

УДК 618.19-006.6-091.8-033.2-08:615.28

Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность рака молочной железы как фактор, отражающий метастатический потенциал и чувствительность опухоли к химиотерапии

Т. С. Геращенко^{1,2}, М. В. Завьялова^{1,2,3}, Е. В. Денисов^{1,2*}, Н. В. Крахмаль^{1,3}, Д. Н. Паутова², Н. В. Литвяков^{1,2}, С. В. Вторушин^{1,3}, Н. В. Чердынцева^{1,2}, В. М. Перельмутер^{1,3}

¹Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, 634050, Томск, пер. Кооперативный, 5

²Томский государственный университет, 634050, Томск, просп. Ленина, 36

³Сибирский государственный медицинский университет, 634050, Томск, Московский тракт, 2

*E-mail: d_evgeniy@oncology.tomsk.ru

Поступила в редакцию 13.03.2016

Принята к печати 11.11.2016

РЕФЕРАТ Рак молочной железы (РМЖ) характеризуется значительной внутриопухолевой морфологической гетерогенностью. Изучена взаимосвязь между различными морфологическими структурами, частотой метастазирования и эффективностью неoadъювантной химиотерапии (НАХТ) в группах больных РМЖ, получавших ($n = 434$) и не получавших ($n = 249$) НАХТ. Изучена также вовлеченность эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) в формирование внутриопухолевой морфологической гетерогенности РМЖ. Показана значительная ассоциация внутриопухолевой морфологической гетерогенности с риском метастазирования РМЖ и ответом на НАХТ, в большинстве случаев коррелирующая с вкладом альвеолярных и трабекулярных структур. В частности, повышенная частота лимфогенного метастазирования обнаружена в опухолях, содержащих альвеолярные или трабекулярные структуры, по сравнению с опухолями без данных структур. Наличие альвеолярных или трабекулярных структур связано с повышенной частотой гематогенного метастазирования и низкой безметастатической выживаемостью больных, получавших НАХТ. Более того, альвеолярные или трабекулярные структуры были ассоциированы с отсутствием ответа на НАХТ. Интересно, что корреляция между альвеолярными структурами и высокой вероятностью гематогенного метастазирования опухоли выявлена только у пациенток, устойчивых к НАХТ, тогда как ассоциация трабекулярных структур была справедлива только в случае РМЖ, чувствительного к химиотерапии. Альвеолярные структуры были ассоциированы с химиорезистентностью только в группе с лимфогенными метастазами, в то время как трабекулярные структуры, напротив – только в группе без лимфогенных метастазов. В целом, увеличение морфологического разнообразия опухоли коррелировало с повышением лекарственной устойчивости и частоты лимфогенного и гематогенного метастазирования РМЖ. Показана переменная экспрессия эпителиальных (*EPCAM* и *CDH1*) и мезенхимальных (*ITGA5*, *ITGB5*, *CDH2*, *CDH11*, *TGF β 2*, *ZEB1*, *MMP2*, *DCN*, *MST1R*) маркеров и, тем самым, разная выраженность ЭМП в различных морфологических структурах. Таким образом, внутриопухолевую морфологическую гетерогенность РМЖ можно рассматривать как фактор, отражающий метастатический потенциал и чувствительность опухоли к химиотерапии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА внутриопухолевая гетерогенность, инвазия, метастазирование, рак молочной железы, химиотерапия, эпителиально-мезенхимальный переход.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ НАХТ – неoadъювантная химиотерапия; РМЖ – рак молочной железы; ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход.

ВВЕДЕНИЕ

Одна из основных характеристик злокачественности опухоли – неоднородность ее клеточного состава, или внутриопухолевая гетерогенность. Впервые неоднородность клеток по форме и морфологии в пределах одной опухоли была описана еще Рудольфом Вирховым в 19 веке [1]. Со времен Вирхова представления о феномене внутриопухолевой гетерогенности значительно расширились. В настоящее время известно, что различные популяции клеток могут существовать в опухоли и оказывать специфическое влияние на ее биологическое поведение [2]. Высокая степень внутриопухолевой гетерогенности ассоциирована с плохим клиническим прогнозом, а наличие определенных популяций клеток связывают с метастазированием и формированием лекарственной устойчивости опухоли [3]. Изучение различных форм внутриопухолевой гетерогенности и особенностей ее влияния на клиническое течение злокачественных новообразований является важнейшей проблемой современной онкологии.

Опухоли молочной железы характеризуются значительной вариабельностью клеточного состава, а также гистологической, экспрессионной, генотипической гетерогенностью [4]. Описана внутриопухолевая морфологическая гетерогенность инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа, наиболее распространенной гистологической формы РМЖ (частота встречаемости до 80%). Согласно классификации ВОЗ, клетки РМЖ могут быть организованы в корды (от англ. cords), кластеры и трабекулы, в некоторых опухолях преобладает солидный или синцитиальный клеточный компонент [5]. Кроме того, в пределах опухолей молочной железы могут встречаться тубулярные, альвеолярные, железисто-сосочковые и солидные формирования опухолевых клеток, а также участки наподобие карциноида либо представляющие собой фокусы скirrра [6]. В наших предыдущих исследованиях сделан акцент на изучение тубулярных, альвеолярных, солидных, трабекулярных структур и дискретных групп опухолевых клеток, их генетическом и экспрессионном портрете и их ассоциации с частотой лимфогенного метастазирования и эффективностью неoadъювантной химиотерапии РМЖ [7–12].

Ранее мы предположили, что различные типы структур могут быть морфологическим проявлением инвазивного роста опухоли молочной железы [8, 13]. Так, принято выделять индивидуальную и коллективную формы инвазии, представленные различными вариантами, которые отличаются друг от друга по форме и механизмам клеточной миграции. Индивидуальная миграция может проходить как амeboидным путем за счет регулируемых акто-

миозином сокращений цитолеммы, так и мезенхимальным (фибробластоподобным) с приобретением клетками вытянутой формы, усилением адгезии к внеклеточному матриксу и протеолитической активности. Коллективная инвазия осуществляется посредством мезенхимальной миграции групп опухолевых клеток (кластеров, солидных структур и др.) [13, 14]. Ключевым механизмом клеточной миграции является трансформация эпителиальных клеток в мезенхимальные в ходе ЭМП и приобретение ими локомоторного фенотипа [15]. Эпителиальные клетки в ходе ЭМП теряют межклеточные взаимодействия и апикально-базальную полярность, приобретают вытянутую форму и подвижность, что помогает им отделяться от основного опухолевого пласта. Описанные изменения регулируются факторами транскрипции Snail, Twist, Slug, ZEB1, ZEB2 и сопровождаются утратой молекул межклеточной адгезии (E-кадгерин, EPCAM и др.) и приобретением мезенхимальных характеристик – экспрессии N-кадгерина, виментина и т.д. [14, 16–19]. Известно, что инвазивный рост тесно связан с процессом метастазирования и влияет непосредственно на формирование лекарственной устойчивости [15].

В настоящей работе рассмотрена связь частоты лимфогенного и гематогенного метастазирования и эффективности назначаемой терапии с наличием в первичной опухоли молочной железы различных морфологических структур. С целью понимания вовлеченности процесса инвазии в формирование внутриопухолевой морфологической гетерогенности РМЖ проанализирован паттерн экспрессии генов, связанных с ЭМП, в различных морфологических структурах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Морфологический анализ и ассоциативные исследования

В работе проанализированы две группы больных РМЖ, проходивших лечение в отделении общей онкологии Томского НИИ онкологии. Первая группа включала 427 пациенток с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа $T_{1-4}N_{0-3}M_{0-1}$ в возрасте от 28 до 90 лет (средний возраст 49.9 ± 9.44 лет), получавших 2–4 курса НАХТ по схемам: CMX/CMF, CAH, FAC, таксаны. Во вторую группу вошли 249 пациенток с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа $T_{1-4}N_{0-3}M_{0-1}$ в возрасте от 21 до 85 (средний возраст 56.02 ± 11.16 лет), не получавших НАХТ. Характеристика пациенток приведена в *табл. 1 и 2*.

В образцах биопсий и операционного материала, полученных от больных обеих групп, оценивали при-

Таблица 1. Клинико-патологическая характеристика пациенток, получавших НАХТ

Клинико-патологический параметр	Показатель	Число случаев, %
Возраст	≤ 50 лет	230 (53.8)
	> 50 лет	197 (46.2)
Состояние менструальной функции	Сохраненная менструальная функция	224 (52.4)
	Менопауза	203 (47.6)
Размер опухоли	T ₁	101 (23.7)
	T ₂	266 (62.3)
	T ₃	48 (11.2)
	T ₄	12 (2.8)
Лимфогенные метастазы	N ₀	213 (49.9)
	N ₁	138 (32.3)
	N ₂	64 (15.0)
	N ₃	12 (2.8)
Гематогенные метастазы	M ₀	220 (51.5)
	M ₁	127 (29.7)
	Нет данных	80 (18.8)
Экспрессия рецепторов к эстрогенам	Есть	167 (39.1)
	Нет	158 (37.0)
	Нет данных	102 (23.8)
Экспрессия рецепторов к прогестерону	Есть	154 (36.1)
	Нет	173 (40.5)
	Нет данных	100 (23.4)
Экспрессия рецепторов эпидермального фактора роста (HER2)	-	160 (37.5)
	+	76 (17.9)
	++	26 (6.0)
	+++	8 (1.8)
	Нет данных	157 (36.8)
Молекулярный подтип	Люминальный	153 (35.8)
	Трижды негативный	96 (22.5)
	HER2-позитивный	26 (6.1)
	Нет данных	152 (35.6)
Схема НАХТ	CMX/CMF	165 (38.7)
	CAH	56 (13.1)
	Таксаны	31 (7.2)
	FAC	110 (25.8)
	Нет данных	65 (15.2)
Эффект НАХТ	Полная регрессия	27 (6.3)
	Частичная регрессия	183 (42.9)
	Стабилизация	133 (31.2)
	Прогрессия	21 (4.9)
	Нет данных	63 (14.7)

Примечания: CMX – циклофосфан, метотрексат, кселода; CMF – циклофосфан, метотрексат, 5-фторурацил; FAC – 5-фторурацил, адрибластин, циклофосфан; CAH – циклофосфан, адрибластин, кселода; таксаны – доцетаксел, паклитаксел.

Таблица 2. Клинико-патологическая характеристика пациенток, не получавших НАХТ

Параметр	Показатель	Число случаев, %
Возраст	≤50 лет	77 (31.0)
	>50 лет	172 (69.0)
Состояние менструальной функции	Сохраненная менструальная функция	169 (67.9)
	Менопауза	80 (32.1)
Размер опухоли	T ₁	145 (58.2)
	T ₂	95 (38.2)
	T ₃	8 (3.2)
	T ₄	1 (0.4)
Лимфогенные метастазы	N ₀	146 (58.6)
	N ₁	65 (26.1)
	N ₂	26 (10.5)
	N ₃	12 (4.8)
Гематогенные метастазы	M ₀	222 (89.2)
	M ₁	27 (10.8)
Экспрессия рецепторов к эстрогенам	Есть	184 (74.0)
	Нет	65 (26.0)
Экспрессия рецепторов к прогестерону	Есть	159 (63.9)
	Нет	90 (36.1)
Экспрессия рецепторов эпидермального фактора роста (HER2)	Есть	48 (19.3)
	Нет	201 (80.7)
Молекулярный подтип	Люминальный	195 (78.3)
	Трижды негативный	36 (14.5)
	HER2-позитивный	17 (6.8)
	Нет данных	1 (0.4)

существование морфологических структур. Биопсийный и операционный материалы, представленные двумя–шестью образцами опухоли молочной железы, использовали для подготовки двух срезов (5–6 мкм). Срезы окрашивались гематоксилином и эозином и просматривались двумя–тремя врачами-патологами на предмет представленности различных морфологических структур (тубулярных, альвеолярных, солидных, трабекулярных и дискретных групп опухолевых клеток) в соответствии с [10].

Эффективность НАХТ оценивали по результатам инструментального исследования (УЗИ и маммография) по шкале RECIST [20]. Под клинически объективным ответом на НАХТ подразумевалась полная или частичная регрессия опухоли, под отсутствием ответа – стабилизация или прогрессирование.

Проведены ассоциативные исследования связи клинических параметров заболевания у пациенток обеих групп и эффективности химиотерапии в груп-

пе, получавшей НАХТ, с наличием в опухолях различных морфологических структур. Полученные данные обрабатывали с помощью стандартных непараметрических методов (критерий χ^2 и критерий Фишера) с использованием программного пакета Statistica 8.0 for Windows. Показатели выживаемости оценивали по методу Каплан–Майера. Обсуждали результаты с достоверностью различий при $p < 0.05$.

Экспрессионный анализ

Анализ экспрессии генов, вовлеченных в ЭМП: *ERCAM, ITGA5, ITGB5, CDH1, CDH2, CDH11, TGFb2, ZEB1, MMP2, DCN, MST1R*, проведен в различных морфологических структурах опухолей молочной железы с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени. Использовали замороженные образцы опухолевой ткани, полученные в ходе оперативного вмешательства от семи пациенток с инвазивной карциномой молочной железы неспецифиче-

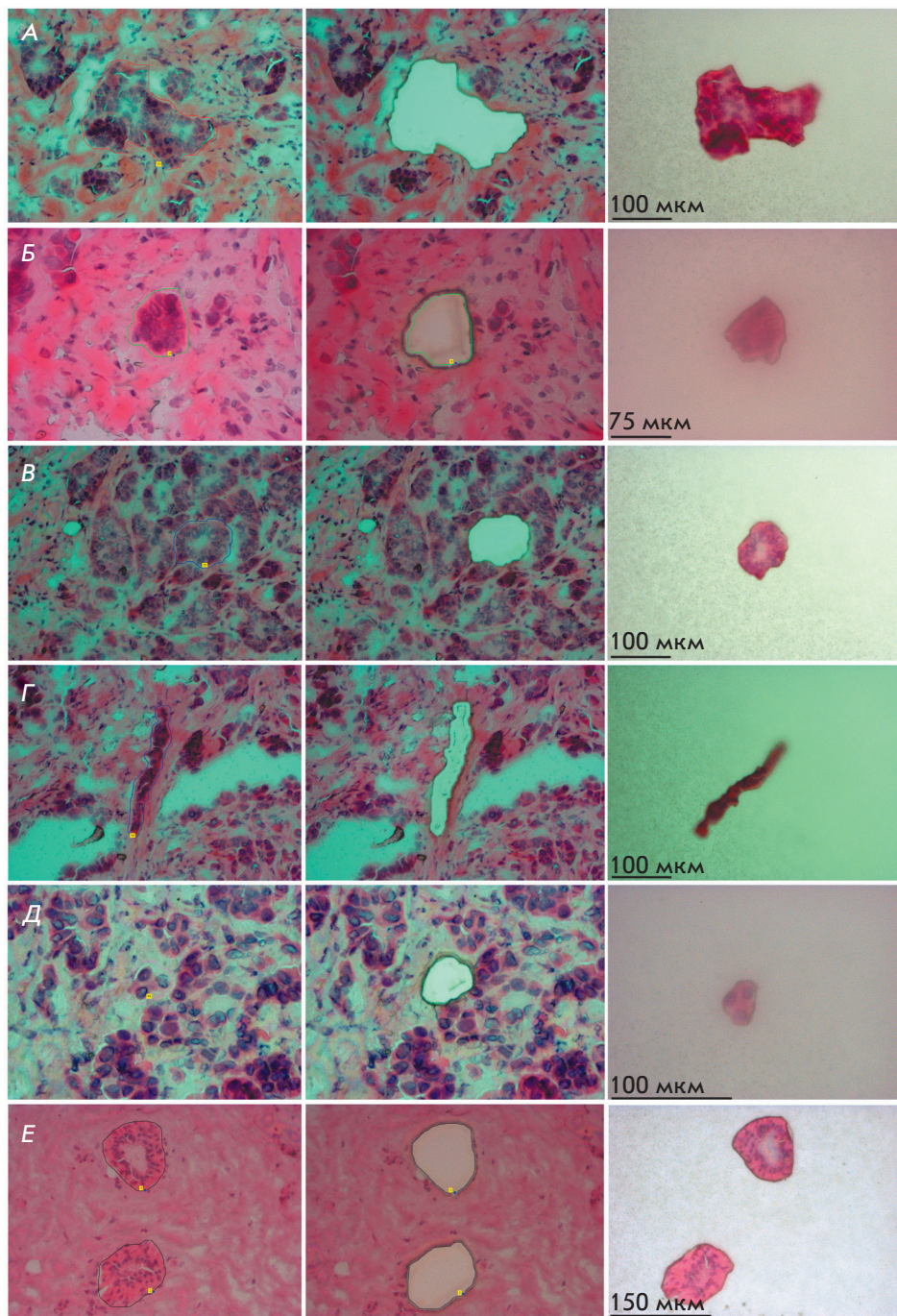


Рис. 1. Лазерная микродиссекция различных морфологических структур и морфологически неизменных протоков из опухолевой и нормальной тканей молочной железы соответственно. Представлены срезы до и после микродиссекции, а также полученные структуры: А – солидная, Б – альвеолярная, В – тубулярная, Г – трабекулярная, Д – дискретная группа опухолевых клеток, Е – морфологически неизменные протоки молочных желез. Окраска гематоксилином и эозином

ского типа люминального В молекулярного подтипа ($T_{1-2}N_{0-3}M_0$, возраст от 42 до 65 лет, средний возраст 56.42 ± 8.75 лет), не получавших НАХТ. Из окрашенных гематоксилином и эозином срезов свежесамороженных образцов опухолевой ткани молочной железы с помощью технологии лазерной микродиссекции PALM (Carl Zeiss, Германия) согласно ранее опубликованной методике (рис. 1) получили пять типов морфологических структур [8, 21]. В частности, получены тубулярные, альвеолярные и трабекулярные

структуры (90–120 образцов, ~900–1200 клеток), солидные структуры (50–60 образцов, до 5000 клеток) и дискретные группы опухолевых клеток (300–350 образцов, ~400–600 клеток). Для предотвращения попадания компонентов стромы в образцы лазерную микродиссекцию проводили по краю наружного эпителиального слоя морфологических структур. Из полученных в результате микродиссекции образцов выделяли суммарную РНК (RNeasy Micro Plus Kit, Qiagen, США) и оценивали ее целостность

(RIN) с помощью системы автоматического электрофореза (2200 TapeStation, Agilent, США). РНК подвергали обратной транскрипции (кДНК), лигированию и полнотранскриптомной амплификации (QuantiTect Whole Transcriptome, Qiagen, США). Амплифицированную кДНК использовали для проведения ПЦР согласно [8]. Результаты экспрессионного анализа нормализовали относительно экспрессии в морфологически неизменных протоках молочной железы, также полученных в ходе лазерной микродиссекции образцов прилегающей к опухоли нормальной ткани. Уровень экспрессии оценивали относительно экспрессии референсного гена *ACTB* с использованием метода Pfaffl [22].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Хорошо известно, что химиотерапия влияет на популяционный состав опухоли. Изменения, возникающие в опухолевых клетках под действием химиотерапии, в значительной степени определяют дальнейшее течение заболевания: лекарственную устойчивость, метастазирование и рецидивирование [23–25]. В связи с этим нами проанализированы две независимые выборки больных РМЖ, получавших и не получавших НАХТ.

Выраженность лимфогенного и гематогенного метастазирования у больных РМЖ, не получавших НАХТ, в зависимости от внутриопухолевой морфологической гетерогенности

Наличие либо альвеолярных, либо трабекулярных структур в опухоли пациенток, не получавших НАХТ, ассоциировано с большей частотой лимфогенного метастазирования РМЖ по сравнению с опухолями без данных структур (47.8 против 23.2%, $p = 0.0004$; 43.0 против 30.0%, $p = 0.0012$ соответственно, *рис. 2А*). Отсутствие в опухоли дискретных групп клеток связано с увеличением частоты гематогенного метастазирования по сравнению с опухолями, содержащими данные структуры (16.9 против 8.2%, $p = 0.043$, *рис. 2В*). Выявленные закономерности согласуются с полученными ранее на меньшей выборке больных данными о сопряженности альвеолярных структур с частотой лимфогенного метастазирования [7, 10, 11] и трабекулярных структур с вероятностью возникновения лимфогенного метастазирования на уровне тенденции [12].

Выраженность лимфогенного метастазирования у больных РМЖ, получавших НАХТ, в зависимости от внутриопухолевой морфологической гетерогенности

У пациенток, получавших НАХТ, частота лимфогенного метастазирования опухолей, содержащих аль-

веолярные или трабекулярные структуры, или дискретные группы клеток, была выше, чем опухолей без этих структур (64.2 против 33.0%, $p < 0.0001$; 57.7 против 36.8%, $p < 0.0001$; 59.3 против 41.4%, $p = 0.0002$ соответственно, *рис. 2Б*). Ранее мы уже описали связь между присутствием альвеолярных структур в опухолях больных, получавших НАХТ, и повышением вероятности лимфогенного метастазирования. Однако исследуемая группа была меньшего размера, а закономерность прослеживалась только у пациенток в состоянии менопаузы [26]. У пациенток с альвеолярными или трабекулярными структурами частота лимфогенного метастазирования была выше, независимо от эффекта химиотерапии ($p = 0.0032$ и $p < 0.0001$; $p = 0.0004$ и $p = 0.0152$, *рис. 3А*). Напротив, в группе с клинически объективным ответом на химиотерапию частота лимфогенного метастазирования у пациенток с дискретными группами клеток в опухоли была выше, чем у больных, опухоли которых не имели этих структур (53.8 против 34.0%, $p = 0.0041$ соответственно, *рис. 3А*).

Выраженность гематогенного метастазирования у больных РМЖ, получавших НАХТ, в зависимости от внутриопухолевой морфологической гетерогенности

У пациенток с альвеолярными или трабекулярными структурами в опухолях частота гематогенного метастазирования была выше, чем у женщин с опухолями без таких структур (42.8 против 27.3%, $p = 0.0036$; 41.9 против 20.7%, $p = 0.0005$, *рис. 2Г*). Более того, больные с альвеолярными или трабекулярными структурами имели низкие показатели безметастатической выживаемости в сравнении с пациентками без данных структур ($p = 0.0087$; $p = 0.0073$ соответственно, *рис. 4А,Б*). Связь альвеолярных структур с гематогенным метастазированием выявлена только у пациенток, опухоли которых были устойчивы к химиотерапии (58.5 против 31.0%, $p = 0.0030$, *рис. 3Б*), тогда как в случае трабекулярных структур такая связь наблюдалась только у пациенток, чувствительных к химиотерапии (34.3 против 9.3%, $p = 0.0011$, *рис. 3Б*). Кроме того, связь морфологических структур с гематогенным метастазированием зависела от состояния менструальной функции. Так, альвеолярные и солидные структуры были ассоциированы с высокой частотой гематогенного метастазирования только у больных с сохраненной менструальной функцией (48.0 против 26.5%, $p = 0.0059$; 50.0 против 33.0%, $p = 0.028$ соответственно, *рис. 3Д*), тогда как трабекулярные структуры оказались связанными с высокой вероятностью развития отдаленных метастазов только в подгруппе пациенток, находящихся в менопаузе (41.4 против 9.7%, $p = 0.0002$, *рис. 3Д*).

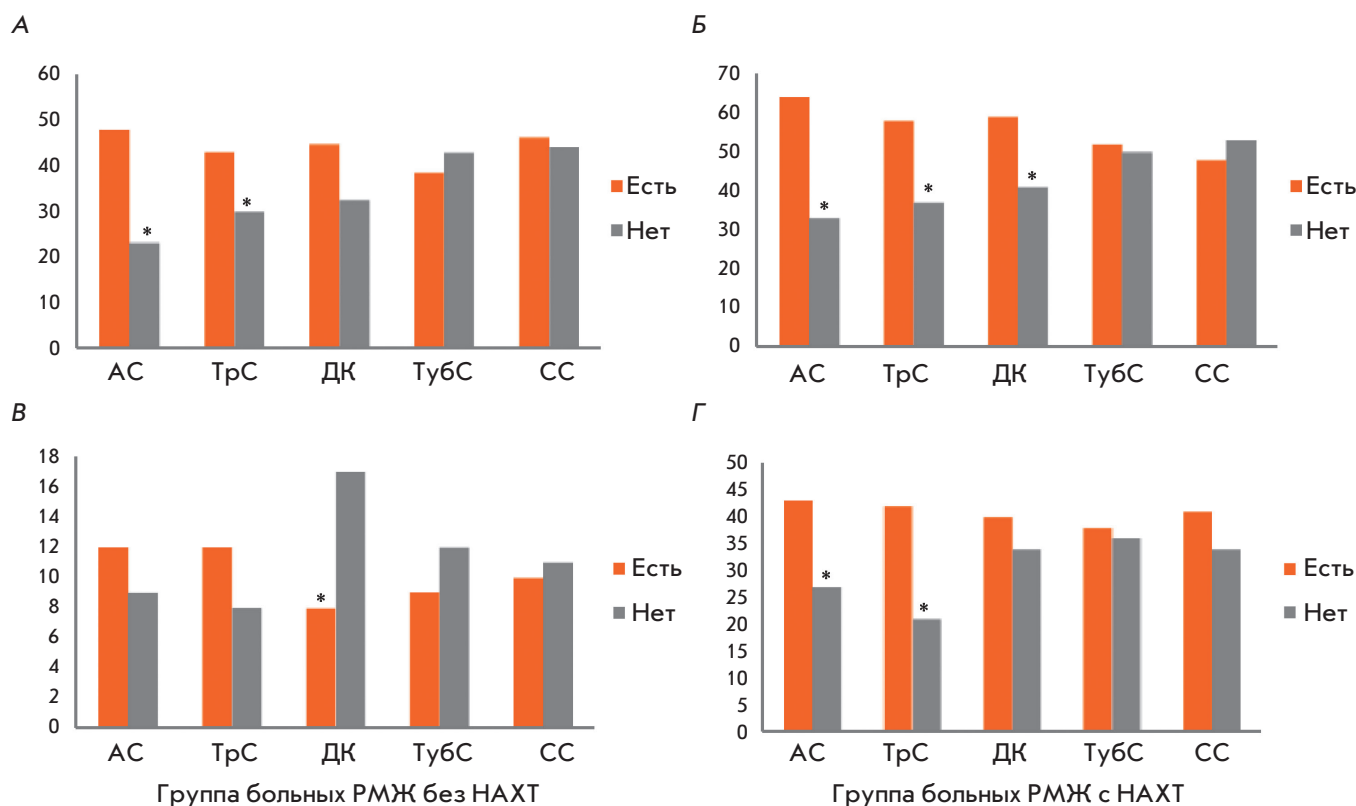


Рис. 2. Частота лимфогенного (А, Б) и гематогенного (В, Г) метастазирования у больных РМЖ в зависимости от наличия в опухоли различных типов морфологических структур. А – частота (%) лимфогенного метастазирования у больных, не получавших НАХТ. Б – частота (%) лимфогенного метастазирования у больных, получавших НАХТ. В – частота (%) гематогенного метастазирования у больных, не получавших НАХТ. Г – частота (%) гематогенного метастазирования у больных, получавших НАХТ. АС – альвеолярные структуры; ТрС – трабекулярные структуры; ДК – дискретные группы опухолевых клеток; ТубС – тубулярные структуры; СС – солидные структуры. * – статистически значимые различия ($p < 0.05$)

Зависимость эффективности НАХТ от внутриопухолевой морфологической гетерогенности РМЖ

Наличие альвеолярных или трабекулярных структур в опухолях молочной железы чаще сочеталось с отсутствием ответа на НАХТ по сравнению с опухолями без данных структур (50.3 против 35.8%, $p = 0.0056$; 50.7 против 31.6%, $p = 0.0004$ соответственно, *рис. 3В*). Ранее на меньшей выборке больных мы описали сопряженность альвеолярных и трабекулярных структур с химиорезистентностью РМЖ и рассмотрели возможные механизмы такой взаимосвязи [8, 9]. Интересно, что связь альвеолярных структур с химиорезистентностью наблюдалась только в группе с лимфогенными метастазами: 57.1 (наличие структур) против 36.2% (больные без структур; $p = 0.0089$ соответственно, *рис. 3Г*). В то же время связь трабекулярных структур с химиорезистентностью обнаружена только у пациенток без лимфогенных метастазов (45.8 против 28.0%, $p = 0.0117$ соответ-

ственно, *рис. 3Г*). Связь структур с эффективностью НАХТ также зависела от менопаузы больных РМЖ. Присутствие альвеолярных, либо трабекулярных структур, либо дискретных групп клеток было связано с отсутствием ответа на химиотерапию только в подгруппе больных, находящихся в репродуктивном периоде (51.0 против 33.3%, $p = 0.0133$; 56.2 против 24.7%, $p = 0.0000$; 50.0 против 35.0%, $p = 0.0365$ соответственно, *рис. 3Е*). Наличие солидных структур оказалось связанным с клинически объективным ответом на химиотерапию только у пациенток с сохраненной менструальной функцией (67.0 против 48.4%, $p = 0.0094$, *рис. 3Е*).

Следует отметить, что лекарственная устойчивость, высокая частота лимфогенного и гематогенного метастазирования в целом чаще наблюдались в опухолях с тремя–пятью типами структур по сравнению с опухолями с одним–двумя вариантами структур ($p = 0.0082$; $p < 0.0001$; $p = 0.0005$ соответственно, *рис. 5*).

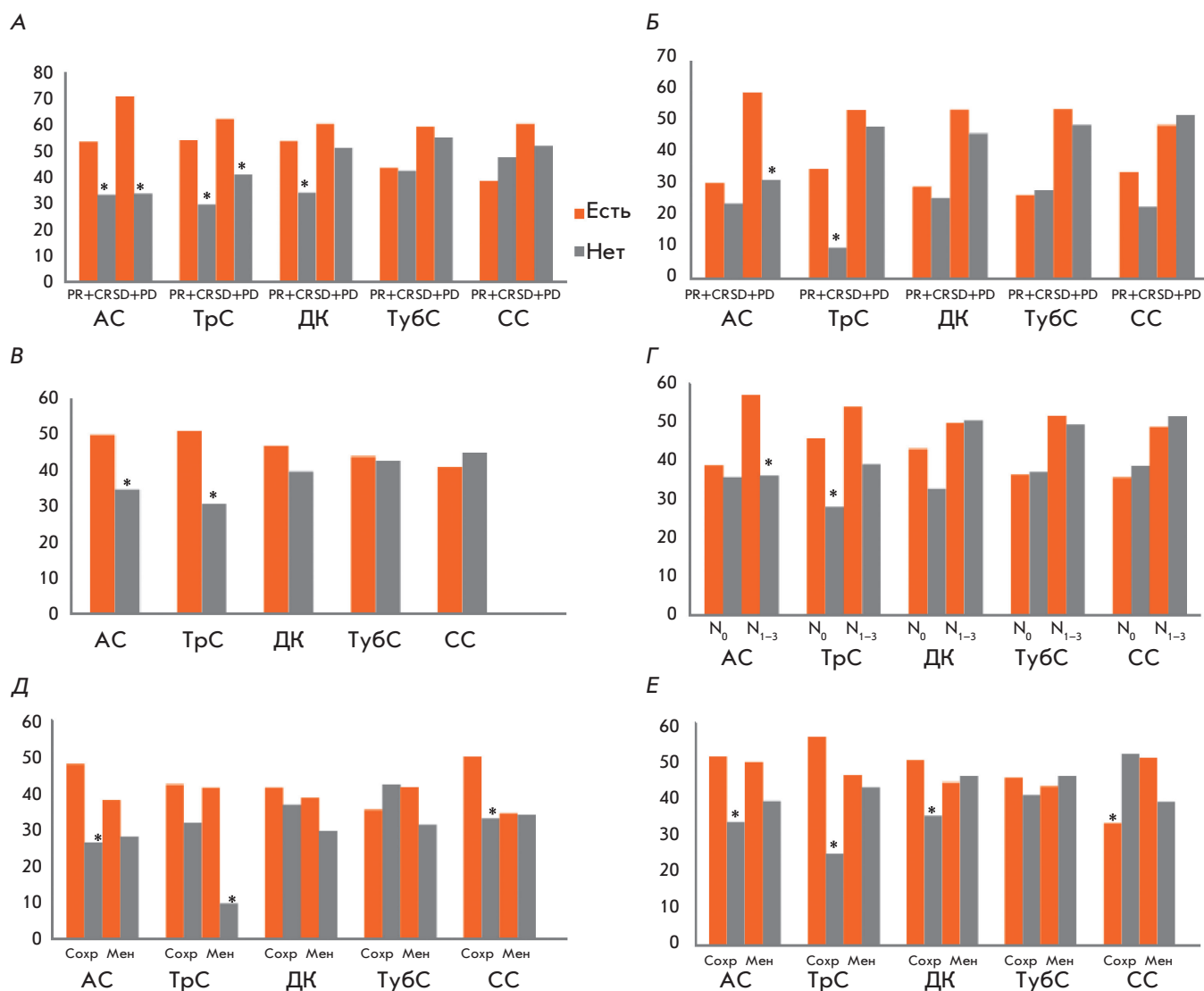


Рис. 3. Эффект химиотерапии и частота метастазирования у больных РМЖ, получавших НАХТ, в зависимости от присутствия в опухоли различных типов морфологических структур. **А, Б** – частота (%) лимфогенного и гематогенного метастазирования у больных с отсутствием и наличием ответа на химиотерапию. **В** – частота (%) отсутствия ответа на неoadъювантную химиотерапию. **Г** – частота (%) отсутствия ответа на неoadъювантную химиотерапию в группах больных с/без лимфогенных метастазов. **Д, Е** – частота (%) гематогенного метастазирования и отсутствия ответа на неoadъювантную химиотерапию у больных, находящихся в репродуктивном периоде и в менопаузе. АС – альвеолярные структуры; TrC – трабекулярные структуры; ДК – дискретные группы опухолевых клеток; ТубС – тубулярные структуры; СС – солидные структуры; Сохр – сохраненная менструальная функция; Мен – менопауза; N₀ – отсутствие лимфогенных метастазов; N₁₋₃ – наличие лимфогенных метастазов; PR + CR (от англ. partial response + complete response) – частичная и полная регрессия (клинически объективный ответ на НАХТ); SD + PD (от англ. stable disease + progressive disease) – стабилизация и прогрессирование заболевания (отсутствие ответа на НАХТ). * – статистически значимые различия (p < 0.05)

Анализ ассоциации внутриопухолевой морфологической гетерогенности с частотой метастазирования и эффективностью НАХТ в зависимости от схемы химиотерапии, молекулярного подтипа РМЖ и размера опухоли не проводили, ввиду непропорционального соотношения числа случаев в подгруппах.

Экспрессия генов ЭМП в различных морфологических структурах опухолей молочной железы

Анализ экспрессии генов, вовлеченных в ЭМП, показал, что для каждой из структур характерен специфический набор маркеров (рис. 6). Экспрессия ге-

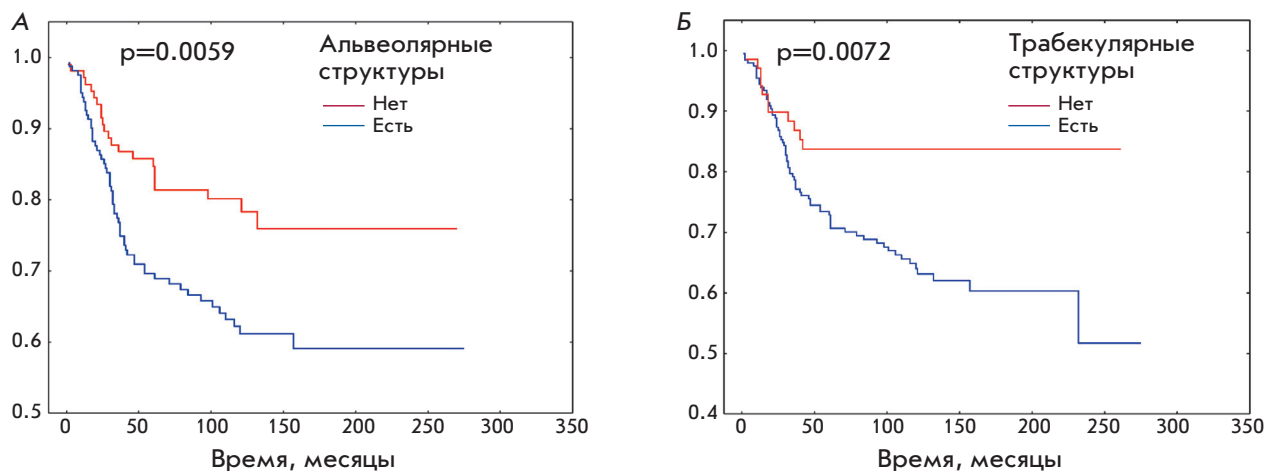


Рис. 4. Безметастатическая выживаемость больных РМЖ с наличием в опухоли альвеолярных (А) или трабекулярных структур (Б)

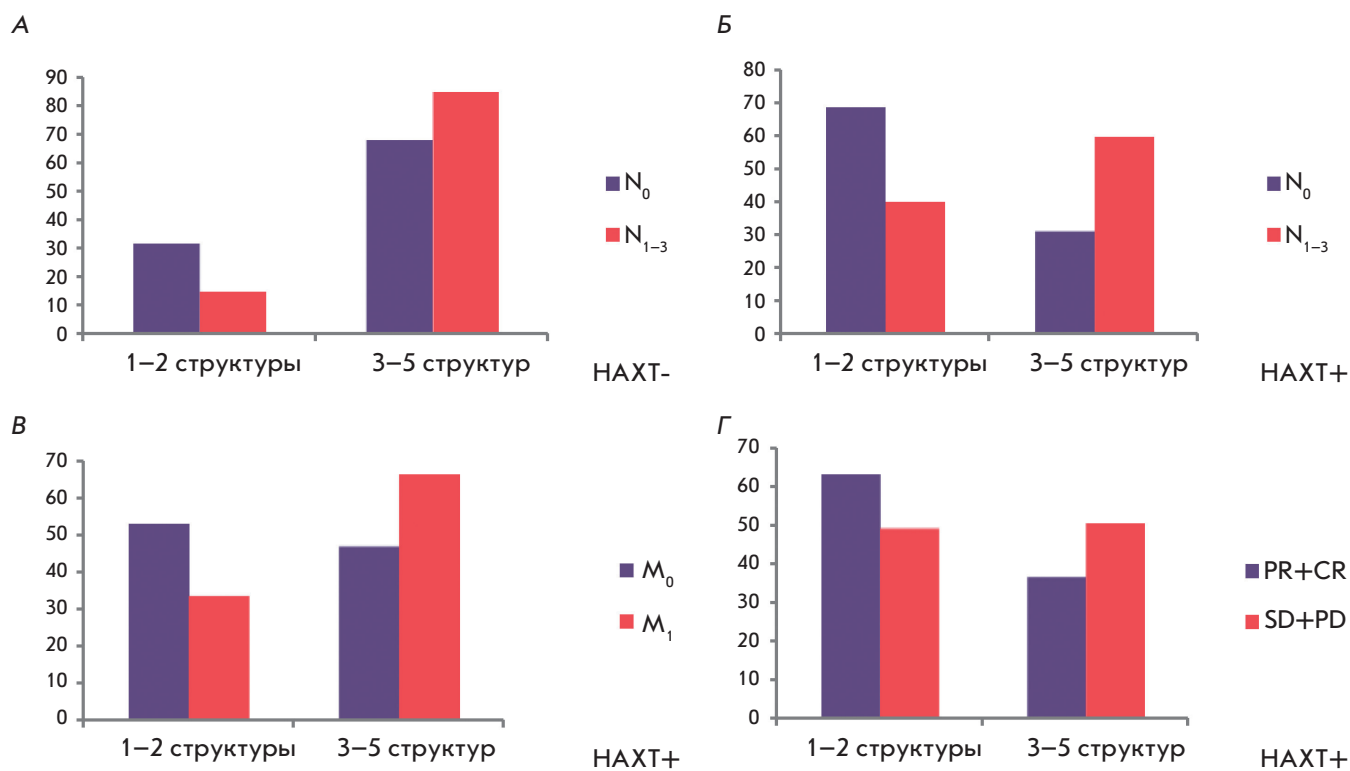


Рис. 5. Эффект химиотерапии и частота метастазирования в зависимости от количества различных типов морфологических структур в опухолях больных РМЖ. А – частота (%) лимфогенного метастазирования у больных с низким (1–2 структуры) и высоким (3–5 структур) морфологическим разнообразием опухолей, не получавших НАХТ. Б – частота (%) лимфогенного метастазирования у больных с низким (1–2 структуры) и высоким (3–5 структур) морфологическим разнообразием опухолей, получавших НАХТ. В – частота (%) гематогенного метастазирования у больных с низким (1–2 структуры) и высоким (3–5 структур) морфологическим разнообразием опухолей. Г – частота (%) отсутствия ответа на неoadъювантную химиотерапию у больных с низким (1–2 структуры) и высоким (3–5 структур) морфологическим разнообразием опухолей. НАХТ- – больные без неoadъювантной химиотерапии; НАХТ+ – больные с неoadъювантной химиотерапией. На рисунке представлены статистически значимые различия ($p < 0.05$)

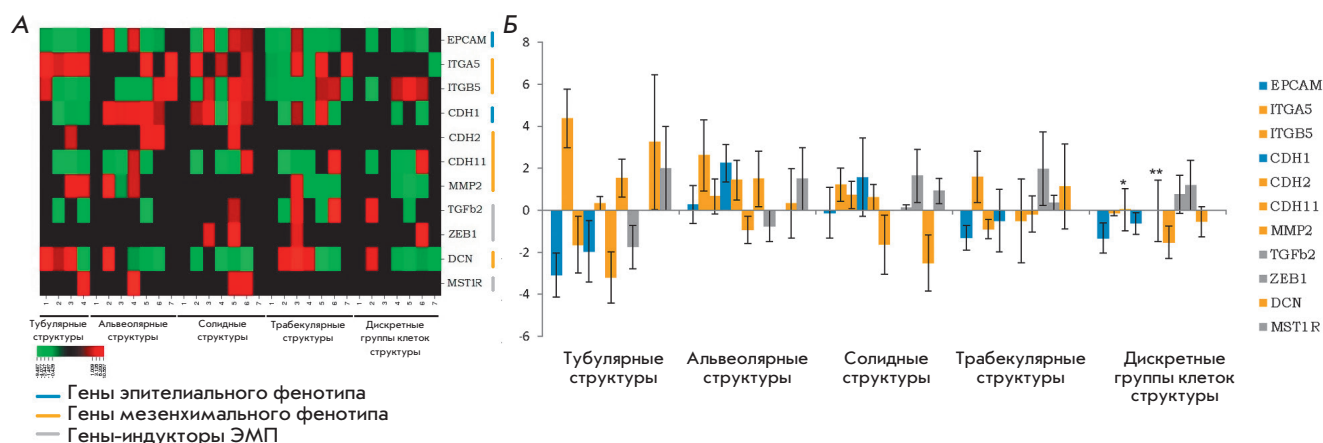


Рис. 6. Экспрессия генов ЭМП в различных морфологических структурах опухолей молочной железы. **А** – тепловая карта уровня экспрессии. **Б** – логарифмированное среднее значение уровня экспрессии. * – уровень экспрессии равен 0.029. ** – уровень экспрессии равен 0.016. Большая величина стандартной ошибки среднего обусловлена малым количеством пациенток в изучаемой группе, значительным варьированием уровня экспрессии между пациентками и отсутствием экспрессии в некоторых образцах морфологических структур

нов эпителиального фенотипа *EPCAM* и *CDH1* была свойственна всем структурам (рис. 6Б). Однако тубулярные, трабекулярные структуры и дискретные группы опухолевых клеток имели низкий уровень экспрессии (рис. 6Б). Экспрессия генов-индукторов ЭМП – *TGFb2*, *ZEB1* и *MST1R* была гетерогенной как в различных опухолях молочной железы, так и в структурах (рис. 6А). *ZEB1* и *MST1R* чаще экспрессировались в солидных структурах, тогда как *TGFb2* – в трабекулярных структурах. Экспрессия генов мезенхимального фенотипа (*CDH2*, *CDH11*, *ITGA5*, *ITGB5*, *MMP2* и *DCN*) проявлялась в разной степени. *CDH2*, кодирующий классический мезенхимальный маркер – N кадгерин, в большинстве структур не экспрессировался. Экспрессия гена интегрина (*ITGA5*) практически полностью отсутствовала в дискретных группах опухолевых клеток и была более выраженной в тубулярных и трабекулярных структурах. Напротив, экспрессия гена *ITGB5*, как и гена протеогликана декорина (*DCN*), равномерно встречалась в различных структурах. Интересно, что экспрессия гена матриксной металлопротеиназы 2 (*MMP2*) отсутствовала только в солидных структурах (рис. 6А).

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты говорят о дифференциальном вкладе различных морфологических структур в химиорезистентность и прогрессию РМЖ. С диссеминацией опухолевых клеток как лимфогенной, так и гематогенной, в наибольшей степени связаны альвеолярные и трабекулярные структуры. Интересно, что вклад альвеолярных и трабеку-

лярных структур в гематогенное метастазирование, а также влияние дискретных групп клеток на частоту лимфогенного метастазирования наблюдали только в группе больных, получавших химиотерапию. Очевидно, что химиотерапия является фактором, модулирующим опухолевую прогрессию РМЖ. Любопытно, что в группе больных с НАХТ присутствие в опухоли альвеолярных и трабекулярных структур было одновременно связано как с частотой лимфогенного и гематогенного метастазирования, так и с химиорезистентностью, что говорит о взаимосвязи данных процессов. Связь между альвеолярными и трабекулярными структурами и частотой лимфогенного метастазирования не зависела от эффекта химиотерапии. Ассоциацию альвеолярных структур с частотой гематогенного метастазирования наблюдали только в группе пациенток, устойчивых к НАХТ, трабекулярных – у больных с клинически объективным ответом. Вероятно, зависимость высокой частоты лимфогенного и гематогенного метастазирования и лекарственной устойчивости от морфологического разнообразия опухоли в целом объясняется также увеличением доли альвеолярных и трабекулярных структур в общем объеме морфологических компонентов. Показано, что внутриопухолевая морфологическая гетерогенность значительно влияет на клинический исход РМЖ. Об этом говорят показатели безметастатической выживаемости: у больных с альвеолярными или трабекулярными структурами в опухоли выживаемость оказалась значимо ниже, чем у пациенток без данных структур.

Ранее мы предположили, что морфологические структуры различного типа можно отнести к вари-

антам инвазивного роста: дискретные группы клеток представляют индивидуальную миграцию, солидные, альвеолярные, трабекулярные и тубулярные структуры – различные виды коллективной миграции [8, 13]. В ходе инвазивного роста опухолевые клетки мигрируют из первичного очага посредством интравазации в лимфатические и/или кровеносные сосуды с последующей диссеминацией в другие органы. Неопластические клетки не обладают запрограммированной способностью к миграции, они приобретают эту способность путем запуска сигнальных каскадов *de novo*, ответа на цитокиновую стимуляцию или под влиянием противоопухолевой терапии. ЭМП как центральная молекулярная программа, индуцируемая в ходе клеточной миграции мезенхимального типа, создает предпосылки для формирования как минимум трех фенотипических состояний опухолевых клеток: эпителиального, мезенхимального и переходного эпителиально-мезенхимального [27, 28]. Наиболее агрессивным считается переходное состояние, при котором клетка обладает гибридным фенотипом, приобретая мезенхимальные характеристики и частично оставляя сохранными эпителиальные черты [27–29]. Кроме того, как показано в условиях *in vitro*, гибридное состояние ЭМП связано с повышенным образованием сфероидов – кластеров опухолевых клеток (2–50 клеток), обладающих способностью к интравазации в кровеносные сосуды и связанных с более выраженным метастазированием [27, 28]. Интересно, что альвеолярные структуры по форме и количеству клеток подобны сфероидам, циркулирующим в крови онкологических больных, а по результатам настоящего исследования присутствие альвеолярных структур в опухоли связано с повышением частоты лимфогенного и гематогенного метастазирования. По всей видимости, альвеолярные структуры, наряду с трабекулярными, представляют собой варианты коллективной миграции с гибридным эпителиально-мезенхимальным фенотипом, что наделяет их агрессивными характеристиками и, как следствие, высокой метастатической активностью. Действительно, по результатам оценки экспрессии генов эпителиального и мезенхимального состояний альвеолярные и трабекулярные структуры характеризовались переходным состоянием, сохраняя эпителиальные (*EPCAM*, *CDH1*) и мезенхимальные черты (*CDH11*, *ITGB5*, *MMP2*, *DCN* и др.). Солидные структуры можно также отнести к переходному состоянию ЭМП, но с преобладанием эпителиальных характеристик (*EPCAM*, *CDH1*). Так, солидные структуры во многом могут быть вариантом коллективной миграции с парциальным (частичным) ЭМП в зоне инвазивного фронта [13, 14]. Связь альвеолярных структур с повышенным отдаленным мета-

стазированием может также объясняться участием данных морфологических вариантов в формировании преметастатических ниш путем высокой продукции цитокинов и факторов роста [30].

Интересно, что тубулярные структуры характеризовались низкой экспрессией эпителиальных маркеров *EPCAM* и *CDH1* наряду с повышенной экспрессией генов мезенхимального фенотипа – *DCN*, *ITGA5*, *MMP2*. Морфология тубулярных структур, по форме напоминающая нормальные протоки молочных желез, скорее говорит об эпителиальности этих морфологических объединений. Кроме того, наличие тубулярных структур в опухоли стандартно используется как благоприятный прогностический признак при определении степени злокачественности: чем больше тубулярных структур в опухоли, тем ниже степень злокачественности, и наоборот [31]. Подтверждают положительное прогностическое значение тубулярных структур и наши предыдущие данные: повышение соотношения трабекулярных и тубулярных структур (Тр/Туб) в опухоли связано с высокой частотой гематогенного метастазирования. Так, при коэффициенте Тр/Туб, равном 2, риск гематогенного метастазирования в 5 раз выше, чем при Тр/Туб, равном 1 [32]. Вероятно, экспрессию мезенхимальных маркеров в тубулярных структурах можно объяснить тем, что часть структур претерпевает начальные этапы ЭМП. Кроме того, существуют данные, согласно которым эпителиальные клетки в пределах гетерогенной опухоли могут способствовать поддержанию переходного состояния других опухолевых клеток, претерпевающих ЭМП, за счет секреции стимулирующих факторов [19].

Дискретные группы опухолевых клеток как варианты индивидуальной миграции являются наиболее гетерогенными по составу морфологическими компонентами опухоли, они могут содержать одиночные клетки или группы клеток, вероятно, способные передвигаться как мезенхимальным, так и амебоидным путями. Фенотип дискретных групп опухолевых клеток характеризуется переменным экспрессионным портретом с низкой представленностью эпителиальных маркеров на фоне незначительного повышения мезенхимальных черт. Последнее было несколько неожиданным, поскольку образование одиночных опухолевых клеток или небольших их скоплений скорее происходит в результате ЭМП, когда клетки утрачивают эпителиальные черты и способность формировать многоклеточные кластеры. В то же время акцент делается на то, что использования известных маркеров мезенхимального фенотипа, часть из которых мы использовали в нашей работе, недостаточно для суждения о наличии или отсутствии мезенхимальности у опухолевых клеток [33].

Опубликовано немало сведений о том, что назначаемая в предоперационном периоде химиотерапия способна модифицировать геном опухолевых клеток и влиять на популяционный состав опухоли [23–25]. Показано, что молекулярный профиль образцов первичной опухоли трижды негативного РМЖ после НАХТ отличается от профиля биопсийных образцов тех же опухолей до проведения химиотерапии [34]. Установлено, что химиотерапевтическое воздействие способно инициировать образование и/или экспансию клеточных популяций, устойчивых к терапии [24]. Под воздействием НАХТ морфологические структуры опухолей молочной железы могли приобрести дополнительные признаки, усиливающие опухолевую диссеминацию и способствующие последующему формированию химиорезистентности. Более того, лекарственная устойчивость и инвазия являются тесно взаимосвязанными процессами, поддерживаемыми друг друга в процессе злокачественного роста [15, 35, 36]. Подобная взаимосвязь хорошо прослеживается на примере альвеолярных и трабекулярных структур, связанных одновременно и с высокой частотой лимфогенного и гематогенного метастазирования новообразования, и с устойчивостью к проводимой терапии. Все дело в том, что в мигрирующих клетках активируются общие для инвазии и химиорезистентности сигнальные пути. Каскад, запускаемый через интегрины, кадгеринины, малые GTP-азы Ras и Rho, пересекается с молекулярными путями PI3K, mTOR, Src и MAP-киназ [15, 35]. Состояние ЭМП, которое претерпевают мигрирующие клетки, уменьшает чувствительность клеток к противоопухолевой терапии [18, 24]. Опухолевые клетки, находящиеся в процессе ЭМП, проявляют высокую устойчивость к радиотерапии и ряду химиотерапевтических агентов [24]. Кроме того, ЭМП индуцирует работу ABC-транспортеров и активацию альтернативных онкогенных сигнальных путей EGFR, RAF, MEK, что способствует формированию

устойчивости к лекарственной и в том числе к таргетной терапии [37, 38].

Таким образом, биологическое поведение опухоли во многом зависит от особенностей ее инвазивного роста [14, 15]. Нами показано, что внутриопухолевая морфологическая гетерогенность РМЖ, вероятно, представленная вариантами инвазивного роста на различных стадиях ЭМП, может быть фактором, определяющим метастатический потенциал опухоли, способность клеток отвечать на проводимую терапию и влиять на клинический исход заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основной преградой на пути к успешной диагностике и лечению онкологических заболеваний является внутриопухолевая гетерогенность. Ввиду значительного внутриопухолевого разнообразия современные биопсийные методы диагностики не дают развернутого представления о дальнейшем характере клинической манифестации опухоли. Нами показано, что внутриопухолевая морфологическая гетерогенность РМЖ, представленная вариантами инвазивного опухолевого роста, ассоциирована с частотой лимфогенного, гематогенного метастазирования и эффективностью предоперационной терапии. Возможно, именно морфологическое разнообразие опухоли может лечь в основу создания эффективной модели для разработки прогностических и предиктивных критериев рака молочной железы, а альвеолярные и трабекулярные структуры как ключевые индикаторы агрессивного опухолевого роста – стать мишенями при разработке таргетной терапии.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-15-00318). Е.В. Денисов поддержан программой повышения конкурентоспособности ТГУ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Virchow R. Cellular Pathology as Based upon Physiological and Pathological Histology. Philadelphia: JB Lippincott Co, 1863.
2. Fisher R., Pusztai L., Swanton C. // Br. J. Cancer. 2013. V. 108. № 3. P. 479–485.
3. Almendro V., Marusyk A., Polyak K. // Annu. Rev. Pathol. 2013. V. 8. P. 277–302.
4. Ng C.K., Pemberton H.N., Reis-Filho J.S. // Expert. Rev. Anticancer Ther. 2012. V. 12. № 8. P. 1021–1032.
5. Lakhani S.R., Ellis I.O., Schnitt S.J., Tan P.H., van de Vijver M.J. World Health Organization (WHO) classification of tumours of the breast. Lyon, France: IARC Press, 2012.
6. Давыдов М.И., Летагин В.П. Рак молочной железы (Атлас). М.: АБВ-пресс, 2006.
7. Завьялова М.В., Перельмутер В.М., Слонимская Е.М., Вторушин С.В., Гарбуков Е.Ю., Глущенко С.А. // Сиб. онкол. журн. 2006. Т. 1. С. 32–35.
8. Denisov E.V., Gerashchenko T.S., Zavyalova M.V., Litviakov N.V., Tsyganov M.M., Kaigorodova E.V., Slonimskaya E.M., Kzhyshkowska J., Cherdyntseva N.V., Perelmuter V.M. // Neoplasma. 2015. V. 62. № 3. P. 405–411.
9. Denisov E.V., Litviakov N.V., Zavyalova M.V., Perelmuter V.M., Vtorushin S.V., Tsyganov M.M., Gerashchenko T.S., Garbukov E.Y., Slonimskaya E.M., Cherdyntseva N.V. // Sci. Rep. 2014. V. 4. P. 4709.
10. Zavyalova M.V., Perelmuter V.M., Vtorushin S.V., Denisov E.V., Litviakov N.V., Slonimskaya E.M., Cherdyntseva N.V. // Diagn. Cytopathol. 2013. V. 41. № 3. P. 279–282.
11. Zavyalova M.V., Denisov E.V., Tashireva L.A., Gerashchenko

- T.S., Litviakov N.V., Skryabin N.A., Vtorushin S.V., Telegina N.S., Slonimskaya E.M., Cherdyntseva N.V., et al. // *BioRes. Open Access*. 2013. V. 2. № 2. P. 148–154.
12. Завьялова М.В., Литвяков Н.В., Гарбуков Е.Ю., Вторушин С.В., Стахеева М.Н., Савенкова О.В., Крицкая Н.В., Перельмутер В.М., Слонимская Е.М., Чердынцова Н.В. // *Сиб. онкол. журн.* 2008. Т. 6. С. 30–34.
13. Крахмаль Н.В., Завьялова М.В., Денисов Е.В., Вторушин С.В., Перельмутер В.М. // *Acta Naturae*. 2015. Т. 7. № 2. С. 18–31.
14. Friedl P., Alexander S. // *Cell*. 2011. V. 147. № 5. P. 992–1009.
15. Alexander S., Friedl P. // *Trends Mol. Med.* 2012. V. 18. № 1. P. 13–26.
16. De Craene B., Berx G. // *Nat. Rev. Cancer*. 2013. V. 13. № 2. P. 97–110.
17. Александрова А.Ю. // *Биохимия*. 2014. V. 79. № 9. P. 1169–1187.
18. Nieto M.A. // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2011. V. 27. P. 347–376.
19. Neelakantan D., Drasin D.J., Ford H.L. // *Cell Adh. Migr.* 2015. V. 9. № 4. P. 265–276.
20. Hayward J.L., Carbone P.P., Heuson J.C., Kumaoka S., Segaloff A., Rubens R.D. // *Cancer*. 1977. V. 39. № 3. P. 1289–1294.
21. Denisov E.V., Skryabin N.A., Vasilyev S.A., Gerashchenko T.S., Lebedev I.N., Zavyalova M.V., Cherdyntseva N.V., Perelmutter V.M. // *J. Clin. Pathol.* 2015. V. 68. № 9. P. 758–762.
22. Pfaffl M.W. // *Nucl. Acids Res.* 2001. V. 29. № 9. P. e45.
23. Marusyk A., Almendro V., Polyak K. // *Nat. Rev. Cancer*. 2012. V. 12. № 5. P. 323–334.
24. Saunders N.A., Simpson F., Thompson E.W., Hill M.M., Endo-Munoz L., Leggatt G., Minchin R.F., Guminski A. // *EMBO Mol. Med.* 2012. V. 4. № 8. P. 675–684.
25. Litviakov N.V., Cherdyntseva N.V., Tsyganov M.M., Slonimskaya E.M., Ibragimova M.K., Kazantseva P.V., Kzhyshkowska J., Choinzonov E.L. // *Oncotarget*. 2016. V. 7. № 7. P. 7829–7841.
26. Перельмутер В.М., Завьялова М.В., Вторушин С.В., Слонимская Е.М., Крицкая Н.В., Гарбуков Е.Ю., Литвяков Н.В., Стахеева М.Н., Бабышкина Н.Н., Малиновская Е.А. и др. // *Успехи геронтологии*. 2008. Т. 21. № 4. С. 643–653.
27. Grosse-Wilde A., Fouquier d’Herouel A., McIntosh E., Ertaylan G., Skupin A., Kuestner R.E., del Sol A., Walters K.A., Huang S. // *PLoS One*. 2015. V. 10. № 5. P. e0126522.
28. Huang R.Y., Wong M.K., Tan T.Z., Kuay K.T., Ng A.H., Chung V.Y., Chu Y.S., Matsumura N., Lai H.C., Lee Y.F., et al. // *Cell Death Dis.* 2013. V. 4. P. e915.
29. Bulfoni M., Gerratana L., Del Ben F., Marzinotto S., Sorrentino M., Turetta M., Scoles G., Toffoletto B., Isola M., Beltrami C.A., et al. // *Breast Cancer Res.* 2016. V. 18. № 1. P. 30.
30. Таширева Л.А., Денисов Е.В., Савельева О.Е., Герашченко Т.С., Завьялова М.В., Перельмутер В.М. // *Biopolymers Cell*. 2015. Т. 31. № 6. С. 429–435.
31. Bloom H.J., Richardson W.W. // *Br. J. Cancer*. 1957. V. 11. № 3. P. 359–377.
32. Перельмутер В.М., Завьялова М.В., Слонимская Е.М., Вторушин С.В., Гарбуков Е.Ю. // *Сиб. онкол. журн.* 2006. Т. 3. С. 29–33.
33. Westcott J.M., Prechtel A.M., Maine E.A., Dang T.T., Esparza M.A., Sun H., Zhou Y., Xie Y., Pearson G.W. // *J. Clin. Invest.* 2015. V. 125. № 5. P. 1927–1943.
34. 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., Sanchez V., et al. // *Cancer Discov.* 2014. V. 4. № 2. P. 232–245.
35. Häger A., Alexander S., Friedl P. // *Eur. J. Cancer Suppl.* 2013. V. 11. № 2. P. 291–293.
36. Alexander S., Weigelin B., Winkler F., Friedl P. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2013. V. 25. № 5. P. 659–671.
37. Mallini P., Lennard T., Kirby J., Meeson A. // *Cancer Treat. Rev.* 2014. V. 40. № 3. P. 341–348.
38. Holohan C., van Schaeybroeck S., Longley D.B., Johnston P.G. // *Nat. Rev. Cancer*. 2013. V. 13. № 10. P. 714–726.