,359	0,928
KLF4 до лечения	1,195±0,230	0,990±0,518	0,158
BMI1 до лечения	2,771±0,494	3,252±1,242	0,719
VIM до лечения	0,390±0,056	0,298±0,086	0,305
FLT3 до лечения	3,029±0,682	3,366±1,763	0,199
SMAD2 до лечения	0,294±0,048	0,202±0,090	0,228
KLF1 до лечения	0,670±0,422	0,367±0,286	0,068
TERT до лечения	0,492±0,106	2,145±1,527	0,644
TGFB1 до лечения	1,064±0,170	1,067±0,252	0,681
TGFBR1 до лечения	1,161±0,201	1,180±0,392	0,827
ОСТ3 после НХТ	2,507±0,709	7,094±3,490	0,492
SMO после НХТ	1,000±0,376	1,281±0,357	0,309
MYC после НХТ	0,757±0,232	2,620±1,794	0,218
SNAI2 после НХТ	1,819±0,586	2,118±0,906	0,841
KLF4 после НХТ	3,070±0,639	1,401±0,347	0,144
BMI1 после НХТ	78,334±72,576	10,567±8,336	0,148
VIM после НХТ	1,296±0,344	0,789±0,168	0,819
FLT3 после НХТ	2,431±0,543	4,563±3,349	0,240
SMAD2 после НХТ	0,376±0,056	0,579±0,285	0,323
KLF1 после НХТ	0,853±0,489	0,126±0,073	0,045
TERT после НХТ	0,519±0,271	1,125±0,300	0,016
TGFB1 после НХТ	1,694±0,636	3,097±1,710	0,302
TGFBR1 после НХТ	2,230±0,846	1,047±0,393	0,122
Примечание: CR+PR – полная и частичная регрессия в процессе НХТ, SD+P – стабилизация и прогрессирование, <i>p value</i> – уровень доверительной вероятности по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни, полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия ($p < 0,05$).			

ПРИЛОЖЕНИЕ 3.

Таблица 1. Количество ДЭГ в опухоли до лечения у пациентов с амплификацией 8q и без амплификации

#	Ген	До лечения с наличием амплификации и 8q (log2)	До лечения с отсутствием амплификации 8q (log2)	Fold Change	P-value	Цитобэнды
1	PIP	9,47	14,61	-35,19	0,018	7q34
2	UGT2B11	7,64	10,16	-5,74	0,0426	4q13.2
3	HMGCS2	6,98	9,49	-5,68	0,0104	1p13-p12
4	CAPN8	8,64	11,1	-5,48	0,0111	1q41
5	CLCA2	5,72	8,16	-5,42	0,0222	1p22.3
6	ANK3	11,76	13,98	-4,66	0,0167	10q21
7	DUSP4	8,49	10,64	-4,47	0,0136	8p12-p11
8	CYP4X1	7,2	9,32	-4,35	0,0395	1p33 1
9	MYBPC1	5,05	7,11	-4,18	0,0381	12q23.2
10	LTF	11,33	13,33	-4,01	0,044	3p21.31
11	S100A7	6,19	8,13	-3,85	0,0483	1q21
12	TRIM29	7,23	9,16	-3,81	0,035	11q23.3
13	ESRRG	7,68	9,55	-3,65	0,001	1q41
14	CCDC6	12,29	14,11	-3,53	0,0325	10q21
15	ZBTB18	7,11	8,9	-3,45	0,0003	1q44
16	CHI3L2	8,94	10,7	-3,4	0,0181	
17	COL17A1; MIR936	8,49	10,19	-3,23	0,0332	10q24.3; 10q25.1
18	KRT14	5,69	7,38	-3,21	0,0145	17q21.2
19	AK5	8,66	10,3	-3,12	0,0019	1p31
20	TIPARP	9,4	10,9	-2,83	0,0309	
21	MKNK2	9,25	10,75	-2,82	0,0113	19p13.3
22	UGT2B17	5,91	7,41	-2,82	0,0366	4q13
23	ERP27	9,85	11,34	-2,81	0,0216	12p12.3
24	NBPF4	8,42	9,9	-2,79	0,0395	1p13.3
25	BCL9	10,21	11,67	-2,75	0,0147	1q21
26	RASSF6	6,02	7,47	-2,74	0,0291	4q13.3
27	TECR; MIR639	9,85	11,28	-2,69	0,0031	19p13.12
28	ST8SIA6	8,32	9,74	-2,68	0,0013	10p12.33
29	DMKN	9,75	11,15	-2,63	0,0393	19q13.12
30	EPB41L4A	7,74	9,09	-2,54	0,0094	5q21.3
31	NFIA	10,22	11,56	-2,54	0,0062	1p31.3-p31.2
32	PI4KB	9,57	10,92	-2,54	0,042	1q21
33	PLAT	11,18	12,52	-2,52	0,0226	8p12
34	KRT7	12,68	14,01	-2,51	0,0142	12q13.13
35	ARHGEF38	10,9	12,22	-2,5	0,0288	4q24
36	FAT1	11,22	12,53	-2,49	0,0395	4q35
37	SHROOM3	9,61	10,89	-2,44	0,0408	4q21.1
38	NFIX	10,81	12,06	-2,38	0,0191	19p13.3
39	TP63	7,78	9,03	-2,37	0,0085	3q28

40	FMO5	7,22	8,46	-2,37	0,001	1q21.1
41	ARHGEF2	8,25	9,49	-2,36	0,0379	1q21-q22
42	SF3B4	12,28	13,51	-2,35	0,0457	1q21.2
43	CLMN	10,6	11,78	-2,27	0,0219	14q32.13
44	SETBP1	10,67	11,85	-2,26	0,0049	18q21.1
45	ZBTB7B	8,88	10,05	-2,24	0,0038	1q21.3
46	ATP5A1	8,51	9,66	-2,22	0,0291	18q21
47	ZNF608	8,58	9,71	-2,2	0,002	5q23.2
48	CCDC169	6,18	7,31	-2,2	0,0469	13q13.3
49	ZNF223	8,57	9,7	-2,19	0,0295	19q13.2
50	COL4A5	7,33	8,46	-2,18	0,0059	Xq22
51	TEAD2	8,63	9,75	-2,18	0,0055	19q13.3
52	RORC	7,41	8,53	-2,17	0,0486	1q21
53	UGT2B28	5,53	6,64	-2,15	0,0484	4q13.2
54	FRK	9,72	10,81	-2,13	0,0267	6q21-q22.3
55	PRODH; LOC1027247 88; AC007325.2	6,14	7,22	-2,12	0,0054	
56	MS4A14	8,9	9,98	-2,11	0,036	11q12.2
57	PEX13	8,34	9,41	-2,1	0,0421	2p16.1
58	EFNA1	8,93	10	-2,09	0,0353	1q21-q22
59	SLC16A4	9,28	10,35	-2,09	0,0079	1p13.3
60	PDE1C	7,25	8,3	-2,07	0,0441	7p14.3
61	MIDN	9,75	10,78	-2,04	0,0269	19p13.3
62	RCOR3	7,59	8,62	-2,03	0,0318	1q32.2
63	PCDHB3	5,97	6,99	-2,03	0,0253	5q31
64	GSTM4	7,55	8,56	-2,03	0,0202	1p13.3
65	GSDMB	8,29	7,29	2	0,0274	17q12
66	BCAS3	8,27	7,27	2	0,0067	17q23
67	PEG3; ZIM2	8,6	7,59	2,02	0,0455	19q13.4
68	COCH	7,01	5,99	2,02	0,0468	14q11.2-q13
69	BRCA1	7,48	6,46	2,03	0,0022	17q21
70	CACNB1	7,66	6,63	2,03	0,0361	17q21-q22
71	SGOL1	8,13	7,09	2,06	0,0378	3p24.3
72	MTBP	8,58	7,52	2,08	0,0288	8q24.12
73	PRR11	9,1	8,02	2,11	0,003	17q22
74	FBXL13	7,98	6,9	2,12	0,0029	7q22.1
75	LRRC23	8,85	7,76	2,13	0,0057	12p13
76	CD2	8,73	7,62	2,15	0,0478	1p13.1
77	KIF4A	7,31	6,21	2,15	0,0327	Xq13.1
78	ENOPH1	10,23	9,1	2,18	0,0303	4q21.22
79	CENPK	8,89	7,76	2,18	0,0135	5q12.3
80	CDC6	9,72	8,58	2,19	0,0274	17q21.3
81	PTPRU	9,23	8,07	2,23	0,0446	1p35.3
82	EXOSC9	12,37	11,2	2,24	0,0399	4q27
83	E2F7	10,58	9,41	2,25	0,0065	12q21.2
84	PMCH	7,67	6,49	2,27	0,048	12q23.2
85	TNFRSF11A	8,3	7,1	2,3	0,0323	
86	SNX10	9,62	8,39	2,34	0,005	7p15.2

87	CENPQ	7,85	6,62	2,35	0,0001	6p12.3
88	NDUFAF6	12,01	10,77	2,36	0,0069	8q22.1
89	SLC38A4	7,08	5,83	2,37	0,0425	12q13
90	VPS8	8,36	7,1	2,4	0,0125	3q27.2
91	NOVA1	9,92	8,62	2,45	0,0489	14q
92	KIF5C	7,81	6,51	2,46	0,0032	2q23.1
93	TDRD7	8,9	7,58	2,49	0,0034	9q22.33
94	MYBL1	8,69	7,35	2,52	0,0066	8q13.1
95	STMND1	8,29	6,93	2,57	0,0039	6p22.3
96	FCGR2A	12,1	10,71	2,63	0,0022	1q23
97	RAD51AP1	8,96	7,54	2,67	0,0467	12p13.2- p13.1
98	SIM2	9,86	8,44	2,69	0,0413	21q22.13
99	CECR2	6,85	5,4	2,72	0,0204	22q11.2
100	MCOLN3	8,34	6,88	2,76	0,0352	1p22.3
101	ZFPM2	8,86	7,36	2,83	0,0152	8q23
102	ATAD2	9,98	8,45	2,88	0,0057	8q24.13
103	ZNF572	8,08	6,47	3,04	0,0014	8q24.13
104	ANKRD22	9,98	7,91	4,19	0,0329	10q23.31
105	HSPB8	9,92	7,72	4,62	0,0188	12q24.23

Таблица 2. Топ 10 ДЭГ с Up и Down регуляцией у больных со стабилизацией и частичной регрессией в зависимости от статуса амплификации 8q

ID	Ген	Больные со стабилизацией при наличии ампликации 8q (log2)	Больные со стабилизацией при отсутствии ампликации 8q (log2)	Fold Change	P-value	Цитобэнды
1	OR4F15	7,2	13,42	-74,36	0,013	15q26.3
2	PROK2	8,06	13,71	-50,3	0,0369	3p13
3	OR11H1	5,95	11,53	-48,01	0,0407	22q11.2
4	OR4F17	7,55	13,05	-45,21	0,0282	19p13.3
5	SSX2; SSX2B	6,44	11,75	-39,52	0,0338	Xp11.22
6	CP	6,67	11,95	-38,79	0,0262	3q23-q25
7	CT45A3; CT45A4; CT45A5	6,1	11,14	-32,78	0,0183	Xq26.3
8	USP17L23	6,5	11,38	-29,4	0,0323	
9	CT45A7; CT45A6	6,4	11,11	-26,26	0,0191	Xq26.3
10	OR1S2	5,15	9,72	-23,87	0,0358	11q12.1
10	NDUFA2	11,41	4,96	87,58	0,0283	5q31.2
9	PRDX1	14,37	7,9	88,72	0,0095	1p34.1
8	TMED2	14,05	7,47	95,69	0,0482	12q24.31
7	SERF2	13,51	6,84	101,86	0,0179	15q15.3
6	MRPL42	13,71	7,01	103,95	0,0164	12q22
5	SNRPD2	14,6	7,84	108,16	0,0259	19q13.2

4	RPS21	18,33	11,56	109,16	0,0122	20q13.3
3	TMED10	13	5,72	155,37	0,0266	14q24.3
2	HIST1H2BG	13,38	5,75	198,16	0,0065	6p22.2
1	RPS29; RPL32P29	17,46	8,66	444,42	0,0105	14q; 14q21.3
ID	Gene Symbol	Больные с частичной регрессией при наличии амплификации 8q (log2)	Больные с частичной регрессией при отсутствии амплификации 8q (log2)	Fold Change	P- value	Цитобэнды
1	LGI1	6,97	9,79	-7,1	0,0088	10q23.33
2	PTPRR	6,98	9,37	-5,25	0,0016	12q15
3	OR1S2	4,78	7,13	-5,1	0,0441	11q12.1
4	DEFB107B; DEFB107A	5,71	8,06	-5,07	0,0101	8p23.1
5	SLC28A3	7,83	10,04	-4,62	0,0202	9q21.32- q21.33
6	OR4C12	6,36	8,55	-4,54	0,0268	11p11.12
7	OR2M7	7,65	9,81	-4,46	0,0202	1q44
8	PCP4	7,58	9,7	-4,35	0,0386	21q22.2
9	TSHB	5,67	7,73	-4,15	0,0111	1p13.2
10	FAM177B	6,99	9,04	-4,13	0,0025	1q41
10	FAM73A	11,97	9,15	7,05	0,0091	1p31.1
9	PFN2	12,52	9,56	7,79	0,0243	3q25.1
8	CRABP2	14,21	11,2	8,1	0,0084	1q23.1
7	ADIPOQ	7,99	4,95	8,26	0,0164	3q27.3
6	FZD6	12,93	9,85	8,43	0,0229	8q22.3- q23.1
5	FIS1	11,86	8,69	9,01	0,0173	7q22.1
4	CYB5A	14,68	11,45	9,43	0,0311	18q23
3	HIST1H2BM	12,02	8,71	9,91	0,0385	6p22.1
2	ANAPC11	14,58	11,27	9,92	0,0125	17q25.3
1	FABP4	13,16	8,94	18,64	0,0466	8q21

Таблица 3. Пересечение ДЭГ у пациентов с наличием и отсутствием амплификации 8q после НХТ на фоне частичной регрессии и стабилизации

ID	Ген	Описание	Цитобэнд
1	SAMD13	sterile alpha motif domain containing 13	1p31.1
2	TSHB	thyroid stimulating hormone, beta	1p13
3	CD1E	CD1e molecule	1q23.1
4	OR10J4	olfactory receptor, family 10, subfamily J, member 4 (gene/pseudogene)	1q23.2
5	LY9	lymphocyte antigen 9	1q23.3
6	HP1BP3	heterochromatin protein 1, binding protein 3	1p36.12
7	TRAPPC3	trafficking protein particle complex 3	1p34.3
8	TACSTD2	tumor-associated calcium signal transducer 2	1p32
9	GSTM3	glutathione S-transferase mu 3 (brain)	1p13.3
10	LAMTOR5	late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR	1p13.3

		activator 5	
11	CRABP2	cellular retinoic acid binding protein 2	1q21.3
12	OR6N2	olfactory receptor, family 6, subfamily N, member 2	1q23.1
13	CCDC190	coiled-coil domain containing 190	1q23.3
14	OR2T35	olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 35	1q44
15	CHIT1	chitinase 1 (chitotriosidase)	1q32.1
16	IAH1	isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog	2p25.1
17	AFTPH	aftiphilin	2p14
18	IL18RAP	interleukin 18 receptor accessory protein	2q12
19	DBI	diazepam binding inhibitor (GABA receptor modulator, acyl-CoA binding protein)	2q12-q21
20	EIF2AK2	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	2p22-p21
21	MGAT4A	mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase, isozyme A	2q12
22	ATP5G3	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex subunit C3 (subunit 9)	2q31.1
23	MRPL33	mitochondrial ribosomal protein L33	2p21
24	CCR4	chemokine (C-C motif) receptor 4	3p24
25	CCR5	chemokine (C-C motif) receptor 5 (gene/pseudogene)	3p21.31
26	CDV3	CDV3 homolog (mouse)	3q22.1
27	CADPS	Ca ⁺⁺ -dependent secretion activator	3p14.2
28	TMEM207	transmembrane protein 207	3q28
29	OCIAD1	OCIA domain containing 1	4p11
30	DCUN1D4	DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 4	4q12
31	NDST3	N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 3	4q26
32	RFC1	replication factor C subunit 1	4p14-p13
33	PDS5A	PDS5 cohesin associated factor A	4p14
34	TSPAN5	tetraspanin 5	4q23
35	G3BP2	GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 2	4q21.1
36	SREK1	splicing regulatory glutamine/lysine-rich protein 1	5q12.3
37	BTF3	basic transcription factor 3	5q13.2
38	PJA2	praja ring finger 2, E3 ubiquitin protein ligase	5q21.3
39	NDUFA2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 2, 8kDa	5q31.2
40	YIPF5	Yip1 domain family member 5	5q31.3
41	MARCH11	membrane associated ring finger 11	5p15.1
42	RPS14	ribosomal protein S14	5q31-q33
43	SRSF3	serine/arginine-rich splicing factor 3	6p21
44	PCMT1	protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase	6q25.1
45	HIST1H2BG	histone cluster 1, H2bg	6p22.2
46	DEFB114	defensin, beta 114	6p12.3
47	CITED2	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp rich carboxy-terminal domain, 2	6q23.3
48	SF3B5	splicing factor 3b subunit 5	6q24.2
49	YAE1D1	Yae1 domain containing 1	7p14.1
50	OR2A12	olfactory receptor, family 2, subfamily A, member 12	7q35
51	EIF2AK1	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 1	7p22
52	TOMM7	translocase of outer mitochondrial membrane 7 homolog (yeast)	7p15.3
53	VOPP1	Jeck2013 ALT_ACCEPTOR, ALT_DONOR, coding,	7p11.2

		INTERNAL, intronic best transcript NM_030796	
54	CHCHD2	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2	7p11.2
55	CALCR	calcitonin receptor	7q21.3
56	FIS1	fission, mitochondrial 1	7q22.1
57	OR9A2	olfactory receptor, family 9, subfamily A, member 2	7q34
58	POLR2J3	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide J3	7q22.1
59	UPK3BL; POLR2J2	uroplakin 3B-like; polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide J2	7q22.1
60	UBE2V2	ubiquitin conjugating enzyme E2 variant 2	8q11.21
61	RAB2A	RAB2A, member RAS oncogene family	8q12.1
62	OSGIN2	oxidative stress induced growth inhibitor family member 2	8q21
63	EMC2	ER membrane protein complex subunit 2	8q23.1
64	ENY2	enhancer of yellow 2 homolog (Drosophila)	8q23.1
65	TCEA1	transcription elongation factor A (SII), 1	8q11.2
66	TCEB1	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 1 (15kDa, elongin C)	8q21.11
67	SLC25A32	solute carrier family 25 (mitochondrial folate carrier), member 32	8q22.3
68	DERL1	derlin 1	8q24.13
69	PIP5K1B	Transcript Identified by AceView, Entrez Gene ID(s) 8395	
70	NDUFA8	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 8, 19kDa	9q33.2
71	MID2	midline 2	Xq22.3
72	VSIG1	V-set and immunoglobulin domain containing 1	Xq22.3
73	NDUFA1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 1, 7.5kDa	Xq24
74	TAF9B	TAF9B RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 31kDa	Xq13.1-q21.1
75	IL13RA2	interleukin 13 receptor, alpha 2	Xq23
76	VPS26A	VPS26 retromer complex component A	10q21.1
77	CHCHD1	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 1	10q22.2
78	FAM213A	family with sequence similarity 213, member A	10q23.1
79	CUL2	cullin 2	10p11.21
80	EIF3M	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit M	11p13
81	OR4A5	olfactory receptor, family 4, subfamily A, member 5	11p11.12
82	UQQC3	ubiquinol-cytochrome c reductase complex assembly factor 3	11q12.3
83	POLR2G	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide G	11q13.1
84	PPP6R3	Memczak2013 ALT_ACCEPTOR, ALT_DONOR, coding, INTERNAL, intronic best transcript NM_001164162	11q13
85	OR1S2	olfactory receptor, family 1, subfamily S, member 2	11q12.1
86	CLNS1A	chloride channel, nucleotide-sensitive, 1A	11q13.5-q14
87	IFT46	intraflagellar transport 46	11q23.3
88	OR8D1	olfactory receptor, family 8, subfamily D, member 1	11q24.2
89	TPI1	triosephosphate isomerase 1	12p13
90	C12orf57; RNU7-1	chromosome 12 open reading frame 57; RNA, U7 small nuclear 1	12p13.31
91	KLRG1	killer cell lectin-like receptor subfamily G, member 1	12p13.31
92	PFDN5	prefoldin subunit 5	12q12
93	C12orf74	chromosome 12 open reading frame 74	12q22

94	RPL18A	ribosomal protein L18a	19p13
95	DENR	density-regulated protein	12q24.31
96	PLBD1	phospholipase B domain containing 1	12p13.1
97	PTPRR	protein tyrosine phosphatase, receptor type, R	12q15
98	TSPAN8	tetraspanin 8	12q14.1-q21.1
99	AEBP2	AE binding protein 2	12p12.3
100	RNASE1	ribonuclease, RNase A family, 1 (pancreatic)	14q11.2
101	EAPP	E2F-associated phosphoprotein	14q13.1
102	HSP90AA1	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1	14q32.33
103	GOLGA8T	golgin A8 family, member T	15q13.2
104	COPS2	COP9 signalosome subunit 2	15q21.2
105	RAB11A	RAB11A, member RAS oncogene family	15q22.31
106	OR4F6	olfactory receptor, family 4, subfamily F, member 6	15q26.3
107	MT2A	metallothionein 2A	16q13
108	AARS	alanyl-tRNA synthetase	16q22
109	ARL6IP1	ADP-ribosylation factor like GTPase 6 interacting protein 1	16p12-p11.2
110	MYOCD	myocardin	17p11.2
111	TAOK1; MIR4523	TAO kinase 1; microRNA 4523	17q11.2
112	RPL19	ribosomal protein L19	17q12
113	NFE2L1	nuclear factor, erythroid 2-like 1	17q21.3
114	NME1; NME1- NME2; NME2	NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 1; NME1-NME2 readthrough; NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 2	17q21.3
115	ANKFN1	ankyrin-repeat and fibronectin type III domain containing 1	17q22
116	MSI2	musashi RNA binding protein 2	17q22
117	DYNLL2	dynein, light chain, LC8-type 2	17q22
118	EIF4A3	eukaryotic translation initiation factor 4A3	17q25.3
119	NAA38	N(alpha)-acetyltransferase 38, NatC auxiliary subunit	17p13.1
120	SUPT4H1	SPT4 homolog, DSIF elongation factor subunit	17q22
121	H3F3B	H3 histone, family 3B (H3.3B)	17q25.1
122	IMPACT	impact RWD domain protein	18q11.2-q12.1
123	DSG4	desmoglein 4	18q12.1
124	DCC	DCC netrin 1 receptor	18q21.3
125	NEDD4L	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like, E3 ubiquitin protein ligase	18q21.31
126	MALT1	MALT1 paracaspase	18q21
127	TXNL4A	thioredoxin-like 4A	18q23
128	RPL18A; SNORA68	ribosomal protein L18a; small nucleolar RNA, H/ACA box 68	19p13
129	COX6B1	cytochrome c oxidase subunit VIb polypeptide 1 (ubiquitous)	19q13.1
130	C19orf70	chromosome 19 open reading frame 70	19p13.3
131	SNRPD2	small nuclear ribonucleoprotein D2 polypeptide	19q13.2
132	NDUFA13	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 13	19p13.2
133	SPINT2	serine peptidase inhibitor, Kunitz type, 2	19q13.1
134	ZNF773	zinc finger protein 773	19q13.43

135	NDUFA7	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 7, 14.5kDa	19p13.2
136	DEFB115	defensin, beta 115	20q11.21
137	PIGT	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class T	20q13.12
138	VAPB	VAMP (vesicle-associated membrane protein)-associated protein B and C	20q13.33
139	KCNJ6	potassium channel, inwardly rectifying subfamily J, member 6	21q22.1
140	OR11H1	olfactory receptor, family 11, subfamily H, member 1	22q11.2
141	MRPL40	mitochondrial ribosomal protein L40	22q11.2
142	SNAP29	synaptosome associated protein 29kDa	22q11.21
143	MEI1	meiotic double-stranded break formation protein 1	22q13.2
144	NDUFA6	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 6, 14kDa	22q13.2
145	NDUFA10	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 10, 42kDa	2q37.3