

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ**

На правах рукописи

**КУЛЬТУРЫ ОНКОТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТОК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И  
ЭНДОМЕТРИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ И РАЗРАБОТКИ  
ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ**

Нуштаева Анна Андреевна

03.01.03 – молекулярная биология

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Научный руководитель:**  
к.б.н. Коваль Ольга Александровна

Новосибирск – 2019

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ .....	7
ВВЕДЕНИЕ.....	9
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О КУЛЬТИВИРОВАНИИ КЛЕТОК ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ЧЕЛОВЕКА И РОЛЬ ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА В ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	13
1.1 История развития подходов выращивания клеток млекопитающих в культуре.....	13
1.1.2 Способы получения и выращивания клеток млекопитающих в культуре.....	14
1.1.2.1 Механическая диссоциация.....	16
1.1.2.2 Ферментативная диссоциация.....	17
1.1.2.3 Диссоциация с хелатирующими агентами.....	17
1.1.2.4 Культивирование клеток из тканевого экспланта.....	19
1.1.2.5 Модели ксенотрансплантата опухоли пациента .....	20
1.1.3 Физико-химические свойства сред для культивирования клеток млекопитающих.....	22
1.1.4 Способы культивирования первичных культур клеток .....	22
1.1.4.1 Двумерные (2D) однослойные культуры .....	22
1.1.4.2 Культивирование срезов ткани .....	26
1.1.4.3 Трехмерные (3D) клеточные культуры .....	27
1.1.4.4 Частичная ферментативная диссоциация стромальной ткани.....	29
1.1.4.5 «Сэндвич» культуры .....	30
1.1.4.6 Выделение опухолевых стволовых клеток .....	31
1.2 Особенности терапии злокачественных опухолей молочной железы и эндометрия .....	31
1.2.1 Классификация злокачественных опухолей молочной железы и проблемы гетерогенности .....	31
1.2.2 Терапевтические подходы к лечению злокачественных опухолей молочной железы .....	32
1.2.3 Эндокринная терапия злокачественных опухолей молочной железы.....	32
1.2.4 Ингибиторы путей передачи онкогенных сигналов в терапии злокачественных опухолей молочной железы .....	35
1.2.5 Опухоли эндометрия.....	35
1.2.5.1 Клиническая терапия злокачественных опухолей эндометрия .....	36

1.2.5.2 Терапевтические мишени для лечения злокачественных опухолей эндометрия .....	37
1.3 Эпителиально-мезенхимальный и мезенхимально-эпителиальный переходы .....	37
1.3.1 Механизм эпителиально-мезенхимального и мезенхимально-эпителиального перехода .....	37
1.3.2 Роль эпителиально-мезенхимального перехода в опухолевой прогрессии .....	41
1.3.3 Влияние микроокружение опухоли на эпителиально-мезенхимальный переход ..	44
1.3.3.1 Роль опухоль-ассоциированных фибробластов в эпителиально-мезенхимальном переходе .....	44
1.3.3.2 Влияние воспаления на эпителиально-мезенхимальный переход .....	45
1.3.3.3 Эпителиально-мезенхимальный переход в условиях гипоксии .....	47
1.3.4 Опухолевые стволовые клетки и эпителиально-мезенхимальный переход .....	47
1.3.4.1 Опухолевые стволовые клетки .....	47
1.3.4.2 Взаимосвязь опухолевых стволовых клеток и эпителиально-мезенхимального перехода .....	51
1.3.4.3 Взаимосвязь опухолевых стволовых клеток с процессом метастазирования и МЭП .....	51
1.3.4.4 Молекулярные механизмы, лежащие в основе взаимосвязи эпителиально-мезенхимального перехода и опухолевых стволовых клеток .....	53
1.3.4.5 Лекарственная устойчивость и эпителиально-мезенхимальный переход .....	55
1.3.4.6 Таргетные препараты, направленные на ключевые медиаторы эпителиально-мезенхимального перехода .....	57
1.3.4.6.1 Таргетные подходы предотвращения эпителиально-мезенхимального перехода .....	57
1.3.4.6.2 Таргетная опухоль с активированным процессом ЭМП .....	58
1.3.4.6.3 Обращение эпителиально-мезенхимального перехода через МЭП .....	59
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	61
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....	63
2.1. Материалы .....	63
2.1.1 Реактивы и материалы .....	63
2.1.2 Буферные растворы .....	64
2.1.3 Материалы для культивирования клеток .....	65
2.1.4 Оборудование .....	65
2.1.5 Праймеры для ОТ-ПЦР .....	65

2.1.6 Клеточные культуры.....	66
2.1.7 Лабораторные животные.....	67
2.2 Методы.....	67
2.2.1 Забор образцов ткани.....	67
2.2.2 Получение первичных культур клеток из нормальной и онкотрансформированной ткани молочной железы и эндометрия с методом ферментативной диссоциации .....	68
2.2.3 Получение первичных культур клеток молочной железы без применения ферментов .....	68
2.2.4 Культивирование линий клеток.....	69
2.2.5. Создание криобанка полученных первичных клеточных культур из нормальной и онкотрансформированной ткани молочной железы и эндометрия.....	69
2.2.6 Окрашивание культур клеток гематоксилином и эозином.....	70
2.2.7 Иммуноцитохимия.....	70
2.2.8 Вестерн блот анализ.....	71
2.2.8.1 Электрофорез в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия .....	71
2.2.9 Цитометрический анализ клеток культур эндометрия и молочной железы .....	72
2.2.9.1 Анализ поверхностных маркеров клеток методом проточной цитофлуориметрии.....	72
2.2.9.2 Анализ проапоптотических изменений в первичных культурах клеток из ткани эндометрия .....	72
2.2.9.3 Цитометрический анализ популяции стволовых опухолевых клеток .....	73
2.2.10 Выделение РНК.....	73
2.2.10.1 ОТ-ПЦР в режиме реального времени .....	74
2.2.10.2 Электрофорез в агарозном геле .....	74
2.2.11 Оценка жизнеспособности культур клеток эндометрия и молочной железы человека.....	74
2.2.11.1 Исследование цитотоксической активности (МТТ-тест).....	74
2.2.11.2. Определение жизнеспособности клеток в режиме реального времени на приборе xCELLigence .....	75
2.2.12 Трансплантация опухолевых клеток молочной железы.....	75
2.2.13 Терапия мышей с опухолью молочной железы человека .....	75
2.2.14 Подготовка образцов для гистологического исследования.....	76

2.2.15 Цитогенетическое исследование культур опухолевых клеток молочной железы	76
2.2.15 Исследование ультраструктуры клеток опухолевых культур	77
2.2.17 Статистический анализ	77
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ</b>	<b>78</b>
3.1. Получение первичных культур клеток из образцов нормальной и онкотрансформированной ткани эндометрия и молочной железы человека	78
3.1.1 Получение первичных клеточных культур молочной железы и эндометрия с помощью ферментативной обработки	78
3.1.2 Оптимизация метода получения клеток из ткани молочной железы	83
3.1.2.1 Метод «импульсной гипоксии»	87
3.1.2.2 Сопоставление гистологического строения фрагментов ткани молочной железы с морфологией получаемых культур клеток	89
3.3 Молекулярный профиль первичных культур клеток нормальной и онкотрансформированной ткани эндометрия и молочной железы	92
3.3.1 Молекулярный профиль первичных культур клеток из нормальной и онкотрансформированной ткани эндометрия	93
3.3.2 Молекулярный профиль полученных культур клеток нормальной и онкотрансформированной молочной железы	95
3.3.2.1 Анализ рецепторов семейства эпидермального фактора роста (ErbB)	97
3.3.3 Анализ Ki-67 в культурах клеток молочной железы и эндометрия	101
3.3.4 Взаимосвязь уровня виментина с фенотипом в клетках культур молочной железы	102
3.3.5 Молекулярные маркеры мезенхимально-эпителиального переход в культурах онкотрансформированных клеток молочной железы	105
3.3.6 Содержание стволовых опухолевых клеток в культурах эндометрия и молочной железы	108
3.4. Исследование чувствительности полученных культур клеток к противоопухолевым агентам	111
3.4.1 Чувствительность культур клеток эндометрия к противоопухолевым агентам	111
3.4.1.1 Чувствительность персональных культур клеток эндометрия к ингибиторам ароматазы	115
3.4.2 Чувствительность полученных культур клеток молочной железы к химиопрепаратам	117

3.4.2.1 Исследование чувствительности культур молочной железы к противоопухолевым препаратам в режиме реального времени.....	117
3.4.2.2 Чувствительность культур клеток молочной железы к интерферону альфа...	119
3.5 Туморогенность культур опухолевых клеток молочной железы и эндометрия .....	123
3.5.1 Дополнительные маркеры опухолевых стволовых клеток в опухолевых культурах клеток молочной железы.....	129
3.5.2 Чувствительность опухоли BrCCh2e к цисплатину <i>in vivo</i> .....	131
3.6 Кариотип клеток опухолевых культур молочной железы .....	132
3.7 Ультраструктура опухолевых клеток молочной железы .....	134
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	138
ВЫВОДЫ .....	140
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ...	142
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	143

## СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

a/a – антибиотики-антимикотики

ALDH1 –альдегиддегидрогеназа 1-го типа

ASCO – Американское Общество Клинической Онкологии

CD133 – гликопротеин проминин-1

CD24 – термостабильный гликопротеин муцинового типа

CD44 – поверхностный гликопротеин с адгезивными свойствами, рецептор гиалуроновой кислоты

CYP19 – ароматаза

DAPI – 4, 6-диамидино-2-фенилиндол

EGFR – рецептор эпидермального фактора роста человека 1

EpCAM – молекула адгезии эпителиальных клеток

ER $\alpha$  – рецептор эстрогена альфа

ER $\beta$  – рецептор эстрогена бета

E-кадгерин – эпителиальный кадгерин

FBS – эмбриональная бычья сыворотка

HER2 – рецептор эпидермального фактора роста человека 2

HER3 – рецептор эпидермального фактора роста человека 3

HIFs – факторы, индуцируемые гипоксией

IC<sub>10</sub> – концентрация агента, вызывающая гибель 10% клеток

IC<sub>50</sub> – концентрация агента, вызывающая гибель 50% клеток

IFIT3 – интерферон-индуцируемый белок с тетраатрикопептидными повторами 3

Ki-67 – ядерный белок, продукт гена MKI67, маркер клеточной пролиферации

Mel-CAM –поверхностный гликопротеин, молекула клеточной адгезии меланомы

MTT – 3-(4,5-деметил-2-тиазолил)-2, 5-дифенил-2Н-тетразолия бромид

N-кадгерин – кадгерин-2 или нейрональный кадгерин

PBS – натрий-фосфатный буфер

PR – рецептор прогестерона

TGF $\beta$  – трансформирующий ростовой фактор бета

TNF $\alpha$  – фактор некроза опухолей альфа

BSA – бычий сывороточный альбумин

ECM – внеклеточный матрикс

ЗОМЖ – злокачественная опухоль молочной железы

ЗОЭ – злокачественная опухоль эндометрия

ИНФ $\alpha$  –интерферона альфа

миРНК – некодирующая микроРНК  
мРНК – матричные РНК  
МЭП – мезенхимально-эпителиальный переход  
НМКЛ – немелкоклеточный рак легкого  
ОАМ – опухоль-ассоциированные макрофаги  
ОАФ – опухоль-ассоциированные фибробласты  
ОСК – опухолевые стволовые клетки  
ОТ – обратная транскрипция  
п.о. – пар оснований  
ПЦР – полимеразная цепная реакция  
РНК – рибонуклеиновая кислота  
ЦОК – циркулирующих опухолевых клеток  
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота  
ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход  
ЭМП – ТФ - факторы транскрипции, активирующие ЭМП



## **ВВЕДЕНИЕ**

Успехи в диагностике и лечении злокачественных новообразований молочной железы и эндометрия способствовали повышению уровня выживаемости пациентов, но показатели смертности остаются высокими. Иммутиализованные клеточные линии опухолей молочной железы и эндометрия являются моделью для исследования биологических процессов, связанных с этими заболеваниями, а также платформой для поиска потенциальных терапевтических маркеров и стратегий лечения [1]. Тем не менее, только совокупность иммутиализованных линий опухолевых клеток может моделировать гетерогенность опухолей человека [2-4]. Поэтому, расширение панели опухолевых клеточных линий для изучения опухолевой прогрессии и разработки терапевтических подходов остается актуальной задачей.

Ресурсом для создания новых опухолевых линий является материал опухолей, из которых на начальных этапах получают первичные культуры клеток. Такие культуры, полученные непосредственно из ткани опухоли пациента, являются востребованными клеточными моделями, поскольку на начальных этапах культивирования отражают специфические особенности исходной опухоли, хромосомные перестройки, её морфологические и молекулярные характеристики [5, 6]. В настоящее время одним из перспективных терапевтических подходов представляется персонализация лечения онкологических заболеваний, когда схему лечения назначают исходя из молекулярной и цитологической характеристики опухоли конкретного пациента – экспрессии определённых ферментов, рецепторов гормонов и белковых факторов. Чувствительность и резистентность к противоопухолевым препаратам являются индивидуальными характеристиками опухоли, которые также необходимо оценить для персонализированного подхода к подбору сбалансированной схемы химиотерапии.

Культуры клеток из онкотрансформированной ткани пациентов позволяют расширить уже существующую панель опухолевых клеток для изучения канцерогенеза, пролиферации, метастазирования, клеточной гибели, ответов опухоли на действие лекарственных препаратов и механизмов развития лекарственной устойчивости, а также оценить возможность использования полученных культур для разработки персонализированных схем терапии.

**Целью настоящей работы являлась** разработка методов получения первичных культур клеток из онкотрансформированной и нетрансформированной ткани молочной железы и эндометрия человека как моделей для изучения специфических молекулярных маркеров и фенотипических особенностей, обеспечивающих создание опухолевых и метастатических моделей на животных.

В ходе работы необходимо было решить следующие задачи:

1. Разработать метод получения и получить первичные культуры клеток из онкотрансформированной и нетрансформированной ткани молочной железы и эндометрия человека;
2. Оценить представленность молекулярных маркеров мезенхимально-эпителиального перехода, рецепторов эпидермального фактора роста и популяцию опухолевых стволовых клеток в полученных культурах клеток.
3. Исследовать чувствительность клеток полученных культур эндометрия и молочной железы человека к лекарственным агентам *in vitro*;
4. Исследовать туморогенность опухолевых культур клеток эндометрия и молочной железы человека *in vivo*.

#### **Научная новизна полученных результатов и практическая значимость.**

В ходе исследования разработан новый метод получения культур клеток из ткани злокачественных опухолей молочной железы и эндометрия человека. Получено и охарактеризовано 5 новых культур клеток эндометрия и 12 новых культур клеток молочной железы человека.

Разработан метод “импульсной гипоксии”, индуцирующий мезенхимально-эпителиальный переход в культуре клеток онкотрансформированной молочной железы *in vitro* с представленностью специфических молекулярных маркеров эпителиальных клеток.

Впервые показано, что базовый уровень мРНК IFIT3 в клетках культур молочной железы человека может отражать чувствительность клеток к иммуностимулирующим препаратам.

Получены новые модели метастазирующей и химиорезистентной опухоли молочной железы человека.

Разработанные клеточные и опухолевые модели онкопролиферативных заболеваний человека могут быть использованы исследователями, работающими в области клеточной биологии и канцерогенеза для исследования механизмов опухолевой прогрессии и скрининга новых противоопухолевых агентов.

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

1. Разработан метод получения и получены персональные культуры клеток из онкотрансформированной и нетрансформированной ткани молочной железы и эндометрия человека с эпителиоподобным или мезенхимальноподобным фенотипами.

2. “Импульсная гипоксия” индуцирует мезенхимально-эпителиальный переход в клетках опухолевых культур молочной железы человека *in vitro*, что сопровождается экспрессией соответствующих молекулярных маркеров.
3. Базовый уровень мРНК IFIT3 в клетках культур молочной железы человека может отражать чувствительность клеток к иммуностимулирующим препаратам.
4. Полученные опухолевые модели молочной железы человека могут применяться для изучения молекулярных механизмов лекарственной устойчивости и метастазирования *in vivo*.

**Публикации и апробация результатов.** По результатам диссертации опубликовано 3 работы в рецензируемых журналах. Результаты работы представлены и обсуждены на следующих конференциях: «Новейшие методы клеточных технологий в медицине» (Новосибирск, 2014), первой международной научной конференции молодых ученых: биотехнологов, вирусологов, молекулярных биологов, прошедшей в рамках площадки открытых коммуникаций OpenBio-2014 (Наукоград Кольцово, 2014), медико-биологическом форуме «Биомедицина–2016» (Новосибирск, 2016), на форуме “Биотехнология – медицине будущего» (Молекулярная медицина - завтрашний день) (Новосибирск, 2017), на международной конференции «Опухолевые маркеры: фундаментальные и клинические аспекты», посвященной памяти советского и российского учёного Гарри Израйлевича Абелева (Горно-Алтайске, 2018), на международной конференции «Постгеном 2018» (Казань, 2018).

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 171 странице, включает 38 рисунков, 15 таблиц и 3 схемы. Список литературы содержит 326 источников.

**Личный вклад автора.** Основная часть экспериментальной работы и аналитический анализ полученных результатов выполнены лично автором. Забор образцов онкотрансформированной ткани эндометрия и молочной железы проведен в онкологическом отделении №4 (гинекологическое) ГБУЗ НСО «НООД» онкологом-гинекологом к.м.н. Герасимовым А.В., забор образцов онкотрансформированной ткани молочной железы проведен в онкологическом отделении №3 ГБУЗ НСО «Городская клиническая больница №1» онкологом-маммологом д.м.н. Сидоровым С.В. Образцы нетрансформированной ткани молочной железы получены в отделении пластической хирургии ЦМНТ СО РАН к.м.н. Савельевым Е.И. Определение молекулярного профиля клеток культур ЗОМЖ и оценка чувствительности к лекарственным препаратам *in vitro* и *in vivo* была выполнена совместно с магистрантом ФГБУ НГУ Карпушиной А.А., а культур ЗОЭ совместно с аспирантом ИХБФМ

СО РАН Сакаевой Г.Р. Вестерн блот анализ белков был проведен совместно с сотрудником ЛБТ ИХБФМ СО РАН Ткаченко А. В. Цитометрический анализ был выполнен совместно с к.б.н. Коваль О.А. Цитогенетическое исследование культур клеток молочной железы был проведен рук. группы цитогенетики ИХБФМ СО РАН к.б.н. Гайнер Т.А. и Каримовой О.Г. Микроскопическое исследование ультраструктуры клеток проведено в группе микроскопического анализа ИХБФМ СО РАН д.б.н. Рябчиковой Е.И. и Юнусовой А.Ю.

# ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О КУЛЬТИВИРОВАНИИ КЛЕТОК ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ЧЕЛОВЕКА И РОЛЬ ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА В ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

## 1.1 История развития подходов выращивания клеток млекопитающих в культуре

Клетки различных тканей растений и животных можно культивировать в искусственной среде *in vitro*. История развития методов культивирования клеток млекопитающих начинается с конца девятнадцатого века, когда Вильгельму Ру удалось поддерживать живые клетки нервной пластинки эмбрионов цыплят в солевом буфере в течение нескольких дней [7]. В 1907 году Росс Харрисон разработал метод выращивания тканевой культуры методом «висящей капли», когда фрагмент ткани нервной трубки эмбрионов лягушки помещали на покрывное стекло покрытое лимфой, и когда лимфа сворачивалась, покрывное стекло переворачивали и помещали в физиологический раствор, позволяя клеткам мигрировать из ткани в окружающую среду [8; 9]. Последующие большие успехи в культивировании тканей были сделаны Алексисом Карелом и Чарльзом Линдбергом в 1930 годы, разработавшими метод выращивания ткани на стеклянных пластинах с сохранением непрерывного роста ткани [10]. Эти методы заложили основу технологии получения клеточных культур и культивирования клеток в виде монослоя на твердой подложке.

В 1948 году Эрл и его коллеги получили клоны L-клеток кишечника мыши - культуру L929 [11; 12]. В 1952 году Геом и его коллегами впервые была получена культура клеток HeLa из злокачественной опухоли шейки матки пациентки Генриетты Лакс (англ. Henrietta Lacks) [12]. До начала 60х годов прошлого столетия считалось, что полученная клеточная линия имеет неограниченное время жизни. Однако в 1961 году Хейфлик и Мурхед получили линию клеток человека WI-38 из ткани легкого и показали, что период ее существования в культуре ограничивается приблизительно 50-ю раундами удвоения популяции. Перед гибелью в популяции клеток этой линии наблюдали события, описываемые как «клеточное старение». Погибая эти клетки оставались диплоидными и не имели признаков злокачественных изменений, что указывало на нормальное физиологическое старение. В сравнении с культивированием клеток из нетрансформированной ткани, клетки злокачественных опухолей или трансформированные в ходе культивирования, характеризуются «бессмертием» и как правило, гетероплоидны [13].

Джон Франклин Эндерс и его коллеги в 1949 году обнаружили, что вирус полиомиелита и другие вирусы могут размножаться в клетках эукариот в культуре [14]. Эти

результаты позволили развить метод наработки и культивирования вирусов в культурах клеток эукариот для производства вакцин и фундаментальной вирусологии.

В 1960-х и 1970-х годах на примере клеток HeLa были разработаны методы клонального роста опухолевых клеток в культуре. Позднее было показано, что «бессмертие», то есть потенциальную способность к неограниченному числу делений, в клетках HeLa обеспечивает фермент теломераза, наращивающая теломеры хромосом [15; 16]. HeLa стала первой клеточной моделью, использованной для изучения фундаментальных процессов, происходящих в нормальных или измененных клетках и тканях [17; 18]. В клеточных культурах онкотрансформация может происходить самопроизвольно, и появление бессмертных клеточных популяций наблюдали во многих лабораториях с начала 40-х годов прошлого столетия [19]. Культуры клеток могут приобретать признаки злокачественности при заражении онкогенными вирусами, например, SV40 [20], под действием ионизирующего излучения [21], или в результате воздействия химических канцерогенов, например, метилхлорантрацена [22]. Хейфлик определил термин «бессмертия» как «жизненную форму, способную к долгому выживанию в условиях, когда не произошло никаких изменений в молекулярном составе с некоторого произвольного начала» [23]. Хейфлик и Мурхед определили, что клетки не могут делиться бесконечно: *in vitro* они проходят примерно 50 раундов удвоений и прекращают пролиферацию, и такая закономерность получила название «предел Хейфлика» [24]. Именно с момента определения предела Хейфлика начинается история развития иммортализованных клеточных линий [13].

В настоящее время иммортализованные линии клеток, обладающие уникальными свойствами, стали незаменимыми моделями молекулярных и клеточных биологов для решения различных задач (Схема 1). Эти свойства отражают различия в клеточной физиологии. Такие культуры клеток должны расти в определенных условиях, экспрессировать определенные группы генов, и демонстрировать признаки тканевой специфичности [25].

### ***1.1.2 Способы получения и выращивания клеток млекопитающих в культуре***

Существующие иммортализованные опухолевые линии клеток имеют свои преимущества в качестве опухолевых моделей, такие как простота культивирования, стандартизированные характеристики, относительная легкость генетических манипуляций. В качестве примера, Томлинсон и его коллеги сравнивали первичную опухоль молочной железы и клеточную линию, возникшую из этой опухоли.



**Схема 1.** Применение культур клеток.

Авторы обнаружили идентичные мутации в гене BRCA1 с идентичной структурой аллельных потерь в исходном материале опухоли и в культуре клеток, что указывает на то, что клеточная линия сохраняет многие характеристики исходной опухоли [26]. Также данные Финлея и Багулая показали, что линии опухолевых клеток имеют близкий с исходной опухолью ответ на противоопухолевые препараты [27]. В сравнительных исследованиях, проведенных на линиях опухолевых клеток и исходных опухолях, была выявлена конкордантность по нескольким параметрам, включая статус белков P53 (100%) и ERBB2 (93%) [28]. Однако, длительное культивирование иммортализованных опухолевых линий приводит к появлению субпопуляций внутри линии, которые изменяют общие характеристики линии. Кроме этого, накопление генетических aberrаций, которые накапливаются с увеличением числа пассажей, ограничивает использование таких линий клеток как моделей для различных молекулярно-генетических исследований [29]. Различия между линиями опухолевых клеток и соответствующими опухолями могут быть объяснены селекцией только одного типа исходных клеток при культивировании и эволюцией *in vitro* [1]. Линии клеток из опухолевого образца имеют обширные хромосомные перегруппировки, содержат онкогенные мутации, демонстрируют аллельные потери и нарушения экспрессии генов. Это может привести к потере фенотипических свойств исходной опухоли и к появлению дополнительных молекулярных изменений во время культивирования клеток в течение длительного времени [1].

Успешное выделение опухолевых клеток во многом зависит от способа разрушения внеклеточного матрикса [30]. Дополнительными факторами, усложняющими процесс получения новой культуры клеток, является «загрязнение» неопухолевыми клетками, например, клетками стромы или кровеносных сосудов. С другой стороны, для стабильной пролиферации целевой популяции клеток культуральная среда должна содержать

оптимальный набор факторов, необходимых для жизнедеятельности клеток [30]. Митогенные факторы роста влияют на поддержание жизнеспособности опухолевых клеток *in vitro*, стабильность генотипа и фенотипа.

Культивирование клеток ткани солидной опухоли человека *in vitro* в идеале требует схожего микроокружения, как в исходной опухоли человека, что является сложной задачей и требует специальных методологических подходов. Успешное выделение опухолевых клеток зависит от способа разрушения внеклеточного матрикса [30]. Как правило, внеклеточный матрикс состоит из соединительной ткани, гликопротеинов и специфических тканевых белков. Способы диссоциации ткани можно разделить на механическую, ферментативную и диссоциацию с хелатирующими агентами [31].

#### *1.1.2.1 Механическая диссоциация*

Механическая диссоциация тканей включает в себя измельчение ткани ножницами или скальпелем, очистку поверхности ткани от кровеносных сосудов и некротизированных участков, последующую гомогенизацию и/или фильтрацию клеток через нейлоновую или металлическую сетку с размерами пор 50-100 мкм или любую комбинацию этих методов. В случае опухолевой ткани, образцы сначала измельчают на фрагменты до 1 мм, затем промывают в тканеспецифической среде для удаления неспецифической контаминации. Такой способ диссоциации ткани ведёт к быстрому образованию моноклеточной суспензии с минимальным количеством промежуточных манипуляций и затрат времени, но плохо подходит для получения культуры клеток. При механической диссоциации образуется много мертвых клеток, а выделяющиеся из них ферменты деградации оказывают токсическое воздействие на окружающие клетки [32]. В настоящее время существуют различные коммерчески доступные механические диссоциаторы, к примеру, gentleMACS™ Dissociator компании Miltenyi Biotec® с наборами измельчителей для диссоциации различных видов ткани.

Франческо и другие провели сравнение ферментативного и механического способа получения культуры клеток из жировой ткани человека. Фенотипические характеристики клеток жировой ткани сходны с характеристиками мезенхимальных стволовых клеток человека. Источником жировой ткани были образцы после липосакции. При механическом способе фрагменты жировой ткани с помощью специальных инструментов уменьшали до сфероидов размером 1–3.5 мм, а далее до более мелких – 0.2–0.8 мм с получением клеточной суспензии. При ферментативном способе липоаспираты инкубировали при 37°C в буфере с коллагеназой I типа в присутствии бычьего сывороточного альбумина. Клетки жировой ткани, полученные этими методами, переносили в культуральные планшеты и через 10 дней



анализировали специфические клеточные маркеры. Они показали, что все полученные культуры клеток экспрессировали маркеры мезенхимальных стволовых клеток, такие как CD90, CD34, CD73, CD105, но при механическом способе процент клеток, поддерживающих мультипотентные свойства, был выше. Данный подход является более щадящим для сохранения поверхностных по сравнению с ферментативными методами [33].

### 1.1.2.2 Ферментативная диссоциация

Ферментативную диссоциацию применяют для дезагрегации ткани, предварительно измельченной до фрагментов минимального размера. Основными ферментами, применяемыми для диссоциации, являются ферменты желудочно-кишечного тракта: трипсин, эластаза, либраз, гиалуронидаза, коллагеназа, проназа и дезоксирибонуклеазы, а также гидролаза из папайи – папаин. Все эти ферменты обладают различной специфичностью гидролиза (Таблица 1). Очевидно, что слишком глубокая ферментативная диссоциация будет снижать выход жизнеспособных клеток.

Поэтому, для диссоциации различных типов ткани следует подобрать комбинацию гидролитических ферментов экспериментально, исходя из гистологических особенностей органа и строения внеклеточного матрикса, ориентируясь на выход жизнеспособных клеток [31]. К примеру, для тканей, богатых коллагеновыми фибриллами, коллагеназа будет более предпочтительна для диссоциации ткани, чем трипсин [34].

Си и другие разработали легкий и практичный метод получения первичных культур клеток из опухолевой ткани легкого *in vitro*. Образцы ткани были получены от 6 пациентов после хирургического вмешательства. Фрагменты ткани подвергали ферментативной обработке коллагеназой I типа (1% раствор) типа при встряхивании на водяной бане в течение 1 ч при 37°C. В результате были получены 5 первичных культур клеток, которые имели типичные характеристики злокачественных клеток и экспрессировали цитокератины - 7 и -19. Эти опухолевые культуры клеток легкого при подкожном введении образовывали опухоли в ксенографтах с сохранением морфологии исходной опухоли. Таким образом, было показано, что первичная культура клеток опухолей легкого человека может быть успешно получена методом ферментативной диссоциации коллагеназой I типа [35].

### 1.1.2.3 Диссоциация с хелатирующими агентами

В ряде случаев неферментативные методы дезагрегации оказываются предпочтительнее, поскольку позволяют избежать гидролиза поверхностных рецепторов, специфических антигенов или хемокинов [36].

**Таблица 1.** Специфичность ферментов, применяемых для диссоциации клеток солидных опухолей

<b>Фермент</b>	<b>Специфичность гидролиза</b>	<b>Специфичность тканей</b>
Коллагеназа	Пептидные связи в коллагене. Бактериальная коллагеназа обладает специфичностью для связи X-Gly в последовательности Pro-X-Gly-Pro, где X чаще всего нейтральная аминокислота. Коллагеназы млекопитающих расщепляют коллаген в его нативной конформации тройной спиральной.	Кишечник, печень, толстая кишка, почки
ДНКаза I	Гидролиз фосфодиэфирной связи в ДНК после пиримидиновых нуклеотидов, с образованием при этом полинуклеотидов с концевым-5'-фосфатом и свободной гидроксильной группой на 3'-конце.	Печень, легкие, толстая кишка, почки
Гиалуронидаза	Гидролиз эндо-N-ацетилгексозаминовой связи в гиалуроновой кислоте и хондроитин-сульфокислотных А и С кислот внеклеточного матрикса.	Печень, почки
Трипсин	Гидролиз пептидной связи после остатков лизина и аргинина.	Мозг, эпидермис, почки и легкие
Проназа (смесь протеиназ)	Содержит 10 протеолитических ферментов с широкой специфичностью. Исчерпывающий гидролиз проназой дает в результате смесь отдельных аминокислот.	Печень, почки, толстая кишка, сердце
Папаин	Обладает эндопептидазной, амидазной и эстеразной специфичностью в отношении объемных гидрофобных или ароматических остатков.	Мышцы
Эластаза	Гидролизует пептидные связи после глицина, аланина и валина в эластине.	Сердце, легкие
Либраза	Смесь коллагеназы I и коллагеназы II с соответствующей специфичностью	Легкие, печень, головной мозг

Так, например, при получении культуры мезенхимальных стромальных клеток костного мозга использование ЭДТА повышает выход способных к дифференцировке и делению клеток. Баланс катионов, таких как  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , важен для сохранения целостности наружной клеточной мембраны и внутриклеточного гомеостаза. При химической диссоциации происходит поглощение этих катионов из комплексов с кадгеринами между контактирующими эпителиальными клетками, в результате чего межклеточные контакты ослабляются [30]. Разделение контактов лучше всего достигается путем воздействия ЭДТА или ЭГТА, которые используют для диссоциации ткани печени, клеток крипт кишечника, а также ткани молочной железы [31]. Например, ткань печени может быть диссоциирована с помощью ЭДТА для получения функционально активных гепатоцитов. В настоящее время диссоциация с ЭДТА лежит в основе метода переведения клеточной культуры из монослоя в клеточную суспензию. Например, инкубация с ЭДТА (20 мМ, рН 7.4) в течение 60-90 мин позволяет отделить клетки цилиндрического эпителия от клеток базального эпителия в фрагментах трахеи [37]. Кроме того, гипертонические растворы дисахаридов, таких как сахароза, мальтоза, лактоза, способны разрывать щелевые контакты. Наличие таких контактов может вызывать слипание клеток после обработки ткани ферментами [34].

#### *1.1.2.4 Культивирование клеток из тканевого экспланта*

Успешное культивирование эксплантатов нормальных и опухолевых тканей человека, например, молочной железы, достигается в том числе использованием богатой питательными веществами среды, как было показано в работе [38]. Для создания клеточных линий из эксплантов, опухолевую ткань разрезали на фрагменты 2 мм<sup>3</sup> и помещали в лунки 6-луночного планшета, покрытые FBS. Большинство клеток погибает на первых пассажах, но некоторые образцы опухолевых клеток удавалось пассировать более 10 пассажей без признаков старения. При сравнении питательных сред было показано, что среда IMDM лучше всего подходила для культивирования из экспланта клеток с различной морфологией. При использовании культуральной среды DMEM:F12 была получена одна клеточная культура, но миграция опухолевых клеток из экспланта прекращалась очень быстро. В среде MCDB151 прикрепление эксплантов к подложке было плохим, но эта среда была эффективна для ингибирования роста фибробластов, что способствовало получению опухолевых клеток с эпителиальным фенотипом. В итоге, экспланты культивировали в среде IMDM, содержащей 0.5 % или 2% FBS. При использовании 2% FBS прикрепление эксплантов было лучше, чем при 0.5% FBS. Тем не менее, поскольку низкая концентрация FBS в среде тормозит рост фибробластов, то для получения эпителиальных культур клеток добавление 0.5% FBS было предпочтительно. Важно отметить, что изначально высокая концентрация

сыворотки для нанесения на покрытие желателна для лучшего прикрепления и начального роста клеток, а последующее быстрое разбавление концентрации сыворотки в среде подавляет рост фибробластов. Таким образом, лимитирующими условиями успешного культивирования эксплантов является прикрепление экспланта к поверхности пластика и добавление среды таким образом, чтобы эксплантаты не могли плавать. На начальном этапе, из эксплантатов происходит «выход» фибробластов, которые должны быть далее удалены из культивирования, после чего начинается выход эпителиальных клеток. При достижении целевыми клетками состояния монослоя, эксплант вынимается и переносится в новый культуральный флакон для последующего культивирования. Такой подход требует серийного субкультивирования для получения первичных культур клеток [38]. Этот метод позволяет выделять популяции клеток при сохранности структурной организации ткани и микроокружения. Тем не менее, фенотип клеток может изменяться из-за неправильной ориентации эксплантов в культуральной среде.

В современной модификации этот метод был применен Гош и другими для создания модели для скрининга лекарств для пациентов с опухолями головы и шеи *ex vivo*. Этот метод был назван TEVA (tumor *ex vivo* analysis). Образцы опухолевой ткани имплантировали подкожно мышам линии NOD/SCID для образования КП (PDX, ксенотрансплантат пациента) и при достижении КП объема 500 мм<sup>3</sup>, извлекали из мыши. Извлеченный образец разрезали на эксплантаты ткани размером 2×2×2 мм<sup>3</sup> и культивировали в 48-луночных планшетах или повторно имплантировали подкожно мышам линии NOD/SCID для тестирования действия лекарственных препаратов *in vivo* и *ex vivo*. Для скрининга лекарственных препаратов *ex vivo* экспланты в течение 24 часов обрабатывали лекарственными препаратами и проводили анализ методами вестерн блота и иммуногистохимии для определения сигнальных путей, на которое воздействовали лекарственные препараты. На мышах с повторно перевитыми эксплантами также проводили скрининг лекарственных препаратов. Было показано, что TEVA может имитировать опухолевое окружение *in vivo* и предсказать реакции пациента на лекарства, а также эффективные комбинации препаратов. Таким образом, такой подход позволяет тестировать многочисленные препараты и их комбинации [39].

#### 1.1.2.5 Модели ксенотрансплантата опухоли пациента

Модели ксенотрансплантации опухолей пациента - КП, могут быть получены при трансплантации опухолевых клеток или тканей опухолей пациентов мышам с иммунодефицитом [40]. Такая модель является важной для доклинических исследований биологии опухоли. КП модели позволяют преодолеть ограничения, связанные с использованием опухолевых клеточных линий, и позволяют исследователям получать

результаты, которые более точно отражают клинические реакции на противоопухолевые препараты у пациентов [41]. Это связано с тем, что КП, выращенные в мышцах с ослабленным иммунитетом, сохраняют ключевые паттерны, присутствующие в опухолях пациентов, включая мутации, клеточную гетерогенность опухоли, эпигенетические особенности и паттерн экспрессии генов [42]. Для создания моделей КП используют различные линии мышей с иммунодефицитом, к примеру, NOD/SCID и NOG, NSG и NOJ. Мыши NOD/SCID не являются идеальными реципиентами из-за их относительно короткой продолжительности жизни, высокого уровня спонтанных опухолей и чувствительности к генотоксическим лекарственным средствам из-за мутации *scid*. Мыши NOG, NSG и NOJ являются широко используемыми реципиентами ксенотрансплантатов и демонстрируют высокую эффективность ксенотрансплантатов, в том числе гематологических злокачественных новообразований [41].

Место имплантации опухоли является важным фактором для генерации КП. Подкожная трансплантация используется чаще всего вследствие простоты процедуры и доступности измерения размера опухоли [40]. Другим предпочтительным сайтом имплантации является почечная капсула из-за её гиперваскуляризации [43]. Ортопическая имплантация КП позволяет воспроизводить условия существования опухоли подобные исходным для опухоли пациента [44].

Тэрада и другие создали модель ксенотрансплантата под названием KUCaP-2 с использованием образцов рецидивирующей опухоли предстательной железы гормонально-независимого типа. Такая модель востребована при исследовании развития гормонально-независимости опухолей предстательной железы. Рецидивирующую опухоль пациента после радикальной простатэктомии измельчали до размера 20-30 мм<sup>3</sup> и трансплантировали подкожно самцам мышей NUDE в матригеле, инъецированного вокруг имплантата. Модель ксенотрансплантата KUCaP-2 была создана примерно за 10 месяцев после первой инокуляции. KUCaP-2 экспрессирует андрогенный рецептор дикого типа (AR) и продуцирует простат-специфический антиген (PSA). Опухоли, полученные из модели КП KUCaP-2, регрессируют сразу после кастрации, но повторно возникают через 1-2 месяца, таким образом, имитируя клиническое поведение опухоли предстательной железы, прогрессирующей до кастрационной резистентности [45].

Хотя использование моделей КП помогает преодолеть ограничения, связанные с использованием клеточных линий, модели КП имеют свои недостатки. Прежде всего, стоит отметить, что выращивание опухоли и тестирование препаратов в режиме трансплантации фрагментов опухолевой ткани животным занимает более 6 месяцев. Такая продолжительность экспериментов помимо увеличения стоимости исследований ведет к

длительному ожиданию результата по чувствительности к лекарственным агентам, что снижает привлекательность этого метода для онкобольных с быстро прогрессирующей формой заболевания. Кроме того, размеры опухолевого материала (операционного или биопсии) не всегда позволяют получить достаточное количество опухолевых фрагментов при трансплантации на большие группы животных для скрининга большого числа препаратов [46].

### ***1.1.3 Физико-химические свойства сред для культивирования клеток млекопитающих***

Физико-химические свойства культуральной среды для культивирования клеток млекопитающих должны имитировать физиологические условия в организме. Определенные параметры культивирования позволяют сохранять жизнеспособность клеток млекопитающих в культуре (Таблица 2) [25].

### ***1.1.4 Способы культивирования первичных культур клеток***

На сегодняшний день только ограниченное число методов позволяют культивировать клетки *in vitro* с разной степенью эффективности [34].

#### ***1.1.4.1 Двумерные (2D) однослойные культуры***

В 1885 Вильгельм Ру продемонстрировал двумерный (2D) способ выращивания клеток нервной пластинки эмбрионов цыплят, используя стеклянные пластины и теплый соляной раствор [7]. С тех пор способ культивирования эукариотических клеток претерпел значительные модификации в использовании подложек, культуральных сред, добавок факторов роста и гормонов. При выращивании первичных опухолевых клеток в адгезивном состоянии культуральные планшеты предварительно покрывают коллагеном, фибронектином, матригелем или смесью различных компонентов для имитации оптимального внеклеточного матрикса. Суспензию клеток разбавляют до  $1-2 \times 10^6$  клеток/мл и высевают на культуральные планшеты. При достижении монослоя клетки серийно пересаживают до получения интересующей исследователя гомогенной клеточной линии. К сожалению, 2D культура не может точно воспроизводить тканеспецифичные характеристики топологии, дифференциации, профиль экспрессии генов, межклеточные контакты и физиологическое поведение клеток и, таким образом, является не самым эффективным подходом. Как правило, клетки, выращенные этим способом в виде монослоя, не имеют структурного разнообразия из-за плоского микроокружения, что имеет значение при изучении механизма передачи клеточных сигналов, миграции и инвазии. Кроме того, культура, выращенная 2D способом, более изменчива, чем культура выращенная как 3D [55].

**Таблица 2.** Особенности условий для культивирования клеток млекопитающих

Подложка	Большинство клеток млекопитающих, культивируемых <i>in vitro</i> , растут в виде монослоя на искусственной подложке, хотя некоторые трансформированные клеточные линии и клетки крови могут расти в суспензии. Поверхности клеток животных и поверхности традиционных подложек из стекла и пластика, обладающие высокой поверхностной энергией, несут отрицательные заряды для лучшей клеточной адгезии и пролиферации. Чаще всего используют подложки из модифицированного алюмоборосиликатного стекла, пластика (полистирол, полиэтилен, поликарбонат, поливинилхлорид, тефлон, целлофан и другие) при условии обработки этих материалов для прикрепления к ним клеток. Свойства подложки могут быть улучшены путем обработки поверхности компонентами внеклеточного матрикса, коллагеном и фибронектином или полимерами, такими как поли-L-лизин или другими [47].
pH	Большинство клеток млекопитающих растут при оптимальном pH в диапазоне 7.0-7.4. Этот диапазон может меняться для специализированных клеток или трансформированных клеток [48].
Буферизация, CO <sub>2</sub> и бикарбонат натрия	Углекислый газ растворяется в среде, достигая равновесия с ионами HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> и понижает pH [25]. Несмотря на низкую буферную емкость при физиологическом pH, бикарбонат натрия обычно используют из-за низкой токсичности и потребления в процессе жизнедеятельности культурами клеток. Культуральная среда может быть забуферена двумя способами: при открывании флакона CO <sub>2</sub> попадает внутрь и повышает pH или CO <sub>2</sub> и кислые продукты жизнедеятельности клеток при плотном монослое, снижает pH [49].
Кислород	Это еще одна важная составная часть газовой фазы, так как обычно для большинства клеток кислород требуется для дыхания <i>in vivo</i> , жизнедеятельность клеток зависит от гликолиза, поэтому некоторые из трансформированных клеток могут быть анаэробными. Тем не менее, кислород требуется, и его концентрация варьируется в зависимости от вида культуры; низкие концентрации O <sub>2</sub> предпочтительны для большинства клеток [48].

Осмолярность	Большинство клеток проявляют толерантность к осмотическому давлению, и осмолярность между 260 мОсм/кг и 320 мОсм/кг до $\pm 10$ мОсм/кг приемлемы для большинства клеток [13].
Температура	Температура тела животного, из ткани которого получена культура, определяет оптимальную температуру культивирования, например, для ткани кожи и тестикул температура культивирования ниже, чем для других тканей [50]. Для большинства клеточных линии теплокровных животных рекомендуется температура 37°C.
Вязкость	Вязкость культуральной среды зависит от содержания в ней сыворотки крови. Это становится важным при перемешивании клеточной суспензии или при диссоциации после трипсинизации. Увеличение вязкости уменьшает повреждения клеток при манипуляциях [13].
Аминокислоты и витамины	Незаменимые аминокислоты являются обязательными добавками при культивировании (цистеин, аргинин, глутамин и тирозин). Потребность в аминокислотах варьирует между типами клеток [51].
Соли и глюкоза	Основные компоненты, обеспечивающие осмолярность среды, это соли $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ , $\text{Mg}_2^+$ , $\text{Ca}_2^+$ , $\text{Cl}^-$ , $\text{SO}_4^{2-}$ , $\text{PO}_4^{3-}$ и $\text{HCO}_3^-$ , которые поступают из культуральной среды. Глюкоза входит в большинство культуральных сред как источник энергии в концентрации $x$ -у [52].
Органические добавки	В состав культуральных сред входят разнообразные добавки, такие как белки, пептиды, нуклеозиды, промежуточные продукты цикла лимонной кислоты, пируват и липиды. Эти добавки позволяют поддерживать рост и пролиферацию в условиях низкого процента содержания сыворотки во время клонирования или при культивировании специализированных клеток для поддержания жизнеспособности [25].
Гормоны и факторы роста	Гормоны и факторы роста часто добавляются в бессывороточные культуральные среды, либо при культивировании гормон-зависимых тканей. Основными факторами являются фактор роста тромбоцитов, фибробластоподобный, эпидермальный, эндотелиальный и инсулиноподобный факторы роста. Среди гормонов наиболее распространенными гормонами инсулин и гидрокортизон [53].
Антибиотики и антимикотики	Необходимы для уменьшения частоты загрязнения бактериями и грибами [25].
Сыворотка	Содержит факторы роста, которые способствуют пролиферации и адгезии клеток. Это также источник минеральных веществ, липидов и



гормонов, которые могут быть связаны с белками. Обычно используют телячью, эмбриональную бычью, лошадиную и человеческую сыворотку в зависимости от решаемых задач [54].
--

В современных исследованиях существуют различные модификации способов получения и культивирования клеток в однослойном состоянии. Так, например, культивирование первичных кератиноцитов человека из образцов ткани нормальной слизистой оболочки толстой кишки *in vitro* до настоящего времени оставалось невыполнимой задачей. Торреггиан и другие разработали метод получения и культивирования кератиноцитов из материала биопсии ткани слизистой оболочки ободочной и прямой кишки. Метод можно разделить на три этапа: на первом этапе проводили ферментативное расщепление ткани коллагеназой II типа и высевали отдельные полученные клетки в культуральный флакон. На втором этапе через неделю с помощью клонирующих колец первичные колонии кератиноцитов переносили в 6-луночный планшет и продолжали культивировать. На последнем этапе исследователи анализировали оптимальный состав культуральной среды и обнаружили, что бессывороточная культуральная среда dKSMF подходит для успешного выращивания кератиноцитов в виде постоянной культуры. Этот метод культивирования позволяет получать первичные кератиноциты простым и быстрым способом. Кроме того отмечается, что кератиноциты, полученные этим методом, экспрессируют специфические эпителиальные маркеры [56].

Помимо культивирования, существует задача получения моделей лекарственно-устойчивых культур клеток. Такеда и другие создали две культуры клеток опухолей предстательной железы DU145-TxR и PC-3-TxR, устойчивые к паклитакселу для изучения механизмов такой устойчивости. Культуры клеток были получены путем инкубации родительских клеток DU145 и PC-3 с паклитакселом в режиме постепенного увеличения концентрации паклитаксела с последующим культивированием в отсутствие препарата [57]. Для паклитаксела значение  $IC_{50}$  в клетках DU145-TxR и PC-3-TxR, было в 43.4 раза выше, чем в родительских клетках. Нокдаун Р-гликопротеина, который активируется в резистентных клетках с помощью миРНК MDR1, восстанавливает чувствительность к паклитакселу клеток DU145-TxR, но не в PC-3-TxR. Анализ на микрочипах показал, что экспрессия гена тензин-подобного белка (CTEN, тензин 4) снижается в 10 раз в клетках PC-3-TxR. Нокдаун CTEN в клетках PC-3 вызывает резистентность к паклитакселу, а избыточная экспрессия CTEN в клетках PC-3-TxR и DU145-TxR восстанавливает чувствительность к паклитакселу [58].

Кодак и другие разрабатывали метод получения первичных культур клеток из материала биопсии пациентов с опухолями легких для моделирования реакций пациентов на

лекарственную терапию. Образцы опухолей легкого после хирургического вмешательства механически измельчали и подвергали ферментативной обработке либразой (25 мкг/мл) в течение 1 часа при встряхивании при 37°C. Далее использовали диссоциатор с нагреванием gentleMACs (Miltenyi Biotec). Диссоциированные клетки высевали в культуральные планшеты с коллагеновым покрытием или облученными фибробластами крайней плоти человека. Полученные с помощью такого подхода персональные культуры клеток опухолей легких далее использовали для моделирования реакции пациента на химиопрепараты [59].

#### *1.1.4.2 Культивирование срезов ткани*

Процедура подготовки для культивирования срезов ткани аналогична системе культивирования эксплантов, но размер среза имеет ограничение по толщине [60]. Срез толщиной 160 мкм является оптимальным для выращивания клеток и сохранения их морфологии. При более тонком срезе клетки могут быть разрушены или возникнут механические повреждения ядер. При более толстом срезе, напротив, будут сложности в обогащении клеток питательными веществами и кислородом, что будет снижать их жизнеспособность [61].

Для получения срезов фрагмент ткани с помощью скальпеля нарезают на фрагменты 0.5 см<sup>3</sup>, затем их заливают в агорозные блоки и нарезают на микротоме. Образцы срезов помещают в лунки 6-луночных планшетов и добавляют обогащенную среду для культивирования клеток. Незначительное количество апоптотических клеток детектируемое через 24 и 48 часов, подтверждают высокую эффективность получения жизнеспособных клеток при использовании этого метода [62].

В современной модификации метод культивирования срезов был применен Мисра и другими для получения органотипической культуры протоковой аденокарциномы поджелудочной железы человека. Протоковая аденокарцинома поджелудочной железы имеет плохой прогноз, что в основном связано с поздней диагностикой и высокой устойчивостью к лечению. Лекарственную устойчивость этих клеток в значительной степени связывают со стромой опухоли, которая участвует в сложных взаимодействиях с опухолевыми клетками. В исследовании из образцов опухолевой ткани после хирургической резекции готовили срезы толщиной 350 мкм. Срезы помещали на вставку Millicell® (Millipore) с порами 0.4 мкм и диаметром 30 мм, и всю конструкцию помещали в среду так, чтобы слой среды покрывал срез на 1.0 мм. Пространство между вставкой и чашкой для культивирования обеспечивало площадь поверхности ~ 255 мм<sup>2</sup>, что позволяло осуществлять прямой газообмен между окружающей и культуральной средами. Эта модель приближена к реальному состоянию в опухоли пациента, так как срезы содержат все составляющие её типы

клеток и бесклеточные компоненты, которые находятся в микроокружении опухоли поджелудочной железы [63].

#### 1.1.4.3 Трехмерные (3D) клеточные культуры

Трехмерные клеточные культуры изменили представление о традиционной модели культивирования *in vitro*. Метод предполагает применение дополнительных структурирующих компонентов или субстратов. Одним из вариантов культивирования в 3D является культивирование в виде сфероидов. Сфероиды - это агрегаты, которые можно выращивать в неадгезивной капсулированной форме или на 3D-матриксах. К способам культивирования 3D-культур относят культивирование с использованием различных матриксов, таких как гидрогель, биопечать, микрофлюидные методы [64].

Сфероиды представляют собой самоорганизованные сферические кластеры-колонии клеток с тканеподобной архитектурой [65]. Клетки в сфероиде приобретают большее сходство с клетками опухоли *in vivo*, чем те же клетки, выращенные в монослойной культуре [65]. Морфологическое сходство сфероидов с опухолью связано с уходом опухолевых клеток от неестественной распластанной морфологии, характерной для монослойной культуры [66].

В методе «висящей капли» каплю клеточной суспензии помещают на нижнюю сторону крышки чашки Петри, крышку переворачивают и из-за поверхностного натяжения клеточная суспензия оказывается висящей на чашке Петри, которая содержит фосфатный буфер для предотвращения дегидратации капли. Клетки скапливаются в кончике капли на границе раздела воздух-жидкость и образуют сфероиды [67]. Этот метод имеет свои преимущества, так как позволяет работать с небольшим количеством клеток без использования дорогостоящих реагентов, что важно при работе с ограниченными размерами образцов ткани, а также при работе с медленно пролиферирующими клетками. Размеры капли не должны превышать 40 мкл, чтобы не нарушать поверхностное натяжение, и такой метод не предполагает длительного культивирования [68].

Спонтанное образование сфероидов предполагает использование подложки, покрытой инертным субстратом (агаром или поли-2-гидроксиэтилметакрилат (поли-НЭМА)), который предотвращает прикрепление клеток к поверхности лунок, заставляя клетки агрегировать и формировать сфероиды [69]. Преимуществом этого метода является нетоксичность субстрата, простота манипуляций и возможность длительного культивирования. Размеры и состав образующихся сфероидов могут быть слишком неоднородными, что является ограничением для такого метода, кроме того правильное соотношение разных типов клеток в сфероидах при совместном культивировании может быть нарушено [70].

Модель, которая может воспроизводить взаимодействие клеток с внеклеточным матриксом *in vivo*, можно получить с использованием природных или синтетических гидрогелей [71]. Для получения первичных 3D-культур диссоциированные клетки сначала высевают как монослой в пределах двух слоев внеклеточного матрикса, который моделирует микроокружение *in vivo* [72]. Применение тканеспецифического матрикса является основным преимуществом данного метода [73]. Клетки высевают на верхний слой матрикса после затвердевания, либо смешивают с жидким гидрогелем для того, чтобы клетки были встроены в матрикс в процессе гелеобразования. В обоих способах планшеты для культивирования клеток предварительно покрывают гидрогелем. В первом случае клетки просто добавляют поверх гидрогеля после затвердевания и культивируют при 37°C при перемешивании, чтобы позволить клеткам прилипать друг к другу и образовывать сфероиды, прикрепленные к гидрогелю. Во втором способе клетки смешанные с гидрогелем также добавляют поверх гидрогеля на подложку и инкубируют при 37°C, при этом гидрогель превращается в желеобразную структуру. Матригель является разновидностью гидрогеля, он может обеспечивать необходимую реорганизацию и формирование клеток в трехмерные структуры. Матригель является коммерчески доступным матриксом, который содержит белки базальных мембран, такие как коллаген IV, энтактин, ламинин, матриксную металлопротеиназу 2 и факторы роста, полученные из опухолевых клеток мыши [74]. Белки базальной мембраны необходимы для обеспечения клеточных функций, таких как полярность, регуляция пролиферации, химиорезистентность и адгезия. Другим доступным матриксом может служить коллаген I типа, который является основным компонентом соединительной ткани, синтезируемым фибробластами [75]. В результате, фенотип клеток имеет характерную для тканевого источника морфологию, полярность, профиль экспрессии генов и скорость пролиферации [76]. Такой подход выращивания первичных опухолевых клеток позволяет изучать основные характеристики клеточных линий, такие как пролиферация, секреция, иммунологические особенности, развитие гипоксии, ангиогенные свойства, независимость роста и метастатический потенциал. Использование гидрогеля имеет свое преимущество, так как может воспроизвести механистическую основу взаимодействия клеток с матриксом и распределение структурных сигналов в нативной ткани. С другой стороны, при использовании природных гидрогелей могут возникать эндогенные сигналы, которые не относятся к опухолевой среде человека [64].

Способ 3D культивирования клеток имеет преимущество над традиционной 2D системой лишь в определенных областях исследований. К недостаткам метода можно отнести то, что реагенты для культивирования 3D культур более дорогие, чем для 2D, и 3D

культура требует разработки инновационных методов создания полноценной модели с заданной цитоархитектурой, а также методов анализа [77].

Ван и другие разработали модель совместного культивирования опухолевых и эндотелиальных клеток на основе гидрогеля из полиэтиленгликоля, которая имитирует пространственную организацию сосудов. Такая модель необходима для создания микроанатомической архитектуры опухолево-эндотелиальных взаимодействий *in vivo* при глиобластоме. Чтобы повысить физиологическую значимость, в качестве модельных типов клеток использовали клетки глиобластомы, полученные от пациента, и эндотелиальные клетки головного мозга мыши. Используя разлагаемые волокна водорослей в качестве матрикса, эндотелиальные клетки формировали 3D сосудистые структуры с высокой жизнеспособностью и сохранением эндотелиального фенотипа клеток в гидрогеле. Совместное культивирование клеток глиобластомы и эндотелия привело к усиленной пролиферации клеток глиобластомы и снижению экспрессии белков клеточной адгезии эндотелиальных клеток. Таким образом, была разработана новая 3D модель совместного культивирования, которая имитирует пространственную организацию опухоли головного мозга и эндотелиальных клеток *in vivo* [78]. В другом исследовании Ван и другие смогли получить эпителиальную культуру клеток из ткани легкого ребенка для изучения механизмов дифференцировки клеток дыхательных путей человека и реакции новорожденных на загрязнение окружающей среды. В задачу входило получение культуры, существующей на границе воздух/жидкость (ALI). Образец ткани легкого диссоциировали литическим коктейлем, содержащим коллагеназу типа I (2 мг/мл), диспазу II (1 мг/мл), эластазу (0.5 мг/мл) и ДНКазу (2 мг/мл). Клетки легкого высевали на культуральный планшет, содержащий селективную среду для роста эпителиальных клеток, через сутки фибробластоподобные клетки удаляли из культивирования путем краткой обработки трипсином. Через 24–48 ч среду меняли на смесь 1:1 сред BEBM и DMEM, клетки высевали на специальные вставки для лунок, покрытые коллагеном I типа. Когда клетки достигли монослоя (~10–15 дней), среду с поверхности клеток удаляли, и клетки взаимодействовали только со средой под подложкой, формируя, таким образом пограничные условия воздух/жидкость [79].

#### *1.1.4.4 Частичная ферментативная диссоциация стромальной ткани*

В случае культивирования опухолевых клеток частичная ферментативная диссоциация стромальной ткани приблизительно в 66% случаев позволяет получить культуры опухолевых клеток, способных к пролиферации и пассированию [80]. Образцы опухолевой ткани измельчают и суспендируют в полной среде, содержащей коллагеназу I

типа и гиалуронидазу, при 37°C от 1 до 6 часов. Затем, диссоциированный образец фильтруют и центрифугируют. Клеточный осадок культивируют в соответствующей для данного типа ткани среде с низким содержанием кальция и дополнительными питательными добавками. Фибробласты могут быть удалены из культуры клеток с помощью кратковременной обработки трипсином [80]. После достижения состояния монослоя клетки периодически пересаживают для получения клеточной линии.

Этот метод наиболее эффективен для выделения клеток из образцов ткани молочной железы, однако разделить эпителиальные и стромальные клетки полностью достаточно сложно, поэтому такая культура будет обладать достаточно сильной гетерогенностью. Кроме того, важно следить за скоростью пролиферации и особенностями морфологии клеток для поддержания фенотипа и генотипа культуры для проведения дальнейших исследований.

#### 1.1.4.5 «Сэндвич» культуры

Культивирование клеток по типу «сэндвич» подходит для опухолевых культур, поскольку обеспечивает рост в среде, лишённой питательных элементов, в условиях, при которых нормальные клетки не выживают. Для «сэндвич» культуры необходимо механически или ферментативно отделить от опухолевого образца фрагменты, содержащие эпителиальные клетки, и диссоциировать до однородной клеточной суспензии с помощью трипсина. Затем клетки высевают на предметное стекло с иммобилизованными на поверхности молекулами адгезии. Через 24 часа поверх первого стекла помещают второе стекло, образуя «сэндвич». Тонкий слой питательной среды полностью покрывает клетки для обеспечения питания. Рост клеток в такой системе приводит к формированию ядра, содержащего некротические клетки с прилегающими к нему снаружи двумя слоями живых клеток, то есть образуется аналог среза сфероиды поперечного сечения [81]. Такой подход культивирования увеличивает жизнеспособность опухолевых клеток. Кроме того, он достаточно хорошо позволяет моделировать морфологию опухолевых клеток в состоянии гипоксии и голодания, типичного для внутренних слоев опухоли *in vivo*, чтобы сохранить специфические биохимические функции ткани. Несмотря на свои преимущества, «сэндвич» культура поддерживает выживание только части опухолевых клеток, а именно устойчивых к гипоксии. Следовательно, вероятность получения гетерогенной популяции опухолевых клеток ограничено.

Бенжи и другие использовали этот метод для создания модели для изучения метаболизма и модуляции липидов сальных желез. Были получены образцы кожи после хирургического вмешательства, которые диссоциировали с диспазой в течение ночи при 4°C. Сальные железы выделяли микрохирургическими инструментами под микроскопом. Чтобы

имитировать микроокружение сальной железы, экспланты были зажаты между стеклянными покровными стеклами, покрытыми фибронектином человека (10 мкг/мл). Через 1-2 недель роста в культуре на периферии долек железы был виден клеточный рост, после чего экспланты убирала, и изолированные клетки культивировали на покрытых фибронектином покровных стеклах. Такая модель позволила исследователям подобрать наиболее подходящую культуральную среду и поддерживать работу сальных желез до 42 дней [82].

#### *1.1.4.6 Выделение опухолевых стволовых клеток*

В настоящее время развивается концепция опухолевых стволовых клеток (CSC, cancer stem cells, ОСК), согласно которой главную роль в развитии злокачественных новообразований играет небольшая субпопуляция опухолевых клеток, обладающая характеристиками стволовых клеток. Современные технологии позволяют селективно культивировать такие клетки из ткани опухоли пациента в лабораторных условиях. Экспрессия специфических поверхностных маркеров и ферментов позволяет выделить иницирующие опухолевые клетки из ткани печени [83], молочной железы [84], головного мозга [85], легких [86], толстой кишки [87], поджелудочной железы [88] и кишечника [89] методом проточной сортировки.

## **1.2 Особенности терапии злокачественных опухолей молочной железы и эндометрия**

Злокачественные опухоли молочной железы (ЗОМЖ) - это гетерогенное заболевание, включающее множество различных подтипов, каждое из которых не только имеет свои биологические особенности, но и отличается клиническим проявлением [90]. Разветвленное протоко-альвеолярное дерево, образующее молочную железу, окружено мембраной и стромальными клетками, которые вносят вклад в тканевой гомеостаз. Два основных типа клеток, организованные в двухслойные структуры, составляют эпителий молочной железы. Прозрачный слой, выстилающий каналы и альвеолы, состоит из клеток, экспрессирующих кератины 8/18/19 (K8/18/19) и/или рецепторы эстрогена и прогестерона (ER/PR). Окружающий эпителий миоэпителиальный слой состоит из клеток, экспрессирующих кератины 5/14 (K5/14) и/или актин гладкой мускулатуры (SMA) и/или p63 [75].

### ***1.2.1 Классификация злокачественных опухолей молочной железы и проблемы гетерогенности***

В течение последних лет значительно расширилась молекулярная субклассификация ЗОМЖ [91]. Геномные исследования выявляют опухоль-ассоциированные молекулы и

ансамбли, которые позволяют идентифицировать маркеры ответа на терапию. Изучение разнообразия и межопухолевой гетерогенности ЗОМЖ привели к разработке новой классификации, которая выделяет 10 подтипов ЗОМЖ с различным клиническим течением [92] (Таблица 3).

### ***1.2.2 Терапевтические подходы к лечению злокачественных опухолей молочной железы***

Современные клинические подходы для лечения ЗОМЖ основаны на фенотипировании опухоли с помощью многопрофильного анализа. Комбинация операционной резекции, лучевой и лекарственной терапии позволяет достигать продолжительных периодов ремиссии. Все чаще корреляционные трансляционные исследования интегрируются в клинических испытаниях и направляются на оптимизацию таргетной группы пациентов и выявление механизмов резистентности к исследуемой терапии. Данные иммуногистохимических исследований, на которые опирается выбор терапевтических агентов, тяжело воспроизводимы и имеют трудности со стандартизацией анализа. Определение уровня экспрессии эстрогена (ER), прогестерона (PR) и рецептора эпидермального фактора роста человека 2 (HER2) в определенной степени решает эту проблему, но для других биомаркеров, включая Ki-67, проблемы остаются.

### ***1.2.3 Эндокринная терапия злокачественных опухолей молочной железы***

В 2016 году ASCO обновило и опубликовало руководство по клинической практике для адъювантной эндокринной терапии для женщин с гормонально-зависимыми ЗОМЖ [93], а в 2018 году стали доступны новые рекомендации для применения ингибиторов ароматазы в клинической практике [94]. Первый разработанный гормональный препарат для лечения гормон-зависимых форм ЗОМЖ – тамоксифен, нестероидный антагонист эстрогена, был описан в 1967 году Харпером и Уолполом [95]. В настоящее время тамоксифен используют как препарат первой линии терапии для пациенток с гормон-положительными ЗОМЖ в предменопаузе, и длительность применения препарата достигает 5ти лет [96]. У женщин в постменопаузе эстроген больше не вырабатывается тканью яичников и синтезируется в других тканях с участием фермента ароматазы. В существующих протоколах для женщин с гормон-положительными ЗОМЖ в постменопаузе рекомендовано использование ингибиторов ароматазы III-го поколения с/без ингибиторами циклинзависимой киназы [93]. Ингибиторы ароматазы подразделяют на стероидные и нестероидные, где стероидные ингибиторы (летрозол, фулвестрант) приводят к необратимому ингибированию ферментативной активности, в то время как нестероидные ингибиторы (экземестан, анастрозол, эверолимус) являются обратимыми конкурентными ингибиторами [97].



**Таблица 3. Особенности подтипов ЗОМЖ**

<b>Тип</b>	<b>Частота встречаемости (n, %)</b>	<b>Генетические особенности</b>	<b>Гормональный статус (n, %)</b>	<b>Клиническое проявление</b>	<b>Нестабильность генома</b>
1	139 (7%)	амплификация 17q23	ER+: 123 (88,49%) PR+: 60 (43,17%) HER2+: 20 (14,39%)	Яркое проявление	Высокая
2	72 (4%)	амплификация 11q13/14	ER +: 69 (95,83%) PR +: 51 (70,83%) HER2 +: 3 (4,17%)	Нет четких особенностей	Высокая
3	290 (15 %)	изменение копийности гена	ER +: 278 (95,86%) PR +: 211 (72,76%) HER2 +: 1 (0,34%)	Низкое проявление	Низкая
4	343 (17%)	соматические абберации отсутствуют	ER +: 238 (69,39%) PR +: 155 (45,19%) HER2 +: 20 (5,83%)	Низкое проявление	Низкая
5	190 (10%)	амплификация ERBB2	ER +: 79 (41,58%) PR +: 40 (21,05%) HER2 +: 181 (95,26%)	Яркое проявление, молодой возраст	Высокая
6	85 (4%)	амплификация 8p12	ER +: 85 (100%) PR +: 36 (45,88%) HER2 +: 3 (3,53%)	Нет четких особенностей	Высокая

7	190 (10%)	амплификация 16p и 8q, потеря 16q	ER +: 187 (98,42%) PR +: 150 (78,95%) HER2 +: 2 (1,05%)	Низкое проявление, старший возраст	Промежуточная
8	299 (15%)	1q амплификация, потеря 16q	ER +: 297 (99,3%) PR +: 236 (78,93%) HER2 +: 1 (0,33%)	Низкое проявление, старший возраст	Промежуточная
9	146 (7%)	8q и 20q амплификация	ER +: 125 (85,62%) PR +: 79 (54,11%) HER2 +: 10 (6,85%)	Яркое проявление	Высокая
10	226 (11 %)	8q, 10p и 12p амплификация, 5q потеря	ER +: 25 (11,06%) PR +: 19 (8,41%) HER2 +: 6 (2,65%)	Яркое проявление, молодой возраст, большие опухоли	Промежуточная

#### **1.2.4 Ингибиторы путей передачи онкогенных сигналов в терапии злокачественных опухолей молочной железы**

Агенты, нацеленные на пути передачи онкогенного сигнала, особенно на рецептор HER2 эпидермального фактора роста человека, оказали значительный прогресс в лечении определенных подтипов ЗОМЖ [98]. Для HER2-положительных ЗОМЖ двойная блокада рецептора HER2 более эффективна, чем монотерапия, и может помочь предотвратить или преодолеть резистентность [99]. Герцептин, гуманизированное моноклональное антитело, которое избирательно взаимодействует с внеклеточным доменом рецептора HER2 был первым таргетным препаратом, одобренным для лечения HER2-позитивных ЗОМЖ. Хотя в настоящее время доступны другие ингибиторы HER2 (например, пертузумаб и лапатиниб), герцептин остается золотым стандартом для лечения этого подтипа ЗОМЖ [100]. При метастатических ЗОМЖ, анализ метаболитов в сыворотке может помочь выявить пациентов с HER2<sup>+</sup>-опухолью с большей чувствительностью к паклитакселу и лапатинибу [101]. Препарат лапатиниб —обратимый селективный ингибитор внутриклеточного домена тирозинкиназ семейства *erbB*, связывающийся с рецептором EGFR эпидермального фактора роста ErbB1 и рецепторами HER2/*neu* [102].

Также для лечения ЗОМЖ проходят клинические испытания ингибиторы пути фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) [103], ингибиторы HSP90 (например, NVP-AUY922 и ганетеспиб) [104], необратимые ингибиторы широкой специфичности к рецепторам группы HER - нератиниб и афатиниб [105], моноклональные антитела, направленные против рецептора эпидермального фактора роста человека 3 (HER3) и Src, такие как срарациниб [106].

#### **1.2.5 Опухоли эндометрия**

Злокачественные опухоли эндометрия (ЗОЭ) являются наиболее распространенными гинекологическими злокачественными заболеваниями в развитых странах и вторыми по распространенности в развивающихся странах (после злокачественных опухолей шейки матки). Это четвертое по распространенности злокачественное заболевание у женщин [107]. Злокачественные опухоли эндометрия преимущественно встречаются у женщин в постменопаузе, что свидетельствует о вкладе экстра-яичниковых тканей в синтезе циркулирующих эстрогенов. Было показано, что в периферических тканях также происходит преобразование андрогенов надпочечников: дегидроэпиандростерона и андростендиона, предшественников эстрогенов, в эстрадиол (E2), эстрон (E1) и E1-сульфат (E1-S). Данные *in vitro* и *in vivo* также показывают, что андрогены через андрогеновые рецепторы оказывают нейтральное или тормозящее влияние на пролиферацию клеток эндометрия [108]. В

отсутствие гормона рецептор находится в инактивированном конформационном состоянии, при этом через гормон–связывающий домен он взаимодействует с белком теплового шока HSP90 [109] который, стабилизируя его, предотвращает транспорт через ядерную мембрану [109]. Взаимодействие эстрогенов с лиганд-связывающим доменом рецептора вызывает диссоциацию белка HSP90, после чего рецептор фосфорилируется и приобретает активный статус [110]. Активация ER приводит к изменению регуляции клеточного цикла через взаимодействие с циклинами и их киназами и, как следствие этого, нарушению пролиферации.

Опухоли эндометрия очень неоднородны и даже гистологически сходные опухоли могут отвечать на терапию по-разному. Статус рецепторов стероидных гормонов является основным прогностическим маркером при терапии опухолей эндометрия [111]. Доксорубин в сочетании с цисплатином и без/с таксанами играет не только важную роль в лечении болезни на поздних сроках, но также ассоциируется с неполным ответом опухолевых клеток на терапию [112].

#### *1.2.5.1 Клиническая терапия злокачественных опухолей эндометрия*

При выборе метода лечения больных с ЗОЭ необходимо учитывать стадию, гистологическую структуру опухоли, общее состояние и тяжесть сопутствующих заболеваний у пациента. Для лечения ЗОЭ применяют химиотерапию, гормональную терапию, лучевую и таргетную терапию. При I-ой стадии опухоли эндометрия, роль лучевой терапии после гистерэктомии остается спорным вопросом [113]. Химиотерапия с цисплатином/доксорубицином/паклитакселем или, если допустимо, комбинация карбоплатин/паклитаксел используется чаще в качестве первой линии лечения распространенной опухоли эндометрия [114]. Гормональное лечение после первичной операции считается предпочтительным для пациентов с опухолью эндометрия, однако решение использовать любой тип гормонотерапии должно быть персонализированно для снижения смертности [115].

Общую гистерэктомию с удалением маточных труб и яичников относят к стандартным схемам лечения ЗОЭ I-го типа и в большинстве случаев такой подход эффективен. Хотя простая общая гистерэктомию достаточна для большинства ЗОЭ, радикальная гистерэктомию проводится в случаях обширной инвазии шейки матки или при невозможности определить, является ли первичная опухоль эндоцервикального или эндометриального происхождения.

Лучевую терапию обычно проводят в комбинации с другими методами лечения ЗОЭ. Она показана при переходе опухоли на шейку матки, инфильтрации параметрия, поражении влагалища, прорастании до серозной оболочки матки, метастазов в лимфатических узлах,

яичниках или маточных трубах. Как самостоятельный метод лечения лучевая терапия проводится при наличии противопоказаний к операции [116].

Среди химиотерапевтических средств наиболее перспективными препаратами считают таксаны и цисплатин. При прогрессировании заболевания применяют различные комбинации препаратов платины, антрациклинов, таксанов, 5-фторурацила, циклофосфида, ифосфида, этопозида [117].

#### *1.2.5.2 Терапевтические мишени для лечения злокачественных опухолей эндометрия*

Для лечения ЗОЭ нет одобренных таргетных методов лечения. Мишень PI3K/AKT/mTOR является наиболее часто нарушенным каскадом при ЗОЭ, но результаты испытаний с таргетными ингибиторами mTOR показали, что частота ответа составляет менее 10% [118]. Несколько гипотез были выдвинуты для объяснения неэффективности ингибиторов mTOR при ЗОЭ: во-первых, превалирование цитостатического эффекта над цитотоксическим эффектом; во-вторых, некоторая активность в отношении нецелевой популяции и, наконец, сами ингибиторы mTOR могут быть низкоэффективными ингибиторами [119]. Поиск эффективных ингибиторов AKT, PI3K и двойных ингибиторов PI3K-mTOR для терапии ЗОЭ не окончен, и тестирование кандидатных молекул продолжается [120].

### **1.3 Эпителиально-мезенхимальный и мезенхимально-эпителиальный переходы**

#### *1.3.1 Механизм эпителиально-мезенхимального и мезенхимально-эпителиального перехода*

Эпителиально-мезенхимальным переходом называют процесс, при котором эпителиальные клетки могут приобретать мезенхимальный фенотип [121]. В настоящее время получено достаточно доказательств того, что фибробласты играют существенную роль в биологии опухоли [122]. В частности, субпопуляция фибробластов, известных как опухоль-ассоциированные фибробласты (ОАФ или CAFs), участвуют в регуляции роста и прогрессии опухоли [123]. Их можно отличить от функционально «нормальных» фибробластов на препаратах гистологических срезов опухоли по поверхностным маркерам – белкам клеточной мембраны, синтезируемым этими клетками в аномально высоких по сравнению с обычными фибробластами количествах [124]. ОАФ, как полагают, происходят, в том числе от «нормальных» фибробластов и опухолевых эпителиальных клеток через эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП или EMT) и мезенхимальных стволовых клеток [125]. В 1999 году Олуми и др. обнаружили, что совместное культивирование нетрансформированных

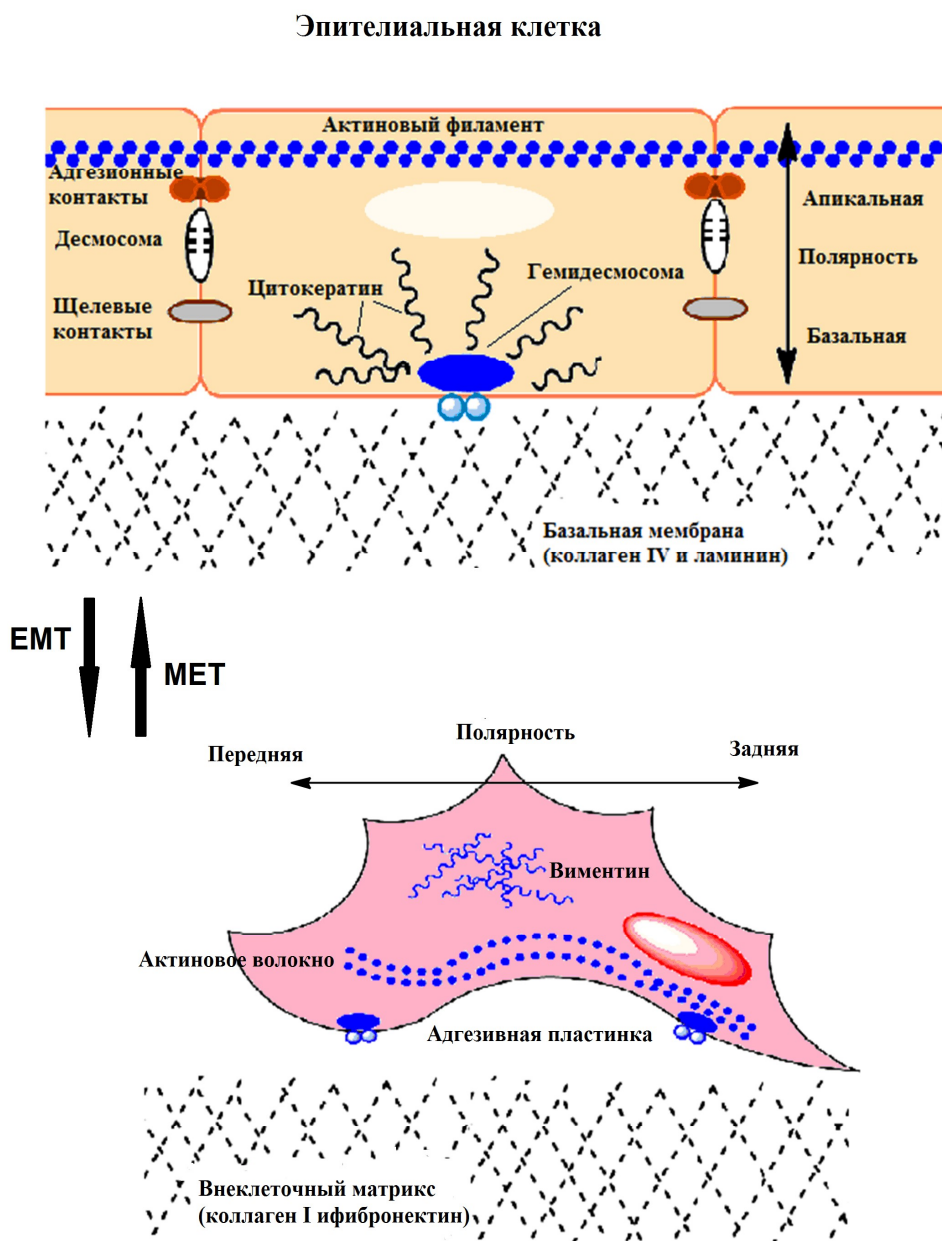
эпителиальных клеток простаты человека с ОАФ, но не с нормальными фибробластами простаты, резко стимулируют рост и изменение гистологии эпителиальных клеток [126]. Точно так же, в 2001 году Гайвард и др. показали, что совместное культивирование нетрансформированной линии клеток простаты ВРН-1 с ОАФ приводит к постоянной трансформации этих эпителиальных клеток в опухолевые [127]. Также была продемонстрирована взаимосвязь между микроокружением злокачественной опухоли и способностью стромы отвечать на хемокины через хемокиновые рецепторы CXCL12/CXCR4 [128].

В 2007 году Лебрет и др. обнаружили, что ОАФ и нетрансформированные фибробласты образцов ткани здоровой молочной железы были способны индуцировать ЭМП в опухолевых клетках линии РМС42-LA, содержащих популяцию опухолевых стволовых клеток [129]. Другое исследование показало, что фибробласты, выделенные из зоны, расположенной в пределах 5 мм от опухолевого очага, а также ОАФ и нормальные фибробласты молочной железы были способны индуцировать ЭМП в клетках аденокарциномы молочной железы линии MCF-7 [130]. Кроме того, фибробласты из доброкачественной гипертрофической опухоли простаты, которые были активированы путем совместного культивирования с агрессивными опухолевыми клетками простаты РС3, DU145 и LNCaP, индуцировали ЭМП в линиях раковых эпителиоцитов [131].

Роль ЭМП и обратного процесса - мезенхимально-эпителиального перехода (МЭП или МЕТ), первоначально были изучены в контексте эмбрионального морфогенеза [132]. Было обнаружено, что во время гаструляции амниот, эпибласт в определенной области примитивной эктодермы, первой эмбриональной эпителиальной ткани, подвергаясь ЭМП дифференцируется в первичные клетки мезенхимы, которые проникают из эктодермального слоя в мезодермальные и энтодермальные клеточные слои. Клетки нервного гребня в пределах дорсальной части нервной трубки, состоящие из нейроэпителиальных клеток, также подвергаются ЭМП, мигрируют и дифференцируются в различные типы клеток, в том числе меланоциты, периферические нейроны, глиальные клетки и клетки соединительной ткани. Во время эмбрионального развития почки, клетки метанефрической мезенхимы проходят обратную трансформацию - МЭП для того, чтобы сформировать почечный эпителий и, в конечном счете, образовать нефроны [133]. Это лишь несколько примеров ключевой роли эпителиально-мезенхимальных взаимопревращений в эмбриогенезе.

ЭМП играет центральную роль в различных патологических процессах: в заживлении ран, фиброзной трансформации ткани и опухолевой прогрессии [134]. Во всех этих процессах, активация ЭМП вызывает внешние и молекулярные изменения клеток: реорганизацию цитоскелета и связанные с этим изменения в морфологии клеток,

превращение из плоскоклеточных, кубических или столбчатых форм в веретеноподобные удлиненные формы, диссоциацию эпителиальных межклеточных контактов, в том числе жестких и щелевых контактов, потерю апикально-базальной полярности и сопутствующего усиления передней и задней полярности; приобретению подвижности, а также способности реорганизовать внеклеточный матрикс (ЕСМ), что позволяет перенастраивать экспрессию, по меньшей мере, 400 различных генов (Рис. 1) [135].



**Рис. 1.** Схематическое изображение клеточных и внеклеточных структур, претерпевающих изменения при ЭМП. Активация ЭМП приводит к значительным изменениям клеточной морфологии в полярности клеток, клеточных контактов, цитоскелете и клеточном взаимодействии с внеклеточным матриксом (ЕСМ).

Как уже отмечено, активировать ЭМП могут и нормальные, и опухолевые эпителиальные клетки. Показано сложное взаимодействие внеклеточных стимулов и соответствующих внутриклеточных сигнальных путей при индукции ЭМП. Центральная роль в ЭМП часто обусловлена компонентами сигнального пути TGF $\beta$ -SMAD [135]. Важно отметить, что процесс ЭМП реализуется в клетках карцином *in vivo*, и, возможно, вызван специфическими сигналами, исходящими от микроокружения опухоли [136]. Другой путь передачи сигналов ЭМП - это каскад Wnt, с вовлечением фактора роста рецептора тирозинкиназы и ECM-интегрин сигнальных путей [137]. В неопухолевых и опухолевых клетках эти сигнальные пути ведут к активации относительно небольшой группы транскрипционных факторов, которые объединяют термином «ЭМП-индуцирующие факторы транскрипции» (ЭМП – ТФ или EMT- TFs).

Эти факторы транскрипции, как правило, могут быть отнесены к одному из трех белковых семейств, а именно - Snail (в том числе Snail и Slug, также известный как SNAI1 и SNAI2, соответственно), ZEB (включая ZEB1 и ZEB2), и основное семейство факторов спираль-петля-спираль (в том числе TWIST1, TWIST2 и Tcf3) [138]. Некоторые авторы отмечают вовлеченность в ЭМП и других факторов транскрипции, таких как PRRX1, YAP1/TAZ и SOX4. В свою очередь, регуляторы процесса ЭМП влияют на транскрипцию ЭМП - ассоциированных генов через активацию/репрессию промоторов за счет модификации структуры хроматина [138]. Итогом подавления экспрессии генов, ассоциированных с эпителиальным фенотипом, например E-кадгерина и цитокератинов, является активация генов, ассоциированных с фенотипом мезенхимальных клеток, в том числе, кодирующих N-кадгерин, фибронектин и виментин [138], что приводит к запуску процесса ЭМП. Кроме того, показано, что активность ароматазы может стимулировать ЭМП через подавление факторов транскрипции процесса ЭМП [139].

Транскрипционные факторы ЭМП функционируют согласованно, для того чтобы регулировать экспрессию общих генов-мишеней и, кроме того, являются активаторами/репрессорами друг друга [134]. Например, активация Snail индуцирует экспрессию многих других ЭМП-ТФ, в том числе SLUG, ZEB1 и TWIST1. С другой стороны, фактор Tcf3 по-видимому, функционирует в качестве репрессора транскрипции для эпителиальных маркеров, а его экспрессию индуцируют другие ЭМП-ТФ, такие как Snail, Slug и ZEB1 [135; 140]. Из-за этих взаимодействий, экспрессия одного ЭМП-ТФ обычно приводит к усилению активности других ЭМП-ТФ, индуцируя ЭМП.

Помимо классических индукторов ЭМП, показано влияние на ЭМП некодирующих микроРНК (миРНК), как по механизму дестабилизации целевых мРНК так и по пути репрессии трансляции факторов ЭМП [141]. Среди наиболее изученных миРНК,



регулирующих ЭМП, стоит отметить миРНК семейства миРНК200, которые подавляют синтез ZEB1 и ZEB2 белков. Интересно, что экспрессия самих миРНК200 подавляется факторами ZEB1 и ZEB2 по пути двойной обратной связи [142]. Аналогично, экспрессия Snail ослабляет экспрессию миРНК семейства миРНК-34, которые, в свою очередь, подавляют Snail, образуя еще одну двойную негативную регуляторную петлю связи между ЭМП-ТФ и миРНК [143].

Хотя механизмы, ведущие к активации ЭМП, становятся все более понятными, механизмы, ответственные за индукцию обратного процесса – МЭП, до сих пор мало изучены. Преобладающая гипотеза гласит, что МЭП происходит вследствие дезактивации ранее активного ЭМП, в результате снижения или отсутствия экспрессии ЭМП-ТФ [144]. Тем не менее, есть доказательства реализации специфических механизмов без ингибирования ЭМП-ТФ. Так, например, перепрограммирование фибробластов мыши в плюрипотентные стволовые клетки включает стадию активации МЭП, которая опосредована индукцией экспрессии генов, связанных с эпителиальным фенотипом клеток фактором транскрипции KLF4 [145]. Недавно был показан переход ЭМП→МЭП в опухолевых клетках поджелудочной железы при культивировании в среде, богатой кислородом [146]. Некоторые молекулярные маркеры МЭП могут зависеть от путей, индуцируемых гипоксией и соответствующих гипоксия-чувствительных факторов (HIFs) [147]. В условиях гипоксии молекула HIF-1 $\alpha$  является фактором регулирующим метаболизм и поддерживающим гомеостаз окислительно-восстановительного состояния клетки [148]. Гипоксия является одним из индукторов ЭМП, активируя HIF-1 $\alpha$  и взаимосвязанные каскады [149]. Хуан и его коллеги показали, что гипоксия стимулирует HIF-1 $\alpha$ -зависимую экспрессию Slug, индуцируя ЭМП, и клетки приобретают фибробластоподобный фенотип [150]. В местах метастазирования опухолевые клетки восстанавливают эпителиальный фенотип [151]. Такой механизм предполагает, что концентрации кислорода важна для активации ЭМП→МЭП в опухолевых клетках.

### ***1.3.2 Роль эпителиально-мезенхимального перехода в опухолевой прогрессии***

В отличие от ЭМП в эмбриональном развитии, участие этой программы в опухолевой прогрессии не было предметом дискуссий до недавнего времени [152]. Это связано с отсутствием данных о ее роли в патогенезе онкологических заболеваний [153].

Действительно, появление клеток в состоянии «полного ЭМП», включая потерю всех эпителиальных и усиление всех мезенхимальных признаков, как это видно при ЭМП во время эмбриогенеза, редко наблюдается в опухолях человека. Исключение составляют только карциносаркомы, редкий тип онкологии, при котором опухоли состоят из отдельных

эпителиальных (карциноматозных) и мезенхимальных (саркоматозных) клеток, происходящих от общего предшественника [154]. Обнаружение маркеров ЭМП в клинических образцах затруднено, так как «полного» ЭМП в опухолях не происходит. Идентификация клеток в состоянии ЭМП в очагах опухоли также усложняется присутствием стромальных клеток, которые экспрессируют многие из маркеров ЭМП. В процессе ЭМП эпителиальные клетки претерпевают множественные биохимические изменения, приводящие к мезенхимальному фенотипу, обеспечивающему миграционные и инвазивные свойства. ЭМП является базисом опухолевой прогрессии и метастазирования [155]. Эпителиальные клетки, претерпевшие ЭМП, отличаются от исходных клеток по экспрессии E-кадгерина, N-кадгерина, ZEB1, SIP1 и виментина. Параллельно происходит сдвиг морфологии клеток к веретенообразному с потерей межклеточных контактов [156]. При ЗОМЖ, экспрессия индукторов ЭМП, таких как Snail и Slug, соотносится с базальными типами ЗОМЖ и более высокой степенью дифференцировки опухоли, что коррелирует с плохим прогнозом [157].

На протяжении последних 20-ти лет, потерю белка адгезии E-кадгерина в клетках опухоли ассоциировали с развитием метастазов и плохим прогнозом. Прямые доказательства связи ЭМП и опухолевой прогрессии получили в начале 2000-х годов, когда была доказана взаимосвязь между Snail и опухолевой прогрессией. В частности, было обнаружено, что экспрессия Snail в клетках опухоли индуцирует ЭМП, ингибируя транскрипцию гена E-кадгерина (CDH1) [141]. Кроме того, экспрессия Snail была обнаружена как в инвазивных иммортализованных опухолевых клеточных линиях, так и в образцах опухолей пациентов с ЗОМЖ [158]. Несколько лет спустя была показана ключевая роль Twist1 в метастазировании опухоли молочной железы у мышей [159].

Исследования показали, что опухолевые клетки, которые подверглись ЭМП и экспрессировали мезенхимальные маркеры, как правило, были более устойчивы к химиотерапии [160]. Показано что, эпителиальные опухолевые клетки линии толстой кишки в процессе развития устойчивости к оксалиплатину приобретают мезенхимальный фенотип [161] и точно так же, эпителиальные опухолевые клетки линии яичников трансформируются в мезенхимальные при развитии устойчивости к паклитакселу [160].

Анализ специфических мРНК методом гибридизации *in situ* в циркулирующих опухолевых клетках (ЦОК или CTCs) пациентов с ЗОМЖ показал, что ЦОК экспрессируют и эпителиальные и мезенхимальные транскрипты, что подтверждает частичную активацию ЭМП [162]. Примечательно, что клетки, прошедшие неполный процесс ЭМП встречаются в образцах пациентов любого из трех основных гистологических подтипов инвазивных ЗОМЖ (ER/PR-положительный, HER2-положительный или трижды негативный).

Кроме того, частичная трансформация пути ЭМП в опухолях человека часто обратима, позволяя опухолевым клеткам восстанавливать эпителиальное состояние фенотипа за счет МЭП. Таким образом, во многих злокачественных образованиях, инвазивные опухолевые клетки первичной опухоли часто демонстрируют признаки активации ЭМП, в том числе сниженный уровень E-кадгерина, одновременно с отображением эпителиальных признаков и поддержанием межклеточных контактов. Такая пластичность в клеточных фенотипах позволяет гибко активировать процессы ЭМП и МЭП в ходе метастазирования опухоли.

На моделях ксенотрансплантатов метастатической ЗОМЖ анализ профиля экспрессии генов показал, что перед формированием метастазов распространяемые опухолевые клетки отображают стволово-подобный транскрипционный профиль и активацию ЭМП. В то же время, прикрепившиеся диссеминированные клетки в метастазах теряют признаки активации ЭМП и демонстрируют люминально-подобную дифференцировку [163]. Действительно, если активировать ЭМП в клетках опухоли мышей *in vitro*, а затем ввести эти клетки в кровоток, это приведет к макроскопическим метастазам в легких [164]. В крысиной модели опухоли молочной железы с мутантной формой гена HER2 был обнаружен высокий уровень экспрессии Twist1 в эпителиальных клетках на стадии атипичной протоковой гиперплазии [165]. Полученные результаты показали, что ЭМП может активироваться на предопухолевых стадиях трансформации клеток. Точно так же, в другой модели ЗОМЖ мыши, экспрессию фактора Snail в эпителиальных клетках молочной железы наблюдали на стадии атипичной протоковой гиперплазии [166]. Более того, в модели рака поджелудочной железы, с нокаутом гена p53 и мутацией Kras<sup>G12D</sup>, эпителиальные клетки экспрессировали фактор ЭМП Zeb1 на стадии неоплазии поджелудочной железы [167]. Эти результаты согласуются с клиническими наблюдениями, показывающими, что системное распространение опухолевых клеток может начаться на самых ранних этапах онкологических заболеваний, в частности для молочной железы и поджелудочной железы [168]. Показано, что при инвазивных формах опухолей молочной железы ЭМП происходит редко. В модели ЗОМЖ с индуцированной экспрессией Muc, ЭМП был непосредственно связан с экспрессией Muc, то есть была показана связь между ЭМП и экспрессией онкогена [169]. Ванг и его коллеги показали, что онкоген Kras стимулируют гиперэкспрессию CD44 в опухолях поджелудочной железы у человека и мышей по  $\beta$ -катениновому пути с активацией ЭМП [170].

Тем не менее, некоторые ключевые вопросы, касающиеся активации ЭМП в начале опухолевой прогрессии остаются без ответа. Например, какие из генетических изменений предрасполагают к появлению предопухолевых клеток во время активации ранее молчащего процесса ЭМП [171].

### ***1.3.3 Влияние микроокружение опухоли на эпителиально-мезенхимальный переход***

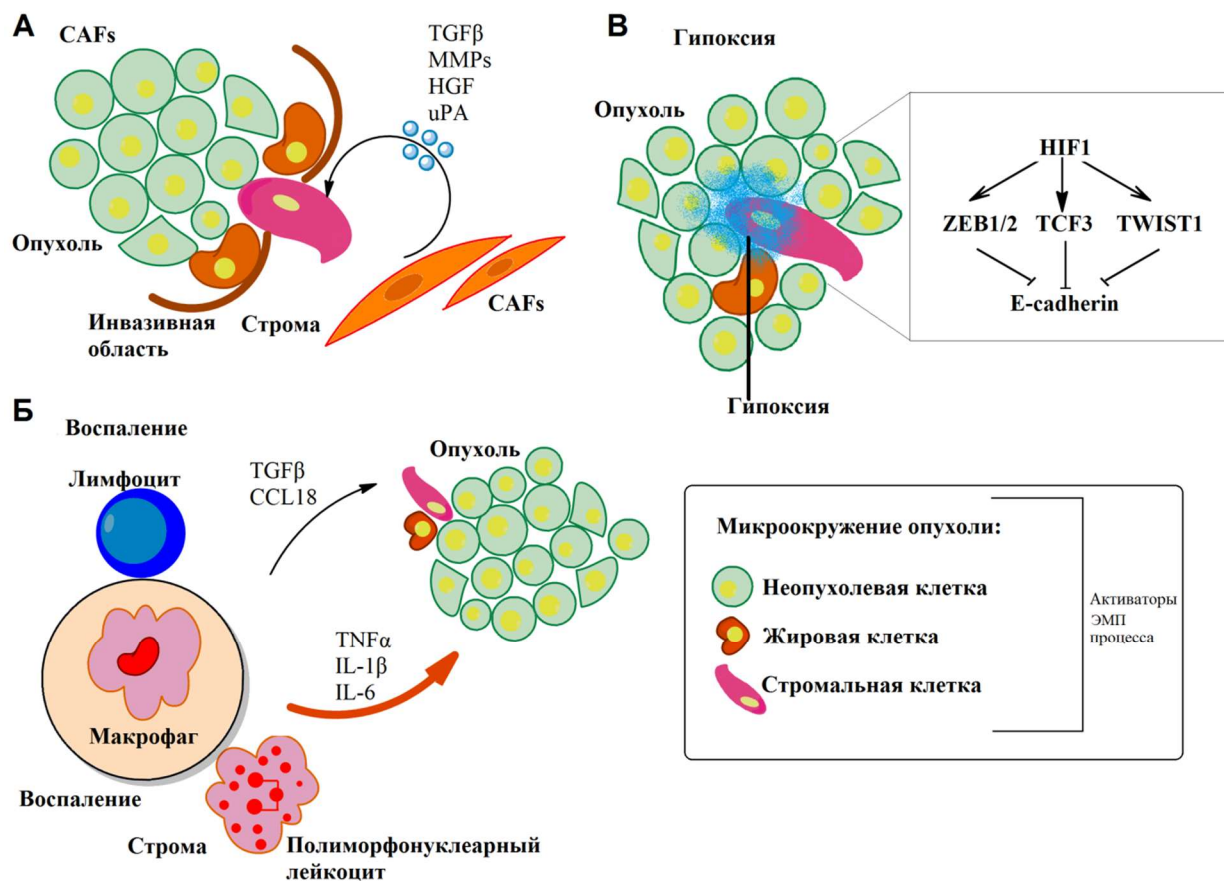
Опухоли формируются в окружении здоровых клеток организма. Здоровые клетки участвуют в регуляции метаболизма и жизнедеятельности опухолевых клеток в опухоли и могут быть классифицированы на три основных вида: ангиогенные клетки сосудов, инфильтрирующие опухоль иммунные клетки, а также опухоль-ассоциированные фибробласты [172].

#### ***1.3.3.1 Роль опухоль-ассоциированных фибробластов в эпителиально-мезенхимальном переходе***

Предшественниками ОАФ могут быть нетрансформированные фибробласты, мезенхимальные стволовые и эндотелиальные клетки. Мезенхимальные стволовые и эндотелиальные клетки отличаются от нетрансформированных фибробластов особым профилем секретируемых сигнальных молекул. ОАФ показывают «активированный» фенотип, напоминающий профиль клеток, активно участвующих в заживлении ран.

Кроме того, классификация ОАФ может пересекаться с миофибробластами, которые в избытке представлены в строме многих опухолей, а также в районах активного воспаления [155]. Хотя полное молекулярное типирование гетерогенной популяции ОАФ остается предметом дискуссий, показана их роль в опухолевой прогрессии [173]. Активность ОАФ хорошо изучена при активации ЭМП в клетках опухоли (Рис. 2, А).

Интересно, что ОАФ, выделенные из злокачественной опухоли простаты, при культивировании совместно с линией нетрансформированных эпителиальных клеток гиперплазии предстательной железы ВРН-1, образуют опухоли при трансплантации бестимусным мышам, а фибробласты, выделенные из соответствующей неопухолевой ткани предстательной железы, не образуют [126]. Некоторые из таких гиперплазированных клеток показывают пониженную экспрессию Е-кадгерина и повышенную экспрессию виментина, что указывает на индукцию в них ЭМП [127]. Было показано, что ОАФ, выделенные из опухолевой ткани предстательной железы человека при совместном культивировании с опухолевыми клетками предстательной железы человека РС-3 индуцируют в последних ЭМП, и важную роль играет секреция матричных металлопротеиназ (ММП) [131]. Кроме того, кондиционированная культуральная среда от ОАФ, выделенных из инвазивных опухолей молочной железы индуцирует ЭМП-подобные изменения в нескольких опухолевых линиях клеток молочной железы человека.



**Рис. 2.** Влияние микроокружения опухоли на эпителиально-мезенхимальный переход. **А.** ОАФ секретируют цитокины и факторы роста, которые достигают клеток опухоли на периферии и стимулируют в них ЭМП. **Б.** Растворимые и клеточные медиаторы воспаления в микроокружении опухоли могут воздействовать на клетки опухоли и активировать в них ЭМП. **В.** Гипоксия глубоко лежащих слоев клеток в опухоли ведет к активации фактора гипоксии HIF-1, мишенями которого являются гены ZEB1/2, TCF-3 и TWIST1, то есть ЭМП – активирующих генов.

Этот эффект в значительной степени также объясняется молекулярными факторами, секретируемыми в культуральную среду ОАФ, особенно фактором  $TGF\beta$  [174].

### 1.3.3.2 Влияние воспаления на эпителиально-мезенхимальный переход

Уже доказано, что микроокружение опухоли способствует активации ЭМП в клетках опухоли. Наиболее существенным фактором является тканевое воспаление. Воспаление способствует, по крайней мере, двум стадиям патогенеза опухоли: во-первых, очаг хронического воспаления ткани является предпочтительным сайтом для инициации опухоли, и во-вторых, медиаторы воспаления способствуют трансформации клеток в клетки с высокой

степенью злокачественности, а также стимулируют ЭМП (Рис. 2, Б). Действительно, в микроокружении злокачественных опухолей присутствуют клетки иммунной системы, связанные с воспалением и растворимые медиаторы воспаления, такие как цитокины и хемокины. Было показано, что белки, зависящие от онкогена RAS, индуцируют продукцию провоспалительных цитокинов и хемокинов, таких как IL-8 и CXCL1 в опухолевых клетках [175]. Возникающее в результате этого RAS-индуцируемое воспалительное микроокружение опухоли способствует прогрессированию болезни, в том числе активации ЭМП [176].

Вклад специфических цитокинов, высвобождаемых опухолевыми воспалительными клетками в активацию процесса ЭМП на сегодня подтвержден *in vitro*. Обработка клеток TNF $\alpha$  приводит к NF- $\kappa$ B-зависимой стабилизации неустойчивого белка Snail в опухолевых линиях человека, тем самым активируя ЭМП, что, в свою очередь, увеличивает инвазивность этих опухолевых клеток и их распространение в отдаленные сайты при трансплантации животным [177]. Также было продемонстрировано, что и другие провоспалительные цитокины, в том числе IL-1 и IL-6, активируют ЭМП в клетках опухоли [178]. Эти данные обеспечивают механистическую связь между воспалением ткани, гетеротипической передачей сигналов и активацией ЭМП в клетках опухоли.

Клеточные компоненты воспаления, такие как макрофаги, нейтрофилы и супрессорные клетки миелоидного происхождения (СКМП) также влияют на опухолевую прогрессию. Эксперименты на мышах, лишенных макрофагального цитокина Csf1 и, следовательно, не имеющих функциональных макрофагов, показали, что эти клетки необязательны для инициации и последующего роста первичной опухоли молочной железы, вызванной вирусом молочной железы мыши (MMTV), но имеют решающее значение для формирования метастазов в легких [179].

Анализ механизмов, лежащих в основе прогрессирования опухоли показал, что опухоль-ассоциированные макрофаги (ОАМ) могут способствовать активации ЭМП в клетках опухоли. Позже, ОАМ были разделены на два подтипа – M1 и M2. ОАМ типа M1 и M2 происходят из периферических моноцитов, инфильтрующей опухоль, однако M2 ОАМ всегда способствуют ангиогенезу в опухоли, ослаблению связи с матриксом и мобильности опухолевых клеток. У мышей с дефицитом макрофагов, несущих аллогенные клетки F9 тератокарциномы, наблюдается только эпителиальная дифференцировка опухолевых клеток, что указывает на критическую роль макрофагов в индукции и поддержании мезенхимального фенотипа опухолевых клеток, поскольку индукция и поддержание мезенхимального фенотипа частично обусловлена секрецией TGF $\beta$  макрофагами [180]. Более того, активированные макрофаги индуцируют ЭМП в опухолевых клетках MCF-7 молочной железы человека во время совместного культивирования *in vitro* или при совместной

имплантации мышам с образованием опухолей *in vivo* [181]. Основной эффекторной молекулой является секретируемый макрофагами хемокин CCL18. Гиперэкспрессия CCL18 M2 ОАМ показана при злокачественных опухолях молочной железы, яичников и глиомах [182]. В работе Ши с коллегами также показано, что секретируемый ОАМ CCL18 стимулирует метастазирование при плоскоклеточном раке головы и шеи, индуцируя ЭМП опухолевых клеток в первичном узле [183].

Кроме того, была показана роль нейтрофилов и супрессорных клеток миелоидного происхождения в образовании, росте и прогрессировании различных типов опухолей [184]. Стимуляцию роста опухоли можно объяснить, в частности, способностью нейтрофилов активировать ЭМП в соседних опухолевых клетках [185]. Таким образом, различные типы иммунных клеток и секретируемые ими белки, присутствующие в воспалительном микроокружении опухоли, способствуют скоординированной активации ЭМП в клетках опухоли.

### *1.3.3.3 Эпителиально-мезенхимальный переход в условиях гипоксии*

Состояние гипоксии в плохо васкуляризованных областях опухолей также может способствовать активации ЭМП (Рис. 2, В). Прямая связь между транскрипционным фактором HIF-1, центральным регулятором транскрипции клеточного ответа на гипоксию и ЭМП в клетках опухоли была продемонстрирована на примере клеток опухоли почки RCC, заболевания, при котором происходит потеря функции белка-супрессора Гиппеля-Линдау (VHL), что приводит к конститутивной активации HIF-1. HIF-1 репрессирует экспрессию E-кадгерина, индуцируя транскрипцию ZEB1, ZEB2 и Tcf3, тем самым придавая мезенхимальные свойства клеткам опухоли [186]. Следует отметить, что также была показана прямая активация промотора гена *Twist1* фактором HIF-1 $\alpha$  [187]. Следовательно, компоненты микроокружения опухоли и физиологические условия способствуют активации ЭМП в опухолевых клетках различными способами. Это многообразие факторов создает серьезную проблему для разработки терапевтических стратегий, направленных на мезенхимальные опухолевые клетки.

### **1.3.4 Опухолевые стволовые клетки и эпителиально-мезенхимальный переход**

#### *1.3.4.1 Опухолевые стволовые клетки*

Опухолевые стволовые клетки и циркулирующие опухолевые клетки оказывают большое влияние не только на фенотип опухоли, но и являются прогностическими факторами, влияющими на выбор терапевтических и хирургических подходов к лечению.

Роль ОСК в развитии, поддержании и метастазировании опухоли подтверждены на примере опухолей молочной железы, толстой кишки, простаты, поджелудочной железы и лейкозов [123]. ОСК участвуют в процессах туморогенеза, метастазирования и развития устойчивости к лекарственным препаратам.

При развитии метастазов из первоначальной опухоли клетки должны успешно пройти ЭМП, отделиться от массы первичной опухоли, преодолеть внеклеточный матрикс, распространиться по кровеносному руслу в отдаленные органы, где далее реализовать МЭП, и в конечном итоге образовать микрометастазы [188]. Даже частичный ЭМП в опухолевых клетках проявляет инвазивный фенотип, дающий начало метастатическим опухолевым клеткам [189].

Стволовые клетки определяют по их способности проходить неограниченное число делений, сохраняя при этом как свою стволовость, так и способность дифференцироваться в специализированные клетки с ограниченной пролиферативной способностью. Стволовые клетки представляют собой популяцию клеток, которые поддерживают гомеостаз тканей, а также регенерацию нормальных и поврежденных тканей [190]. ОСК определяют как популяцию опухолевых клеток, приводящую к развитию и метастазированию опухоли. Существование и функциональная значимость ОСК как отдельной популяции была впервые показана при лейкозе и множественной миеломе. Клетки острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) не способны пролиферировать за исключением небольшой популяции клеток. Дик и его коллеги впервые определили ОСК в образцах пациентов при ОМЛ как клетки с фенотипом  $CD34^+CD38^-$ , которые представляли лишь небольшую часть клеток ОМЛ, способных воспроизводимо вызывать ОМЛ при трансплантации клеток пациентам линии NOD/SCID [191]. Эти данные убедительно показали, что небольшое подмножество клеток ОМЛ способно к самообновлению и инициирует опухолевую прогрессию [192]. В 2003 году Аль-Хадж и др. анализировали образцы клеток первичной ЗОМЖ и определили, что клетки с фенотипом  $CD44^+CD24^{dim/-}$  являются функциональными ОСК [193]. Впоследствии, клетки с опухоль-иницирующими свойствами были обнаружены в других злокачественных солидных новообразованиях, например, глиобластоме, опухолях предстательной и поджелудочной желез [88]. Эльбасатини и коллеги показали, что экспрессия CD44 снижается при прогрессировании и приобретении инвазивных свойств злокачественных опухолей эндометрия [194]. Войцеховский и коллеги предположили, что уровень экспрессии CD44 может значительно различаться при эндометриоидном и папиллярно-серозном типах опухолей, что может влиять на прогрессию опухоли [195]. Ким и коллеги показали корреляцию между экспрессией CD24 и гормональным статусом у пациентов с ЗОЭ. Повышенный уровень экспрессии CD24 наблюдался в гормон-



независимых и высокодифференцированных образцах опухолей и предполагается, что CD24 может выступать как маркер дифференцировки опухоли в отличие от ER/PR, которые характеризуют пролиферацию [196].

Важно отметить, что ОСК не обязательно происходят из плюрипотентных стволовых клеток, а скорее ОСК приобретают некоторые черты стволовых клеток, что позволяет им неограниченно делиться и дифференцироваться. На функциональные характеристики ОСК влияет микроокружение опухоли, увеличивая или снижая агрессивность, метастатическую активность и резистентность к лекарственным агентам [197]. Как правило, ОСК имеют высокую устойчивость к химио- и радиотерапии, что делает их вероятной причиной рецидивов опухоли после лечения [196].

ОСК экспрессируют поверхностные молекулы – маркеры дифференцировки (CD), что позволяет выделить их из общего пула клеток опухоли. Среди наиболее часто используемых маркеров ОСК - CD44, CD24, CD133, CD166 и ALDH1. ABC-транспортеры (ABCG2, ABCB5), EpCAM, CXCR4, Nestin и LRCs также могут быть использованы для идентификации ОСК [198] (Таблица 4).

**Таблица 4.** Биомаркеры, используемые для обнаружения опухолевых стволовых клеток в опухолях различного гистогенеза

<b>Опухоль</b>	<b>Маркер ОСК</b>
Опухоль молочной железы	CD44, CD24, CD326, CD325, CD133, ANTXR1, ALDH1, CD184, CD146
Опухоль поджелудочной железы	CD133, CD44, CD24, CD184, c-Met, ALDH1, CDw338
Колоректальная опухоль	CD133, CD44, CD44v6, CD184, CD26
Опухоль желудка	CD44
Глиобластома	CD133, MMP-13, CD15
Опухоль легкого	CD184, CDw338, CD133, ALDH1
Остеосаркома	CD133, Oct-4
Опухоли головы и шеи	c-Met

CD44 - поверхностный гликопротеин, являющийся рецептором гиалуроновой кислоты; CD24 – гликопротеин, участвующий во внутриклеточной сигнализации; CD326 - трансмембранный гликопротеин EpCAM, молекула клеточной адгезии; CD146 - гликопротеин клеточной поверхности, молекула клеточной адгезии меланомы Mel-CAM; CD325 - гликопротеин N-

кадгерин; CD133 - гликопротеин промиллин-1; CD26 - дипептидилпептидаза-4, мембранный фермент, гидролизующий пептидную связь с N-конца пролина; ANTXR1 – белок, специфичный для опухоли эндотелиального происхождения; ALDH1 - фермент альдегиддегидрогеназа 1-го типа; CD184 - хемокиновый рецептор типа 4 (CXCR4); c-Met - рецептор тирозинкиназы; CDw338 - ABCG2 - мембранный белок, АТФ-связывающий транспортер; MMP-13 - матриксная металлопротеиназа 13; CD15 - углеводная молекула адгезии SSEA1; Oct-4 - маркер недифференцированных клеток.

В ретроспективном анализе подгруппа пациентов с карциномами молочной железы, гиперэкспрессирующими как ЕрСAМ, так и HER2/neu, имела худший прогноз [199]. Некоторое время назад препарат антитела анти-ЕрСAМ (Catumaxomab) получил одобрение Европейской комиссии для лечения пациентов с положительными ЕрСAМ-экспрессирующими опухолями [200]. Последствия гиперэкспрессии и взаимодействия ЕрСAМ с сигнальными молекулами могут сильно зависеть от типа, стадии и микроокружения опухоли. Это предположение подтверждается клиническими наблюдениями о том, что прогностическое значение экспрессии ЕрСAМ зависит от типа опухоли, стадии заболевания и противоопухолевого иммунитета хозяина [201]. Противоречивые результаты исследований на клеточных линиях подтверждают мнение, что экспрессия ЕрСAМ может модулировать клеточную пролиферацию, дифференцировку и миграцию, но результат модуляции сильно зависит от типа и происхождения клеток [202].

Экспрессия Mel-CAM подавляет экспрессию рецепторов ER в клетках опухолей молочной железы, способствуя резистентности к гормональной терапии [203]. Так пациенты, получавшие адъювантно тамоксифен, имели меньший период общей безрецидивной и отдаленной выживаемости без метастазов, когда в первичных опухолях экспрессия Mel-CAM была увеличена [203].

Многочисленные исследования свидетельствуют, что небольшая популяция ЦОК также имеют характеристики ОСК, благодаря их способности образовывать опухоли в отдаленных участках организма [204]. ЦОК представляют собой ОСК [205] со специфическими особенностями, позволяющими им выживать в кровотоке и давать начало метастазам. В моделях ксенографта клетки из образцов крови пациентов с высоким процентом содержания ЦОК были способны образовывать опухоль *in vivo* [206].

О происхождении ЦОК выдвигают две гипотезы. Во-первых, ЦОК существуют в первичной опухоли как ОСК с дополнительными возможностями, что делает их способными к выходу из первичной опухоли в поток крови, и, далее, способными к имплантации в отдаленных сайтах - сайтах метастазов [123]. Во-вторых, ЦОК могут возникать из

диссеминированных опухолевых клеток, например, из клеток в состоянии покоя в отдаленном месте после того, как они уже вышли из первичной опухоли [207]. Важно отметить, что такие мигрирующие опухолевые клетки, “прородители” ЦОК, должны выжить в агрессивной среде потока крови, уклониться от иммунного ответа и прикрепиться в отдаленном месте [196].

Как правило, ОСК обладают функциональной пластичностью перехода ЭМП→МЭП и, скорее всего, именно они участвуют в метастазировании в отдаленных сайтах [208]. Образование метастазов связано с МЭП, с помощью которого клетки вновь обретают свои эпителиальные характеристики.

#### *1.3.4.2 Взаимосвязь опухолевых стволовых клеток и эпителиально-мезенхимального перехода*

Инвазивные способности ОСК реализуются через ЭМП, что приводит к потере эпителиальных и приобретению мезенхимальных признаков с потерей адгезии [209]. Мани и др. в 2008 году впервые продемонстрировали, что реализации ЭМП в опухолевых клетках было достаточно для появления популяции клеток с характеристиками стволовых клеток, способных к миграции [210]. По определению истинно стволовые клетки не могут привести к опухоли *in vivo* [197]. Тем не менее, все больше исследований, в том числе эксперименты по отслеживанию ОСК *in vivo* показывают, что истинно стволовые клетки действительно способны пополнять пул ОСК через ЭМП и, следовательно, способствовать метастазированию. Автономные стимулы инициирования или подавления ЭМП хорошо описаны, а экзогенные триггеры, которые контролируют баланс между ЭМП и МЭП во время метастазирования [211] требуют исследования.

Хакомори и др. впервые сообщили о роли фукозилирования в развитии рака в 1979 году на примере гепатомы и нормальных гепатоцитов [212]. Инвазивные и метастатические свойства опухолевых клеток были связаны с увеличением уровня фукозилирования [213]. Кроме того, было обнаружено, что ингибирование фукозилирования влияет на связывание E-селектина и экстравазацию клеток [214] и имеет решающее значение для метастатического процесса [215]. Таким образом, фукозилирование может быть рассмотрено как механизм, реализуемый в ОСК при изучении инвазивных и метастатических особенностей.

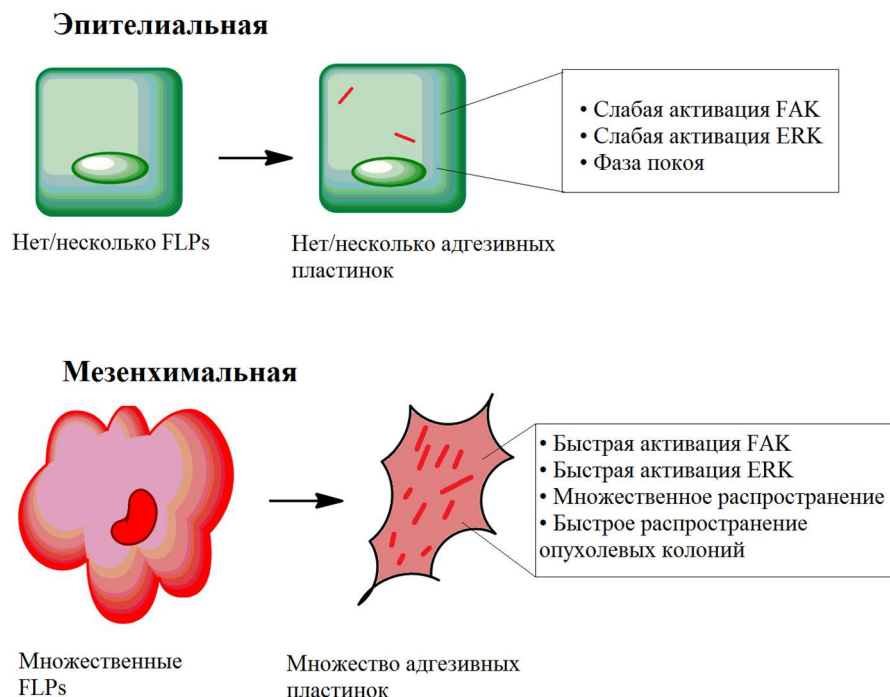
#### *1.3.4.3 Взаимосвязь опухолевых стволовых клеток с процессом метастазирования и МЭП*

Сибу и его коллеги исследовали молекулярные взаимодействия опухолевых клеток, проникающих в паренхиму легких по динамике белков внеклеточной матрикса (БВМ). Было обнаружено, что ОСК с высоким потенциалом метастазирования способны формировать

выступы, которые развиваются в зрелые адгезионные бляшки - высокомолекулярные структуры, состоящие из сгруппированных интегринов с большей эффективностью, чем клетки с низким уровнем метастазирования и без маркеров ОСК [216]. Эти выступы, которые назвали «филоподиями» (FLPs) и последующее развитие удлиненных зрелых адгезивных бляшек, способствуют быстрой пролиферации клеток с метастатическими свойствами и являются предпосылками для образования макроскопических метастазов в легких этими клетками с активацией киназы фокальных контактов (ФАК) [217].

FLPs обильно образуются только в клетках с активированным ЭМП через сигнальные пути Rif/mDia2 (механизм нуклеации/полимеризации) и ILK/ $\beta$ -парвин/кофилин. Сигнальный путь ILK/ $\beta$ -парвин/кофилин представляет собой интегриновую киназу и  $\beta$ -парвин - два интегрин, которые образуют мостик между актином, блокируют опосредованный кофилином разрыв актиновых филаментов, что позволяет им взаимодействовать с окружающим внеклеточным матриксом [217]. Интересно, что в разных типах опухолей, экспериментальная активация ЭМП сопровождается увеличением образования филоподий. Это позволяет таким клеткам пролиферировать, затем снова выходить в кровеносное русло и образовывать метастаз в отдаленном участке (Рис. 3). Большинство клеток опухоли плохо адаптированы к росту в других тканях, по крайней мере, на начальном этапе, и должны быть активированы адаптивные программы для того, чтобы дать начало метастазу в отдаленном участке. Активация адаптивных программ начинается с активации МЭП. Действительно, быстрорастущие метастатические колонии, как правило, состоят из клеток опухоли, которые восстановили свой эпителиальный фенотип [218].

В отличие от преобладающего мнения о том, что ЭМП способствует метастазированию опухоли, существуют и доказательства обратного. В одном из таких исследований отслеживали опухолевые клетки, которые экспрессировали маркеры ЭМП: белок S100A4, также известный как фибробластоспецифический белок 1 и виментин. Было показано, что в мышинной модели опухоли метастазы в легких формируются преимущественно клетками, которые изначально не экспрессировали эти маркеры [219]. В другом исследовании, на модели аденокарциномы протоков поджелудочной железы мыши с нокаутом генов Snail1 или Twist1 не происходило снижения уровня метастазов по сравнению с мышами дикого типа [220].

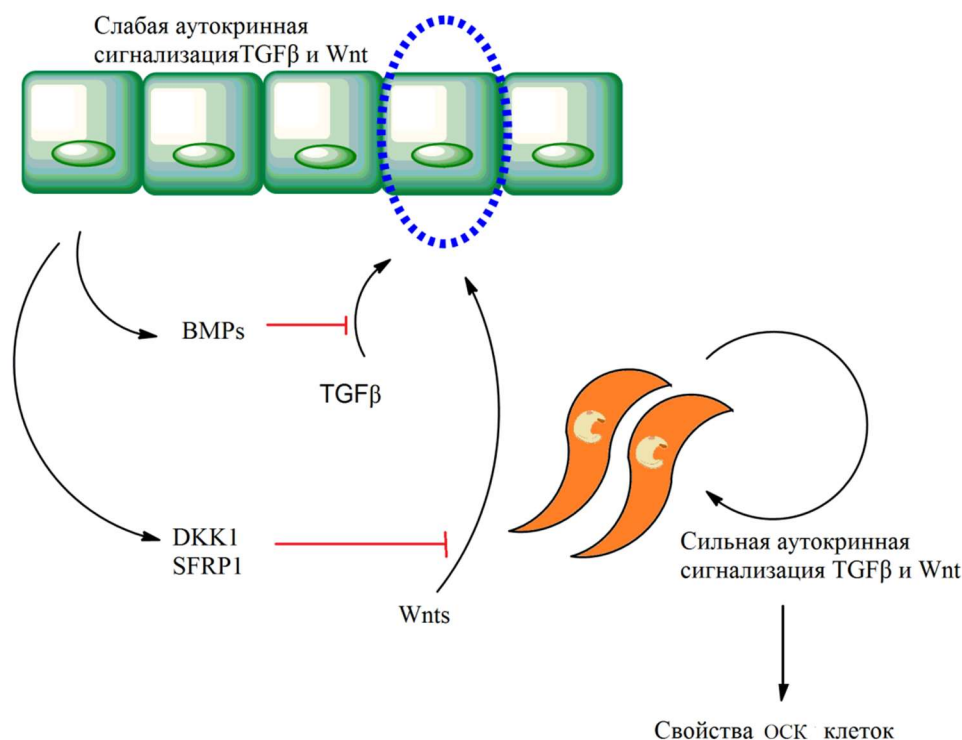


**Рис. 3.** ОСК обеспечивают изменения межклеточных взаимодействий, ведущих к формированию опухоли. ЭМП стимулирует развитие филоподий, которые запускают сигнальные каскады, важные для пролиферации опухолевых клеток, вовлекая киназу фокальных контактов (FAK) и киназу внеклеточного сигнала (ERK).

Возможно, эффекты от генетического ингибирования одних факторов – активаторов ЭМП, могут компенсироваться снижением факторов-ингибиторов ЭМП.

#### *1.3.4.4 Молекулярные механизмы, лежащие в основе взаимосвязи эпителиально-мезенхимального перехода и опухолевых стволовых клеток*

Изменения в спектре секретируемых клетками опухоли белков (секретомов), обусловленные активацией ЭМП, позволили установить аутокринные сигнальные петли, которые в свою очередь имеют важное значение для индукции и поддержания свойств стволовых клеток. Результаты исследования секретомов трансформированных эпителиальных клеток молочной железы человека выявили аутокринные сигнальные петли для этого типа злокачественных опухолей. Один из таких каскадов способствует приобретению признаков «стволовости» у неопухолевых и опухолевых клеток через TGF $\beta$ –SMAD и Wnt– $\beta$ -catenin пути [221] (Рис. 4). Блокада этих аутокринных сигнальных петель предотвращает приобретение свойств ОСК опухолевыми клетками молочной железы HMLER после экзогенной стимуляции.



**Рис. 4.** Аутокринный путь поддержания фенотипа ОСК. Активация ЭМП приводит к образованию аутокринных сигнальных петель, включая трансформирующий фактор роста  $\beta$  ( $TGF\beta$ ) и канонические и/или неканонические пути Wnt. Эти пути регулируют ОСК с активным ЭМП. BMP – белки костного мозга; DKK1 - белок 1, связанный с ингибитором сигнального пути; SFRP1- секретируемый белок 1, связанный с рецепторами, сопряженными с G-белками.

Фактор Snail снижает экспрессию мРНК гена опухолевой супрессии p53 в клетках ЗОМЖ посредством формирования тройного комплекса Snail/гистондеацетилаза 1/p53 с последующим деацетилированием p53 и его быстрой деградацией в протеасомах [222]. Важно отметить, что опухоль-иницирующая способность опухолевых клеток в мышинной модели уменьшается при делеции Snail, но может быть восстановлена посредством сопутствующей делеции гена TP53 [222]. Таким образом, процесс ЭМП активирует фенотип ОСК как через внеклеточные, так и через внутриклеточные сигнальные пути.

При ЗОМЖ, ОСК присутствуют в двух альтернативных фенотипических состояниях, а именно эпителиоподобных и мезенхимальных, любые из которых способны давать начало формированию метастаза [208]. Кроме того, чрезмерная активация ЭМП неблагоприятна для инициации опухоли. Это объясняет, почему все большее внимание уделяют состоянию «частичного» ЭМП, который, как представляется, критичен для реализации онкогенных

свойств ОСК [223]. Так, при ЗОМЖ с низким уровнем белка клаудина большинство клеток опухоли обладают мезенхимальным фенотипом, но существующая в них субпопуляция клеток с эпителиальными характеристиками обладает большой опухоль-инициирующей активностью [224]. Это указывает на то, что вклад процесса ЭМП в фенотип ОСК является разнонаправленным в зависимости от типа клеток и/или генетических/эпигенетических нарушений.

#### *1.3.4.5 Лекарственная устойчивость и эпителиально-мезенхимальный переход*

После постулирования концепции ОСК некоторые исследователи предположили, что ОСК более устойчивы, чем остальные опухолевые клетки в пределах одних и тех же опухолей к традиционной химио- и лучевой терапии [193]. Эта идея возникла благодаря наблюдениям, показывающим, что клетки из нетрансформированных тканей более устойчивы к химиотерапевтическим агентам, чем дифференцированные клетки в пределах одной и той же ткани [225]. Такая резистентность обусловлена многими факторами, в том числе повышением экспрессии антиапоптотических белков и увеличением уровня АВС-транспортеров, которые опосредуют транспорт лекарственного средства из клетки, снижая его концентрацию внутри и таким образом, увеличивают устойчивость опухолевых клеток ко многим лекарственным препаратам [226]. Анализ относительной чувствительности ОСК к терапевтическим агентам показал, что при химио- и/или лучевой терапии выживает только небольшая популяция ОСК, и это воспроизводится для различных типов онкологических заболеваний [227; 228].

Тем не менее, более глубокое понимание механизмов терапевтической резистентности ОСК было затруднено отсутствием надежных маркеров для идентификации ОСК. В настоящее время панель маркеров, используемых для идентификации популяции опухолевых клеток, постоянно обновляется. Идентификация клеток в состоянии ЭМП как общего регулятора фенотипа ОСК в различных типах опухолей позволяет изучить молекулярную взаимосвязь между ОСК и терапевтической резистентностью (Таблица 5). Мета-анализ профиля экспрессии генов образцов опухолей пациентов и клинического ответа у этих пациентов, прошедших курс химиотерапии, обнаружил сильную корреляцию между ЭМП-ассоциированной экспрессией генов и резистентностью к лечению. Так, например, ответы на химиотерапию в большой группе пациентов с ЗОМЖ выявили тесную связь между терапевтической резистентностью и повышением экспрессии генов-регуляторов транскрипции пути Wnt и TGF $\beta$ , которые, как правило, выражают фенотип мезенхимальных клеток с активированным ЭМП в опухоли [229]. Кроме того, результаты исследования взаимосвязи профиля экспрессии генов и ответа на ингибиторы EGFR или PI3K в клинических образцах

и в различных клеточных линиях, полученных от пациентов с опухолями немелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC), также выявили 76 генов, связанных с процессом ЭМП, что может быть маркером клинической резистентности к этим агентам [230].

**Таблица 5.** Терапевтическая резистентность, обусловленная эпителиально-мезенхимным переходом

Терапевтический агент	Наблюдаемые эффекты	Ссылка
<i>Ингибирование апоптоза</i>		
Цисплатин	Slug блокирует p53-зависимую транскрипцию PUMA (белок BBC3, кодирующий компонент 3, связывающий антиапоптотический белок Bcl-2), взаимно действуя с промотором PUMA; Линии клеток аденокарциномы легкого развивают резистентность к цисплатину по этому механизму.	[231]
Фактор некроза опухоли (TNF $\alpha$ ) и $\gamma$ -облучение	Snail придает устойчивость ко многим стимулам, индуцирующим апоптоз, частично способствуя активации киназы АКТ, увеличивая экспрессию антиапоптотического белка Bcl-XL и предотвращая переход к следующей стадии клеточного цикла.	[232]
TRAIL (ФНО - зависимый апоптоз-индуцирующий лиганд)	Активация ЭМП отменяет E-кадгерин зависимую сборку рецепторов DR4 и DR5 для TRAIL, делая опухоли нечувствительными к TRAIL-индуцированному апоптозу.	[233]
<i>Усиление активного транспорта лекарственного средства из клеток</i>		
Доксорубицин	ЭМП индуцирует экспрессию белков членов семейства ABC-транспортеров, усиливая активный транспорт из клетки, делая эти клетки устойчивыми к доксорубицину.	[234]
<i>Защита от таргетных агентов</i>		



ингибитор EGFR; ингибитор PI3K	Активация ЭМП и последующая экспрессия рецептора AXL отменяет чувствительность к ингибиторам EGFR и PI3K в клетках немелкоклеточной карциномы легкого.	[230; 235]
<i>Развитие резистентности к иммунотерапии</i>		
Иммунотерапия дендритными клетками (DC), несущими опухолевый антиген	Экспрессия Snail в клетках меланомы необходима для развития устойчивости к терапии DC и CTL - зависимой иммунотерапии по пути усиления экспрессии тромбоспондина-1 и последующей индукции иммуносупрессорных регуляторных Т-клеток в опухолевой ткани.	[236]
Ингибиторы контрольных иммунных точек	ZEB1 - опосредованная активация ЭМП в клетках НМРЛ ослабляет репрессию лиганда PD-L1 (лиганд программируемой клеточной гибели) молекулой miR200 в CD8 <sup>+</sup> цитотоксических лимфоцитах. Этот эффект сенсibiliзирует эти клетки к иммунопрепаратам, нацеленным на PD-1/PD-L1 взаимодействия, придавая им потенциальную устойчивость к другим стратегиям иммунотерапии через блокаду другого белка иммунной контрольной точки - CTLA-4.	[237]

#### *1.3.4.6 Таргетные препараты, направленные на ключевые медиаторы эпителиально-мезенхимального перехода*

Три стратегически различных противоопухолевых ЭМП-зависимых подходов могут быть реализованы: предотвращение индукции ЭМП, таргетная терапия клеток с активированным процессом ЭМП и воздействие на мезенхимальные клетки опухоли через активацию МЭП для возвращения к эпителиальному фенотипу.

##### *1.3.4.6.1 Таргетные подходы предотвращения эпителиально-мезенхимального перехода*

Предотвратить ЭМП можно на этапе передачи сигналов активации и элонгации ЭМП. Потенциально мишенью может быть молекула TGFβ. В частности, TGFβ способствует опухолевой прогрессии через активацию процесса ЭМП с последующей инвазией

опухолевых клеток в окружающую неопухолевую ткань и через негативную регуляцию антипролиферативных эффектов на начальных этапах формирования опухоли [238]. TGF $\beta$ , участвующий в индукции ЭМП, обладает широким спектром воздействия, поэтому его терапевтическое ингибирование может иметь побочные эффекты. Ингибирование TGF $\beta$  фактически может стимулировать пролиферацию клеток опухоли на ранних стадиях заболевания. Кроме того, TGF $\beta$  участвует в регуляции состояния мезенхимальных и иммунных клеток, что затрудняет его использование как мишени ЭМП в опухолевых клетках. Тем не менее, ингибиторы, направленные на TGF $\beta$ , в настоящее время проходят доклинические и клинические испытания [239; 240].

К другим потенциальным терапевтическим мишеням репрессии активации ЭМП относят фактор роста гепатоцитов (HGF) и его рецептор - HGF (HGFR; протоонкоген c-Met, рецептор тирозинкиназы). Помимо стимуляции пролиферации клеток, взаимодействие фактора HGF с рецептором HGFR также активизирует процесс ЭМП и стимулирует подвижность клеток [241]. Этот путь усиливает патогенез опухоли, о чем свидетельствует его избыточная активация при разных онкологических заболеваниях и наличие множественных точечных мутаций в гене HGFR (c-Met) во многих типах опухолей. Таким образом, HGFR, является перспективной мишенью противоопухолевой терапии, и первые антагонисты уже проходят испытания. В частности, набор низкомолекулярных ингибиторов тирозинкиназного домена HGFR были протестированы в клинических испытаниях. Следует отметить, что два ингибитора с широкой активностью в отношении белка HGFR уже одобрены FDA: кризотиниб, для лечения НМРЛ и кабозантиниб для лечения медуллярного рака щитовидной железы [242].

В принципе, блокада ЭМП также может быть достигнута через компоненты микроокружения опухоли, которые способствуют активации процесса ЭМП в клетках опухоли. Стратегии включают в себя подавление опухоль-ассоциированного воспаления и гипоксии, а также нацеливание на ОАФ или ОАМ [243].

#### *1.3.4.6.2 Таргетная опухолей с активированным процессом ЭМП*

Были предприняты попытки селективного воздействия на опухолевые клетки, которые подверглись ЭМП, начиная с попыток терапевтической блокады классических ЭМП - ассоциированных маркеров. Так, например, природная молекула висаферин А (Withaferin А) связывается с виментиновыми филаментами, стандартными компонентами ЭМП, что в конечном счете, приводит к дезградации этих феламентов [244]. Применение висаферина А блокировало инвазивные свойства опухолевых клеток *in vitro* и образование метастазов *in vivo* на модели клеток ЗОМЖ [245]. В другой работе лечение моноклональными антителами

к эктодомену N-кадгерина также блокировало инвазивные свойства опухолевых клеток простаты [246]. Терапевтический индекс обоих агентов еще должен быть оценен *in vivo*, так как их мишени - мезенхимальные маркеры также широко распространены в неопухолевых мезенхимальных клетках.

Определение сигнальных путей, которые способствуют проявлению свойств, стимулирующих опухолевую прогрессию в клетках, претерпевших ЭМП еще один потенциальный подход к противоопухолевой терапии. Было показано, что рецептор тирозинкиназы AXL, который активируется лигандом Gas6 как сигнальный белок, функционально связан с реализацией ЭМП [230]. Показано, что экспрессия AXL индуцируется при активации ЭМП в иммортализованной линии эпителиальных клеток молочной железы - MCF10A [247]. Кроме того, в этом исследовании была обнаружена корреляция между ЭМП - ассоциированной экспрессией генов и наблюдаемой устойчивостью к ингибиторам EGFR или PI3K в клетках НМРЛ. Экспрессия ЭМП - ассоциированных генов сопровождалась повышенной экспрессией AXL и его лиганда Gas6. Интересно, что лечение комбинацией препаратов ингибитора EGFR эрлотиниба и ингибитора AXL SGI-7079 восстанавливало чувствительность у мезенхимальноподобных клеток НМРЛ при лечении в моделях ксенотрансплантата у мышей [248]. Таким образом, AXL - важный медиатор ЭМП-ассоциированных фенотипов в опухолевых клетках, в том числе с ОСК-подобными свойствами. Это позволяет рассматривать его как потенциальную терапевтическую мишень для селективного воздействия на ОСК с активным процессом ЭМП. Первый малый ингибитор AXL-BGB324, прошел клинические испытания в 2013 [249]. Пилотные клинические испытания на пациентах с диагнозом НМРЛ показали, что BGB324 безопасен для пациентов и стабилизирует заболевание в течение 6ти месяцев и более [248].

#### *1.3.4.6.3 Обращение эпителиально-мезенхимального перехода через МЭП*

С терапевтической точки зрения, реверсия клеток, прошедших ЭМП, происходит через МЭП, делая этот этап важным в лечении онкобольных. При активации МЭП ОСК с активным процессом ЭМП будут дифференцироваться в не ОСК, а восстанавливать эпителиальные свойства, тем самым терять и повышенную онкогенную активность, и устойчивость к различным терапевтическим агентам. Эта стратегия напоминает дифференциальную терапию, используемую у больных с острым промиелоцитарным лейкозом (APL), когда обработка третиноином (АТРА) индуцирует терминальную дифференцировку лейкозных промиелоцитов, и в конечном итоге, приводит к их апоптотической гибели. АТРА является компонентом первой линии лечения APL и его использование значительно улучшает прогноз пациентов с этим заболеванием [250].

В 2016 году, в ходе скрининга реактиваторов промотора гена Е-кадгерина (CDH1) в мезенхимальных клетках идентифицировали два агента: холерный токсин и форсколин, которые увеличивали внутриклеточный уровень цАМФ и последующую активацию протеинкиназы А, активируя МЭП в мезенхимальных клетках молочной железы человека [251]. Лечение пациентов со спонтанно возникающими мезенхимальными клетками из HMLE (иммortalизованные и/или трансформированные человеческие эпителиальные клетки молочной железы человека) любыми из этих двух агентов приводит к индукции МЭП и уменьшению инвазивных свойств [251]. Интересно, что МЭП сопровождается сенсбилизацией этих клеток к терапевтическим агентам, таким как доксорубин, паклитаксел, ингибиторам протеасом и ингибиторам EGFR. Поэтому дополнительные исследования необходимы для оценки переносимости и клинической эффективности этих веществ. Учитывая, что реверсия к эпителиальному фенотипу через МЭП реализуется на последнем этапе метастатического каскада, активация МЭП может способствовать образованию колоний метастатических клеток. Таким образом, стратегия временной активации МЭП должна быть под контролем, для успеха терапевтического подхода. Тем не менее терапия, направленная на МЭП, является привлекательным подходом для разработки новых противоопухолевых препаратов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эволюция методов культивирования клеток из ткани эукариот позволяет создавать новые клеточные модели различных заболеваний. В зависимости от решаемых задач, способы дезагрегации ткани пациентов для перевода в культуру отличаются по эффективности получения жизнеспособных популяций клеток. Несмотря на то, что разрабатываются новые модели культивирования, такие как 3D культуры, экспланты и другие, 2D культуры остаются наиболее востребованными моделями молекулярных биологов. Культивирование клеток в формате 3D-культур предполагает предварительную стадию получения 2D культуры, из которой в дальнейшем могут быть сформированы сфероиды или культуры, растущие в 3D-матриксах, что подчеркивает важность создания 2D культур. Использование эксплантов опухолей пациентов для формирования опухолей в иммунодефицитных животных также имеет свои недостатки: например, выращивание экспланта в мышцах занимает до 3х месяцев, а размеры фрагментов исходных опухолей не всегда позволяют формировать группы животных-опухоленосителей в количестве, необходимом для получения статистически значимых результатов, поэтому исследователи используют ретрансплантацию экспериментальным группам эксплантов после раунда пассирования на животных. Кроме того, и 3D культивирование, и культивирование эксплантов относят к дорогостоящим и технически более сложным методам, требующим высокой квалификации исследователей. Таким образом, востребованность 2D культур остается высокой.

К настоящему времени показано, что онкологические заболевания не инициируются единым общим фактором, а являются следствием суммирования и/или интерференции ряда эффектов или событий, которые по-отдельности не способны вызывать таких фатальных изменений. В свою очередь, гетерогенность природы возникновения злокачественных опухолей ведет к высокой гетерогенности и сложности в интерпретации молекулярных паттернов, характерных для определенных онкологических заболеваний. Поэтому, для развития персонализированной терапии злокачественных опухолей, необходимо развитие комплексных подходов. Персональные культуры клеток опухоли пациента позволяют проводить фундаментальный анализ индивидуальных особенностей проявления канцерогенеза с выявлением новых закономерностей, осуществлять поиск молекулярных маркеров, прогнозирующих чувствительность к лекарственным препаратам и проводить экспериментальный анализ резистентности культур к препаратам.

Возможности проточной цитофлуориметрии и проточной сортировки позволяют выделять и исследовать определенные популяции клеток опухолевой культуры. Одной из наиболее интересных популяций внутри культур опухолевых клеток является популяция

опухолевых стволовых клеток (ОСК) с высоким инвазивным потенциалом и резистентностью к химиотерапевтическим препаратам. Взаимосвязь между химиорезистентностью, подвижностью и инвазией ОСК может быть обусловлена повышенной чувствительностью таких клеток к индукторам эпителиально-мезенхимального перехода. Обратный мезенхимально-эпителиальный переход позволяет воспроизводить эпителиальный фенотип клеткам опухоли в местах отдаленных метастазов. К известным в настоящее время индукторам ЭМП относят факторы роста, сигнальные молекулы клеток микроокружения опухоли и гипоксию, но поиск потенциальных триггеров MET продолжается. Многие исследователи полагают, что свойство опухолевых клеток претерпевать ЭМП для приобретения подвижности и выхода в кровяное русло позволяет рассматривать различные стадии эпителиально-мезенхимального и мезенхимально-эпителиального переходов как ключевые точки для создания новых терапевтических подходов [252].

Новые клеточные модели, позволяющие реализовывать ЭМП и МЭП *in vitro* вносят существенный вклад в представление о молекулярных каскадах, приводящих к метастазированию и инвазии. Уже показано, что при частичной активации ЭМП, эпителиальные клетки опухоли обладают повышенным онкогенным потенциалом, тогда как опухолевые клетки, прошедшие ЭМП и экспрессирующие все мезенхимальные маркеры демонстрируют ослабленный онкогенный потенциал [253]. Нет сомнений, что дальнейшее исследование взаимосвязи между опухолевыми стволовыми клетками, ЭМП и МЭП внесут вклад в разработку эффективных противоопухолевых подходов.

## ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2.1. Материалы

#### 2.1.1 Реактивы и материалы

Реактивы для культивирования клеток эукариот: культуральные среды Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12), HuMEC Basal Serum-Free Medium с добавками HuMEC Supplement Kit, Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) и Leibovitz's L-15 (L-15), (все перечисленные реактивы производителя GIBCO, Life Technologies, Великобритания), эмбриональная бычья сыворотка FBS, коллагеназа I-го и IV-го типов, раствор антибиотиков-антимикотиков (пенициллин, стрептомицина сульфат, амфотерицин) и TrypLE Express Enzyme (все перечисленные реактивы производителя GIBCO, Life Technologies, США), GlutaMAX™ (GIBCO, Invitrogen, Франция), раствор Трипсин-EDTA (GIBCO, Invitrogen, США), DMSO, натрий-фосфатный буфер PBS (Amresco, США), МТО+ Serum Extender (Becton Dickinson, США), ингибитор Rho-киназы (ROCK) (Sigma, США), добавки для культивирования эпителиальных клеток (Cell Biologics, США).

Реактивы для световой микроскопии и иммуноцитохимии: параформальдегид (4%), эозин водно-спиртовой концентрированный, формалин 10% забуференный, парафин для гистологической заливки «HISTOMIX», монтирующая среда для гистологических препаратов Витрогель и гематоксилин Эрлиха (все перечисленные реактивы производителя Био Витрум, Санкт-Петербург), о-ксилол (Вектон, Новосибирск), Prolong™ Gold antifade reagent (Invitrogen, США), глицин (MP Biomedicals, США), Triton X-100 и Tween-20 (Хеликон, Россия), бычий сывороточный альбумин (BSA) (Amresco, США), моноклональные антитела IgG кролика к белку Ki-67, моноклональные антитела IgG мыши к белку виментин, FITC меченые антитела осла к IgG мыши, Alexa Fluor 594 меченые антитела козла к IgG кролика (все перечисленные реактивы производителя Abcam, США), DAPI/Antifade (Millipore, США).

Реактивы для вестерн блота: нитроцеллюлозная мембрана (Bio-Rad, Германия), буфер NuPAGE, буфер iBind Solution Kit (Novex, Life technologies, США), EGFR (Santa Cruz Biotechnology, США), с поликлональными антителами IgG к GAPDH, пероксидазный конъюгат вторичных поликлональных антител кролика к IgG мыши и осла к IgG козы (все перечисленные реактивы производителя R&D Systems, США), хемилюминесцентный субстрат для пероксидазы хрена (Invitrogen, США).

Реактивы для анализа цитотоксического действия: 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолина бромид (МТТ) и диметилсульфоксид (ДМСО) (все перечисленные реактивы производителя Sigma, США); цитостатические препараты: хлорокин (Merck, Германия), метатрексат (Sigma, Великобритания), афинитор (Novartis Pharma Stein AG, Швейцария), доксорубин-лэнс (ОАО «Верофарм», Россия), цисплатин-цева (Pharmachemie B. V., Нидерланды), синдаксел (паклитаксел) (Actavis, Италия), анастразол и экземестан (все перечисленные реактивы Sigma, США), тамоксифен (ОАО «Верофарм», Белгород), ИНФа (ФГУП НПО «Микроген», Россия).

Реактивы для выделения и анализа мРНК: реагент для выделения РНК и ДНК «Лира» (ООО "Биолабмикс", Новосибирск), DEPC-treated water, набор для обработки ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific, США), RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific, Германия), ЭДТА (Gerbu, Германия), Tris (Gerbu, Германия), агароза (Медиген, Новосибирск), бромистый этидий (Хеликон, Россия), реакционная смесь БиоМастер ОТ-ПЦР SYBR Blue (2x), маркер молекулярной массы ДНК «Step 100» и маркер молекулярной массы ДНК «Sky-High» (все перечисленные реактивы производителя ООО "Биолабмикс", Новосибирск), TEMED, акриламид, агароза для электрофореза (Fluka, Швейцария), бромистый этидий (Merck, Германия)

Реактивы для цитометрического анализа: антитела к CD133 (IgG), конъюгированные с APC (BioLegend, США), антитела к CD44 (IgG), конъюгированные с PE и антитела к CD24 (IgG), конъюгированные с FITC (Invitrogen, США), антитела к HER2 (IgG), конъюгированные с FITC, антитела к CD326 (IgG), конъюгированные с FITC, антитела к CD324 (IgG), конъюгированные с PE, антитела к CD325 (IgG), конъюгированные с PE, антитела к (IgG), конъюгированные с APC и антитела к CD146 (IgG), конъюгированные с APC (все антитела производителя Sony Biotechnology Inc., США), ALDEFLUOR™ Kit (Stem Cell™ Technologies, Канада), FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, США), контроль изотипа PE-, FITC- и APC-конъюгированный IgG (BD Biosciences).

Реактивы для работ с животными: матригель BD Matrigel Basement Membrane Matrix (BD Biosciences, США), раствор Рингера (ООО «Гротекс», Россия).

Остальные использованные в работе реактивы спирты и растворители были отечественного производства и имели квалификацию «о.р.ч» и «х.ч.».

### **2.1.2 Буферные растворы**

PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), pH 7.5;

ТАЕ x50: 2 M Трис, 1 M уксусная кислота, 50 mM ЭДТА, pH 8.4;



Блокирующий буфер: 1% BSA, 0.3 М глицин, 10% нормальная козья сыворотка, 0.1% Tween 20 в PBS.

Лизирующий буфер: 20 mM Трис, 150 mM NaCl, 1mM ЭДТА, 1% NP40, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, Protease Inhibitor Cocktail (Merck, Германия), pH 7.5.

Буфер для нанесения: 50 mM Трис-HCl, 100 mM β-меркаптоэтанол, 1% SDS, 10% глицерин, бромфеноловый синий (75 нг/мл), ксиленцианол (75 нг/мл), pH 6.8.

### **2.1.3 Материалы для культивирования клеток**

Флаконы для культивирования с площадью поверхности 25 см<sup>2</sup>, 75 см<sup>2</sup>, 6 – луночные планшеты с площадью лунки 15, 53 см<sup>2</sup>, 96-луночные планшеты с площадью лунки 0,32 см<sup>2</sup> (TPP, Швейцария), культуральные стекла для иммуноцитохимии (BD Falcon culture slides, США), планшеты E-Plates L8 для мониторинга в режиме реального времени на приборе xCELLigence (ACEA Biosciences Inc., США).

### **2.1.4 Оборудование**

Термостат (BIOSAN, Латвия), центрифуга Minispin (Eppendorf, Германия), CO<sub>2</sub>-инкубатор ( Heraeus, Германия), центрифуга с охлаждением 5415 (Eppendorf, Германия), источник тока (ДНК-технология, Россия), низкотемпературный холодильник (GFL, Германия), шейкер-инкубатор (BIOSAN, Латвия), шейкер (Scientific Industries, США), спектрофотометр NanoVue Plus (GE Healthcare, США), амплификатор IQ<sup>TM</sup>5 (Bio-Rad, США), источник тока (Bio-Rad, США), микроскоп AxioSkope 2 Plus (Carl Zeiss, Германия), флуоресцентный микроскоп ZOE<sup>TM</sup> (Bio-Rad, США), сенсоры для подсчёта клеток Scepter<sup>TM</sup> Sensors (Millipore, Мексика), многоканальный спектрофотометр (BioChrom, Англия), фотометр Apollo LB912 (Berthold Technologies, Германия), микроскоп Leica DM 2500 (Leica Microsystems, Германия), аппарат карусельного типа для гистологической проводки Microm STP 120 (Thermo Scientific, Германия), ротационный микротом Microm HM 340E (Thermo scientific, Германия), цитофлуориметр BD FACSCanto<sup>TM</sup> II (Becton Dickinson, США), клеточный анализатор в режиме реального времени xCELLigence RTCA (ACEA Biosciences Inc., США), инкубатор для мембраны при проведении Вестерн Блота iBind Western Device (Life technologies, США), визуализация анализа Вестерн Блот на приборе C-Digit (LI-COR, США), ультрамикротом EM UC7 (Leica, Германия), ультратонкие срезы изучали в ПЭМ JEM 1400 (JEOL, Япония), оснащённом цифровой камерой бокового ввода Veleta (Olympus soft Imaging solution, Германия).

### **2.1.5 Праймеры для ОТ-ПЦР**

Синтетические d-олигонуклеотиды (Таблица 6) были синтезированы в лаборатории медицинской химии ИХБФМ СО РАН (Новосибирск).

**Таблица 6.** Синтетические d-олигонуклеотиды используемые в работе

Название праймера	Праймер	Длина продукта, п.о.
<b>GAPDH</b>	F: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3' R: 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'	226
<b>HPRT</b>	F: 5'-CATCAAAGCACTGAATAGAAAT-3' R: 5'-TATCTTCCACAATCAAGACATT-3'	164
<b>B2M</b>	F: 5'-CGCTCCGTGGCCTTAGCTGT-3' R: 5'-AAAGACAAGTCTGAATGCTC-3'	224
<b>PR</b>	F: 5'-TCATTCTATTTCATTATGCCTTACCA-3' R: 5'-GACTTCGTAGCCCTTCCAAAG-3'	136
<b>ER<math>\alpha</math></b>	F: 5'-ATGATGAAAGGTGGGATACGA-3' R: 5'-CTGTTCTTCTTAGAGCGTTTGATC-3'	167
<b>ER<math>\beta</math></b>	F: 5'-GTCACAGCGACCCAGGAT-3' R: 5'-CTTACTTCTACCTCTGAGAAAAC-3'	225 и 540
<b>Сур19</b>	F: 5'-TGCGAGTCTGGATCTCTGGA-3' R: 5'-GGGCCTGACAGAGCTTTCATA-3'	211
<b>Ki-67</b>	F: 5'-GACATCCGTATCCAGCTTCCT-3' R: 5'-GCCGTACAGGCTCATCAATAAC-3'	139
<b>IFIT3</b>	F: 5'-GGCAGACAGGAAGACTTCTG-3' R: 5'-TTTCTGCTTGGTCAGCATGT-3'	250

### 2.1.6 Клеточные культуры

В работе использовали иммортализованные коллекционные культуры: клетки аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7 и аденокарциномы лёгкого A549 (Российская коллекция клеточных культур позвоночных, Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург), клетки аденокарциномы яичника SKOV3 (Лаборатория ИБХ РАН, г. Москва), клеточную линию аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 (Российская коллекция клеточных культур, ЦВТ ХИМРАР, Москва), неопухолевые эпителиальные

клетки молочной железы MCF10A (Российская коллекция клеточных культур ГНЦ ВБ «Вектор», г. Новосибирск).

### **2.1.7 Лабораторные животные**

В работе использовали мышей линии SCID Hairless Outbred SHO-*Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>hr</sup>* Mouse Outbred, возраст 5-10 недель, разведения ЦКП «SPF-виварий» Института цитологии и генетики СО РАН. Животных содержали в индивидуальных вентилируемых клетках (Animal Care Systems, Colorado, USA) в группах по 1-4 животных со свободным доступом к корму (Ssniff, Soest, Germany) и воде в специальных чистых помещениях класса С свободных от патогенов при постоянной температуре воздуха  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  с режимом освещения день/ночь 14/10 часов и относительной влажности  $45 \pm 15\%$ .

Все эксперименты с лабораторными животными выполнены в соответствии с рекомендациями и требованиями по использованию и уходу за лабораторными животными (ECC Directive 86/609/EEC). Протоколы экспериментов были одобрены Комитетом по этике экспериментов на животных Администрации Сибирского отделения Российской академии наук (протокол: 8 - 2012).

## **2.2 Методы**

### **2.2.1 Забор образцов ткани**

Забор образцов онкотрансформированных тканей проводили онкологи Городской клинической больницы №1 города Новосибирска и Новосибирского областного онкологического диспансера. Забор образцов нетрансформированной ткани молочной железы проводили хирурги Центра новых медицинских технологий (ЦНМТ) города Новосибирска. Полученные в результате операции свежие образцы опухолей молочной железы и эндометрия размером около  $1 \text{ см}^3$  немедленно помещали в ростовую среду DMEM или RPMI, содержащую раствор антибиотиков-антимикотиков (100 ед/мл пенициллин, 0.1 мг/мл стрептомицин и 0.25 мкг/мл амфотерицин, далее а/а) и транспортировали на льду.

Нетрансформированная ткань и ткань гиперплазии эндометрия были получены от пациентов в возрасте 35 и 28 лет соответственно, которые проходили диагностическое выскабливание. Опухолевые образцы ткани были получены от трех пациентов в постменопаузе (в среднем 56 лет) с диагнозом аденокарцинома эндометрия при проведении полной резекции опухоли. Финальный диагноз был подтвержден окрашиванием гематоксилином-эозином парафиновых блоков после операции. Ни один из пациентов не получал химио- или лучевую терапию перед проведением хирургического вмешательства.

Опухолевая ткань молочной железы была получена из зоны опухолевого очага, удаленного в ходе хирургического вмешательства, нетрансформированная ткань молочной железы была получена при пластических операциях по изменению формы молочной железы.

### **2.2.2 Получение первичных культур клеток из нормальной и онкотрансформированной ткани молочной железы и эндометрия с методом ферментативной диссоциации**

Образцы максимально очищали от соединительной ткани и кровеносных сосудов, промывали раствором PBS с а/а и далее измельчали скальпелем до фрагментов размера около 1 мм<sup>3</sup>. Для дезагрегации ткани молочной железы использовали коллагеназу I-го типа, а для ткани эндометрия коллагеназу IV-го типа. Далее, измельченные фрагменты переносили в пробирки объемом 15 мл, добавляли 4 мл среды IMDM, содержащей 10% эмбриональную фетальную сыворотку коровы (FBS), раствор 2 mM L-глутамин, раствор коллагеназы IV типа до финальной концентрации 2000 ед/мл (для ткани эндометрия) и 1800 ед/мл коллагеназы I типа (для ткани молочной железы) (GIBCO, Life Technologies, США) и инкубировали при температуре 37.0±1.0°C в атмосфере 5.0±0.5% CO<sub>2</sub> (стандартные условия) в течение 15 ч. Далее, образцы центрифугировали 10 мин при 200 g, надосадочную жидкость удаляли, а осадок клеток промывали десятикратным избытком раствора PBS и повторяли процедуру центрифугирования. Осадок клеток ресуспендировали в 2 мл среды IMDM, содержащей 10% FBS, 2 mM раствор L-глутамин и раствор а/а, и переносили для культивирования в лунку 6-луночного планшета, наблюдая процесс адгезии при стандартных условиях. Рост клеток контролировали под микроскопом, смену среды осуществляли 1 раз в 5-7 дней до формирования монослоя. Для поддержания жизнеспособности опухолевых клеток *in vitro* использовали коммерчески доступный набор МІТО+, содержащий эпидермальный фактор роста, трансферрин, инсулин, добавку для роста эндотелиальных клеток, трийодтиронин, гидрокортизон, прогестерон, тестостерон, 17-β-эстрадиол, селеновую кислоту, о-фосфорил этаноламин.

### **2.2.3 Получение первичных культур клеток молочной железы без применения ферментов**

Образцы ткани механически дезагрегировали с частичным сохранением жировой ткани помещали в ростовую среду IMDM и переносили в 6-луночный планшет для дальнейшего культивирования при стандартных условиях. Каждые 2-3 дня при смене среды в лунках планшета, ростовую среду с неприкрепившимися живыми клетками и мелким эксплантатами переносили в новый 6 - луночный планшет и ежедневно добавляли по 1 мл свежей ростовой среды. Эту манипуляцию повторяли 2-3 раза для сохранения разнообразия

пула клеток. Кроме того, все отмывочные стоки PBS, содержащие отдельные клетки, после механической дезагрегации собирали и переносили в 6-луночный планшет и помещали в инкубатор при стандартных условиях. При первом пассировании клеток в культуральную среду также добавляли ингибитор протеинкиназы ROCK для супрессии апоптоза и стимуляции пролиферативной активности в соответствии с рекомендациями производителя.

#### **2.2.4 Культивирование линий клеток**

Клетки первичных культур культивировали в среде IMDM в присутствии раствора 10% FBS, 2 mM L-глутамина, раствора а/а и добавки MITO+ для культивирования эпителиальных при стандартных условиях. Клетки открепляли от подложки с помощью TripLE™ (Gibco BRL Co., Invitrogen) при достижении монослоя, открепленные клетки разбавляли полной ростовой средой IMDM в соотношении 1:3 – 1:4 (v:v) для продолжения культивирования.

Клетки MCF-7 культивировали в среде IMDM, клетки MDA-MB-231 культивировали в среде L15, клетки SKOV3 культивировали в среде DMEM:F12, клетки A549 культивировали в среде DMEM, клетки MCF10A культивировали в среде NuMEC добавлением NuMEC Supplement Kit в присутствии 10% FBS, 2 mM L-глутамина, а/а.

Клетки открепляли от подложки с помощью Трипсин-EDTA/TripLE™ (Gibco BRL Co., Invitrogen) при достижении монослоя, открепленные клетки разбавляли полной ростовой средой IMDM в соотношении 1:3 – 1:4 (v:v) для продолжения культивирования. Все клеточные культуры культивировали при стандартных условиях (инкубатор CO<sub>2</sub> Heraeus Hera cell).

#### **2.2.5. Создание криобанка полученных первичных клеточных культур из нормальной и онкотрансформированной ткани молочной железы и эндометрия**

Опухолевые и нетрансформированные клетки ( $6 \times 10^6$  на флакон) из ткани молочной железы и эндометрия выращивали в культуральных флаконах площадью 75 см<sup>2</sup> в стандартных условиях. Клетки открепляли от подложки с помощью TripLE™ и промывали клеточный осадок дважды пятикратным PBS. Криоконсервацию культур клеток ( $2-3 \times 10^6$  клеток на ампулу) проводили в 1 мл раствора, содержащего 10% соответствующей культуральной среды, 80% FBS и 10% ДМСО. Ампулы замораживались в жидком азоте при температуре -196°C.

Для размораживания ампул из жидкого азота на водяной бане при 37°C 2-3 мин, содержимое ампулы переносили в 1 мл культуральной среды и отмывали 10 мл культуральной среды в 3-5 приема от консерванта, затем их центрифугировали в течение 5

мин при 1000 об/мин, удаляли среду с консервантом, ресуспензировали клетки в свежей ростовой среде и переносили в культуральный флаконах площадью 25 см<sup>2</sup>, культивировали в стандартных условиях для дальнейших экспериментов. Кримоконсервацию первичных культур опухолевые и нетрансформированные клеток молочной железы и эндометрия человека осуществляли на 1-5 пассажах.

### ***2.2.6 Окрашивание культур клеток гематоксилином и эозином***

Опухолевые и нетрансформированные клетки молочной железы и эндометрия выращивали на культуральных 4 или 8 луночных стеклах для иммуноцитохимии (BD Falcon culture slides, США) в стандартных условиях. Клетки промывали два раза PBS, после чего их фиксировали 10% нейтральным раствором формалина (Био Витрум, Россия) в течение 1 часа и окрашивали раствором гематоксилина и эозина (1:7 в 15% этаноле) в течение 3 минут. Далее, для обезвоживания препараты последовательно помещали в 70%, в 96% и абсолютный спирты на 1 мин, после чего осветляли добавлением о-ксилола в течение 3 мин. Гистологические препараты заключали в синтетическую монтирующую среду Витрогель (Biovitrum, Россия). Окрашенные клетки визуализировали с использованием светового микроскопа Leica DM 2500 (Leica Microsystems, Германия). Анализ проводили в ЦКП ИЦиГ СО РАН «Микроскопический анализ биологических объектов».

### ***2.2.7 Иммуноцитохимия***

Опухолевые и нетрансформированные клетки молочной железы в количестве  $1 \times 10^4$  на лунку садили на 8 луночный культуральный слайд (BD Falcon, Bedford, MA) в стандартных условиях, промывали два раза PBS и фиксировали метанолом. Фиксатор отмывали два раза 5000 мкл PBS. Для пермеабилзации добавляли 300 мкл 0,1% Тритон X-100 к клеткам в течение 10 мин. После пермеабилзации клетки промывали PBS. Для блокирования неспецифического связывания антител клетки инкубировали в 1% BSA (Sigma-Aldrich), 0.3 М глицина в буфере PBST (PBS с 0.1% Твин 20) в течение 30 минут при комнатной температуре. После блокировки клетки промывали PBS и инкубировали с антителами против виментина и анти-Ki-67 или моноклональными антителами против CD324 человека, PE - конъюгированными в течение 40 минут при комнатной температуре. От первичных антител отмывались 1% BSA/PBS буфером. Для визуализации использовали вторичные антитела, FITC-конъюгированные и Alexa Fluor® 594-конъюгированные, инкубацию со вторичными антителами проводили в течение 1 ч при комнатной температуре в темноте. От вторичных антител клетки отмывали PBS и наносили Prolong™ Gold antifade reagent (Invitrogen, США) или при анализе CD324 использовали DAPI/Antifade (Millipore,

США). Окрашенные клетки визуализировали с использованием флуоресцентного микроскопа Axioscop 2 PLUS (Carl Zeiss, GmbH). Анализ проводили в ЦКП ИЦиГ СО РАН «Микроскопический анализ биологических объектов».

### **2.2.8 Вестерн блот анализ**

Опухолевые и нетрансформированные клетки ( $3 \times 10^6$  на флакон) молочной железы выращивали в культуральных флаконах площадью 25 см<sup>2</sup> в стандартных условиях. Клетки промывали PBS и лизировали в лизис-буфере, инкубировали 10 мин при 70°C, центрифугировали на максимальных оборотах 5 мин. Аликвоты лизатов клеток наносили на ПААГ (5% концентрирующий гель, 10% разделяющий гель) в буфере для нанесения (50 мМ Трис-НСl, 100 мМ β-меркаптоэтанол, 1% SDS, 10% глицерин, бромфеноловый синий (75 нг/мл), ксиленцианол (75 нг/мл), рН 6.8) и проводили электрофоретическое разделение белков лизатов по молекулярной массе. Белки из SDS-ПААГ переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, Германия) в режиме мокрого электропереноса 1 ч при 150В в буфере NuPAGE (Novex by life technologies, США). Нитроцеллюлозную мембрану инкубировали в буфере iBind Solution Kit (Novex by life technologies, США) 5 мин, далее мембрану инкубировали в iBind Western Device (Life technologies, США) с моноклональными антителами IgG к EGFR, полученными в мыши, (1:133, Santa Cruz Biotechnology) или моноклональными антителами IgG к виментину, полученными в мыши (1:50, Abcam), с поликлональными антителами IgG к GAPDH, полученными в козе, (1:133, R&D Systems, США), с пероксидазным конъюгатом вторичных поликлональных антител кролика к IgG мыши (1:200, R&D Systems, США) и осла к IgG козы (1:200, R&D Systems, США) в буфере iBind Solution Kit 18ч, +23°C. По окончании инкубации нитроцеллюлозную мембрану промывали водой. Инкубировали с хемилюминесцентным субстратом для пероксидазы хрена (Invitrogen, США) 1 мин. Для люминесцентного детектирования использовали блот-сканер C-DiGit (Li-COR Bioscience). Денситометрический анализ данных вестерн-блоттинга проводили с использованием программного обеспечения для анализа изображений Gel-Pro Analyzer (Media Cybernetics) версии 3.1.

#### **2.2.8.1 Электрофорез в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия**

Для разделения белков лизатов по молекулярной массе использовали электрофорез белков в полиакриламидном геле. Концентрирующий гель содержал 125 мМ Трис-НСl, 5% акриламид, 0.1% N,N'-метиленабисакриламид, 0.1% SDS, 0.03% ТЕМЕД, 0.4 мМ персульфат аммония, рН 6.8. Разделяющий гель содержал 0.3 М Трис-НСl, 10% акриламид, 0.25% N,N'-

метиленбисакриламид, 0.1% SDS, 0.06% ТЕМЕД, 2 мМ персульфат аммония, pH 8.8. Концентрирование белков проводили при силе тока 15 мА, разделение при силе тока 30 мА.

Белки из ПААГ переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, Германия) в режиме мокрого электропереноса 1 ч 150В в буфере NuPAGE (Novex by life technologies, США).

## ***2.2.9 Цитометрический анализ клеток культур эндометрия и молочной железы***

### *2.2.9.1 Анализ поверхностных маркеров клеток методом проточной цитофлуориметрии*

Опухолевые и нетрансформированные клетки ( $2 \times 10^5$  на лунку) молочной железы и эндометрия, выращивали в 6-луночных планшетах, открепляли от подложки с помощью TripLE™. Открепленные клетки, промытые в PBS, фиксировали 10% водном нейтральном растворе формалина (BioVitrum, Россия). От формалина отмывались два раза PBS. Клетки инкубировали с мечеными мышиными антителами против человека (CD24, CD44 и CD133 или CD325, HER2 / CD34 и HER3, CD146, CD 324 и CD326) 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 проточном цитофлуориметре FACSCanto II (BD Biosciences, США), а данные были проанализированы с помощью программного обеспечения FACSDiva (BD Biosciences). Клеточный дебрис был исключен из анализа по величине прямого и бокового рассеяния, для статистической оценки анализировали всего десять тысяч событий.

### *2.2.9.2 Анализ проапоптотических изменений в первичных культурах клеток из ткани эндометрия*

Опухолевые и нетрансформированные клетки ( $2 \times 10^5$  на лунку) эндометрия, выращивали в 6-луночных планшетах и обрабатывали через 24 часа RL2 или цисплатином для дальнейшей инкубации в стандартных условиях. После инкубации с исследуемым веществом клетки открепляли от подложки с помощью раствора 0.05% трипсин/0.53 мМ ЭДТА и промывали в 500 мкл PBS с ингибитором трипсина согласно рекомендациям производителя (Sigma, США). Далее клетки разделяли и около  $1 \times 10^5$  клеток окрашивали пропидий йодидом (PI) и FITC-аннексином V в соответствии с протоколом производителя (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BD Biosciences). Образцы были проанализированы на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (BD Biosciences, США) с использованием программного обеспечения FACSDiva (BD Biosciences). Клеточный дебрис был исключен из анализа по величине прямого и бокового рассеяния, для статистической оценки анализировали всего десять тысяч событий.



### 2.2.9.3 Цитометрический анализ популяции стволовых опухолевых клеток

Опухолевые и нетрансформированные клетки ( $2 \times 10^5$  на лунку) молочной железы и эндометрия, выращивали в 6-луночных планшетах в стандартных условиях, открепляли от подложки с помощью TripLE™. Для окрашивания образцов клеток использовали коммерчески доступный набор ALDEFUOR™ Kit (Stem Cell™ Technologies, Канада), пробоподготовку проводили согласно рекомендациям производителя. Образцы центрифугировали при 250 g 5 мин, отбирали среду, промывали 500 мкл PBS, добавляли ALDEFUOR™ Assay Buffer в пробирку «тест». В пробирку «контроль» добавляли реагент ALDEFUOR™ DEAB Reagent. В пробирку «тест» добавляли ALDEFUOR™ Reagent, ресуспендировали и переносили в пробирку «контроль». Инкубировали образцы 45 мин при 37°C, центрифугировали, отбирали супернатант, на льду добавляли ALDEFUOR™ Assay Buffer, добавляли антитела к CD133 человека, конъюгированных с флуорохромом APC и антитела к CD44 человека, конъюгированных с флуорохромом PE. Инкубировали 30 мин, центрифугировали при 65 g 10 мин, отбирали супернатант, добавляли ALDEFUOR™ Assay Buffer. Образцы анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (BD Biosciences, США) с использованием программного обеспечения FACSDiva (BD Biosciences). Клеточный дебрис был исключен из анализа по величине прямого и бокового рассеяния, для статистической оценки анализировали десять тысяч событий в исследуемой популяции.

### 2.2.10 Выделение РНК

Опухолевые и нетрансформированные клетки ( $3 \times 10^6$  на флакон) из ткани молочной железы и эндометрия выращивали в культуральных флаконах площадью 25 см<sup>2</sup> в стандартных условиях. Из культурального флакона с клеточной культурой убрали питательную среду, промывали PBS, лизировали добавлением реагента «Лира» на 5 мин при 24°C. Смесь переносили в пробирку, добавляли хлороформ в расчете 1:5 по отношению к объему «Лире» и помещали в шейкер-инкубатор при 24°C на 2-3 мин. По завершении инкубации образцы центрифугировали при 11000 g 15 мин при 4°C. Верхнюю водную фазу переносили в чистые пробирки и осаждали РНК путем добавления 0.5 мл изопропанола (1:1 к водной фазе), далее оставляли для формирования осадков на 1 ч при 4°C. Образцы центрифугировали при 11000 g 15 мин при 2 - 8°C, убрали супернатант, осадок промывали 1 мл 75% EtOH. Осадок высушивали в термостате при 37°C с открытой крышкой. Высушенный осадок растворяли в 40 мкл деионизованной воде и прогревали 10 мин при 55°C. На спектрофотометре NanoVue Plus измеряли ( $\lambda 260/280$ ) концентрацию РНК. О степени чистоты РНК от белков судили по величине отношения  $D_{260}/D_{280}$ . Приемлемой

степенью очистки считали  $D_{260}/D_{280} \geq 1.6$ . Концентрацию суммарной клеточной РНК определяли спектрофотометрически и добавляли в реакционную смесь в количестве 1 мкг.

#### *2.2.10.1 ОТ-ПЦР в режиме реального времени*

Реакцию ОТ-ПЦР в режиме реального времени проводили на приборе Bio-Rad iQ5 Cycler (BioRad, США). Для ОТ-ПЦР использовали коммерчески доступную смесь для ОТ-ПЦР в режиме реального времени - БиоМастер ОТ-ПЦР SYBR Blue (ООО «Биолабмикс», Россия). Объем реакционной смеси составлял 25 мкл. Каждая реакционная смесь содержала 1 мкг исследуемой РНК, 30 пмоль каждого праймера и 1x смесь БиоМастер ОТ-ПЦР SYBR Blue. Реакцию ОТ-ПЦР в режиме реального времени проводили на амплификаторе IQ™5 в следующих условиях: 45°C – 30 мин, 95°C – 5 мин; 35 циклов: денатурация – 95°C – 15 с, отжиг – 61°C – 15 с, элонгация – 72°C – 25 с; 80°C – 11 с.

Продукты ОТ-ПЦР анализировали в 2% агарозном геле.

Порог детекции ( $C_T$ ) для каждой реакции определялся автоматически программой для анализа результатов iQ5 software (BioRad, США). Данные были нормализованы согласно модели  $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ , где  $\Delta C_T = (\text{Avg. gene } C_T - \text{Avg. GAPDH } C_T)$  (1),  $\Delta\Delta C_T = (\text{Avg } \Delta C_{TN} - \text{Avg } \Delta C_{TMSF-N})$ , где N – исследуемая культура (2) [254].

#### *2.2.10.2 Электрофорез в агарозном геле*

Оценку качества препаратов выделенной РНК проводили электрофорезом в 2% агарозном геле в 1x буфере TAE при напряжении электрического поля 20 В/см. Гель окрашивали водным раствором бромистого этидия (1 мкг/мл) или 1xSYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain, фотографировали при визуализации в ультрафиолетовом свете с использованием системы GelDoc XR+.

### **2.2.11 Оценка жизнеспособности культур клеток эндометрия и молочной железы человека**

#### *2.2.11.1 Исследование цитотоксической активности (MTT-тест)*

Опухолевые и нетрансформированные клетки молочной железы и эндометрия высевали в 96-луночные планшеты в количестве  $4 \times 10^3$  клеток на лунку в объеме 100 мкл и культивировали в стандартных условиях в среде RPMI в присутствии 10% FBS, раствора 2 mM L-глутамина, а/а. Через 24 часов к клеткам добавляли 100 мкл исследуемых соединений, растворенных в среде RPMI. Затем клетки растили в течение 48 ч, среду в лунках заменяли на 100 мкл среды RPMI без сыворотки, содержащей MTT (0.25 мг/мл), инкубировали 4 ч при 37°C. Далее, удаляли среду из лунок и добавляли в лунки по 150 мкл DMSO. Оптическую

плотность раствора в лунках проводили при длине волны  $\lambda = 570$  нм на фотометре Apollo LB912 (Berthold Technologies, Германия). Жизнеспособность клеток определяли относительно жизнеспособности контрольных клеток  $(100\%) \pm SD$  по трем независимым экспериментам. Значения  $IC_{50}$  были рассчитаны с помощью программы CompuSyn (ComboSyn, США)

#### *2.2.11.2. Определение жизнеспособности клеток в режиме реального времени на приборе xCELLigence*

Опухолевые и нетрансформированные клетки (1500-3000 клеток/лунка) молочной железы и эндометрия высаживали на 8х-луночные планшеты со встроенным микроэлектронными датчиками в общем объеме 500 мкл полной культуральной среды. Анализ скорости пролиферации полученных первичных культур клеток контролировали 72-110 часов.

Для анализа цитотоксической активности препаратов, через 24 ч пролиферации клеток среду в лунках частично заменяли свежей средой с растворенными лекарственными агентами или PBS. Клеточный индекс (CI) рассчитывали для каждой лунки E-планшета с помощью программного обеспечения RTCA 1.2 (Roche Diagnosis, Франция). Графики с кривыми роста были сгенерированы из системы xCELLigence.

#### *2.2.12 Трансплантация опухолевых клеток молочной железы*

Опухолевые культуры клеток молочной железы и клетки MDA-MB 231 выращивали в культуральных флаконах площадью  $75 \text{ см}^2$  в стандартных условиях. Клетки открепляли от подложки с помощью TripLE™ и промывали клеточный осадок дважды пятикратным PBS. Далее клетки разбавляли холодным физиологическим раствором избытком от необходимой, после чего к клеткам добавляли равный объем матригеля (BD Biosciences, США) и трансплантировали путем подкожной инъекции мышам в объеме 100 мкл (1,5 млн. клеток на мышь). В эксперименте использовали самок мышей SCID возраста 5-10 недель.

#### *2.2.13 Терапия мышей с опухолью молочной железы человека*

Через 3 недели с момента трансплантации опухолевых клеток молочной железы размеры опухолей определяли штангенциркулем и животные с опухолями, достигшими объема не менее  $2 \times 2 \times 2$  мм, использовали в эксперименте. Из животных формировали группы не менее 5 мышей для дальнейшего лечения. Мыши получали 3 инъекции препаратов. По окончании эксперимента животных умерщвляли ингаляцией  $\text{CO}_2$ , проводили

патоморфологический осмотр животного, опухоли вырезали и взвешивали, органы с очагами метастазов также вырезали и фиксировали в формалине для дальнейших исследований.

#### ***2.2.14 Подготовка образцов для гистологического исследования***

При получении первичных культур клеток из здоровой и онкотрансформированной ткани молочной железы человека отбирали образец ткани для гистологического анализа и фиксировали в 10% нейтральном формалине (Био Витрум, Россия). У мышей линии SCID вырезали опухоли, которые фиксировали в 10% нейтральном формалине (Био Витрум, Россия) при температуре +4°C для последующих манипуляций. Дальнейшая обработка заключалась в обезвоживании образцов ткани в серии спиртов и бензола в автоматическом аппарате карусельного типа для гистологической проводки Microm STP 120 (Thermo Scientific, Германия). Далее, обезвоженные образцы опухолей заключали в синтетическую парафиновую смесь «HISTOMIX» (Био Витрум, Россия). Срезы толщиной 4 мкм изготавливали на ротационном микротоме Microm HM 340E (Thermo scientific, Германия). Окраску гематоксилином-эозином проводили по стандартной методике. Окрашенный срез заключали в монтирующую среду для гистологических препаратов Витрогель (Biovitrum, Россия). Окрашенные срезы ткани визуализировали с использованием микроскопа Axioscop 2 PLUS (Carl Zeiss, GmbH) в световом поле. Анализ проводили в ЦКП ИЦиГ СО РАН «Микроскопический анализ биологических объектов».

#### ***2.2.15 Цитогенетическое исследование культур опухолевых клеток молочной железы***

Опухолевые клетки ( $2 \times 10^5$  на лунку) молочной железы, выращивали в 6-луночных планшетах в стандартных условиях в течение 48 часов. Анализ проводили на 4-5 пассажах. Для накопления митотических клеток в метафазе в лунки добавляли 0.1% раствор колхицина и инкубировали 3 часа при 37°C. После этого проводили гипотоническую обработку клеток раствором 75 мМ KCl, затем клетки фиксировали с помощью стандартного фиксатора этанол: уксусная кислота, 3:1. Полученную суспензию клеток раскапывали на поверхность холодных, влажных предметных стекол, высушивали на воздухе и окрашивали красителем Гимза с предварительной обработкой трипсином (GTG-окрашивание). Анализ проводили с помощью светового микроскопа Axioscop 2 PLUS (Carl Zeiss, GmbH) с использованием объективов 10x, 100x (масляная иммерсия). В каждой линии клеток анализировали по 50 отдельно лежащих метафазных пластинок. Подсчитывали количество хромосом в каждой пластинке. Анализ проводили в группе цитогенетики ИХБФМ СО РАН.

### **2.2.15 Исследование ультраструктуры клеток опухолевых культур**

Опухолевые клетки ( $3 \times 10^6$  на флакон) молочной железы выращивали в культуральных флаконах площадью  $25 \text{ см}^2$  в стандартных условиях, открепляли от подложки с помощью TripLE™ и промывали клеточный осадок два раза PBS. Клетки осаждали и фиксировали 4% раствором параформальдегида. Фиксированные параформальдегидом (4%) осадки клеток дофиксировали раствором четырёхокси осмия (1%), проводили по стандартной методике и заливали смесью эпон-аралдит (смола) с катализатором (DMP-30, США). Для полимеризации смолы образцы выдерживали в термостате. С полученных блоков готовили ультратонкие срезы на ультрамикротоме EM UC7 (Leica, Германия), которые контрастировали растворами уранилацетата и цитрата свинца. Контрастированные ультратонкие срезы изучали в ПЭМ JEM 1400 (JEOL, Япония), оснащённом цифровой камерой бокового ввода Veleta (Olympus soft Imaging solution, Германия). Анализ проводили в группе микроскопических исследований ИХБФМ СО РАН.

### **2.2.17 Статистический анализ**

В случае, когда данные соответствовали критериям нормального распределения, статистическую обработку данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Для остальных выборок обработку данных проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Высокий процент онкологических заболеваний женских репродуктивных органов и молочной железы стимулировал развитие новых таргетных и персонализированных методов лечения. На протяжении всей жизни женщины функциональное состояние молочной железы и эндометрия регулируют гормоны и гормональный дисбаланс может быть одной из причин онкотрансформации здоровой ткани. При персонализированном подходе схема лечения учитывает различные молекулярные характеристики опухоли конкретного пациента – экспрессию определенных ферментов, рецепторов гормонов и белковых факторов. Индивидуальной характеристикой опухоли также является её чувствительность или резистентность к различным противоопухолевым препаратам. Поиск новых мишеней для таргетной терапии происходит с использованием данных протеомного и транскриптомного анализов опухолевого материала, а для валидации найденных потенциальных мишеней используют различные опухолевые линии клеток в качестве моделей. Разработка универсальных подходов культивирования *in vitro* клеток опухоли пациента позволяет расширить панель существующих опухолевых линий молочной железы и эндометрия человека.

### **3.1. Получение первичных культур клеток из образцов нормальной и онкотрансформированной ткани эндометрия и молочной железы человека**

#### ***3.1.1 Получение первичных клеточных культур молочной железы и эндометрия с помощью ферментативной обработки***

Источником опухолевых клеток для получения персональных опухолевых культур являлись непосредственно образцы ткани первичных опухолей, полученные при резекции или биопсии. Образцы тканей эндометрия и молочной железы (нетрансформированная, гиперплазия и опухолевая) были получены в ходе хирургического вмешательства. Образцы ткани транспортировали в среде DMEM/RPMI, содержащий раствор антибиотиков-антимикотиков (100 ед/мл пенициллин, 0.1 мг/мл стрептомицин и 0.25 мкг/мл амфотерицин, далее а/а) на льду. Характеристики образцов представлены в Таблице 7. Для дезагрегации ткани молочной железы использовали коллагеназу IV-го типа, а для ткани эндометрия коллагеназу I-го типа. Эти ферменты относятся к семейству матриксных металлопротеиназ и отличаются по специфичности гидролиза коллагенов. Коллагеназа I-го типа гидролизует коллагены I, II, и III типов, составляющие основу соединительнотканного матрикса, а коллагеназа IV типа гидролизует коллаген IV типа базальных мембран [255].

**Таблица 7.** Характеристика исходного биологического материала, использованного для получения первичных культур эндометрия и молочной железы методом ферментативного гидролиза.

Культура	Первичный биологический материал	Тип	ИГХ
<b>Эндометрий</b>			
1	КЕ	эпителий, 17-й день м.ц	Нормальный эпителий
2	HE	эпителий, 12-й день м.ц.	Гиперплазия
3	ЕС1	аденокарцинома	Дифференцированная
4	ЕС2	аденокарцинома	Умеренно-дифференцированная
5	ЕС3	аденокарцинома	Умеренно-дифференцированная
<b>Молочная железа</b>			
6	BC5	Vl mammae	T2N0M0
7	BrCCh1	Vl mammae	T4N3M0, 6 курсов химиотерапии, рецидив
8	BN1	Нетрансформированная ткань	н/а

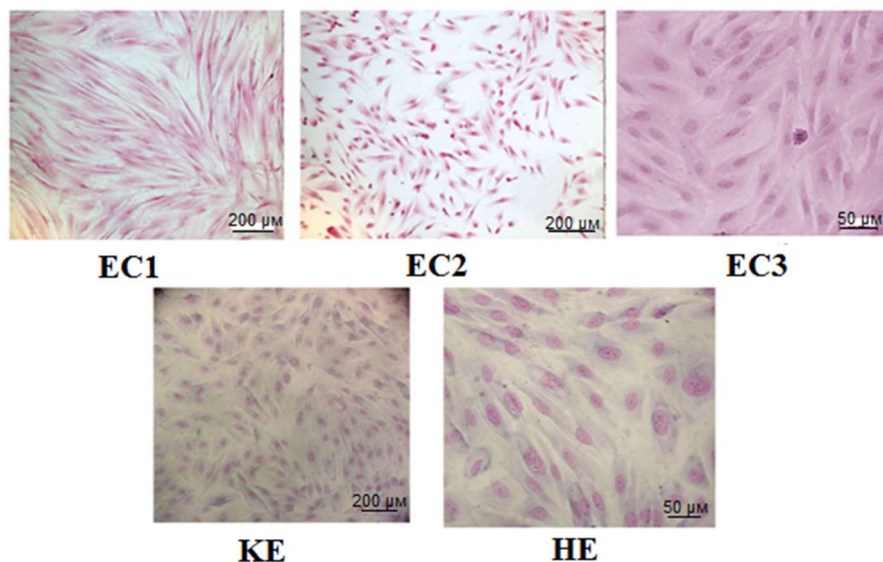
м.ц. – менструальный цикл; Vl mammae – опухоль молочной железы; TNM – опухоль, лимфатический узел, метастаз; химиотерапия: доксорубин + циклофосфамид; н/а – не анализировали; ИГХ – клиническое иммуногистохимическое исследование; ER – рецептор эстрогена; PR – рецептор прогестерона; HER2 – определение рецепторов факторов роста (продукты онкогенов her-2/neu).

Для получения культуры клеток образцы нормальной и онкотрансформированной ткани переносили в лунку 6-ти луночного планшета, промывали добавлением 5 мл буферного раствора PBS, содержащего а/а и измельчали скальпелем до фрагментов размера около 1 мм<sup>3</sup>. Далее, измельченные фрагменты переносили в пробирки объемом 15 мл, добавляли 4 мл среды IMDM, содержащей 10% FBS, раствор 2 mM L-глутамина, раствор а/а и раствор коллагеназы IV типа до финальной концентрации 2000 ед/мл (для ткани эндометрия) и 1800

ед/мл коллагеназы I типа (для ткани молочной железы) и инкубировали при температуре  $37.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$  в атмосфере  $5.0 \pm 0.5\%$   $\text{CO}_2$  (стандартные условия) в течение 15 ч. Далее, образцы центрифугировали 10 мин при 200 g, надосадочную жидкость удаляли, а осадок клеток промывали десятикратным избытком PBS и повторяли процедуру центрифугирования. Осадок клеток ресуспендировали в 2 мл среды IMDM, содержащей 10% FBS, 2 mM раствор L-глутамин и раствор a/a, и переносили для культивирования в лунку 6-луночного планшета, наблюдая процесс адгезии при стандартных условиях. Рост клеток контролировали под микроскопом, смену среды осуществляли 1 раз в 5-7 дней до формирования монослоя. Для поддержания жизнеспособности опухолевых клеток *in vitro* использовали коммерчески доступный набор MTO+, содержащий эпидермальный фактор роста, трансферрин, инсулин, добавку для роста эндотелиальных клеток, трийодтиронин, гидрокортизон, прогестерон, тестостерон, 17- $\beta$ -эстрадиол, селеновую кислоту, о-фосфорил этаноламин. На 3-м пассаже формировали банк культур клеток.

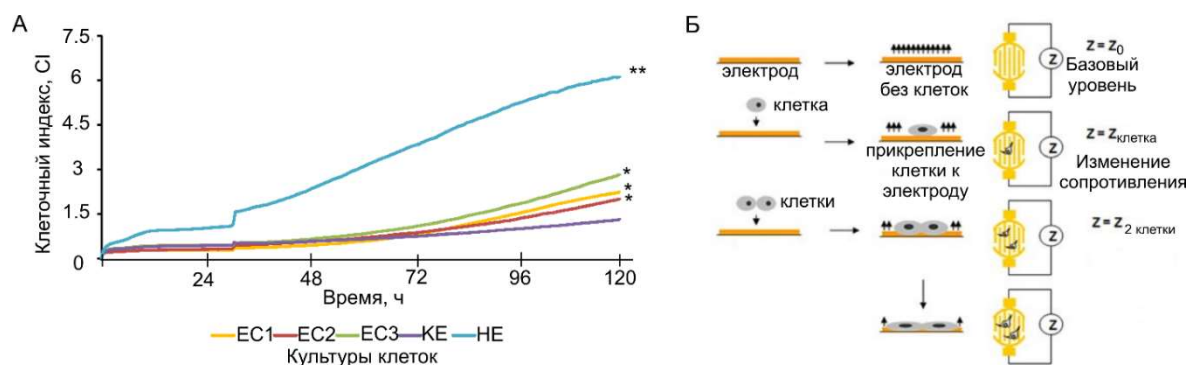
Из всех образцов ткани эндометрия удалось получить первичные культуры клеток: 3 культуры клеток из опухолевых образцов ткани - EC1, EC2 и EC3; культуру клеток из ткани с признаками гиперплазии - HE и культуру клеток из нетрансформированной ткани эндометрия - KE. Период адгезии клеток к пластиковой подложке в среднем составлял 36 часов. Через 48 часов среду, содержащую неприкрепленные клетки удаляли из лунки. Далее, первичную культуру клеток выращивали в течение приблизительно 1 недели до достижения 70–80% конфлюентности. Морфологию визуализировали с помощью окрашивания гематоксилином и эозином. В культурах клеток была выявлена их неоднородность, появление многоугольных клеток, определяемых как эпителиальные и удлинённых клеток, определяемых как фибробластоподобные (Рис. 5). Из полученных первичных культур опухолевых и нетрансформированных клеток эндометрия и молочной железы формировали криобанк на 2-3 пассажах. Для оценки относительной скорости пролиферации персональных культур клеток эндометрия был использован клеточный анализатор, оценивающий пролиферацию в режиме реального времени xCELLigence RTCA. Система xCELLigence (ASEA Bioscience, США) позволяет исследовать динамику роста адгезивных культур клеток в режиме реального времени. Действие прибора основано на том, что в подложку для роста клеток встроены золотые микроэлектродные биосенсоры, и взаимодействие клеток с электродами влияет на локальное ионное окружение на границе электрод/раствор: чем большую площадь подложки занимают прикрепленные клетки, тем выше будет сопротивление. Сопротивление является измеряемой величиной, которая трансформирована в относительные единицы - клеточный индекс CI.





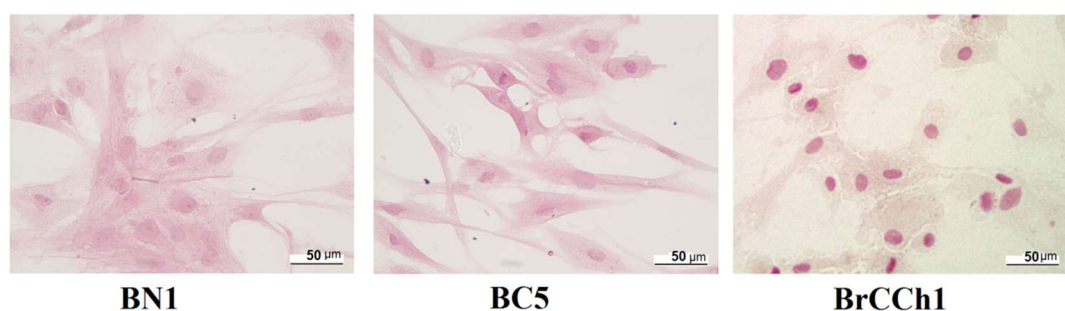
**Рис. 5.** Морфологический анализ первичных культур клеток эндометрия. Клетки выращивали на предметных стеклах и окрашивали гематоксилином и эозином. Световая микроскопия: EC1, EC2, KE – увеличение 63х, EC3, HE – увеличение 252х.

Анализ кривых роста культур клеток показал, что наименьшее значение величины CI выявлено для культуры нетрансформированного эндометрия KE (Рис. 6), что характеризует клетки культуры KE как редко делящиеся клетки. Наиболее короткий период удвоения клеток демонстрировала культура гиперплазии эндометрия HE, что говорит о высокой скорости пролиферации.



**Рис. 6.** Анализ пролиферации культур клеток эндометрия в режиме реального времени. А. Клетки (1500 кл/лунку) культивировали в единообразных условиях в течение 120 ч. Данные представлены как среднее 4х независимых повторов. Различие величины CI культуры KE и остальных культур было достоверно в финальной точке эксперимента с  $p < 0.05$  (\*) и  $p < 0.01$  (\*\*). Б. Принцип анализа пролиферации клеток на приборе xCelligence.

Из образцов ткани молочной железы с использованием коллагеназы I были получены 3 культуры: BC5 и BrCCh1 из онкотрансформированной и BN1 из нормальной ткани. Окрашивание гематоксилином и эозином выявило присутствие схожих по морфологии популяций клеток. Период адгезии составлял в среднем 36 часов. На начальном этапе культивирования клеток наблюдалась морфологическая гетерогенность (Рис. 7), в культуре присутствовали длинные, уплощенные клетки и округлые клетки эпителиального фенотипа. Через несколько пассажей все клетки в культуре приобретали мезенхимальный фенотип. Окрашивание клеток гематоксилином и эозином показало преимущественно фибробластоподобную морфологию полученных первичных клеточных культур. Клетки обладали овальным ядром, имели цитоплазматические выступы и «шипики», от которых можно было наблюдать отделение везикул, также встречались редкие многоядерные клетки.



**Рис. 7.** Морфологический анализ полученных культур клеток молочной железы. Клетки выращивали на предметных стеклах и окрашивали гематоксилином и эозином. Световая микроскопия, увеличение 126х.

Для иммортализованных линий показано, что клетки, относящиеся к разным подтипам ЗОМЖ (базальный/люминальный), также отличаются морфологически, преимущественно проявляя мезенхимальный или эпителиальный фенотип. Так, к примеру, эпителиальные клетки культуры BT-474, относящиеся к подтипу А люминальной ЗОМЖ, выглядят более дифференцированными и образуют плотные межклеточные контакты, тогда как клетки культуры BT20, классифицируемые как подтип В люминальной ЗОМЖ, выглядят менее дифференцированными и имеют мезенхимально-подобный фенотип. Клетки базальноподобной ЗОМЖ могут иметь как мезенхимально-подобный, так и эпителиально-подобный фенотипы. К примеру, клетки культуры MDA-MB-231 базальноподобного типа ЗОМЖ, обладают мезенхимальным фенотипом, а клетки культуры BT-549, также относящиеся к базальноподобному типу ЗОМЖ, обладают эпителиальным фенотипом.

Таким образом, именно молекулярные маркеры, а не внешняя морфология позволяют соотнести культуры клеток с определенным подтипом ЗОМЖ.

### 3.1.2 Оптимизация метода получения клеток из ткани молочной железы

Поскольку при получении культуры опухолевых клеток методом ферментативной дезагрегации коллагеназой IV типа удалось получить культуры, обладающие смешанным фенотипом с преобладанием фибробластоподобных клеток, необходимо было оптимизировать протокол для получения культур с эпителиальным фенотипом. В предыдущих экспериментах было замечено, что в культуральной среде при транспортировке образца ткани и во всех отмывочных буферных растворах встречаются диссоциированные живые клетки, поэтому для сохранения популяционного многообразия клеток опухоли, в дальнейшем клетки из промежуточных растворов сохраняли. Характеристики образцов ткани молочной железы, используемых для получения культур, представлены в Таблице 8.

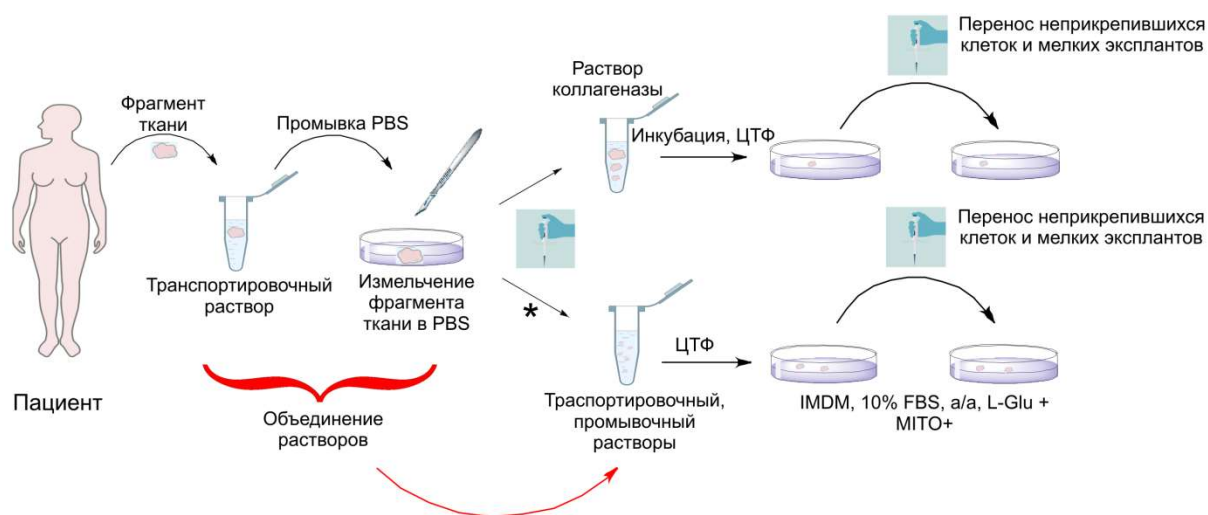
**Таблица 8.** Характеристики исходного биологического материала, использованного для получения культур молочной железы оптимизированным методом

Культура		Первичный биологический материал	Тип	ИГХ
1	BrC3	Вl mammae	T1N0M0	ER+/PR+/HER2-
2	BrC4	Вl mammae	T2N0M0	ER+/PR-/HER2-
3	BrC5	Вl mammae	T3N0M0	ER-/PR-/HER2-
4	BrC6	Вl mammae	T2N1M0	ER+/PR-/HER2-
5	BrCCh2	Вl mammae	T2N0M0, 4 курса химиотерапии	ER+/PR-
6	BrCCh3	Вl mammae	T1N0M0, 4 курса химиотерапии	ER+/PR-/HER2+
7	BrCCh4	Вl mammae	T4N1M0, 4 курса химиотерапии,	ER-/PR-/HER2-
8	BN4	Нетрансформированная ткань		н/а

Вl mammae – опухоль молочной железы; TNM – опухоль, лимфатический узел, метастаз; химиотерапия: циклофосфан и доксорубицин; н/а – не анализировали; ИГХ – клиническое иммуногистохимическое исследование; ER – рецептор эстрогена; PR – рецептор прогестерона.

Для оптимизации процедуры получения клеточных культур было проведено сравнение методов диссоциации с использованием коллагеназы I-го или IV-го типа и без использования ферментов. Для получения большего количества эпителиальных клеток без использования ферментов, транспортировочную среду IMDM или DMEM объединяли с раствором PBS после промывания и измельчения образцов ткани, в том числе и отмывочные буферные растворы (Схема 2, этап (\*)). В качестве транспортировочного раствора для опухолевых образцов использовали среду IMDM или DMEM с добавлением а/а. Объединенные растворы, содержащие клетки, центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли, а клетки разводили средой IMDM, содержащей 10% FBS, 2 мМ L-глутамин, а/а, митогенные факторы MITO+ и помещали в лунки 6-луночного планшета для дальнейшего культивирования в стандартных условиях (Схема 2).

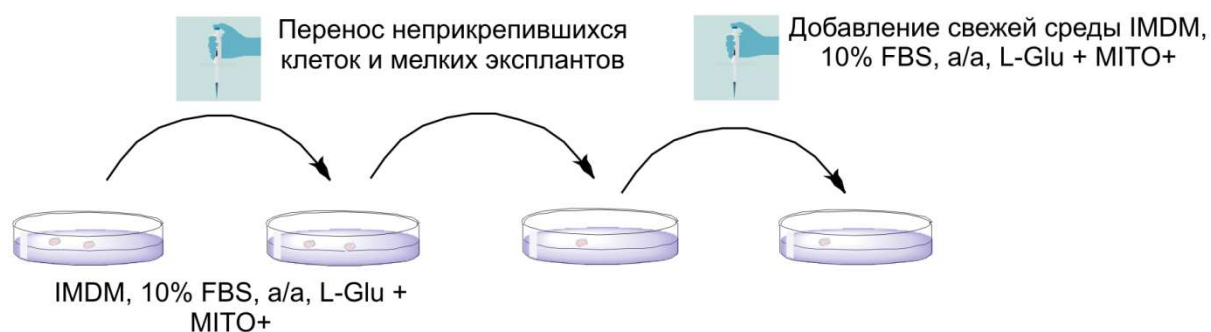
В случае использования ферментов, измельченные образцы с частичным сохранением жировой ткани переносили в флаконы для центрифугирования, добавляли 2/3 (от объема) ростовой среды IMDM, содержащей 2 мМ L-глутамин, а/а и раствор коллагеназы I-го или IV-го типа до финальной концентрации 1500 ед/мл и инкубировали в CO<sub>2</sub> инкубаторе в течение 24 ч. После этого, образцы центрифугировали при 400g 10 мин. Супернатант удаляли, а к клеточному осадку добавляли среду IMDM с 10% FBS, 2 мМ L-глутамином, а/а, набором митогенных факторов MITO+ и помещали в лунку 6-луночного планшета для дальнейшего культивирования (Схема 2).



**Схема 2.** Оптимизация получения первичных культур клеток молочной железы.

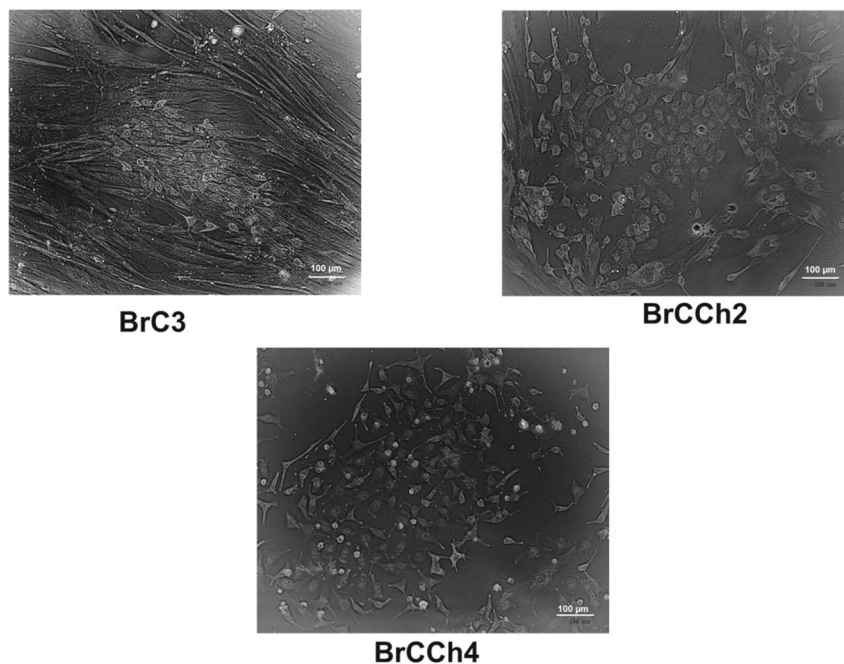
Период адгезии клеток, полученных без использования коллагеназы составлял 36 часов в среднем, тогда как после диссоциации коллагеназой IV типа составлял около 72

часов. Так как не все клетки прикреплялись к подложке, то каждые 2-3 дня при смене среды в лунках планшета ростовую среду с не прикрепившимися живыми клетками и мелкими эксплантатами переносили в новый 6-луночный планшет и ежедневно добавляли по 1 мл свежей ростовой среды (Схема 3). Данные условия обеспечили поддержание высокого пролиферативного потенциала клеток и образование монослоя, который формировался в течение 10-14 суток. При ферментативной обработке формирование монослоя происходило в течение недели. При первом пассировании клеток в культуральную среду также добавляли ингибитор протеинкиназы ROCK для супрессии апоптоза и стимуляции пролиферативной активности [256].



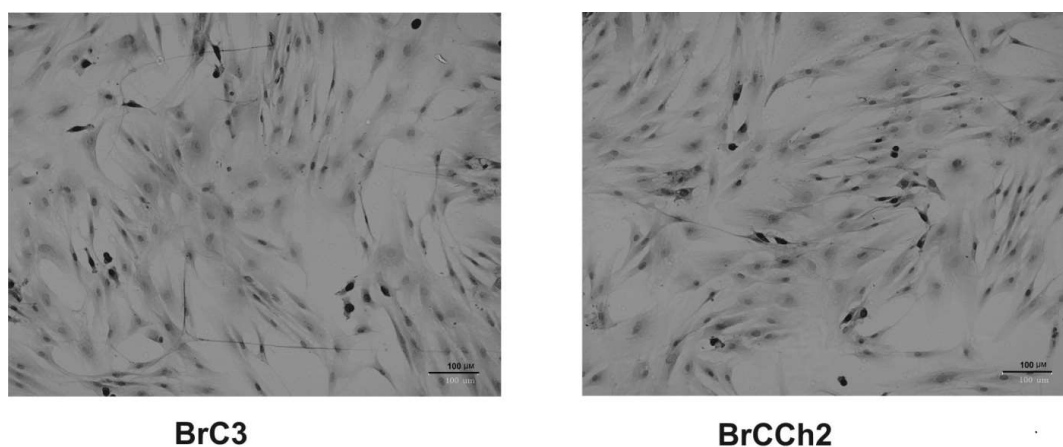
**Схема 3.** Манипуляции с неприкрепившимися клетками и мелкими эксплантатами образцов ткани молочной железы для сохранения гетерогенности в получаемых культурах клеток молочной железы.

В случае метода объединения растворов (Схема 2, этап (\*)), на 5-7-е сутки в лунках с клетками, полученными из образцов BrC3 и BrCCh2, выявлялась популяция с эпителиоподобным фенотипом среди клеток с фибробластоподобным фенотипом. После 1-2 раундов пересаживания эпителиоподобные клетки полностью замещали фибробластоподобные. Клетки первичной культуры BrCCh4 адгезировались к подложке сразу с эпителиоподобным фенотипом (Рис. 8). При использовании коллагеназы IV типа для деструкции образцов опухолей BrC3, BrCCh2 и BrCCh4 на 14е сутки (2й пассаж) формировался монослой клеток с фибробластоподобным фенотипом опухолей BrC3 и BrCCh2, а для образца BrCCh4 не удалось получить жизнеспособной популяции клеток (Рис. 9). Таким образом, тип коллагеназы влиял на морфологию получаемых из образцов ткани культур клеток.



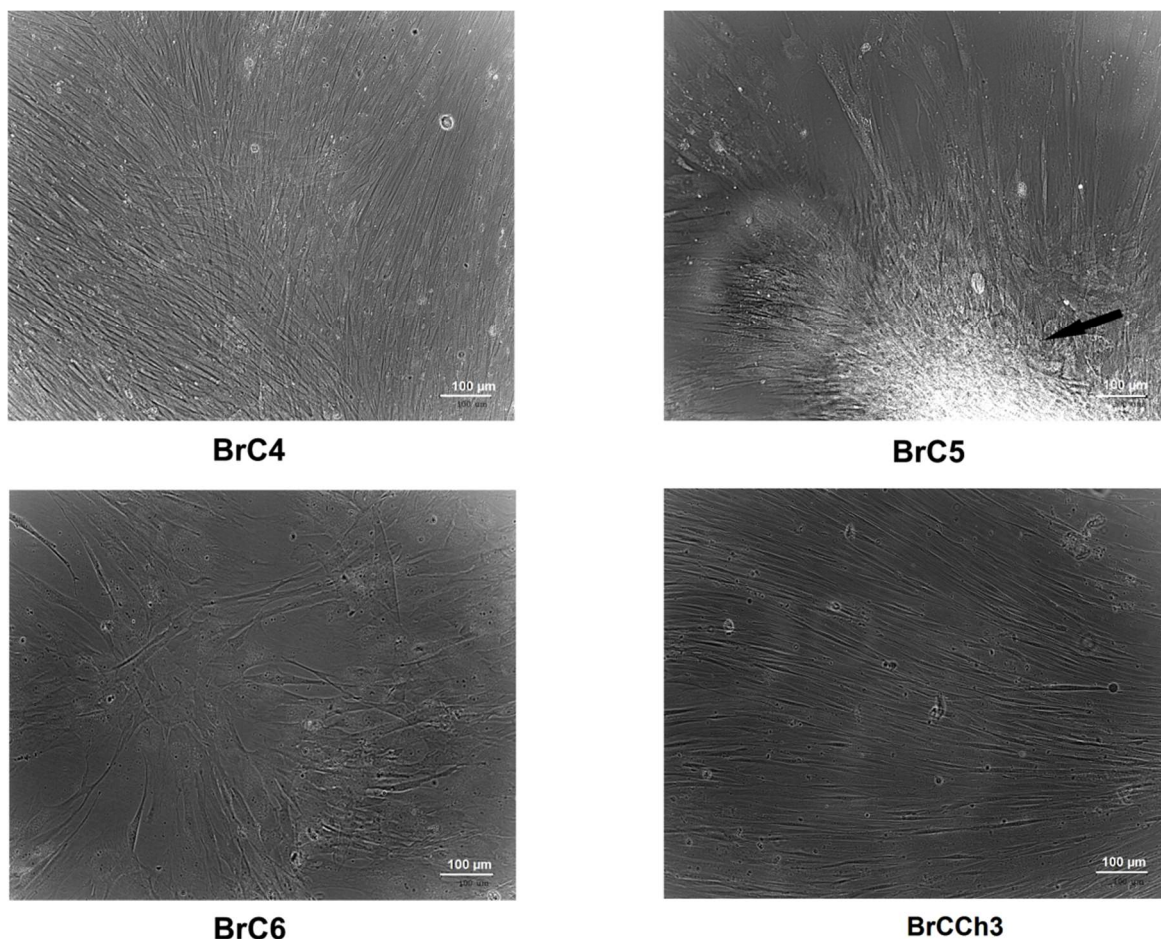
**Рис. 8.** Образование колоний эпителиоподобных клеток в культурах BrC3 и BrCCh2. Фазово-контрастная микроскопия (1й пассаж).

Адгезию и пролиферацию клеток BrC4, BrC5, BrC6, BrCCh3 и BN4 наблюдали только в случае ферментативной диссоциации коллагеназой I-го типа. На 14 сутки (1й пассаж) клетки формировали монослой и демонстрировали веретенообразный фибробластоподобный фенотип (Рис. 10).



**Рис. 9.** Фибробластоподобные культуры клеток BrC3 и BrCCh2, полученные методом ферментативной диссоциации коллагеназой IV типа. Световая микроскопия, окрашивание гематоксилином и эозином (2й пассаж).

Полученные данные позволяют заключить, что успех в получении культур клеток с применением различных техник дезагрегации ткани зависит от строения опухолевой и окружающей ткани, в том числе от специфического состава тканевых фибрилл и волокон, которые должны быть гидролизованы используемыми ферментами.

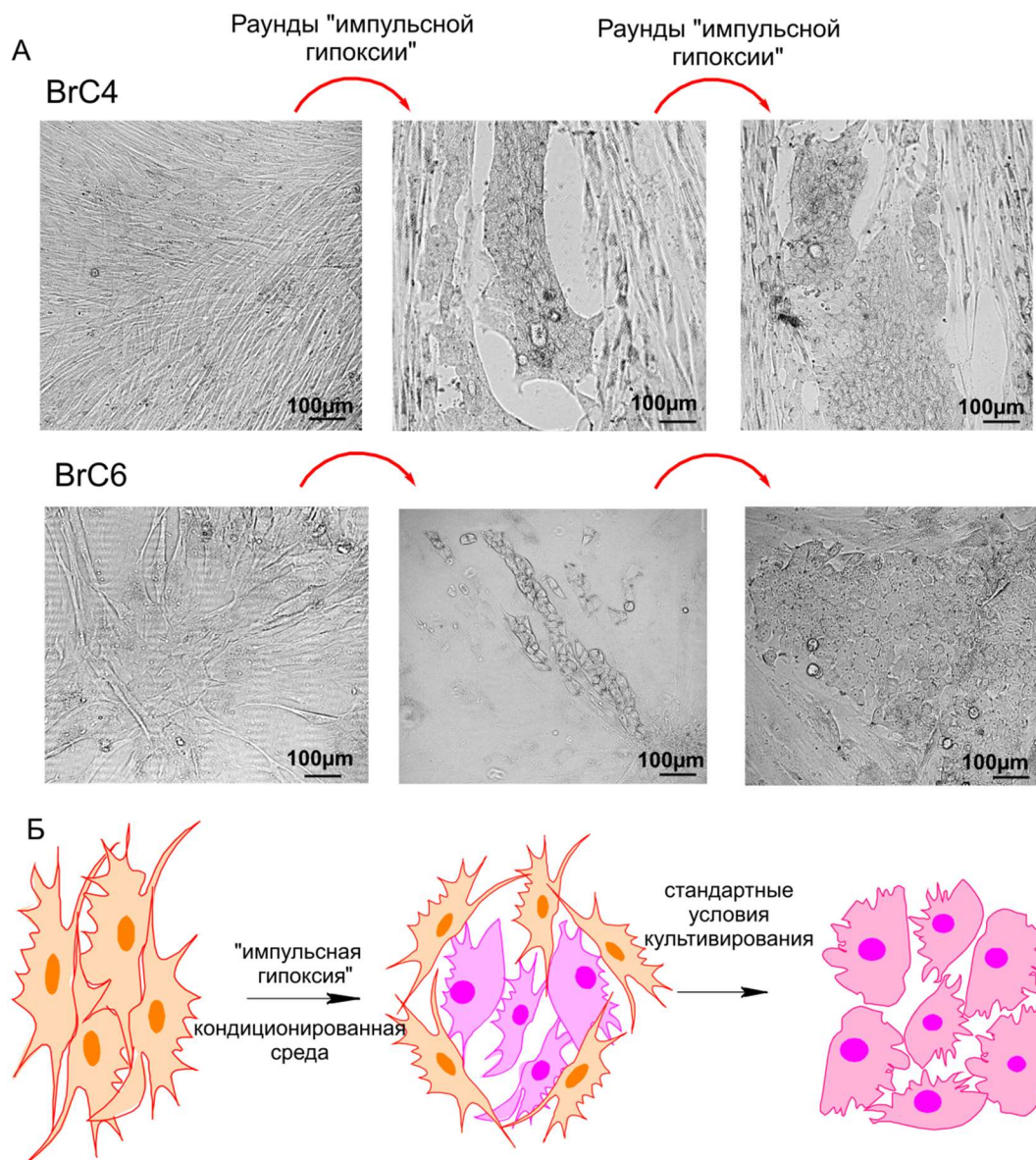


**Рис. 10.** Культуры клеток BrC4, BrC5, BrC6, BrCCh3. 14е сутки после обработки коллагеназой I-го типа. Стрелкой отмечен район выхода клеток из образца опухолевой ткани. Фазово-контрастная микроскопия (1й пассаж).

### 3.1.2.1 Метод «импульсной гипоксии»

Поскольку в задачи исследования входила разработка протокола для стабильного рутинного получения эпителиальных первичных опухолевых клеток, условия культивирования полученных фибробластоподобных клеток были модифицированы, для того, чтобы вызвать смещение фенотипа в эпителиоподобный. Известно, что гипоксия является сильным трансформирующим фактором, стимулирующим ЭМП [149]. Гипоксию

относят к особому физиологическому состоянию клетки, поддерживающему и развивающему опухолевый процесс [257]. Мы обнаружили, что четыре раунда смены концентрации кислорода от нормы до гипоксии с добавлением кондиционированной среды к фибробластоподобным клеткам BrC4, BrC6 и BrCCh3 приводили к смещению фенотипа в сторону округлых эпителиоподобных клеток BrC4 и BrC6, но не для клеток BrCCh3 (Рис. 11, А).



**Рис. 11.** Образование колоний с эпителиоподобными клетками в первичных культурах BrC4 и BrC6. **А.** Фазово-контрастная микроскопия. **Б.** Схематическое изображение наблюдаемой трансформации.

Пассирование клеток BrC4, BrC6 и BrCCh3 в присутствии кондиционированной среды от предыдущих пассажей клеток BrC4, BrC6 и BrCCh3, разбавленной ростовой средой (1:1), при стандартной концентрации  $O_2$  не индуцировало трансформацию фибробластоподобных



клеток в эпителиальные клетки. Мы назвали такие условия культивирования со сменой раундов концентрации  $O_2$  от нормального до слабой гипоксии «импульсная гипоксия». Продолжительность каждого раунда гипоксии составляла от 24 до 48 часов. На Рис. 11, Б изображена схема трансформации фенотипа, которую мы наблюдали во время культивирования при «импульсной гипоксии». Далее, при стандартных условиях культивирования, фенотипы родительских и трансформированных клеток были стабильными в течение не менее 30-ти пассажей. На основании полученных данных можно сделать вывод, что «импульсная» гипоксия имеет решающее значение для показанного процесса перехода фибробластоподобных культур в эпителиоподобных. Внешние изменения морфологии клеток соответствовали описываемому в литературе мезенхимально-эпителиальному переходу. Тем не менее, для подтверждения такого перехода необходимо дальнейшее определение экспрессии молекулярных маркеров, специфических для определенного состояния клеток. Термин “первичные” для полученных культур использовали до 3-го пассажа. Соответственно, опухоли BrC4 и BrC6 были представлены парами клеточных культур: эпителиоподобными (символ «e») и фибробластоподобными клетками (символ «f»).

Оптимизированный метод получения эпителиальных культур клеток с высокой жизнеспособностью из образцов опухолевой ткани может быть распространен и на другие опухоли, обогащенные фиброзными образованиями. Кроме того, частичное сохранение жировой ткани, сохранение клеток, диссоциированных от фрагментов опухоли в транспортировочных и отмывочных буферных растворах, позволяет повысить сохранность клеточной массы для получения первичных культур клеток.

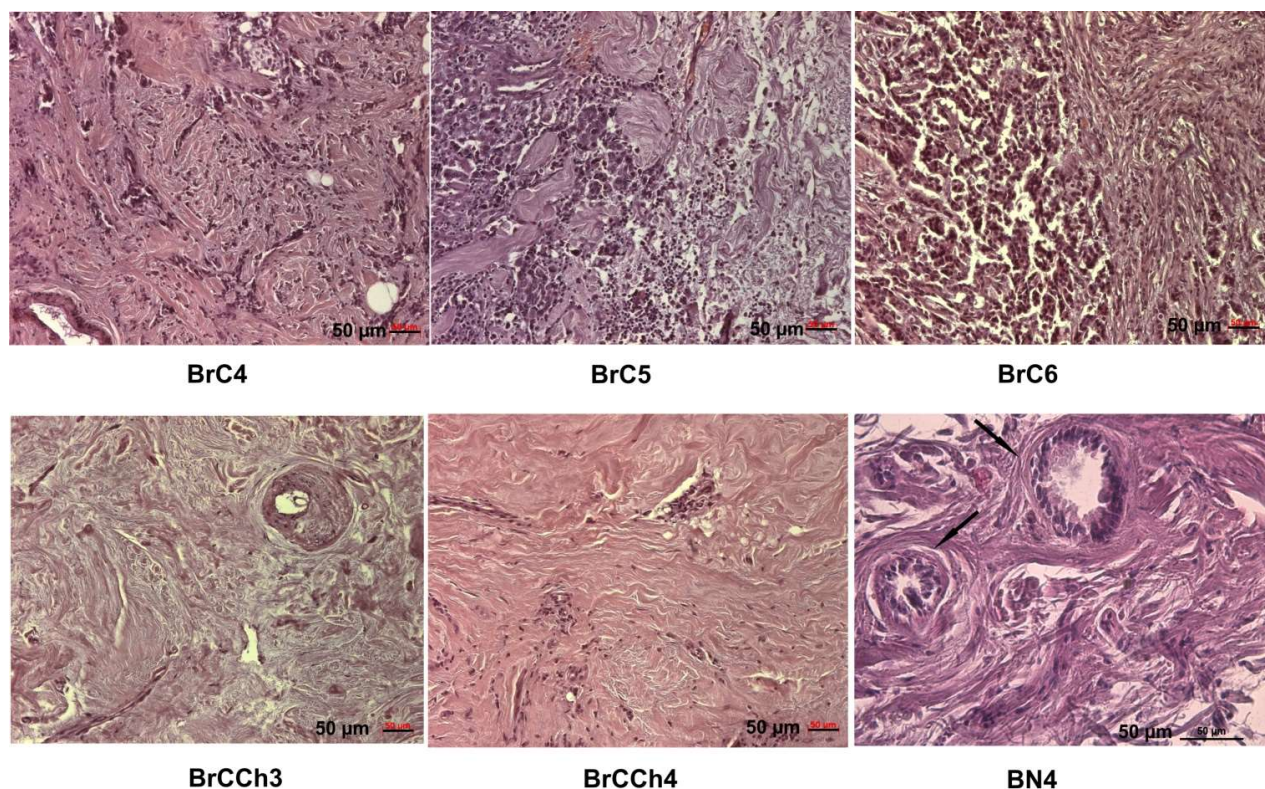
Полученные данные позволяют предположить, что такой оптимизированный подход к выделению и последующему культивированию эпителиальных клеток из опухоли пациента будет эффективным с точки зрения получения жизнеспособных клеток с эпителиальным фенотипом.

### *3.1.2.2 Сопоставление гистологического строения фрагментов ткани молочной железы с морфологией получаемых культур клеток*

Молочная железа представляет собой тубуло-альвеолярную структуру, состоящую из ветвящейся сети протоков. Эти протоки состоят из двух слоев первичных эпителиальных клеток: внутренняя часть состоит из люминальных эпителиальных клеток, которые могут продуцировать молоко во время лактации, а внешний слой содержит миоэпителиальные клетки, обеспечивающие сократительную способность протоков [258]. Эти две основные

клеточные популяции окружены базальной мембраной и внедрены во внеклеточный матрикс. Внеклеточный матрикс состоит из клеток различного происхождения, в том числе макрофагов, фибробластов, адипоцитов, эндотелиальных клеток и других клеток иммунной системы, которые вместе составляют микроокружение ткани [258]. Поэтому, клеточная гетерогенность присутствует не только в онкотрансформированных тканях молочной железы, но и в нормальной молочной железе человека [259].

Для дальнейшей характеристики полученных культур, важно провести сопоставление фенотипа клеток в исходных опухолевых образцах и полученных культурах клеток. Для этого, из исходных образцов опухолевой и нормальной ткани молочной железы готовили парафиновые блоки, которые далее нарезали микротомом на срезы толщиной 400–500 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином.

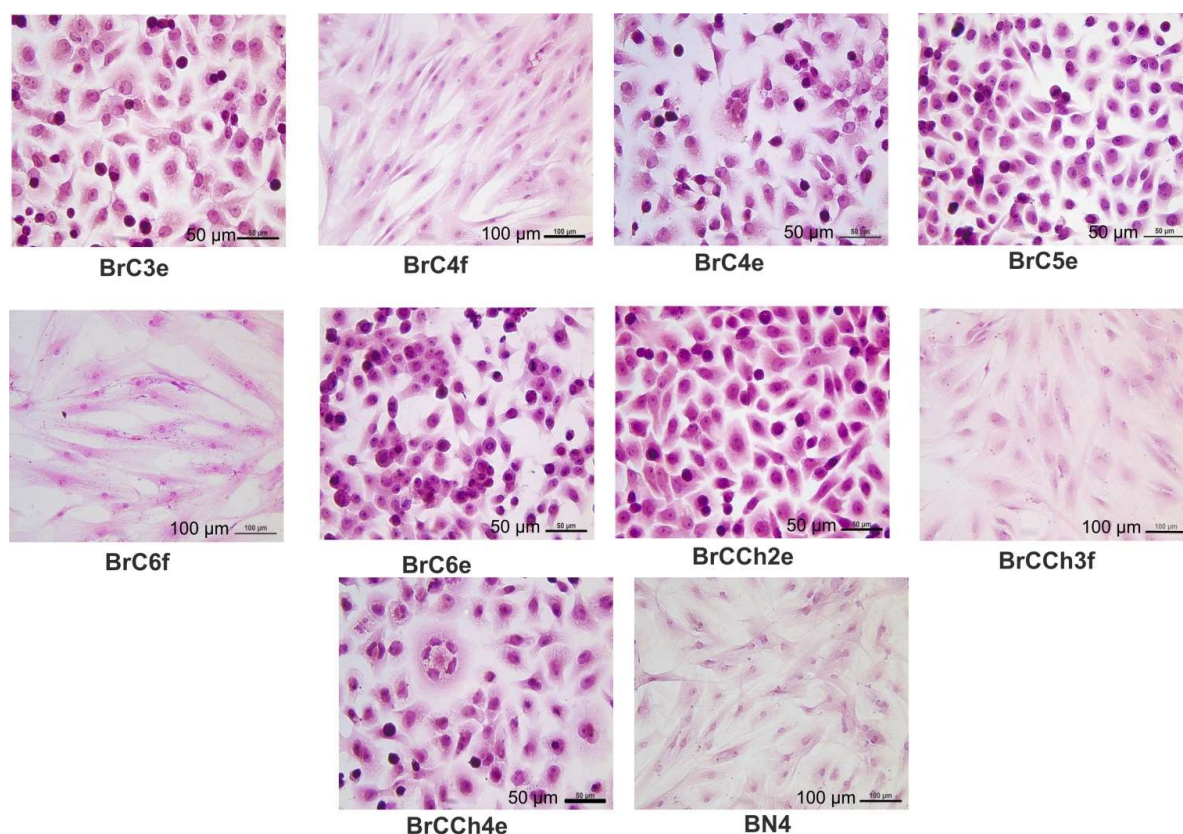


**Рис. 12.** Гистологический анализ образцов опухолей. Срезы ткани окрашены гематоксилином и эозином. Световая микроскопия, увеличение 126х. Стрелками указаны протоки молочной железы.

Сравнение гистологического строения образцов BrC4, BrC5, BrC6, BrCCh3 и BN4, из которых были получены культуры клеток с использованием коллагеназы IV типа показал, что образец BrCCh3, из которого не удалось получить культуру с эпителиальным фенотипом, был преимущественно представлен волокнами с одиночными эпителиальными клетками,

тогда как остальные образцы были обогащены клетками с эпителиальным фенотипом (Рис. 12). Таким образом, можно заключить, что неудача в получении эпителиальной культуры BrCCh3 наиболее вероятно связана с исходным источником клеток. При сравнении опухолевых образцов и образца здоровой ткани молочной железы, в последнем хорошо видны протоки молочной железы, тогда как в опухолевых строение молочной железы сильно изменено.

Для визуализации морфологии полученных культур опухолевых и нетрансформированных клеток, клетки выращивали на предметных стеклах и затем окрашивали гематоксилином и эозином (Рис. 13). Клетки культур BrC3e, BrC5e, BrCCh2e и BrCCh4e обладают преимущественно эпителиальным фенотипом, в то время как BrCCh3f и BN4 были представлены фибробластоподобными клетками. В Таблице 9 приведено сопоставление методов диссоциации опухолевой ткани с полученным фенотипом клеток.



**Рис. 13.** Морфология персональных культур клеток молочной железы. Окрашивание гематоксилином и эозином на 4-5-м пассаже. Световая микроскопия. Для эпителиальных клеток увеличение 252х, для фибробластоподобных клеток – 126х.

Анализ полученных данных позволяет заключить, что неферментативный метод дезагрегации ткани, описанный в работе, позволяет получать культуры клеток с эпителиальным фенотипом.

**Таблица №9.** Соответствие методов получения персональных культур клеток и их морфологии

Культура	Метод	
	<i>Диссоциация коллагеназой/ Фенотип</i>	<i>Без коллагеназы/ Фенотип</i>
BrC3	+ / f	+ / e
BrC4	+ / f	н/а
BrC5	+ / f	н/а
BrC6	+ / f	н/а
BrCCh2	+ / f	+ / e
BrCCh3	+ / f	+ / f
BrCCh4	+ / (-)	+ / e
BN4	+ / f	н/а

f – фибробластноподобная морфология; e – эпителиоподобная морфология

### 3.3 Молекулярный профиль первичных культур клеток нормальной и онкотрансформированной ткани эндометрия и молочной железы

Современные подходы лечения ЗОМЖ и ЗОЭ основаны на выявлении молекулярных подтипов опухолей. Только экспрессия рецепторов (ER $\alpha$ , ER $\beta$ , PR и ERBB2/HER2), позволяет классифицировать опухоли молочной железы как минимум на шесть подтипов (Таблица 3) [260]. В то же время, клинические рекомендации Европейского Общества Медицинской Онкологии (ESMO) при определении подтипа ЗОМЖ рекомендуют дополнительно использовать маркер пролиферации клеток Ki-67 [261]. Американское общество клинической онкологии (ASCO) также рекомендует включать при трижды негативных ЗОМЖ анализ уровня эпидермального фактора роста EGFR [262]. Профили экспрессии мРНК указанных генов в некоторой степени позволяют прогнозировать ответы на гормоно- и химиотерапию [259]. Для опухолей молочной железы и эндометрия, содержащих рецепторы эстрогенов и/или прогестерона дополнительным молекулярным маркером является экспрессия ароматазы [263]. На основании данных об экспрессии

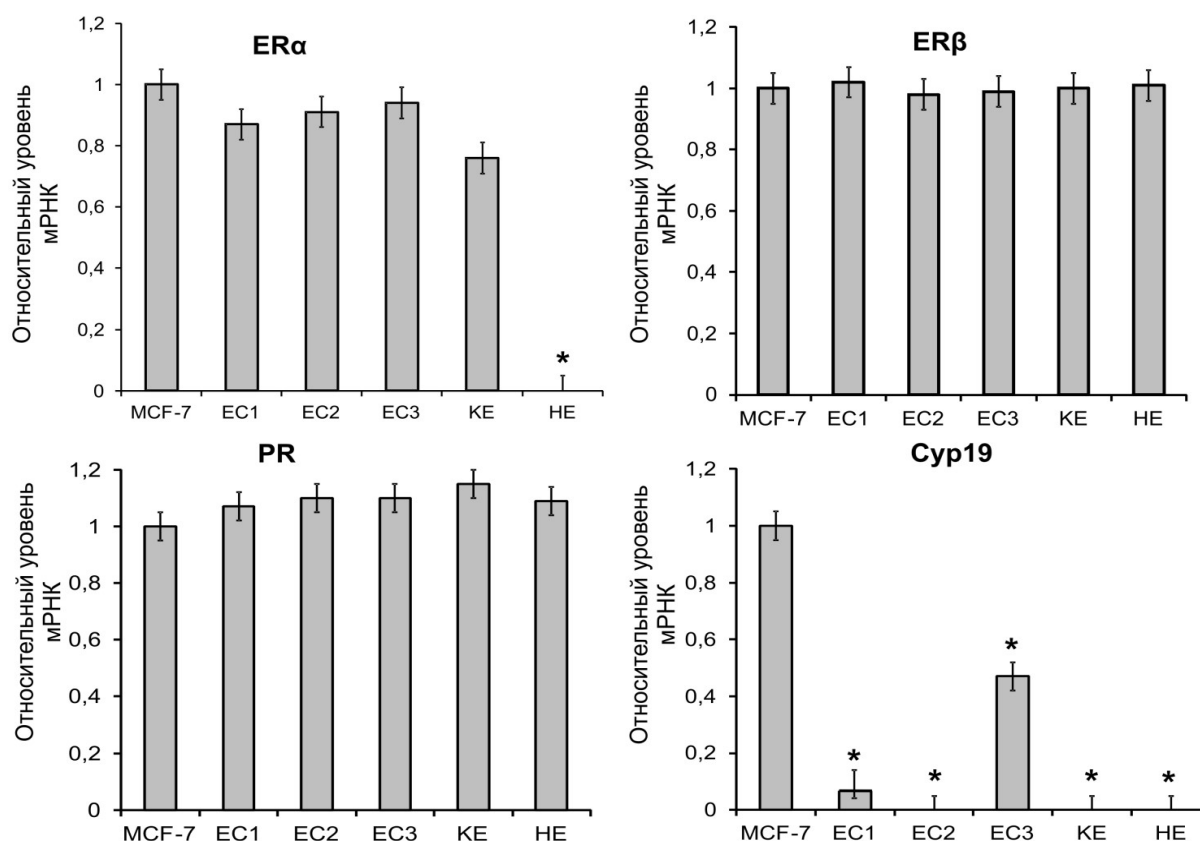
ароматазы для лечения опухолей эндометрия и молочной железы применяют ингибиторы ароматазы при адъювантной гормонотерапии у больных с неблагоприятным прогнозом.

### ***3.3.1 Молекулярный профиль первичных культур клеток из нормальной и онкотрансформированной ткани эндометрия***

Регуляция роста и развития гормон-зависимых тканей, таких как эндометрий и молочная железа, происходит вследствие взаимодействия гормона и клеточного рецептора. ER $\alpha$  и ER $\beta$  относятся к суперсемейству ядерных рецепторов, в частности к семейству стероидных рецепторов, которые действуют как лиганд-регулируемые транскрипционные факторы [264]. В присутствии эстрогенов происходит запуск пролиферации клеток, экспрессирующих ER $\alpha$ . ER $\beta$  является антагонистом ER $\alpha$  и тормозит ER $\alpha$ -опосредованную пролиферацию во многих типах клеток. Гиперэкспрессия ER $\alpha$  в нормальной ткани увеличивает чувствительность к эстрогенам, что увеличивает риск возникновения гормонозависимой опухоли. Важнейшей стадией формирования специфической структуры эстрогенов является ароматизация кольца А при превращении андрогенов в эстрогены путем отщепления метильной группы [265]. Реакцию ароматизации осуществляет ферментный комплекс, имеющий в своем составе уникальный цитохром P450 - ароматазу, продукт гена Cyp19 [266]. Гиперэкспрессию ароматазы рассматривают как один из патофизиологических факторов развития опухолей женской репродуктивной системы и молочной железы.

Для определения молекулярного профиля персональных культур эндометрия анализ экспрессии генов ER $\alpha$ , ER $\beta$ , PR и Cyp19 проводили методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени на 2 -3 м пассажах. Для этого выделяли суммарную клеточную РНК с помощью реагента Trizol® (Invitrogen, США) согласно руководству производителя. Степень загрязнения образцов РНК белками оценивали по величине отношения D260/D280. Приемлемой степенью очистки считали  $D260/D280 \geq 1.6$ . В качестве внутреннего контроля, относительно которого проводилось нормирование продуктов амплификации исследуемого гена, был использован ген «домашнего хозяйства» глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (GAPDH). Использование гена внутреннего контроля необходимо для нормализации количества мРНК целевого гена в реакции обратной транскрипции. Эксперименты проводили в трех независимых повторах. Порог детекции (C<sub>T</sub>) для каждой реакции определялся автоматически программой для анализа результатов iQ5 software (BioRad, США). Относительный уровень экспрессии целевых мРНК в полученных культурах клеток эндометрия представлен в виде гистограмм (Рис. 14). В качестве эталонной экспрессии указанных генов за единицу был взят уровень экспрессии этих генов в клетках

аденокарциномы молочной железы MCF-7. Такая относительная нормализация возможна, так как известно, что клетки MCF-7 являются гормонозависимыми и экспрессируют мРНК генов PGR и ER $\alpha$ . На Рис. 14 представлены данные относительного уровня экспрессии генов ER $\alpha$ , ER $\beta$ , PR и Cyp19 в полученных культурах клеток эндометрия.



**Рис. 14.** Относительный уровень экспрессии мРНК ER $\alpha$ , ER $\beta$ , PR и Cyp19 в первичных культурах клеток эндометрия. Уровень транскриптов анализировали методом ОТ-ПЦР в реальном времени со специфическими праймерами и нормализовали к мРНК GAPDH. ER - рецептор эстрогена, PR - рецептор прогестерона, Cyp19 - ароматаза. Данные представлены как среднее значение 3х независимых экспериментов  $\pm$  SD. Относительный уровень мРНК в культурах клеток эндометрия и клетках MCF-7 достоверно отличался при  $p < 0.05$  (\*).

Можно видеть, что все персональные культуры клеток эндометрия экспрессируют мРНК ER $\alpha$  за исключением первичной культуры клеток гиперплазии эндометрия HE, и все без исключения экспрессируют мРНК ER $\beta$  и PR. Для мРНК Cyp19 в полученных культурах клеток детектировалась дифференцированная экспрессия: клетки культуры EC3 были выражено Cyp19–положительными, клетки EC1 были слабо Cyp19–положительными, остальные клетки не экспрессировали мРНК Cyp19. Сравнивая рецепторы ER и PR в

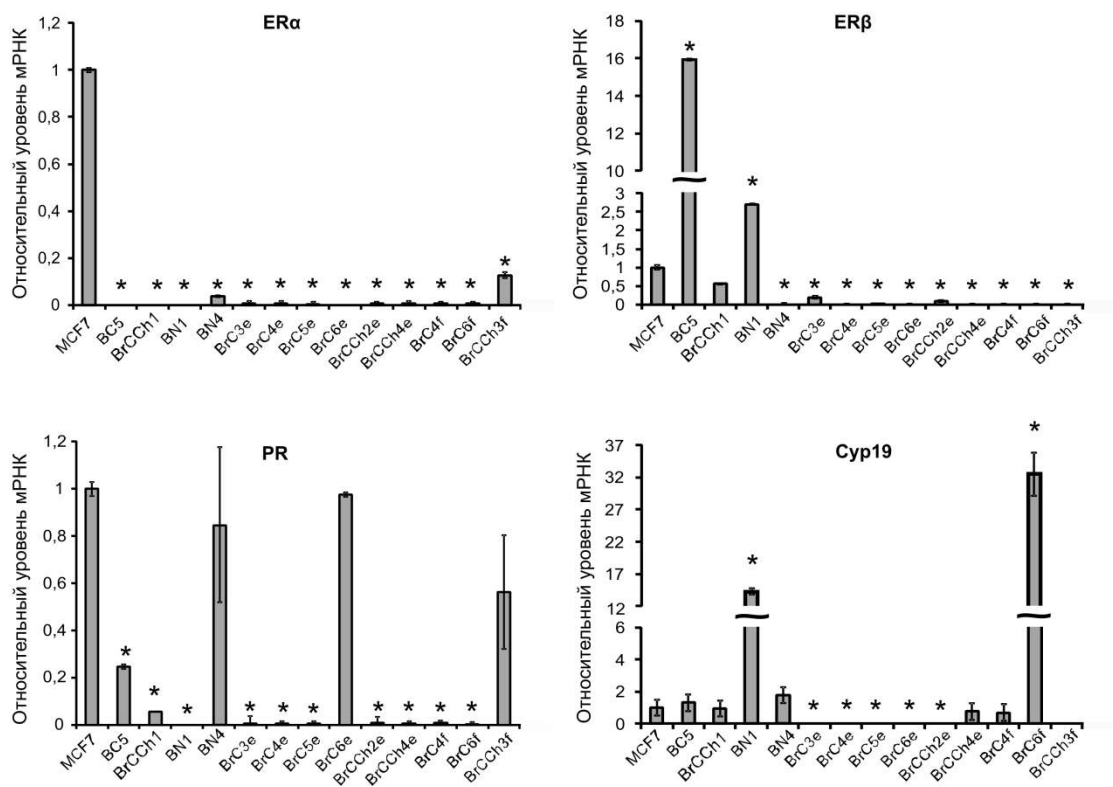
исходных опухолях (Табл. 7) и полученных культурах (Рис. 14) можно заключить, что культуры опухолевых клеток эндометрия сохраняли профиль экспрессии рецепторов стероидных гормонов исходных опухолей.

ER $\alpha$  играет важную роль в дифференцировке и пролиферации эпителиальных клеток, тогда как ER $\beta$  моделирует экспрессию ER $\alpha$ , оказывая антипролиферативное действие в клетках эндометрия матки [267]. Тем не менее, факт дисбаланса в соотношении ER $\alpha$ /ER $\beta$  при патологии в сравнении с нормой не является четким доказательством опухолевой прогрессии [268]. Как правило, присутствие ER $\alpha$  в опухоли эндометрия связывают с менее агрессивным фенотипом. Все полученные культуры опухолевых клеток эндометрия были ER- и PR-положительными и могут быть описаны как гормон-зависимые опухоли. Клетки нормального эндометрия также экспрессировали мРНК рецепторов эстрогена и прогестерона. Известно, что между ферментативной активностью ароматазы в клетках человека и уровнем мРНК Cyp19 существует прямая зависимость [269]. Ватанабе и др. продемонстрировали, что экспрессия активной ароматазы в опухолях эндометрия выявляется в стромальных клетках, но не в клетках опухоли [270] и коррелирует с плохим прогнозом [271]. Мы обнаружили, что только одна из персональных опухолевых культур эндометрия ЕС3 экспрессирует мРНК ароматазы на уровне, близком к уровню клеток MCF-7. Эти данные позволяют предположить, что клетки культуры ЕС3 могут быть чувствительны к ингибиторам ароматазы.

### ***3.3.2 Молекулярный профиль полученных культур клеток нормальной и онкотрансформированной молочной железы***

Анализ экспрессии мРНК генов ER $\alpha$ , ER $\beta$ , PR и Cyp19 в культурах клеток молочной железы проводили методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени, аналогично анализу для культур клеток эндометрия. На Рис. 15 представлены данные об относительном уровне экспрессии мРНК всех четырех генов в полученных культурах клеток молочной железы. Экспрессию мРНК ER $\alpha$  детектировали только в двух культурах клеток- BrCCh3f и BN4, которые обладали фибробластоподобной морфологией. Мы обнаружили, что самый высокий уровень экспрессии мРНК ER $\beta$  был в клетках культуры BC5, что превышает в 16 раз мРНК ER $\beta$  в клетках линии MCF-7. Экспрессия мРНК PR была сопоставима в клетках MCF-7 и в культурах BrC6e, BrCCh3f, BN4. Экспрессия мРНК Cyp19 в клетках BC5, BrCCh1, BrCCh4e, BrC4f и BN4 была сходной с экспрессией в клетках MCF-7, в то время как клетки BN1 и BrC6f экспрессировали мРНК Cyp19 на высоком уровне. В Таблице 10 суммированы данные по молекулярным фенотипам первичных культур клеток в соответствии с экспрессией мРНК генов ER $\alpha$ , ER $\beta$ , PR и Cyp19.

Было обнаружено, что только фибробластоподобные клетки BrCCh3f и BN4 имели фенотип ER $\alpha$ <sup>+</sup>/PR<sup>+</sup>, а BC5 и BrCCh1 - ER $\beta$ <sup>high</sup>/PR<sup>+</sup>, таким образом, большинство полученных культур клеток молочной железы можно охарактеризовать как гормон-независимые. Сравнение молекулярного профиля рецепторов стероидных гормонов в образцах опухоли (Табл. 7, 8) и полученных опухолевых культурах клеток молочной железы (Рис. 15) позволяет заключить, что полученные культуры молочной железы утрачивают экспрессию рецепторов стероидных гормонов.



**Рис. 15.** Относительный уровень экспрессии мРНК ER $\alpha$ , ER $\beta$ , PR и Cyp19 в первичных культурах клеток молочной железы человека. Уровень транскриптов анализировали методом ОТ-ПЦР в реальном времени со специфическими праймерами и нормализовали к мРНК GAPDH. ER - рецептор эстрогена, PR - рецептор прогестерона, Cyp19 - ароматаза. Данные представлены как среднее значение 3х независимых экспериментов  $\pm$  SD. Относительный уровень мРНК в культурах клеток эндометрия и клетках MCF-7 достоверно отличался при  $p < 0.05$  (\*).

**Таблица 10.** Молекулярный фенотип полученных культур клеток молочной железы

Культура клеток	Молекулярный фенотип	Зависимость от гормонов
BN1	PR <sup>low</sup> /ER $\beta$ <sup>low</sup> /ER $\alpha$ <sup>-</sup> /Cyp19 <sup>high</sup>	гормон-зависимая



<b>BN4</b>	PR <sup>high</sup> /ERβ <sup>-</sup> /ERα <sup>low</sup> /Cyp19 <sup>low</sup>	гормон-зависимая
<b>BC5</b>	PR <sup>low</sup> /ERβ <sup>high</sup> /ERα <sup>-</sup> /Cyp19 <sup>low</sup>	гормон-зависимая
<b>BrCCh1</b>	PR <sup>low</sup> /ERβ <sup>high</sup> /ERα <sup>-</sup> /Cyp19 <sup>low</sup>	гормон-зависимая
<b>BrC3e</b>	PR <sup>-</sup> /ERβ <sup>low</sup> /ERα <sup>-</sup> /Cyp19 <sup>-</sup>	гормон-независимая
<b>BrC4e</b>	PR <sup>-</sup> /ERβ <sup>-</sup> /ERα <sup>-</sup> /Cyp19 <sup>-</sup>	гормон-независимая
<b>BrC5e</b>	PR <sup>-</sup> /ERβ <sup>-</sup> /ERα <sup>-</sup> /Cyp19 <sup>-</sup>	гормон-независимая
<b>BrC6e</b>	PR <sup>high</sup> /ERβ <sup>-</sup> /ERα <sup>-</sup> /Cyp19 <sup>-</sup>	гормон-зависимая
<b>BrCCh2e</b>	PR <sup>-</sup> /ERβ <sup>low</sup> /ERα <sup>-</sup> /Cyp19 <sup>-</sup>	гормон-независимая
<b>BrCCh4e</b>	PR <sup>-</sup> /ERβ <sup>-</sup> /ERα <sup>-</sup> /Cyp19 <sup>-</sup>	гормон-независимая
<b>BrC4f</b>	PR <sup>-</sup> /ERβ <sup>-</sup> /ERα <sup>-</sup> /Cyp19 <sup>low</sup>	гормон-независимая
<b>BrC6f</b>	PR <sup>-</sup> /ERβ <sup>-</sup> /ERα <sup>-</sup> /Cyp19 <sup>low</sup>	гормон-независимая
<b>BrCCh3f</b>	PR <sup>high</sup> /ERβ <sup>-</sup> /ERα <sup>low</sup> /Cyp19 <sup>-</sup>	гормон-зависимая

Аберрантную репрессию рецептора ERα относят к ключевому фактору, способствующему развитию и прогрессированию опухолей молочной железы и ухудшению клинического прогноза пациентов с метастатическими ЗОМЖ [272]. По данным медицинской статистики, при опухолях молочной железы часто наблюдается ко-экспрессия ERα и ERβ так что 55% ERα-положительных ЗОМЖ также экспрессируют ERβ. Остальные ERα-положительные опухоли молочной железы (около 15% от общего числа опухолей молочной железы) являются ERβ-негативными. Высокая активность ароматазы может встречаться как при ER-негативных, так и при ER-положительных опухолях молочной железы. Поскольку большинство полученных культур клеток ЗОМЖ являются ERα-негативными, можно заключить, что рецепторный статус культур клеток не позволяет прогнозировать ответ опухоли на гормональную терапию.

### 3.3.2.1 Анализ рецепторов семейства эпидермального фактора роста (ErbB)

Рецепторы HER2 и HER3 являются представителями семейства EGFR. Рецептор HER2 кодируется геном erbB2, и в отличие от других представителей семейства не имеет специфического лиганда. Тем не менее, рецептор обладает как лиганд-независимой, так и лиганд-зависимой тирозинкиназной активностью [273]. Гиперэкспрессия тирозинкиназ HER2 (CD340) и HER3 в опухолях молочной железы и эндометрия ассоциирована со снижением общей выживаемости пациентов.

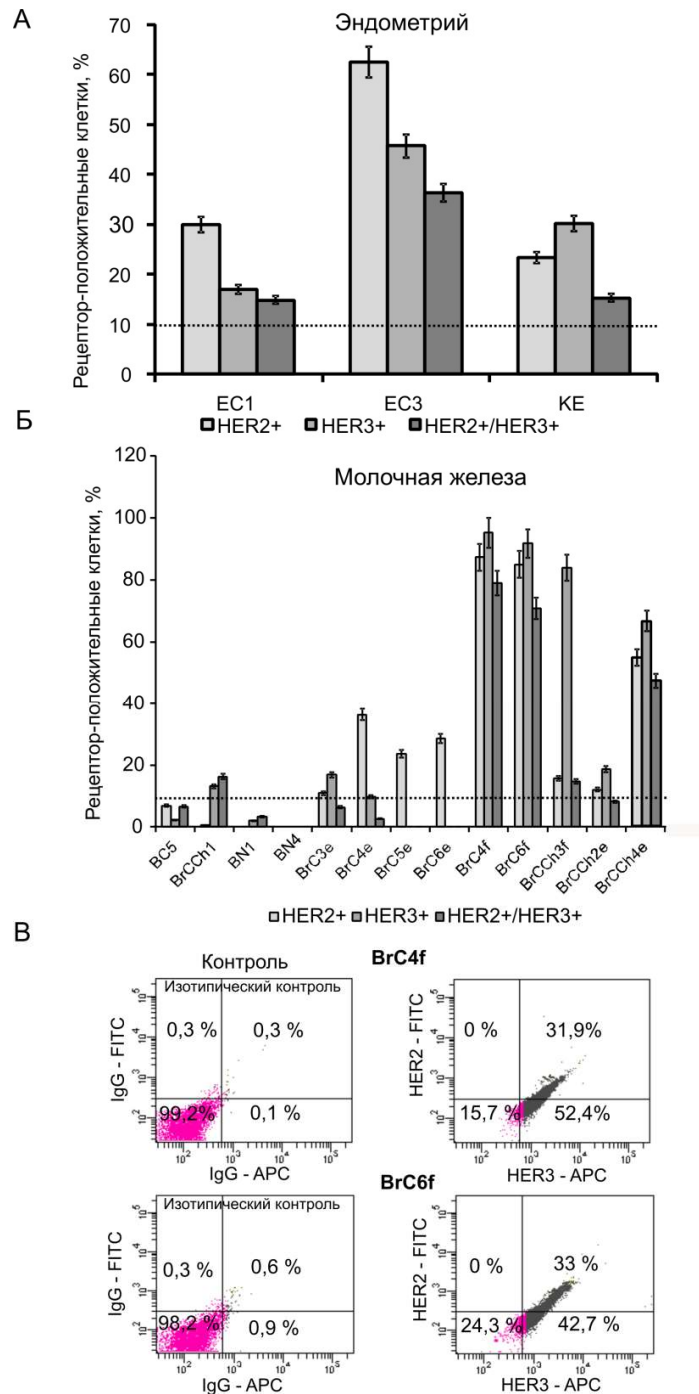
Поверхностную экспрессию HER2 и HER3 в культурах клеток эндометрия и молочной железы анализировали методом проточной цитометрии с применением моноклональных

антител (Рис. 16). Рецептор-положительными считали культуры, в которых доля HER2<sup>+</sup> клеток была более 10% клеток, в соответствии с рекомендациями ASCO (Американское общество клинической онкологии); аналогично предельное значение в 10% было использовано для определения HER3<sup>+</sup> культур [274]. Высокое содержание HER2-положительных клеток было обнаружено в культуре EC3, при этом, процент дважды-положительных (HER2<sup>+</sup>/HER3<sup>+</sup>) клеток также был высокий – около 35% (Рис. 16, А). Таким образом, можно предположить, что клетки EC3 будут чувствительны к ингибиторам рецептора HER2.

При анализе содержания HER2<sup>+</sup> и HER3<sup>+</sup> клеток в полученных культурах молочной железы условно можно провести разделение культур на три группы, одна из которых содержала высокую долю HER2<sup>+</sup> и HER3<sup>+</sup> клеток, вторая состояла из HER2<sup>+</sup>/HER3<sup>-low</sup> клеток, а клетки третьей группы имели фенотип HER2<sup>-</sup>/HER3<sup>-</sup>. Группу с двойной положительной экспрессией HER2<sup>high</sup>/HER3<sup>high</sup> представляли клетки с фибробластоподобной морфологией - BrC4f и BrC6f (Рис. 16, Б, В). Клетки культур BrC4e, BrC5e и BrC6e были HER3-отрицательными с умеренной экспрессией HER2. В свою очередь культуры BrCCh1, BrC3e и BrCCh2e были представлены клетками с незначительным содержанием HER3 и HER2. Клетки культур здоровой молочной железы BN1 и BN4 и опухолевой культуры BC5 не содержали поверхностных рецепторов HER2 и HER3 (Рис. 16, Б). Известно, что пролиферативная активность опухолевых клеток молочной железы в опухолях с HER2<sup>+</sup>-положительными клетками связана с гиперэкспрессией ErbB2 [275]. Несмотря на то, что в культурах BrC4f и BrC6f доля HER2<sup>+</sup>/HER3<sup>+</sup> клеток была наибольшей, их дочерние клетки BrC4e и BrC6e полностью утратили HER3. Таким образом, трансформация фенотипа культур BrC4f и BrC6f из фибробластоподобного в эпителиоподобные культуры BrC4e и BrC6e сопровождалось потерей HER3. Гетеродимер HER2/HER3 является одной из ключевых онкогенных единиц, связанных со снижением безрецидивной и общей выживаемости [276]. Для культур, исходно проявлявших эпителиальный фенотип, также был показан сниженный уровень HER3, за исключением культуры BrCCh4e. Поскольку рецептор HER2 является подтвержденной мишенью для различных таргетных препаратов – от малых ингибиторов до CAR-NK и CAR-T клеток (содержащих CAR к HER2), полученные культуры клеток, экспрессирующие HER2, могут быть моделями для тестирования новых HER2-направленных препаратов.

Помимо HER2, рецептор эпидермального фактора роста EGFR (HER1) также может оказывать влияние на опухолевую прогрессию. Экспрессия EGFR является независимым отрицательным прогностическим фактором при трижды негативных ЗОМЖ [277]. Опухоли с гиперэкспрессией EGFR являются целевой группой для терапии ингибиторами EGFR [278].

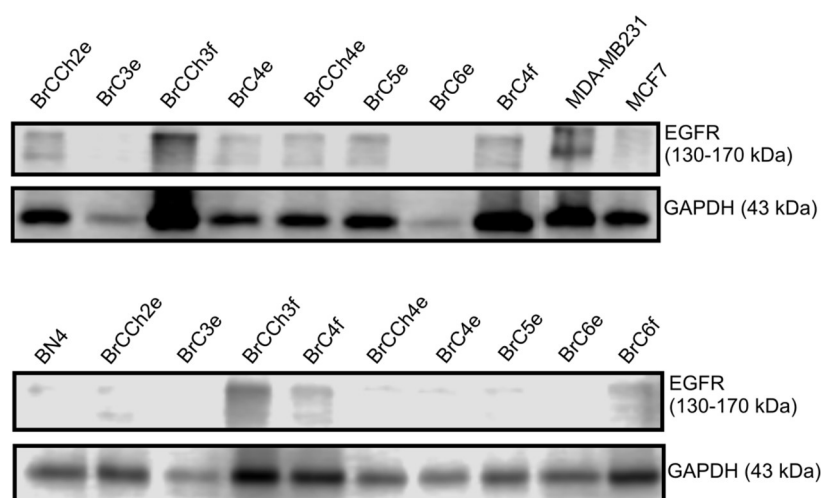
Таким образом, определение уровня EGFR в клетках полученных культур является дополнительной прогностической характеристикой.



**Рис. 16.** Анализ поверхностных рецепторов HER2 и HER3 в культурах клеток эндометрия и молочной железы методом проточной цитофлуориметрии. **А.** Содержание HER2- и HER3- положительных клеток в культурах эндометрия. Пунктирная линия указывает пороговое положительное значение (10%, рекомендация ASCO). **Б.** Содержание HER2- и HER3- положительных клеток в культурах молочной железы. **В.** Типичный пример

анализа содержания HER2 и HER3 методом проточной цитометрии. Гейтирование проводили таким образом, чтобы HER2/HER3–негативная популяция клеток находилась в нижнем левом квадрате. Клетки из правого верхнего квадрата были учтены как двойная положительная HER2<sup>+</sup>/HER3<sup>+</sup> популяция.

Определение белка EGFR в лизатах клеток проводили методом вестерн блота (Рис. 17). В качестве референсных культур использовали гормон-зависимую культуру MCF-7 и гормон-независимую культуру MDA-MB 231. Можно отметить, что обладающие эпителиальным фенотипом культуры клеток BrC3e и BrC6e не содержат белок EGFR, либо содержат его мутантную форму, не выявляемую используемыми антителами. При этом все фибропластоподобные клетки, полученные из опухолевых образцов ткани, отличались высоким содержанием белка EGFR. Клетки культуры из нетрансформированной ткани молочной железы BN4 не содержали белок EGFR. На основании полученных данных можно сделать вывод, что среди исследуемых культур именно фибропластоподобные культуры ЗОМЖ, в том числе MDA-MB-231 являются EGFR–положительными, а эпителиоподобные клетки, в том числе и MCF-7 слабоположительными или негативными по содержанию EGFR.

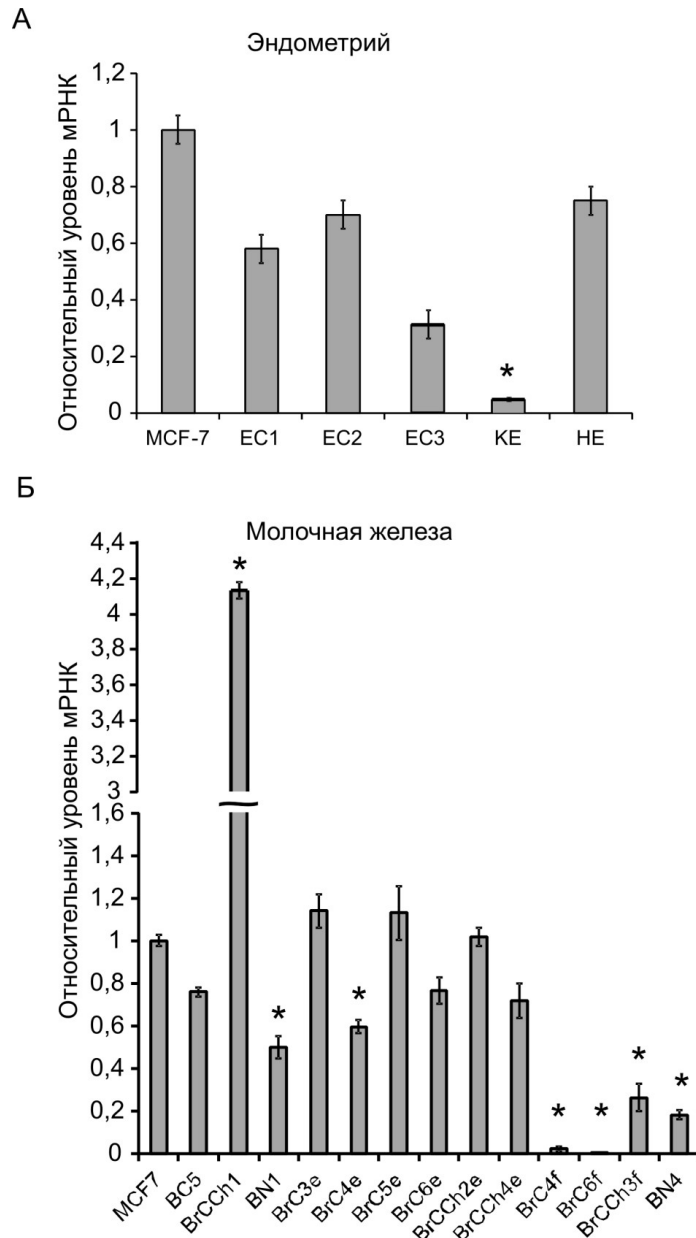


**Рис. 17.** Вестерн блот анализ белка EGFR в образцах клеток культур молочной железы человека.

Таким образом, опухолевые культуры клеток BrCCh3f, BrC4f, BrC6f, BrC4e, BrC5e и BrCCh4e могут быть использованы как модели для тестирования таргетных препаратов, направленных на EGFR.

### 3.3.3 Анализ Ki-67 в культурах клеток молочной железы и эндометрия

Неограниченная пролиферация является отличительной характеристикой злокачественных новообразований и может быть оценена различными методами, такими как определение числа клеток в состоянии митозов на гистологическом срезе, эффективность включения меченых нуклеотидов в ДНК, оценка проточной цитометрией относительного числа клеток в S-фазе клеточного цикла и другими [279].



**Рис. 18.** Относительный уровень экспрессии мРНК Ki-67 в культурах клеток эндометрия (А) и молочной железы человека (Б). Уровень транскриптов анализировали методом ОТ-ПЦР в реальном времени со специфическими праймерами и нормализовали к мРНК GAPDH. Данные представлены как среднее значение 3х независимых экспериментов

± SD. Отличия между уровнем мРНК в MCF-7 и персональных культурах клеток считали достоверным при  $p < 0.05$  (\*). Относительный уровень мРНК в культурах клеток и клетках MCF-7 достоверно отличался при  $p < 0.05$  (\*).

Ядерный белок Ki-67 присутствует во всех активно пролиферирующих клетках, что позволяет использовать его как маркер пролиферации при постановке онкологического диагноза [280]. Резкое снижение уровня Ki-67 происходит на поздних стадиях митоза во время анафазы и телофазы [281], поэтому в популяции опухолевых клеток с высоким митотическим индексом основная часть клеток Ki-67–положительная. Ki-67 входит в перечень из 21-го гена, включенных в панель Oncotype DX™ (Genomic Health), которую используют для выбора стратегии химиотерапии и прогнозирования риска рецидива у женщин с опухолями молочной железы [282]. Показано, что экспрессия Ki-67 ассоциирована с гистотипами и стадией опухолевой прогрессии при ЗОЭ и ЗОМЖ [283].

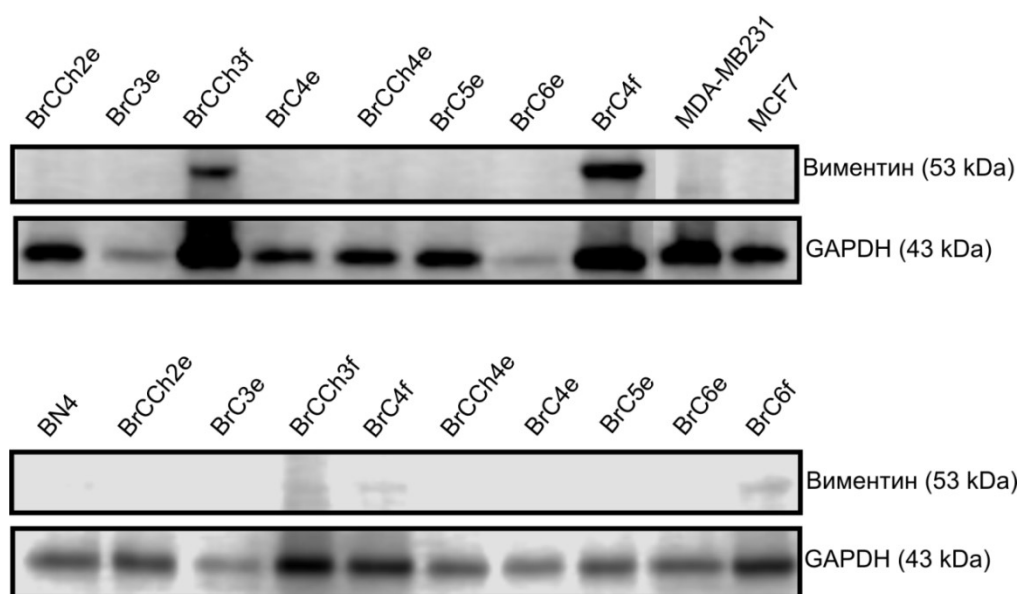
Для анализа уровня Ki-67 в полученных культурах клеток эндометрия и молочной железы использовали метод ОТ-ПЦР в режиме реального времени со специфическими праймерами. На Рис. 18, А представлен относительный уровень экспрессии мРНК Ki-67 в культурах клеток эндометрия. Как видно из рисунка, в опухолевых культурах клеток EC1, EC2 и EC3 экспрессия мРНК Ki-67 отличается незначительно. В культуре клеток гиперплазии эндометрия HE, обладающей самой высокой скоростью пролиферации по данным xCelligence (Рис. 6), был наиболее высокий уровень экспрессии мРНК Ki-67 (Рис. 18 А). В клетках культуры здорового эндометрия KE уровень экспрессии мРНК Ki-67 был наименьшим, и эти данные также сочетаются с данными о пролиферации клеток KE (Рис. 6).

При исследовании экспрессии мРНК Ki-67 в культурах клеток молочной железы (Рис. 18, Б) выявлено, что максимально высокий уровень мРНК Ki-67 был в клетках культуры BrCCh1. Поскольку культура BrCCh1 получена из ткани рецидивирующей опухоли после прохождения шести курсов химиотерапии, высокий уровень Ki-67 свидетельствует в пользу плохого прогноза для пациента. Остальные культуры клеток показали сопоставимый уровень экспрессии мРНК Ki-67 с клетками иммортализованной культуры MCF-7. «Родительские» культуры BrC4f и BrC6f имели достоверно низкий уровень Ki-67, а их дочерние культуры – BrC4e и BrC6e – высокий уровень экспрессии мРНК Ki-67.

### ***3.3.4 Взаимосвязь уровня виментина с фенотипом в клетках культур молочной железы***

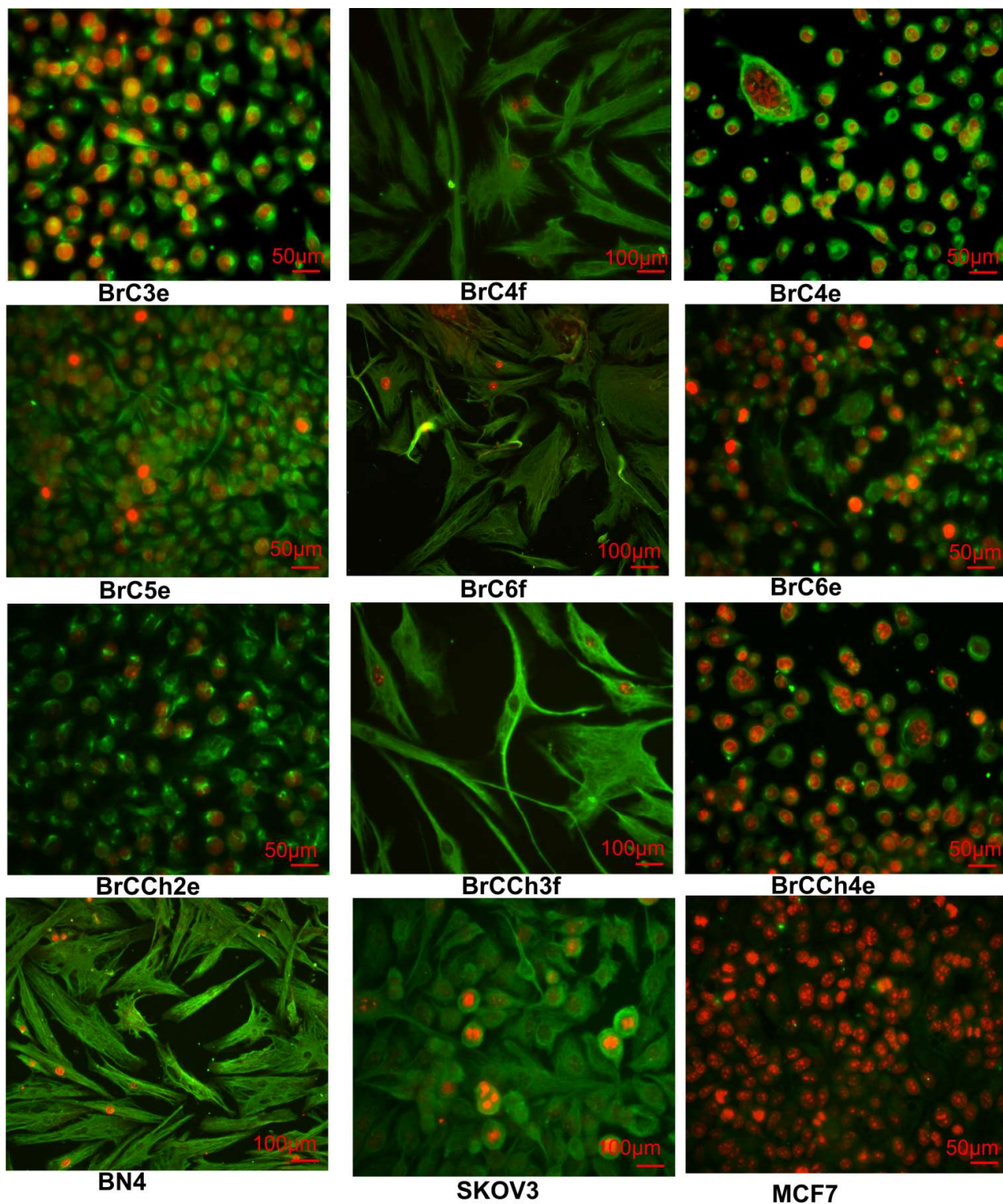
Фибробластоподобные клетки культуры молочной железы человека могут быть потомками опухоль-ассоциированных фибробластов (ОАФ) или представлять опухолевые клетки в состоянии эпителиально-мезенхимального перехода. Для ОАФ и клеток в ЭМП характерна экспрессия белка промежуточных филаментов виментина. Поскольку для

виментина показано участие в процессах ЭМП, опухолевого роста и метастазирования, он включен в перечень потенциальных мишеней для таргетной терапии [284]. Поэтому, в работе дополнительно анализировали уровень виментина в полученных культурах методом вестерн блота, используя белок GAPDH как контроль нанесения. Анализ показал большое количество виментина в фибробластоподобных клетках (Рис. 19), что хорошо согласуется с литературными данными о том, что в опухолевых мезанхимальных клетках виментин замещает цитокератины и становится основным белком цитоскелета. Таким образом, по уровню виментина клетки BrCCh3f, BrC4f и BrC6f с фибробластоподобным фенотипом являются мезенхимальными клетками.



**Рис. 19.** Вестерн блот анализ виментина в образцах клеточных культур молочной железы.

Уровень и локализацию Ki-67 и виментина в персональных культурах клеток ЗОМЖ также оценивали иммуноцитохимически с применением моноклональных антител (Рис. 20). В качестве положительного контроля виментина использовали клетки аденокарциномы яичника человека SCOV3, а в качестве негативного контроля клетки MCF-7. Также клетки MCF-7 были использованы в качестве позитивного контроля Ki-67. Иммуноцитохимический анализ показал, что культуры с эпителиальным фенотипом были Ki-67-положительными и наибольший уровень Ki-67 (> 95%) был в клетках культур BrC3e и BrCCh4e [285]. При анализе виментина в клетках исследуемых культур можно видеть, что внутриклеточное распределение виментина различно для эпителиальных и фибробластоподобных культур клеток.



**Рис. 20.** Иммунофлуоресцентная визуализация Ki-67 и виментина в культурах клеток молочной железы. Красный сигнал - Ki-67, зеленый – виментин. Увеличение 252х для эпителиоподобных клеток и 126х для фибробластоподобных клеток.

В культурах, в которых преобладают клетки с фибробластоподобным фенотипом – BrC4f, BrC3f, BrCCh3f, BN4, виментин распределен равномерно по всему цитоплазматическому пространству, обозначая цитоскелет. В культурах, представленных эпителиальными

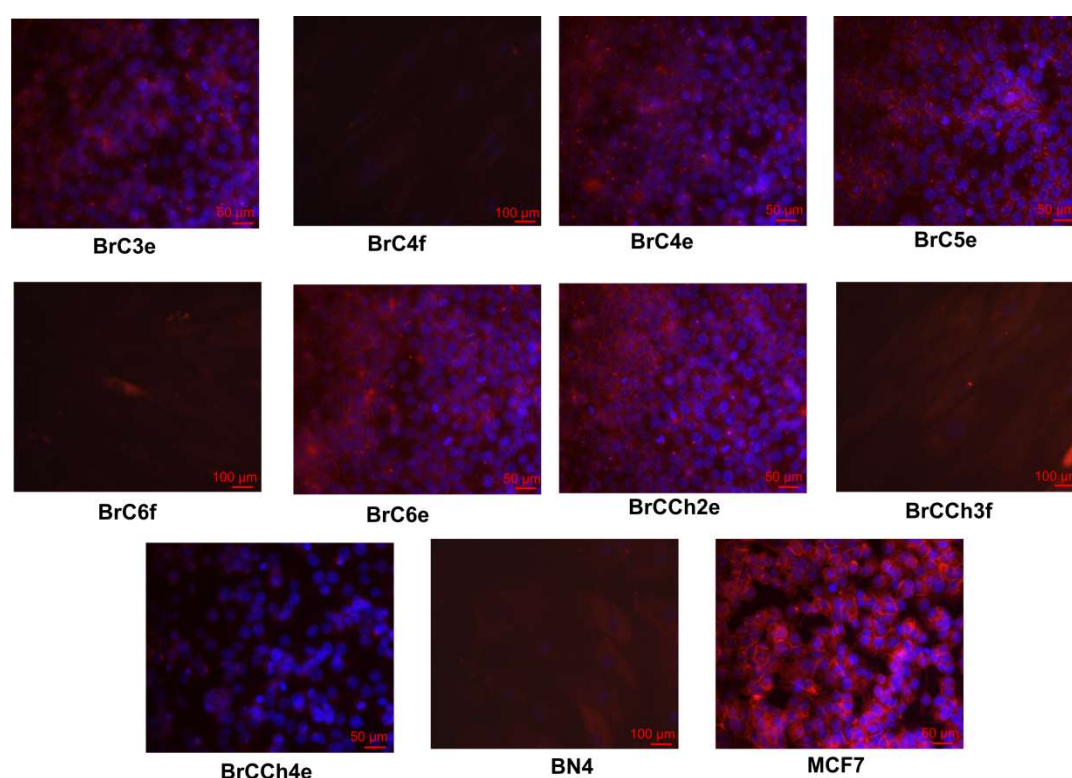


клетками (BrC3e, BrC4e, BrC5e, BrC6e, BrCCh2e, BrCCh4e), виментин локализован в около ядерной области, и не визуализируется в отростках клеток.

Иммуноцитохимический анализ Ki-67 подтверждает вывод о том, что уровень белка Ki-67 выше в полученных эпителиальных культурах по сравнению с фибробластоподобными культурами. Тем не менее, среди эпителиальных культур уровень Ki-67 не был одинаково высоким. Наименьший уровень Ki-67 был в культурах опухолевых клеток BC5, BrC4f, BrC6f и BrCCh3f. Можно заключить, что высокое содержание виментина и его распределение в клетке локализуящие структуры структурами цитоскелета подтверждает мезенхимальное состояние полученных фибробластоподобных культур.

### ***3.3.5 Молекулярные маркеры мезенхимально-эпителиального переход в культурах онкотрансформированных клеток молочной железы***

Известно, что во время метастазирования эпителиальные опухолевые клетки сначала подвергаются ЭМП, при котором приобретают фибробластоподобный фенотип с высоким миграционным и инвазивным потенциалом [134].



**Рис. 21.** Иммунофлуоресцентная визуализация E-кадгерина в культурах опухолевых и нормальных клеток молочной железы. E-кадгерин – красный сигнал, ядра клеток - DAPI (синий сигнал). Увеличение 252x для эпителиоподобных клеток и 126x для фибробластоподобных клеток.

При ЭМП разрушаются адгезионные и щелевые контакты, филаменты базальной мембраны, придавая клеткам подвижность, подавляется экспрессия Е-кадгерина, формирующего адгезионные контакты, а вместо него экспрессируется N-кадгерин [286]. Происходят перестройки в цитоскелете: вместо цитокератинов экспрессируются виментин и фибронектин, на периферии клетки формируются актиновые стресс-фибриллы [189].

Для анализа внутриклеточного Е-кадгерина проводили иммуноокрашивание культур клеток, растущих на предметных стеклах с применением моноклональных антител. Можно видеть, что Е-кадгерин присутствует в клетках всех персональных культур, кроме клеток BrCCh3f, но в фибробластоподобных культурах клеток его гораздо меньше (Рис. 21).

Поскольку фенотип полученных персональных культур клеток молочной железы согласовывался с экспрессией мезенхимального маркера виментина и эпителиального маркера Е-кадгерина, важно было определить содержание других характерных маркеров эпителиального/мезенхимального фенотипа. В качестве дополнительных молекулярных маркеров были выбраны EpCAM, Mel-CAM и N-кадгерин.

**Таблица 11.** Доля клеток, содержащих Е-кадгерин, N-кадгерин, Mel-CAM и EpCAM в персональных культурах ЗОМЖ

Доля положительных клеток, %				
Персональная культура клеток	Mel-CAM (CD146)	EpCAM (CD326)	Е-кад (CD324)	N-кад (CD325)
<b>BrC3e</b>	34.9	98.2	97.0	10.2
<b>BrC4e</b>	33.4	99.0	76.6	н/г
<b>BrC5e</b>	23.9	99.0	73.0	н/г
<b>BrC6e</b>	42.6	99.0	78.4	н/г
<b>BrC4f</b>	96.0	9.7	1.2	85
<b>BrC6f</b>	91.0	20.9	5.6	74
<b>BrCCh3f</b>	93.6	н/г	н/г	66
<b>BrCCh2e</b>	65.7	60.4	58.1	20.0
<b>BrCCh4e</b>	71.5	97	89	8.8

Е-кад - Е-кадгерин; N-кад - N-кадгерин; н/г - негативные

Молекула адгезии эпителиальных клеток EpCAM (CD326), представляет собой трансмембранный гликопротеин I типа, который экспрессируется в различных эпителиальных клетках [287]. Недавно было выявлено участие EpCAM в клеточной

сигнализации, миграции, пролиферации, дифференцировке и метастазировании. Гиперэкспрессия EpCAM часто наблюдается при инвазивных ЗОМЖ [288].

Молекула адгезии меланомы Mel-CAM (также MCAM, MUC18 или CD146), впервые была обнаружена в злокачественных меланомах как обеспечивающая адгезию клеток молекула [289]. Позднее было описано функционирование Mel-CAM в норме и при онкологических заболеваниях, включая злокачественные опухоли молочной железы. В случае ЗОМЖ снижение Mel-CAM индуцирует процесс ЭМП в опухолевых клетках [203].

Проводя анализ экспрессии указанных молекулярных маркеров методом проточной цитометрии, обнаружено, что хотя фибробластоподобные клетки BrC4f и BrC6f содержали высокий процент клеток с N-кадгерином и не экспрессировали E-кадгерин, их дочерние эпителиальные клетки были E-кадгерин-положительными и не содержали N-кадгерина (Таблица 11). Следует отметить, что культуры клеток BrC3e, BrCCh2e и BrCCh4e, обладающие эпителиальным фенотипом, содержали как E-кадгерин-положительную популяцию, так и незначительную популяцию N-кадгерин-положительных клеток, что отличало их от культур BrC4e, BrC5e, BrC6e. Было показано, что экспрессия указанных маркеров в полученных культурах клеток ЗОМЖ строго коррелирует с морфологией клеток: фибробластоподобные клетки демонстрируют высокое содержание Mel-CAM-положительных и N-кадгерин-положительных клеток в сочетании с низким уровнем содержанием EpCAM- и E-кадгерин-положительных клеток. Эпителиальные клетки демонстрируют «обратный» фенотип – с низким содержанием Mel-CAM и N-кадгерина и высоким содержанием EpCAM и E-кадгерина.

Таким образом, содержание N-кадгерина, E-кадгерина, Mel-CAM и EpCAM в родительских культурах BrC4f и BrC6f подтверждало их мезенхимальный фенотип.

Известно, что экспрессия Mel-CAM различается для разных подтипов ЗОМЖ и наибольшего уровня достигает в трижды негативных ЗОМЖ [203, 290]. При сравнении Mel-CAM в культурах BrC3e и BrCCh2e с фенотипом трижды негативных ЗОМЖ с остальными культурами, можно видеть, что в клетках BrCCh2e доля Mel-CAM положительных клеток отличается. Можно видеть, что Mel-CAM выше в клетках с мезенхимальной морфологией содержащих димер HER2/HER3 – BrC4f, BrC6f и BrCCh3f. Другим феноменом, характерным для опухолей, которые подвергаются ЭМП, является потеря EpCAM [291], поэтому можно ожидать, что культуры клеток с высоким содержанием Mel-CAM утратили EpCAM. При сравнении исходных и дочерних культур, полученных в результате «импульсной гипоксии», мы обнаружили обращение фенотипа Mel-CAM<sup>high</sup>/EpCAM<sup>low</sup> в фибробластоподобных культурах BrC4f и BrC6f в Mel-CAM<sup>low</sup>/EpCAM<sup>high</sup> в эпителиальных культурах. В клетках культуры BrCCh3f при высоком уровне Mel-CAM не детектировался маркер EpCAM.

Полученные результаты коррелируют с данными группы исследователей под руководством Котб, которые продемонстрировали, что замещение E-кадгерина N-кадгерином в клетках молочной железы приводит к фиброзно-кистозным изменениям, так как стимулирует изменения фенотипа с эпителиального на фибробластоподобный [292]. Прикрепившись в конечной точке метастазирования, мигрирующие опухолевые клетки с мезенхимальным фенотипом претерпевают обратный процесс – мезенхимально-эпителиальный переход (МЭП). При подходящих условиях *in vitro* мезенхимальные клетки также подвергаются процессу МЭП, что приводит к приобретению клетками эпителиального фенотипа [293]. В настоящее время набор стимулов, регулирующих *in vitro* процесс МЭП до конца не установлен. Мы предположили, что продолжительный процесс «импульсной гипоксии» может быть одним из таких стимулов. Гипоксия, как правило, стимулирует процесс ЭМП *in vivo* с изменением морфологии опухолевых клеток на фибробластоподобный фенотип и этот процесс довольно быстрый, он занимает *in vitro* до 48 часов [294]. В свою очередь, недавно была показана конверсия ЭМП→МЭП для опухолевых клеток поджелудочной железы, в среде, богатой кислородом [295]. Достигнутый нами переход МЭП→ЭМП под действием раундов «импульсной гипоксии» позволяет предположить, что гипоксия может быть одним из стимулов МЭП → ЭМП для опухолевых клеток молочной железы. Этот процесс трансформации можно описать как медленный и постепенный переход, занимающий до трех недель. При этом, видимые изменения фенотипа сопровождалось изменением основных молекулярных маркеров: E-кадгерина, N-кадгерина, Mel-CAM и EpCAM, которые связаны с МЭП-подобной трансформацией.

### **3.3.6 Содержание стволовых опухолевых клеток в культурах эндометрия и молочной железы**

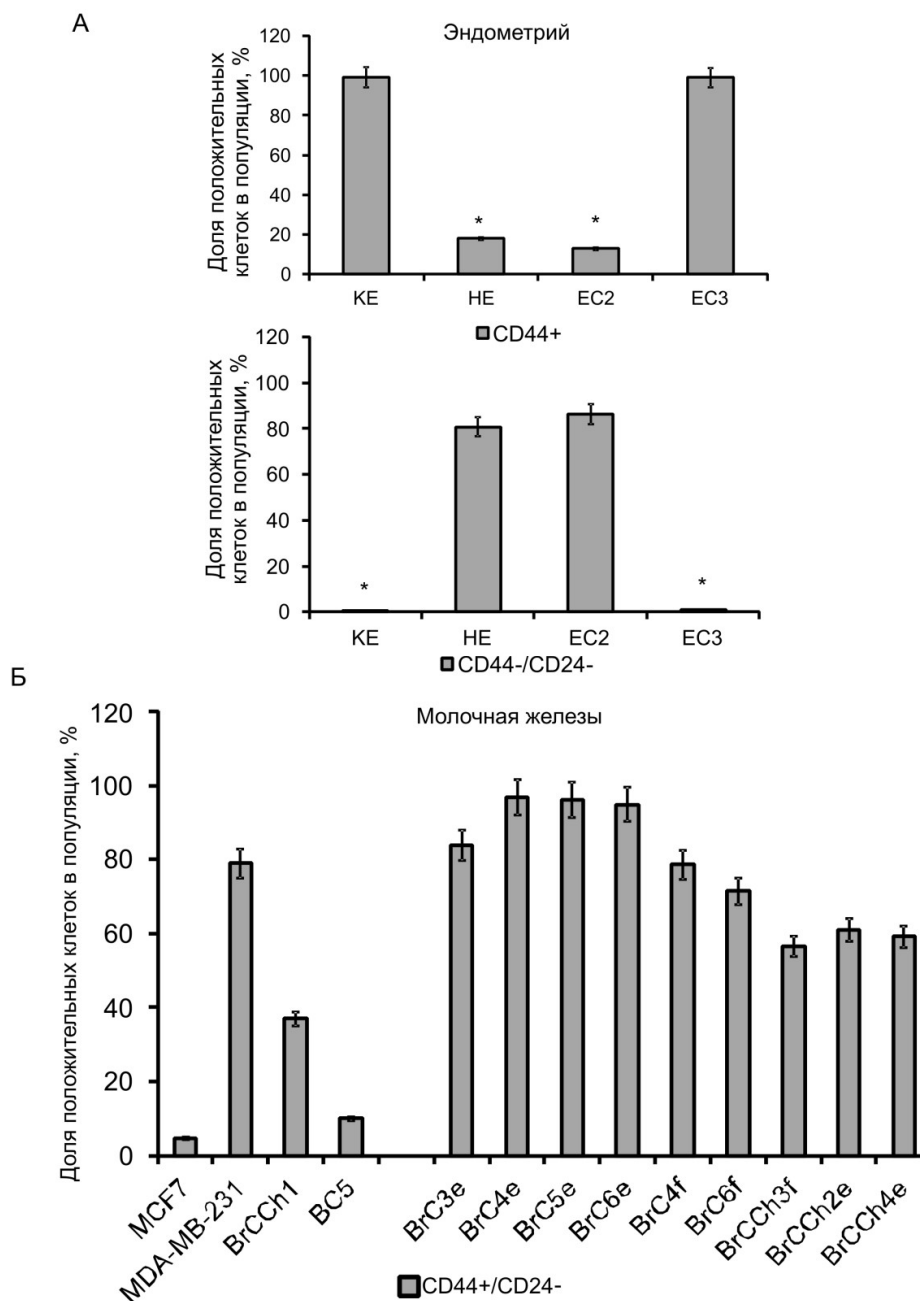
Поскольку популяция опухолевых стволовых клеток является ключевой для опухолевой прогрессии, в задачи исследования входило определение содержания опухолевых стволовых клеток (ОСК) в полученных культурах клеток. ОСК экспрессируют маркеры эпителиально-мезенхимального перехода и, как правило, более агрессивны [252]. Большинство авторов согласны с тем, что клетки с фенотипом CD44<sup>+</sup>CD24<sup>low/-</sup> являются функциональными стволовыми клетками злокачественных опухолей молочной железы. Для эндометрия при гиперплазии и ЗОЭ во время секторной фазы нормального менструального цикла уровень экспрессии CD44 и CD24 снижается [296]. Предполагается, что снижение экспрессии CD44 взаимосвязано с развитием и прогрессированием опухолей эндометрия. Поэтому, был проведен анализ маркеров CD44 и CD24 в клетках культур молочной железы и эндометрия.

Сравнение CD44 и CD24 в полученных культурах клеток эндометрия выявил сниженное содержание CD44-положительных клеток в культуре гиперплазии эндометрия HE и в культуре опухолевых клеток EC2 по сравнению с нетрансформированными клетками культуры KE (Рис. 22, А). Только в культуре EC3 не происходило снижения содержания CD44<sup>+</sup> клеток по сравнению с KE. Экспрессия CD24 не была выявлена ни в одной из полученных культур клеток эндометрия. Таким образом, наибольшая доля клеток с фенотипом ОСК для опухолей эндометрия CD44<sup>-</sup>/CD24<sup>-</sup> была в культурах HE и EC2 и составляла около 80%. Культуры HE и EC2 содержали значительную долю клеток с фенотипом CD44<sup>-</sup>/CD24<sup>-</sup> – около 80%. В культуре нормального эндометрия KE клетки с фенотипом CD44<sup>-</sup>/CD24<sup>-</sup> отсутствовали, как и в культуре опухолевых клеток EC3. Если учитывать, что снижение CD44 и CD24 может быть связано с развитием злокачественной трансформации эндометрия, то можно заключить, что культура HE представлена клетками гиперплазии с тенденцией к онкотрансформации.

Популяция ОСК в культурах ЗОМЖ с фенотипом CD44<sup>+</sup>CD24<sup>low/-</sup> коррелирует с инвазивными свойствами опухолевых клеток и другими клиническими параметрами, такими как экспрессия ER, PR и статус Ki-67 [297, 298]. Идову и коллеги определили, что у пациентов с трижды негативными опухолями молочной железы с высоким содержанием клеток CD44<sup>+</sup>CD24<sup>low/-</sup> частота рецидивов и метастазов значительно выше, чем у пациентов с другими подтипами ЗОМЖ [299]. Напротив, Хоримото и коллеги показали, что пациенты с ER-положительными опухолями молочной железы, содержащими популяцию CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>, имели наибольший период выживаемости без рецидива, чем остальные пациенты с ER-положительными опухолями [300].

Анализ популяции ОСК в культурах клеток BC5, BrCCh1 и BN1, полученных с помощью диссоциации коллагеназой IV типа показал, что примерно 37% клеток культуры BrCCh1 демонстрировали фенотип CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>, что связано с плохим исходом у пациентов [299]. Содержание CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> клеток в культуре BrCCh1 было значительно выше, чем в клетках иммортализованной культуры MCF-7, но ниже чем в культуре MDA-MB-231. Учитывая данные по экспрессии рецепторов эстрогена, прогестерона и HER2, можно заключить, что клетки культуры BrCCh1 обладают фенотипом ER<sup>low</sup>/PGR<sup>low</sup>/HER2<sup>low</sup>, которой можно соотнести с трижды негативным типом ЗОМЖ с высоким процентным содержанием популяции CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> клеток (Рис.22, Б) и этот фенотип близок к фенотипу MDA-MB-231. Поскольку культура клеток BrCCh1 получена из опухоли пациента, прошедшего 6 курсов химиотерапии, мы можем предположить, что данная популяция ОСК сыграла определенную роль в рецидиве заболевания пациента. ЭМП визуально определяется появлением фибробластоподобной морфологии клеток. Так как было установлено, что

культура BrCCh1 представлена клетками с гетерогенной морфологией и содержит как фибробластоподобные, так и эпителиоподобные клетки, возможно, в процессе культивирования некоторые из этих клеток могут претерпевать ЭМП. Такой переход может быть также индуцирован популяцией ОСК, которые мы обнаружили в культурах BrCCh1.



**Рис. 21.** Содержание клеток с маркерами ОСК CD44 и CD24 в культурах ЗОЭ и ЗОМЖ. **А.** Содержание CD44<sup>+</sup> и CD44<sup>-</sup>/CD24<sup>-</sup> клеток в культурах клеток эндометрия. (\*) Статистически значимое различие ( $p < 0.05$ ) с нетрансформированными клетками KE. **Б.** Доля CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> клеток в культурах опухоли молочной железы. Анализ выполнен методом проточной цитометрии. Представлены данные средних значений  $\pm$ SD по результатам трех независимых измерений.

Анализ популяции  $CD44^+CD24^{low/-}$  в культурах молочной железы, полученных оптимизированным методом с применением/без применения коллагеназы I типа выявил, что наибольшим процентным содержанием клеток с фенотипом  $CD44^+CD24^{low/-}$  обладали культуры, полученные с помощью «импульсной гипоксии» – BrC4e и BrC6e. Наименьшее число  $CD44^+CD24^{low/-}$  клеток было в гормон-зависимой культуре BrCCh3f (Рис. 22, Б). Камерлинг с коллегами обнаружили, что наибольшее процентное содержание  $CD44^+CD24^{low/-}$  было в гормон-независимых опухолях с высокой скоростью пролиферации [298]. Эти данные хорошо согласуются с полученными результатами по содержанию  $CD44^+CD24^{low/-}$  клеток в популяции и уровню Ki-67 в них. Кроме того, отсутствие конверсии клеток культуры BrCCh3f в эпителиальный фенотип под действием «импульсной гипоксии» также может быть связано с низким содержанием  $CD44^+CD24^{low/-}$  клеток в культуре, если рассматривать  $CD44^+CD24^{low/-}$  клетки как обладающие способностью к трансформации по аналогии с нормальными стволовыми клетками.

Известно что, активация рецептора эпидермального фактора роста EGFR стимулирует пролиферацию клеток с фенотипом  $CD44^+/CD24^{low/-}$ , связанным с инвазивностью при трижды негативных ЗОМЖ [295]. Действительно, из полученных нами данных видно, что клетки трижды негативных ЗОМЖ MDA-MB-231 с высоким уровнем EGFR (Рис. 17) содержат высокую долю  $CD44^+/CD24^{low/-}$  клеток. Среди персональных культур ЗОМЖ, представляющих фенотип трижды негативных ЗОМЖ - BrC3e и BrCCh2e, только клетки культуры BrCCh2e также содержали некоторое количество EGFR (Рис. 17). Наиболее вероятно, что опухоль, из которой получена культура BrCCh2e характеризуется плохим прогнозом.

### **3.4. Исследование чувствительности полученных культур клеток к противоопухолевым агентам**

Тестирование новых лекарственных агентов на линиях опухолевых клеток обычно является задачей начальной стадии разработки лекарственных препаратов, а расширение такой панели позволяет выявлять взаимосвязь между экспрессируемыми маркерами и чувствительностью/резистентностью к препаратам.

#### ***3.4.1 Чувствительность культур клеток эндометрия к противоопухолевым агентам***

Поскольку для молодых женщин с диагнозом ЗОЭ рекомендована щадящая терапия для сохранения репродуктивных функций, консервативное лечение опухоли эндометрия может быть альтернативой гистерэктомии [301]. Разработка новых противоопухолевых препаратов с высокой эффективностью и низкой токсичностью все еще необходимо даже для

высокодифференцированных опухолей эндометрия. Ранее сотрудниками ЛБТ ИХБФМ СО РАН было установлено, что белок из молока человека, лактаптин, фрагмент частичного протеолиза каппа-казеина, обладает цитотоксическим действием на опухолевые клетки человека в культуре. Рекомбинантный аналог лактапина RL2 вызывал апоптоз клеток различных опухолевых линий *in vitro* [302–304], но не был испытан в отношении опухолевых клеток эндометрия. В процессе исследования помимо RL2, чувствительность полученных культур клеток эндометрия экспериментально была оценена в отношении действия доксорубина и цисплатина. Для расчета значений IC<sub>50</sub> исследуемых лекарственных препаратов был проведен МТТ-анализ клеток после 74 часов воздействия. Все культуры клеток, полученные из опухолевых образцов, имели близкие значения IC<sub>50</sub> для аналога лактапина RL2. Клетки культуры KE, полученные из нетрансформированной ткани эндометрия, обладали низкой чувствительностью (высокими значениями IC<sub>50</sub>) для исследуемых препаратов (Таблица 12). Поскольку МТТ является косвенным методом, не детектирующим непосредственно гибель клеток, а только позволяющим оценить изменение метаболизма вследствие индукции гибели, данные МТТ не позволяют четко разделить цитотоксическое действие и антипролиферативное (цитостатическое). Более точно различить эти процессы позволяет динамический мониторинг роста клеток в режиме реального времени на приборе xCelligence.

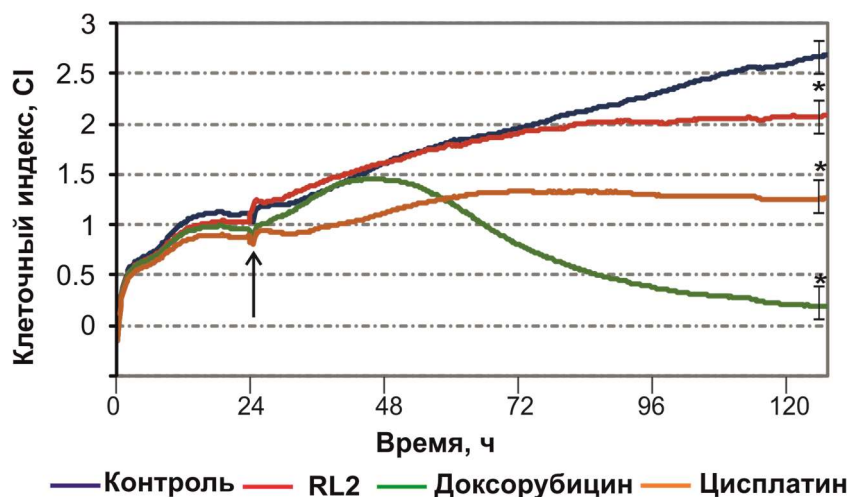
**Таблица 12.** Оценка чувствительности культур клеток эндометрия к препаратам доксорубин, цисплатин и RL2 (IC<sub>50</sub>).

Культура клеток	IC <sub>50</sub>		
	Доксорубин, $\mu\text{M}$	Цисплатин, $\text{мкг/мл}$	RL2, $\text{мг/мл}$
ЕС1	0.21 ± 0.1	7.5 ± 2.3	0.38±0.1
ЕС2	0.16 ± 0.1	1.97± 0.8	0.32±0.1
ЕС3	0.29 ± 0.1	1.54± 0.6	0.34± 0.1
HE	2 ± 0.2	43.2±4.6	0.57±0.1
KE	> 50	69 ± 2.8	0.64±0.1

Значения IC<sub>50</sub> представлены как среднее значение ± SD.

Для опухолевых клеток культуры ЕС3 можно видеть начало снижения значения клеточного индекса (CI), отражающего жизнеспособность клеток, после 24 ч инкубации с доксорубином (Рис. 22).





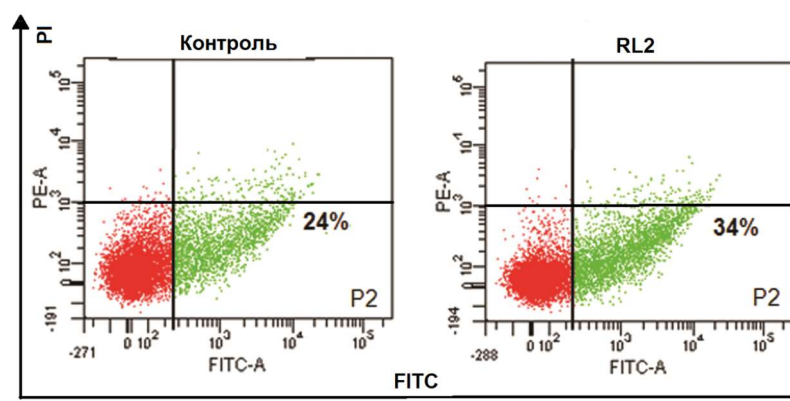
**Рис. 22.** Анализ влияния противоопухолевых препаратов на жизнеспособность культуры клеток EC3 в режиме реального времени. К культивируемым клеткам добавляли доксорубицин (0.3 мкМ), цисплатин (2 мкг/мл) и рекомбинантный аналог лактапина RL2 (0.2 мг/мл), к контрольным клеткам добавляли 30 мкл физиологического раствора. Момент добавления препарата указан стрелкой. Различие с контролем в финальной точке эксперимента считали достоверным при  $p < 0.05$  (\*).

Цисплатин и RL2 в используемых концентрациях не вызывали гибели клеток, но оказывали значительный антипролиферативный эффект, выраженный в отсутствии изменения значения CI на протяжении 70 ч (Рис. 22). Таким образом, только доксорубицин снижал жизнеспособность клеток культуры EC3 в концентрации близкой к значению  $IC_{50}$  (Рис. 22).

Значения  $IC_{50}$  всех исследуемых препаратов для клеток KE и HE превышало  $IC_{50}$  для опухолевых клеток приблизительно в 2 раза. Таким образом, клетки нетрансформированного эндометрия KE и клетки из ткани гиперплазии эндометрия HE были устойчивы к препаратам, в том числе к рекомбинантному аналогу лактапина. Эти данные подтверждают результаты ранее полученные для других опухолевых клеточных линий, где лактапин преимущественно индуцировал гибель опухолевых клеток в культуре без существенного воздействия на здоровые клетки [304]. Оказалось, что  $IC_{50}$  доксорубицина находился в диапазоне 0.16–0.29 мкМ для всех опухолевых клеток эндометрия, поэтому можно считать их чувствительными к доксорубицину. Доксорубицин используется в клинической практике при лечении прогрессирующих ЗОЭ в комбинации с цисплатином. Значения  $IC_{50}$  цисплатина указывают на то, что опухолевые клетки культуры EC1 были наиболее устойчивы к цисплатину среди исследуемых культур клеток. Ранее в работе сотрудников ЛБТ ИХБФМ СО РАН было показано, что  $IC_{50}$  RL2 в эстроген-положительных клетках аденокарциномы молочной железы MCF-7 составляет 0.25 мг/мл, а в трижды негативных клетках MDA-MB 231 – 0.2

мг/мл. Для опухолевых культур клеток эндометрия значение  $IC_{50}$  RL2 было выше и составляло приблизительно 0.35 мг/мл, что указывает на большую специфичность RL2 к клеткам ЗОМЖ, чем к клеткам ЗОЭ.

Поскольку чувствительность к препарату RL2 для опухолевых клеток эндометрия отличалась между клеточными культурами, важно было определить, индуцирует ли RL2 в обработанных клетках апоптоз или вызывает другой тип клеточной гибели. Транслокация фосфатидилсерина на плазматическую мембрану является одним из ранних признаков апоптоза [305].



**Рис. 23.** Анализ апоптоза в клетках EC3 при обработке рекомбинантным аналогом лактапина RL2. Клетки инкубировали с рекомбинантным аналогом лактапина RL2 (0.2 мг/мл) в течение 24 часов и анализировали методом проточной цитометрии с использованием окрашивания аннексином V/PI.

Аннексин V взаимодействует с поверхностным фосфатидилсерином с образованием нековалентного комплекса, который может быть детектирован при использовании Аннексина V, конъюгированного с флуоресцентной меткой. Для анализа индукции апоптоза использовали метод, основанный на двойном флуоресцентном окрашивании клеток Аннексином V-FITC и йодидом пропидия (PI) с последующим анализом методом проточной цитометрии. Аннексин V-положительная популяция клеток (FITC-положительная) состоит из ранних апоптотических клеток (Аннексин V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) и вторичных апоптотических и/или некротических клеток (Аннексин V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>). Можно видеть, что по сравнению с контрольными необработанными клетками в клетках EC3, обработанных RL2 происходит увеличение популяции P2 – популяции истинных апоптотических клеток (Рис. 23). Таким образом, гибель опухолевых клеток эндометрия под действием RL2 происходит по типу апоптоза.

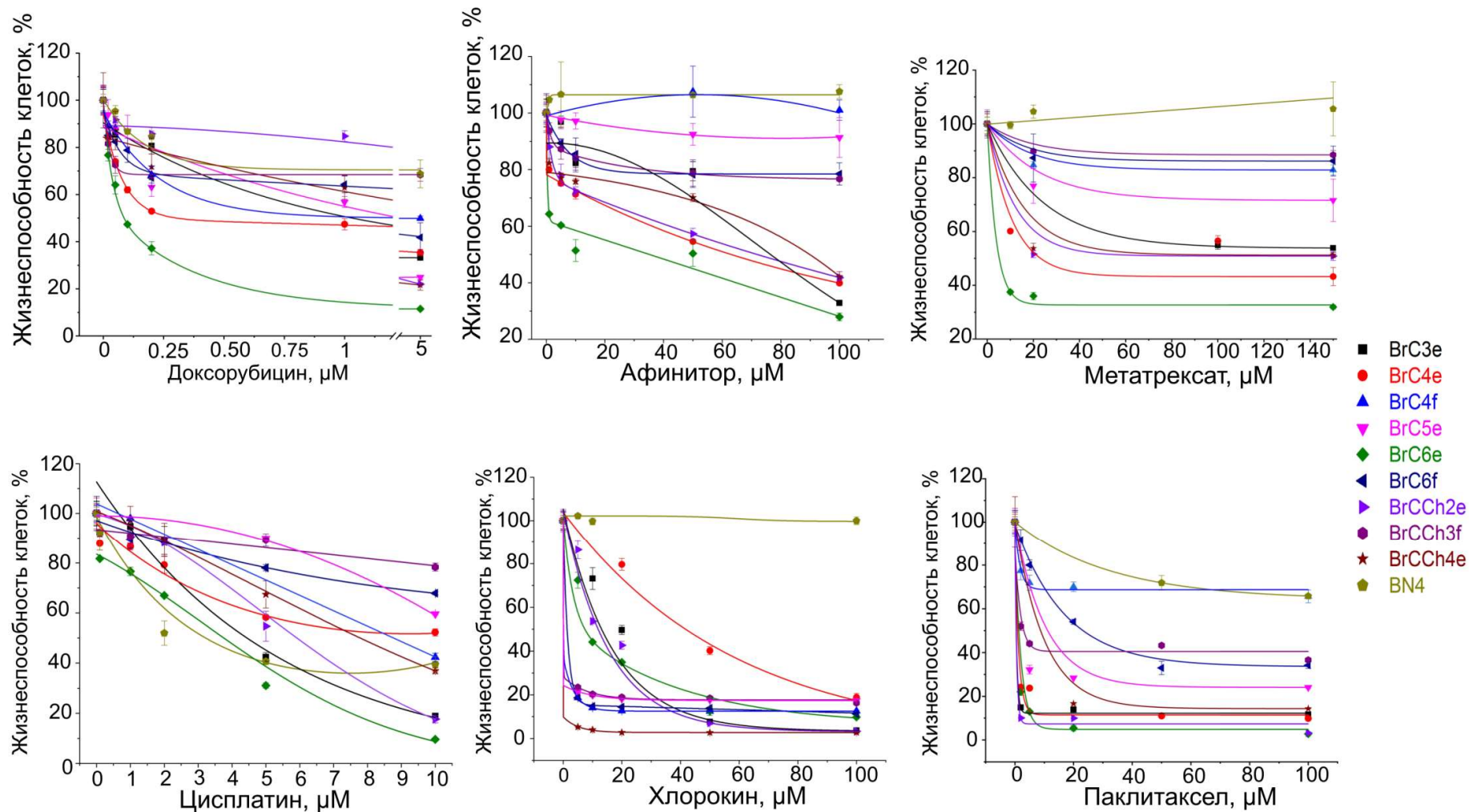
### 3.4.1.1 Чувствительность персональных культур клеток эндометрия к ингибиторам ароматазы

Ингибиторы ароматазы входят в перечень препаратов, применимых для лечения злокачественных опухолей эндометрия, экспрессирующих ароматазу [306]. Так как было обнаружено, что только одна из полученных опухолевых культур клеток эндометрия – ЕС3 – экспрессировала мРНК Сур19 на уровне, близком к уровню в иммортализованных опухолевых клетках MCF-7, было сделано предположение о том, что клетки культуры ЕС3 могут быть чувствительны к ингибиторам этого фермента. Для проверки гипотезы использовали препараты третьего поколения ингибиторов ароматазы: анастрозол, который селективно и обратимо ингибирует ароматазу, и стероидный препарат эксеместан, который является необратимым ингибитором этого фермента. Влияние эксеместана и анастрозола на пролиферацию первичных культур ЕС3, HE и линию опухолевых клеток MCF-7 определяли методом МТТ. Клетки обрабатывали эксеместаном (1–1000 мкМ) и анастрозолом (2–500 мкМ) в течение 48 ч. Рассчитанные значения IC<sub>10</sub> и IC<sub>50</sub> представлены в Таблице 13. Можно видеть, что чувствительность опухолевых клеток ЕС3 к ингибиторам ароматазы ниже, чем у клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7. Возможно, несмотря на высокий уровень экспрессии ароматазы в клетках эндометрия ЕС3, ее влияние на пролиферацию опухолевых клеток не является столь же существенным, как в клетках MCF-7.

**Таблица 13. Оценка чувствительности культур клеток эндометрия к препаратам эксеместан и анастрозол (IC<sub>10</sub> и IC<sub>50</sub>).**

Культура клеток						
Лекарственный препарат	MCF-7		ЕС3		HE	
	IC <sub>10</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>10</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>10</sub>	IC <sub>50</sub>
Анастрозол	12	93	65	346	150	350
Эксеместан	80	120	50	450	112	598

Жизнеспособность клеток оценивали в МТТ тесте после 48 ч обработки препаратом, по полученным значениям рассчитывали IC<sub>10</sub> и IC<sub>50</sub> (мкМ). IC<sub>50</sub>–половина максимальной ингибирующей концентрации, IC<sub>10</sub>–концентрация, вызывающая гибель 10% клеток.



**Рис. 24.** Зависимость жизнеспособности персональных культур клеток молочной железы от концентрации цитотоксических препаратов. К клеткам добавляли лекарственные средства (доксорубицин (0.02-5  $\mu\text{M}$ ), афинитор (1-100  $\mu\text{M}$ ), метатрексат (10-150  $\mu\text{M}$ ), цисплатин (0.1-10  $\mu\text{M}$ ), хлорокин (5-100  $\mu\text{M}$ ), паклитаксел (2-100  $\mu\text{M}$ ) и через 48 ч оценивали жизнеспособность относительно контрольных необработанных клеток.

### **3.4.2 Чувствительность полученных культур клеток молочной железы к химиопрепаратам**

Для культур клеток опухолей молочной железы панель анализируемых цитотоксических агентов содержала препараты, действующие различными молекулярными механизмами противоопухолевого действия. Помимо препаратов первой линии для лечения ЗОМЖ - доксорубицина, паклитаксела и цисплатина, была исследована активность препаратов афинитор, метатрексат и хлорокин. На Рис. 24 результаты исследования представлены в виде графиков зависимости жизнеспособности клеток от концентрации препарата, а в Таблице 14 представлены рассчитанные значения  $IC_{50}$  каждого препарата.

Анализ кривых зависимости цитотоксической активности от концентрации препаратов и рассчитанные значения  $IC_{50}$  позволили условно разделить культуры на чувствительные и устойчивые. Было обнаружено, что наибольшую чувствительность к исследуемым препаратам проявляли клетки BrC6e, полученные методом «импульсной гипоксии». В то же время, их, родительская культура BrC6f обладала широким спектром устойчивости (цисплатин, афинитор и метатрексат). Наряду с BrC6f, суммарно наиболее устойчивыми к химиопрепаратам были клетки культуры BrC4f (метатрексат, паклитаксел, афинитор), BrCCh3f (метатрексат, паклитаксел, афинитор, цисплатин) и BN4 (доксорубицин, афинитор, паклитаксел, метатрексат, хлорокин). Помимо них, культура BrCCh2e была относительно устойчива к доксорубицину. Наблюдаемая тенденция устойчивости указывает на то, что именно фибробластоподобные клетки экспрессирующие мезенхимальные маркеры проявляют устойчивость к действию широкого спектра препаратов с различными механизмами действия. Таким образом, полученные результаты согласуются с данными других исследователей, показывающих, что приобретение мезенхимального фенотипа связано с проявлением лекарственной устойчивости [157]. Исключение составляет лишь культура BrCCh2e, в которой, по-видимому, в результате 4х курсов химиотерапии произошла селекция клеток с фенотипом лекарственной устойчивости.

#### **3.4.2.1 Исследование чувствительности культур молочной железы к противоопухолевым препаратам в режиме реального времени**

По аналогии с культурами эндометрия, в отношении культур нормальной и онкотрансформированной молочной железы важно было определить тип действия препаратов – цитотоксическое и/или цитостатическое. Оценку действия препаратов доксорубицин, цисплатин, тамоксифен, анастрозол проводили на приборе xCelligence для культур опухолевых клеток BC5, BrCCh1 и нетрансформированных клеток BN1. Дополнительно использовали таргетный препарат афинитор (эверолимус), ингибитор

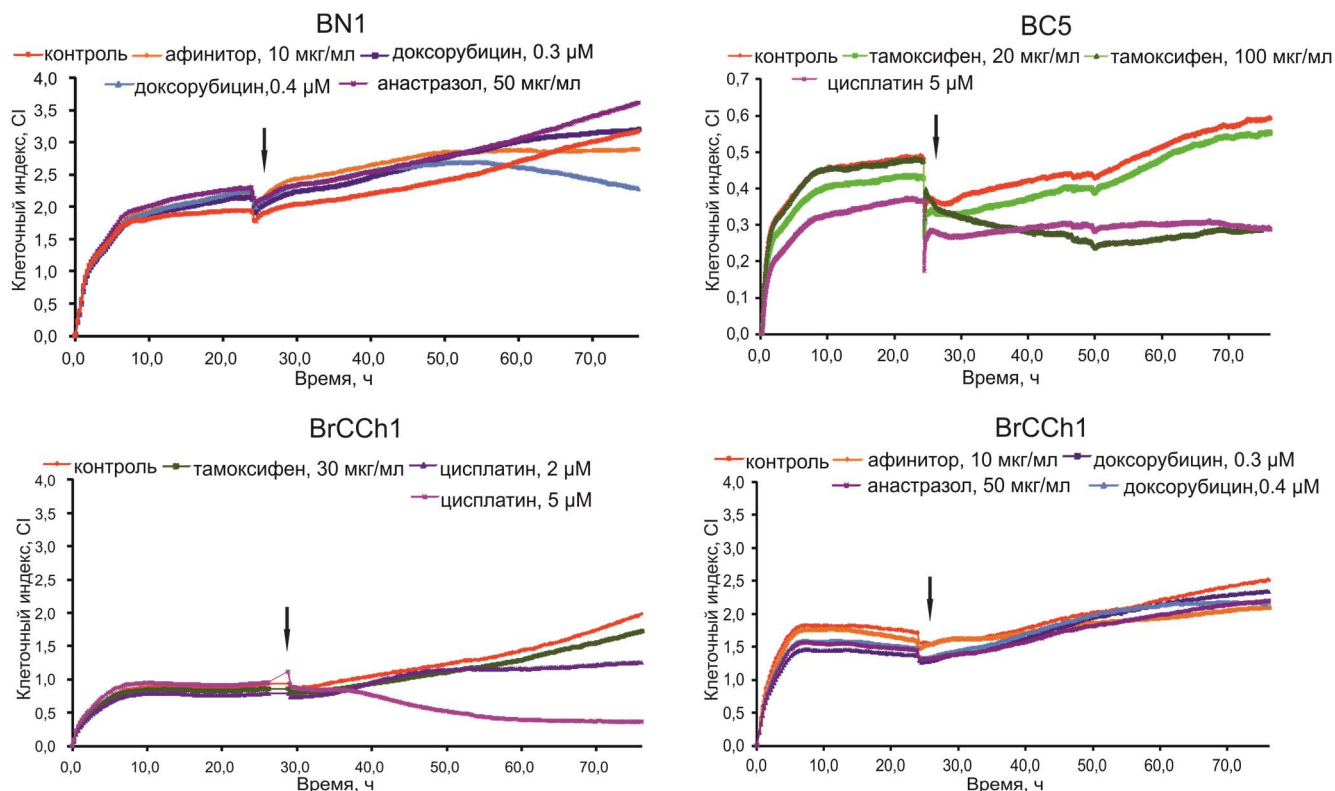
mTOR-киназы, который используется для лечения прогрессирующего гормон-положительного HER2-независимого рака молочной железы [307].

**Таблица 12.** Цитотоксическая активность химиопрепаратов в отношении персональных культур клеток ЗОМЖ (IC<sub>50</sub>)

IC <sub>50</sub> , μM						
Культура	Доксорубицин	Цисплатин	Афинитор	CQ	Паклитаксел	Мега-трексат
<b>BrC3e</b>	5.6	4.7	64.9	17.3	<2	н/д
<b>BrC4f</b>	5.8	9.7	н/д	<5	н/д	н/д
<b>BrC4e</b>	0.7	н/д	62.5	42.1	<2	113
<b>BrC5e</b>	1.04	н/д	н/д	<5	<2	н/д
<b>BrC6f</b>	0.4	н/д	н/д	<5	29.6	н/д
<b>BrC6e</b>	0.1	1.8	13.2	10.1	<2	<10
<b>BrCCh2e</b>	3.1	6.5	68	13.4	<2	7
<b>BrCCh3f</b>	н/д	н/д	н/д	<5	9.4	н/д
<b>BrCCh4e</b>	0.9	7.3	164.2	<5	<2	54.3
<b>BN4</b>	н/д	3.4	н/д	н/д	н/д	н/д

н/д – не достигается; CQ – хлорокин

Кривые роста культур клеток, обработанных исследуемыми лекарственными средствами, представлены на Рис. 25. Было установлено, что клетки нормальной молочной железы BN1 были чувствительны только к высокой дозе доксорубицина. Клетки культур BN1 и BrCCh1 были устойчивы к низким концентрациям (50 мкг/мл) анастрозола. Клетки культуры BC5 были более чувствительны к высоким дозам тамоксифена и цисплатина, чем клетки BrCCh1 (Рис. 25). Цисплатин в высокой концентрации оказывал цитотоксическое, а в низкой - цитостатическое действие на опухолевые клетки BrCCh1. Таким образом, клетки BrCCh1 были чувствительны только к цисплатину, что позволяет нам описать эти клетки как обладающие лекарственной устойчивостью, что характерно для опухолевых культур с мезенхимальным фенотипом. Как мы показали ранее, эти клетки содержали значительную долю CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> клеток, по сравнению с BC5. Таким образом, низкая чувствительность клеток BrCCh1 к лекарственным препаратам также может быть объяснена высоким процентным содержанием популяции опухолевых стволовых клеток (Рис. 21).

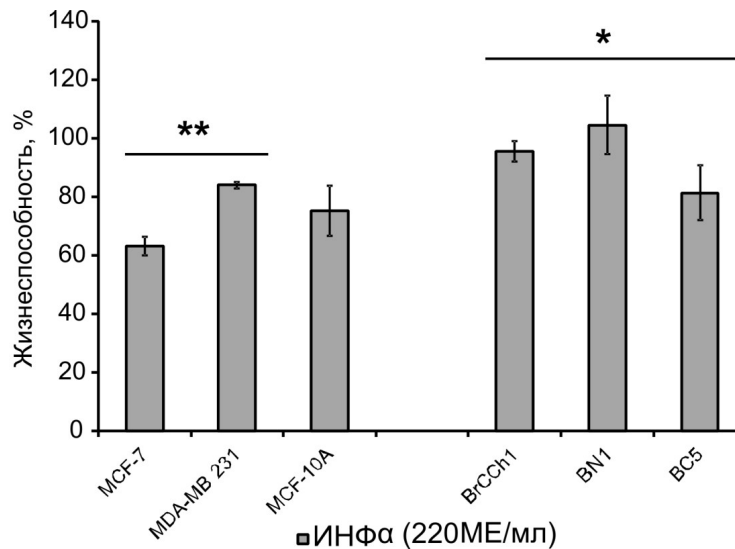


**Рис. 25.** Влияние химиотерапевтических препаратов на пролиферацию клеток молочной железы BN1, BC5 и BrCCh1 в режиме реального времени. Анализ пролиферации на приборе xCelligence. Лекарственный препарат добавляли через 24 часа после высевания клеток, момент добавления препарата отмечен стрелкой. Данные представлены как среднее значение 3х независимых повторов.

#### 3.4.2.2 Чувствительность культур клеток молочной железы к интерферону альфа

За последние десятилетия иммунотерапия стала частью комплексного подхода к лечению злокачественных новообразований. В дополнение к инновационному подходу адаптивного переноса Т-клеток и использованию моноклональных антител, интерфероны (ИФН) и цитокины также могут оказывать терапевтическое действие при онкопролиферативных заболеваниях [308; 309]. ИФНа применяют для лечения лейкозов, почечной карциномы, миеломы и меланомы, тогда как ИФНγ одобрен для применения в отношении опухолей яичников, почек и эндометрия [310]. Для выявления чувствительности культур клеток молочной железы к иммуностимуляторам использовали препарат рекомбинантного интерферона альфа человека.

Для сравнения чувствительности полученных и иммортализованных культур использовали линии молочной железы человека – аденокарциномы MCF-7 и MDA-MB 231, и клетки гиперплазии молочной железы MCF10A.



**Рис. 26.** Влияние ИФН $\alpha$  на жизнеспособность культур клеток молочной железы. Клетки обрабатывали ИФН $\alpha$  (220 МЕ/мл) и после 48 ч инкубации данные жизнеспособности обработанных клеток сравнивали с жизнеспособностью контрольных клеток (100%). Статистический анализ включал результаты трех независимых экспериментов (среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение). Различия между контрольными (необработанными) и обработанными клетками для каждой культуры были статистически значимыми при  $p < 0.05$  (\*) и при  $p < 0.01$  (\*\*).

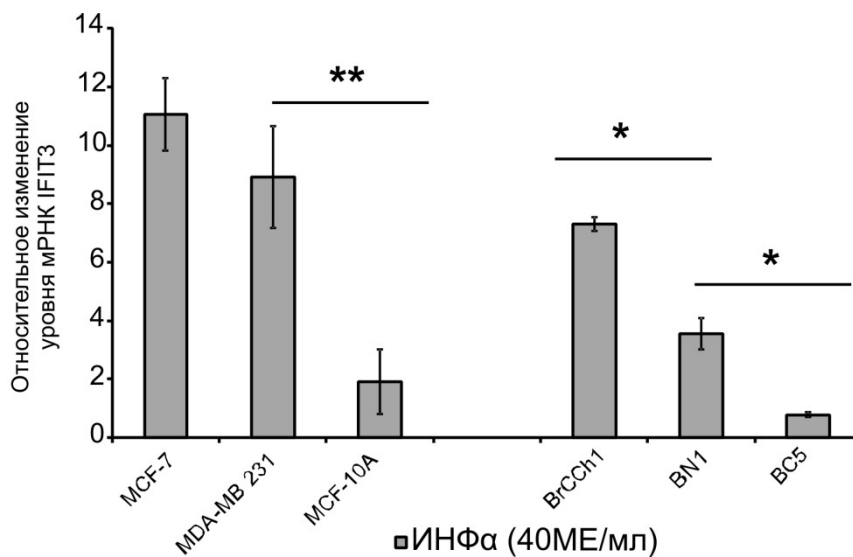
Было установлено, что ИФН $\alpha$  индуцировал снижение жизнеспособности клеток от ~ 5 до 70% при концентрации 220 МЕ/мл (Рис. 26). Наиболее чувствительными к действию ИФН $\alpha$  были клетки MCF-7 и чувствительность уменьшалась в ряду MCF-7 > MCF10A > MDA-MB 231 > BC5 > BrCCh1 > BN1 (Рис. 26). Полученные культуры клеток, как опухолевые BC5 и BrCCh1, так и клетки нормальной молочной железы BN1, не показали статистически значимых различий в чувствительности к ИФН $\alpha$  (Рис. 26).

Недавно было продемонстрировано, что уровень экспрессии мРНК интерферон-индуцируемого белка с тетрапептидными повторами 3 (IFIT3) может быть маркером ответа на ИФН $\alpha$  пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой [311]. Известно, что индукция IFN/STAT1-зависимых генов, в том числе IFIT3, может быть ранним прогностическим маркером ответа на химиотерапию для эстроген-независимых опухолей молочной железы [312]. Принимая во внимание, что интерферон- $\alpha$  имеет плеiotропную биологическую активность, не связанную напрямую с пролиферацией или апоптозом, исследовали активацию врожденного иммунитета в клетках культур молочной железы. Для этого клетки инкубировали с ИФН $\alpha$  и оценивали уровень мРНК IFIT3 методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Степень изменения уровня мРНК IFIT3, вызванная ИФН $\alpha$ , уменьшалась



в следующем порядке MCF-7 > MDA-MB 231 > MCF10A, составляя 11-, 9- и 2-х кратные увеличения, относительно необработанных клеток (Рис. 27).

Для того, чтобы объяснить различия в активации гена IFIT3 при воздействии ИНФ $\alpha$ , мы оценили базовый уровень мРНК IFIT3 и определили, что уровень активации был обратно связан с базовым уровнем мРНК IFIT3 (Рис. 28). Сравнение уровня мРНК IFIT3 в необработанных клетках полученных культур молочной железы BC5, BrCCh1 и BN1 и после обработки ИНФ $\alpha$  показало, что наибольшая активация IFIT3 была в клетках BrCCh1 (Рис. 27 и 28), в то время как эти клетки характеризовались самым низким базовым уровнем мРНК IFIT3. То есть, в клетках с наименьшим базовым уровнем мРНК IFIT3 изменения мРНК IFIT3 при обработке ИНФ $\alpha$  были наибольшими как для immortalized культур клеток молочной железы, так и для персональных культур клеток. Это говорит о том, что относительный базовый уровень мРНК IFIT3 позволяет прогнозировать чувствительность опухолевых клеток к воздействию иммуномодуляторов. Опухолевые клетки BC5 и нетрансформированные клетки BN1 продемонстрировали меньшую активацию транскрипции IFIT3, и она была обратно пропорциональна базовому уровню экспрессии гена.

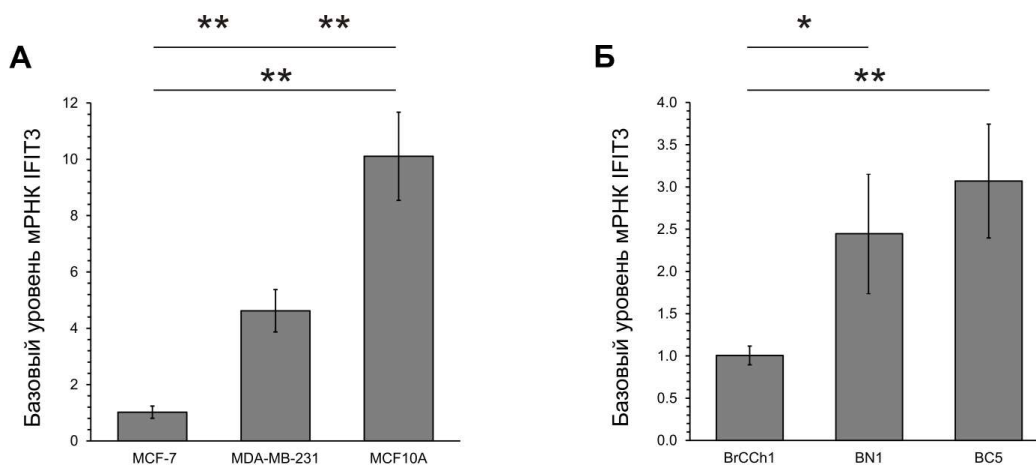


**Рис. 27.** Изменение уровня экспрессии мРНК IFIT3 в линиях клеток молочной железы человека под действием ИНФ $\alpha$ . Количественные значения ОТ-ПЦР нормализованы на уровень экспрессии мРНК генов домашнего хозяйства GAPDH, HPRT и RNU6. Результаты представлены относительно образцов необработанных клеток. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение в двух независимых экспериментах. Разница между группами была статистически значимой при  $p < 0.05$  (\*) и при  $p < 0.01$  (\*\*).

Воздействие ИНФа приводило к 3.5-кратному увеличению мРНК IFIT3 в клетках BN1 и не оказывало воздействия на мРНК IFIT3 в клетках BC5 (Рис. 27) Коэффициент корреляции Спирмена между базовым уровнем и относительной активацией экспрессии мРНК IFIT3 под воздействием ИНФа для всех исследуемых клеточных линий был оценен как  $r = -0.94$  ( $p < 0.05$ ).

Таким образом, показано, что чем ниже базовый уровень мРНК IFIT3 в клетках молочной железы, тем выше степень активации транскрипции под влиянием индукторов врожденного иммунитета.

Из литературных данных известно, что повышенная экспрессия мРНК IFIT3 усиливает антиапоптотические эффекты и устойчивость к химиотерапии аденокарциномы протоков поджелудочной железы [313]. Полученные данные показывают, что лекарственно



**Рис. 28.** Базовый уровень мРНК IFIT3 в клетках культур молочной железы человека. Количественные значения ОТ-ПЦР нормализованы на уровень экспрессии мРНК генов GAPDH, HPRT и RNU6. **А.** В immortalized культурах за единицу принята экспрессия гена IFIT3 в клетках MCF-7. **Б.** В персональных культурах за единицу принята экспрессия гена IFIT3 в клетках BrCCh1. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение двух независимых экспериментов. Разница между группами была статистически значимой при  $p < 0.05$  (\*) и при  $p < 0.01$  (\*\*).

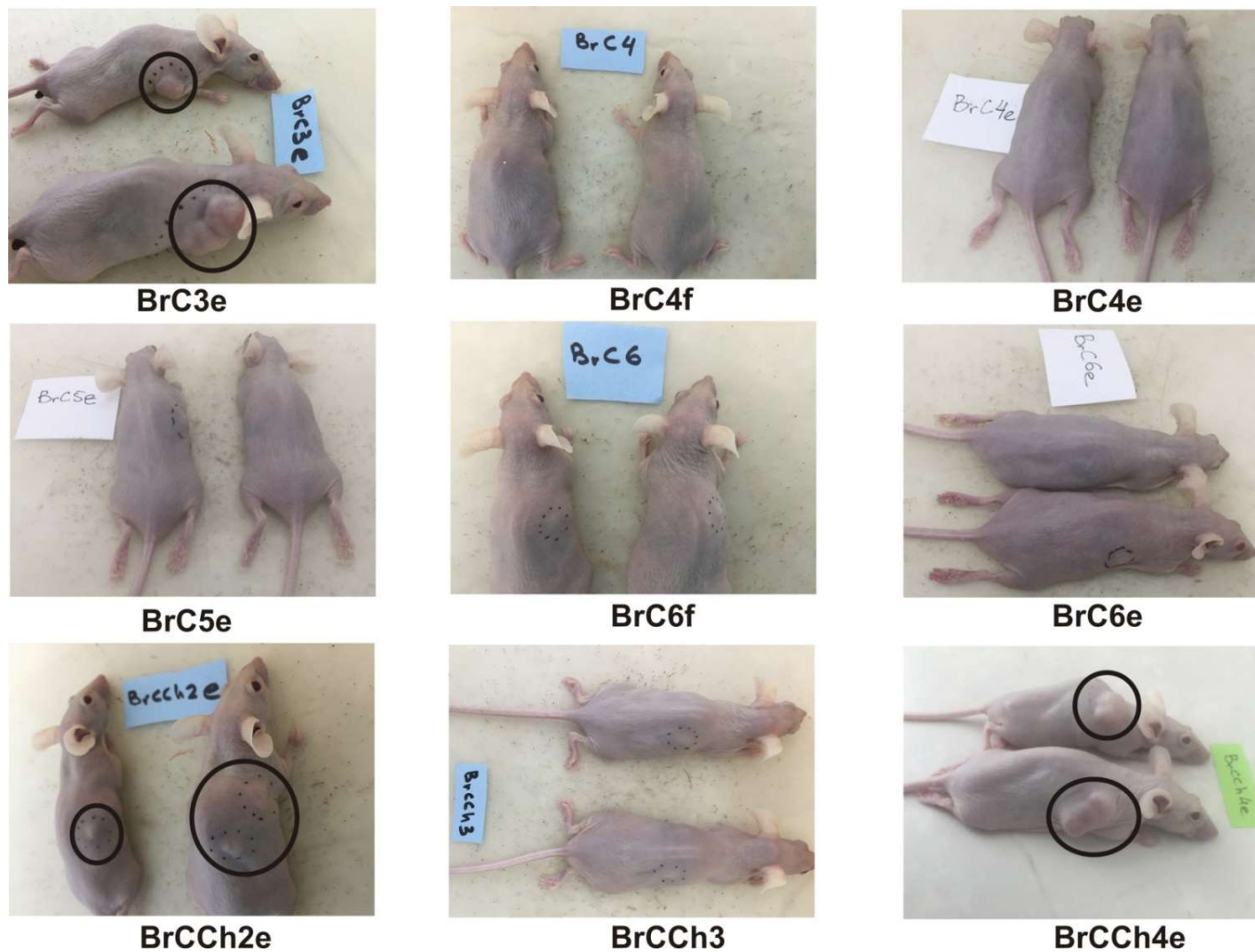
устойчивые клетки культуры BrCCh1 с исходно низким уровнем мРНК IFIT3 были чувствительны к стимуляции ИНФа. И наоборот, нетрансформированные клетки культуры MCF10A с относительно высоким уровнем мРНК IFIT3 были резистентны к ИНФа.

### 3.5 Туморогенность культур опухолевых клеток молочной железы и эндометрия

Важной характеристикой опухолевых клеток является способность давать рост опухоли в качестве ксенографтов или аллогграфтов. В случае способности к формированию опухоли на животном-носителе, модельная культура клеток позволяет проводить более широкий спектр исследований, как, например, проводить анализ сайтов метастазирования или изучать чувствительность к химиопрепаратам *in vivo*. В качестве вспомогательного компонента при трансплантации клеток животным используют матриксы, например матригель. Матригель содержит природные белки внеклеточного матрикса, необходимых для роста опухолевых клеток на иммунодефицитных животных.

Для оценки туморогенности *in vivo* культур опухолевых клеток эндометрия и молочной железы клетки были перевиты мышам линии SCID. Для этого  $2 \times 10^6$  клеток суспендировали в смеси PBS:матригель (Matrigel™) 1:1 до концентрации клеток  $2 \times 10^6$ /мл и трансплантировали подкожно в объеме 150 мкл. Рост опухоли контролировали один раз в неделю. Ни одна из полученных опухолевых культур эндометрия не давала опухолевого роста при трансплантации мышам. Возможно, дополнительная стимуляция животных препаратами эстрогенов могла бы способствовать росту опухолевых узлов, так как все опухолевые культуры эндометрия были гормон-зависимыми, поскольку экспрессировали мРНК рецепторов стероидных гормонов.

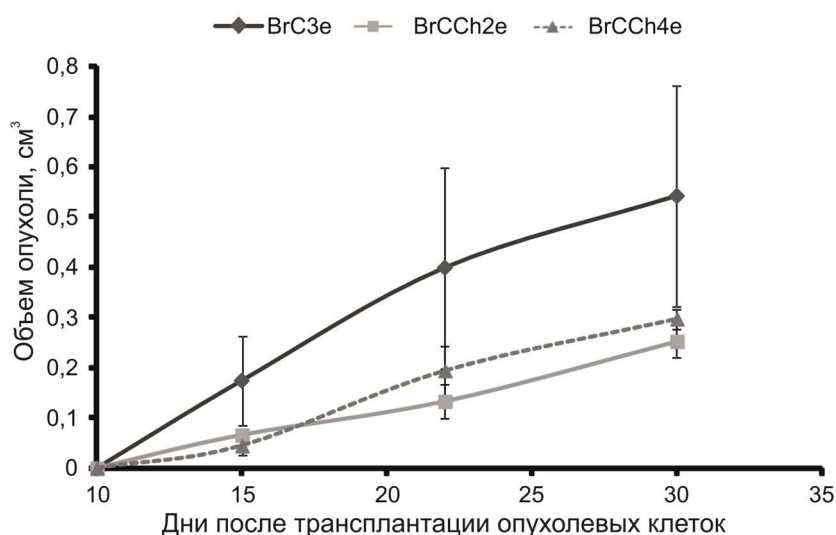
В случае опухолевых клеток молочной железы только три клеточные линии вызвали рост опухоли на месте подкожного введения - BrC3e, BrCCh2e и BrCCh4e (Рис. 29). Все три культуры BrC3e, BrCCh2e и BrCCh4e исходно получены как эпителиальные и содержат маркеры эпителиальных клеток. Клетки с фенотипом ЭМП – BrCCh3f, не проявляли туморогенных свойств. Анализ способности опухолевых клеток BrC4 и BrC6 инициировать рост опухоли *in vivo* показал, что ни родительские фибробластоподобные клетки, ни дочерние эпителиоподобные клетки, не ведут к формированию и росту опухолей у мышей. В настоящее время вопрос о том, какие опухолевые клетки - с фенотипом ЭМП или МЭП - способствуют образованию опухоли *in vivo*, все еще обсуждается. Существуют доказательства, подтверждающие обе концепции. Так показано, что онкотрансформированные эпителиальные клетки молочной железы человека, подвергшиеся процессу ЭМП, образуют опухоли более эффективно, чем клетки вне ЭМП [210]. Тем не менее, показано, что прохождение клетками ЭМП и способность инициировать опухоль клетками не имеют прямой взаимосвязи [314]. Эти результаты полностью подтверждают вывод о том, что клетки опухолей молочной железы с фенотипом ЭМП не обладают способностью инициировать опухоль. В то же время, другие исследователи показали, что



**Рис. 29.** Оценка туморогенности персональных культур опухолевых клеток молочной железы в мышах SCID. Репрезентативные изображения мышей с образованием опухолей в месте введения опухолевых клеток.

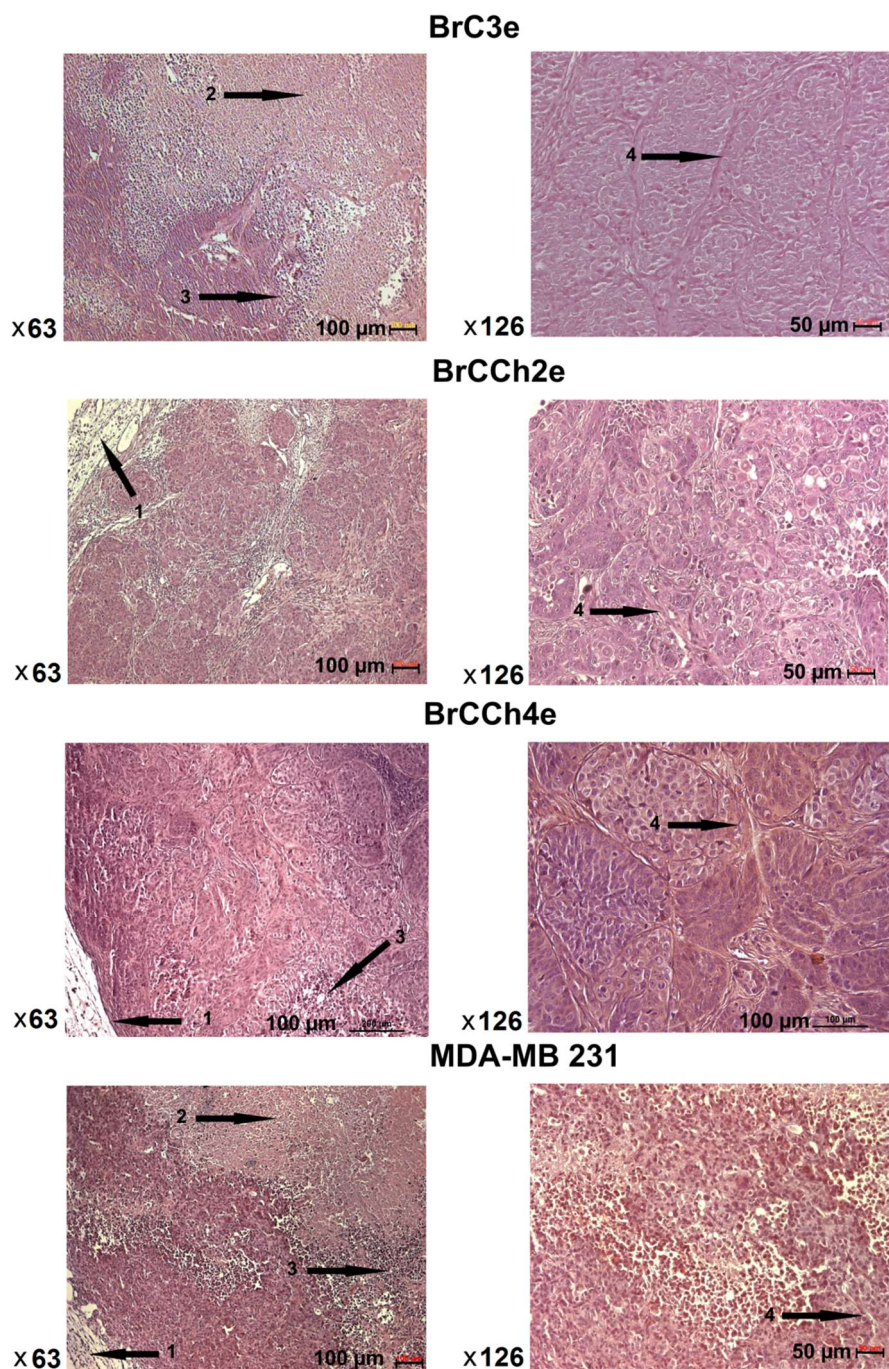
клетки опухолей молочной железы, подвергшиеся процессу МЭП, образуют пальпируемые опухоли с задержкой по времени относительно клеток, не подвергшихся МЭП, и демонстрируют более медленный рост опухоли *in vivo*. Это свидетельствует о том, что МЭП не приводит к ингибированию или потере способности опухолевых клеток инициировать опухоль [314]. Тот факт, что клетки BrC4e и BrC6e, претерпевшие мезенхимально-эпителиальный переход не инициировали рост опухоли *in vivo*, отчасти, может быть объяснен тем, что период наблюдения за ростом опухоли был слишком коротким для таких клеток. Наконец, можно согласиться с Кси и его коллегами, которые показывают, что в некоторых клеточных линиях опухолей молочной железы способность инициировать опухоль обусловлена генетическими способностями опухолевых клеток, а не прохождением клеткой ЭМП или МЭП [314].

Сравнение скорости роста опухолей, инициированных клетками BrC3e, BrCCh2e и BrCCh4e показало, что наиболее быстро растущие опухоли были инициированы клетками BrCCh4e (Рис. 30).



**Рис. 30.** Кривые роста опухолей, образованных клетками опухоли молочной железы, при подкожной трансплантации мышам SCID. Группы содержали 5 мышей, данные представлены как среднее значение  $\pm$  ошибка среднего.

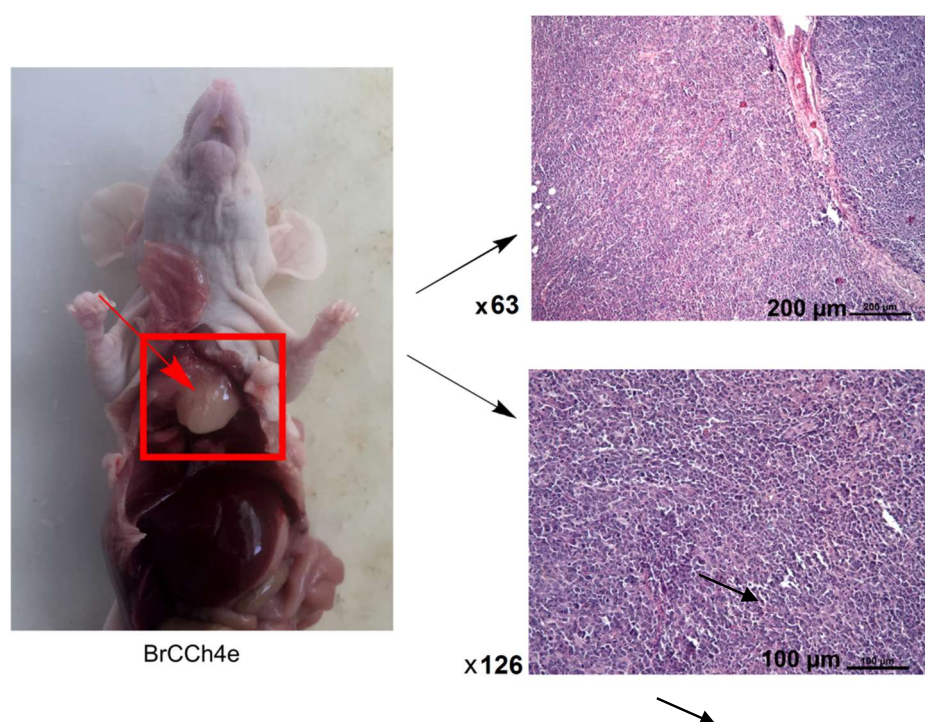
По окончании эксперимента опухоли извлекали и готовили препараты для гистологического анализа. Интерпретация данных выполнена совместно с научным сотрудником Лаборатории биохимии нуклеиновых кислот ИХБФМ СО РАН к.м.н. Сеньковой А.В. При исследовании гистологических срезов опухолей видно структуры, подобные структурам в молочной железе (Рис. 31): хорошо выделяются дольки с прослойками соединительной ткани.



**Рис. 31.** Гистологический анализ препаратов опухолей BrC3e, BrCCh2e, BrCCh4e и MDA-MB 231. Стрелками обозначены: 1 – соединительно-тканная капсула, 2 – некроз, 3 – воспаление, 4 – прослойки соединительной ткани.

Однако, в отличие от нормальной молочной железы, у опухолей, сформированных персональными культурами клеток, наблюдается тканевой атипизм, который частично проявляется в исчезновении протоков, присутствующих в нормальной молочной железе. Кроме того, наблюдается клеточный атипизм, который проявляется ядерным полиморфизмом, большим количеством митозов, изменением ядерно-цитоплазматического

соотношения в пользу ядра. Эти изменения типичны для злокачественных новообразований, когда опухолевые клетки пролиферируют внутри протоков молочной железы [294]. Границы опухоли представлены капсулой из коллагеновых волокон. Зоны некроза инфильтрированы лимфоцитами и макрофагами, и такая картина была типичной для различных срезов препаратов опухолей. В сравнении с опухолями, образованными клетками MDA-MB 231, опухоли BrC3e, BrCCh2e и BrCCh4e сохраняли визуальные признаки онкотрансформированной ткани молочной железы (Рис. 31). Таким образом, при подкожной трансплантации опухолевых клеток BrC3e, BrCCh2e и BrCCh4e формируются солидные опухоли, проявляющие внешние признаки онкотрансформированной молочной железы. По окончании эксперимента все животные-опухоленосители были подвергнуты патологоанатомическому осмотру для выявления метастазов.



**Рис. 32.** Репрезентативное изображение метастаза в лимфатическом узле средостения у мышей с опухолью BrCCh4e. Стрелкой на гистологических препаратах метастаза отмечено образование фиброзных тяжей (окрашивание срезов гематоксилином и эозином).

Было обнаружено, что опухоль BrCCh4e метастазировала в лимфатический узел средостения (Рис. 32). Интересно, что через две недели после подкожной трансплантации опухолевых клеток, средний размер метастазов был сопоставим со средним размером исходного опухолевого узла. Гистологический анализ метастазов показал нарушение морфологии лимфатического узла, фолликулы имели расплывчатые очертания. Лимфоидная

ткань была вытеснена разрастанием опухолевой ткани, проявляется клеточный атипизм. Кроме того, видны области склерозирования с образованием фиброзных тяжей (Рис. 32). Принимая во внимание данные о скорости роста опухолей (Рис. 30), возможно быстрый рост опухолевой массы мог быть провоцирующим фактором метастазирования опухоли BrCCh4e.

У больных злокачественными новообразованиями молочной железы метастазирование обычно происходит в регионарные лимфатические узлы, кости, легкие, печень и головной мозг [315]. Смертность от опухолей молочной железы в основном является результатом метастазов в костях, легких, головном мозге и печени [316]. Размер опухоли и наличие метастазов в лимфатических узлах является показателем плохого прогноза при злокачественных опухолях молочной железы [317]. Чтобы имитировать метастазирование опухоли молочной железы, обычно используют ортотопическую или эктопическую имплантацию раковых клеток, а также прямые инъекции опухолевых клеток в хвостовую вену или левый желудочек сердца [318]. Среди широко используемых опухолевых линий молочной железы только опухолевые клетки MCF-7 и T47D генерируют метастазы в лимфатических узлах у мышей линии Nude или SCID [319]. Клетки MCF-7 и T47D формируют метастазы только через 12 недель после ортотопической трансплантации иммунодефицитным мышам, и, кроме того, для роста опухоли клетки MCF-7 нуждаются в стимуляции эстрогеном в виде инъекции или с использованием помпы-дозатора с прописанными временами инъекций [317]. Первичные опухоли, образованные клетками MDA-MB 231, MDA-MB 436 и MCF-7 на мышах NOD/SCID при внутривенном введении вызывали метастазы в подмышечных, паховых или брыжеечных лимфоузлах, но не в лимфатический узел средостения [318]. Таким образом, можно заключить, что полученная культура клеток BrCCh4e, формирующая опухоль без дополнительных стимуляторов и обладающая способностью метастазировать в лимфатические узлы средостения, может быть полезной моделью для изучения молекулярных механизмов, лежащих в основе метастазирования опухолей молочной железы в лимфатические узлы.

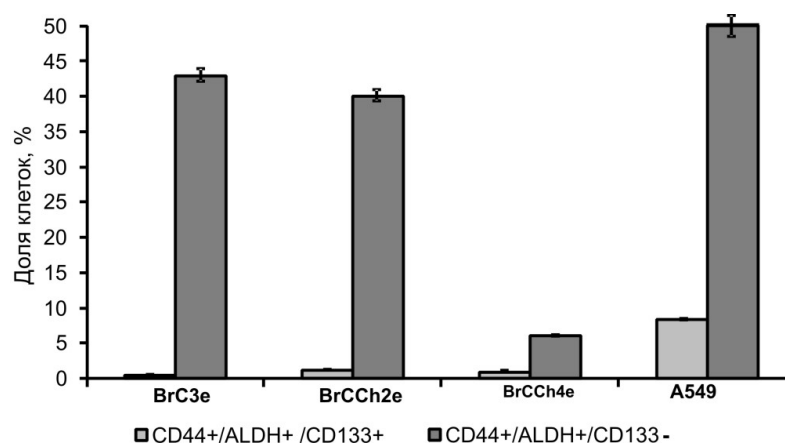
Коэкспрессия рецепторов тирозинкиназ HER2/HER3 может усиливать инвазивность и подвижность клеток молочной железы при метастазировании [276]. Сравнение экспрессии рецепторов HER2/HER3 в клетках культур, дающих рост опухоли *in vivo*, показал, что культуры BrC3e и BrCCh2e не содержат HER3, и, следовательно, не могли формировать функциональные димеры HER2/HER3, в отличие от клеток BrCCh4e, где содержание клеток, одновременно экспрессирующих HER2/HER3 составляет 44%. Поскольку димер HER2/HER3 функционирует как онкогенная единица, в гормон-независимых опухолях активный димер может способствовать пролиферации и метастазированию [320]. Сравнивая другие протестированные молекулярные маркеры в полученных эпителиальных культурах



клеток, чтобы выявить различия между опухоленными и нетуопуелными эпителиальными клетками, можно заключить, что нетуопуелные культуры эпителиального фенотипа не содержат N-кадгерин. Гипотеза о важности N-кадгерина для опухоленных свойств опухолевых клеток нуждается в исследовании на более объемной выборке опухолевых культур.

### 3.5.1 Дополнительные маркеры опухолевых стволовых клеток в опухоленных культурах клеток молочной железы

Поскольку при сравнении уровня целого ряда маркеров – HER2/HER3, Ki-67 и маркеров мезенхимального перехода культуры BrC3e, BrCCh2e и BrCCh4e слабо отличались между собой, не было до конца ясно, какой фактор позволяет клеткам BrCCh4e индуцировать метастазирование. Известно, что только небольшое фенотипически отличное подмножество клеток в опухоли обладает способностью пролиферировать и формировать новые опухоли [321]. В настоящее время экспериментальные данные свидетельствуют о том, что группа клеток с CD24<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> может представлять собой более устойчивую к лекарственным препаратам популяцию. В моделях ЗОМЖ на животных при лечении герцептином или паклитакселем фракция CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> клеток снижалась, но фракция CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> увеличивалась [246].



**Рис. 33.** Содержание клеток с различным уровнем маркеров CD44, CD133 и активностью ALDH1 в опухоленных культурах клеток молочной железы. Данные проточной цитофлуориметрии.

В дополнение к молекулярным маркерам CD44/CD24 в настоящее время предложен функциональный маркер – активность фермента альдегиддегидрогеназы 1 (ALDH1) *in vivo*, фракция клеток ЗОМЖ с активностью ALDH1 показывала высокую способность

опухолеобразования и низкую выживаемость животных-опухоленосителей даже в отсутствие метастазов [322]. Дальнейшие исследования показали, что клетки с фенотипом ALDH1<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> были основной популяцией опухоль-образующих клеток ЗОМЖ в иммунодефицитных мышах [323]. Для выявления экспрессии дополнительных маркеров ОСК в туморогенных культурах BrC3e, BrCCh2e и BrCCh4e проводили иммуноокрашивание поверхностных маркеров CD44 и CD133, и тест функциональной на активности ALDH1. На Рис. 33 представлены результаты анализа маркеров ОСК методом проточной цитометрии. Для сравнительного анализа были выбраны популяции CD44<sup>+</sup>/ALDH1<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> и CD44<sup>+</sup>/ALDH1<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup>.

Клетки A549 аденокарциномы легкого использовали в качестве положительного контроля, как имеющие высокоактивный фермент ALDH1. Изначально для построения гейтов выделяли популяцию клеток CD44<sup>+</sup>, а затем только среди этих клеток определяли клетки CD133<sup>+</sup>/ALDH1<sup>+</sup>. Процентное содержание клеток с искомым фенотипом в культурах составлял 0.4% для линии BrC3e, 1.14% для линии BrCCh2e, 0.89% для линии BrCCh4e (Рис. 33). Таким образом, исследуемые культуры содержат незначительную долю клеток с фенотипом CD133<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>/ALDH1<sup>+</sup>. В то же время, клетки с фенотипом CD44<sup>+</sup>/ALDH1<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup> присутствовали в значительном количестве во всех исследуемых культурах, кроме BrCCh4e (Рис. 33). Возможно, фенотипа CD44<sup>+</sup>/ALDH1<sup>+</sup> было достаточно для проявления свойств опухолевых стволовых клеток. Поскольку содержание популяции клеток с фенотипом ОСК в культуре BrCCh4e было ниже, чем в двух других туморогенных культурах, объяснить высокую скорость роста опухоли у мышей и метастатический потенциал клеток BrCCh4e только наличием ОСК не представляется возможным. В Таблице 15 приведен сводный фенотип, основанный на выявленных маркерах для туморогенных культур клеток BrC3e, BrCCh2e и BrCCh4e.

**Таблица 15.** Фенотип туморогенных культур клеток

<b>Культура клеток</b>			
<b>Фенотип</b>	<b>BrC3e</b>	<b>BrCCh2e</b>	<b>BrCCh4e</b>
<b>Зависимость от гормонов</b>	независимая	независимая	независимая
<b>Ki-67</b>	++	+	++
<b>EGFR</b>	-	-	-
<b>HER2<sup>+</sup>, %</b>	10.9	12	51
<b>HER3<sup>+</sup>, %</b>	16.9	18.7	65.8
<b>HER2<sup>+</sup>/HER3<sup>+</sup>, %</b>	6.4	8.2	44

<b>N-кадгерин, %</b>	10.2	20	8.8
<b>E-кадгерин, %</b>	97	58.1	89
<b>Mel-CAM, %</b>	34.9	65.7	71.5
<b>EpCAM, %</b>	98.2	60.4	97
<b>CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>, %</b>	83.8	60.9	59.2
<b>CD44<sup>+</sup>/ALDH1<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>, %</b>	0.4	1.14	0.89
<b>CD44<sup>+</sup>/ALDH1<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup>, %</b>	42.9	40	6.1

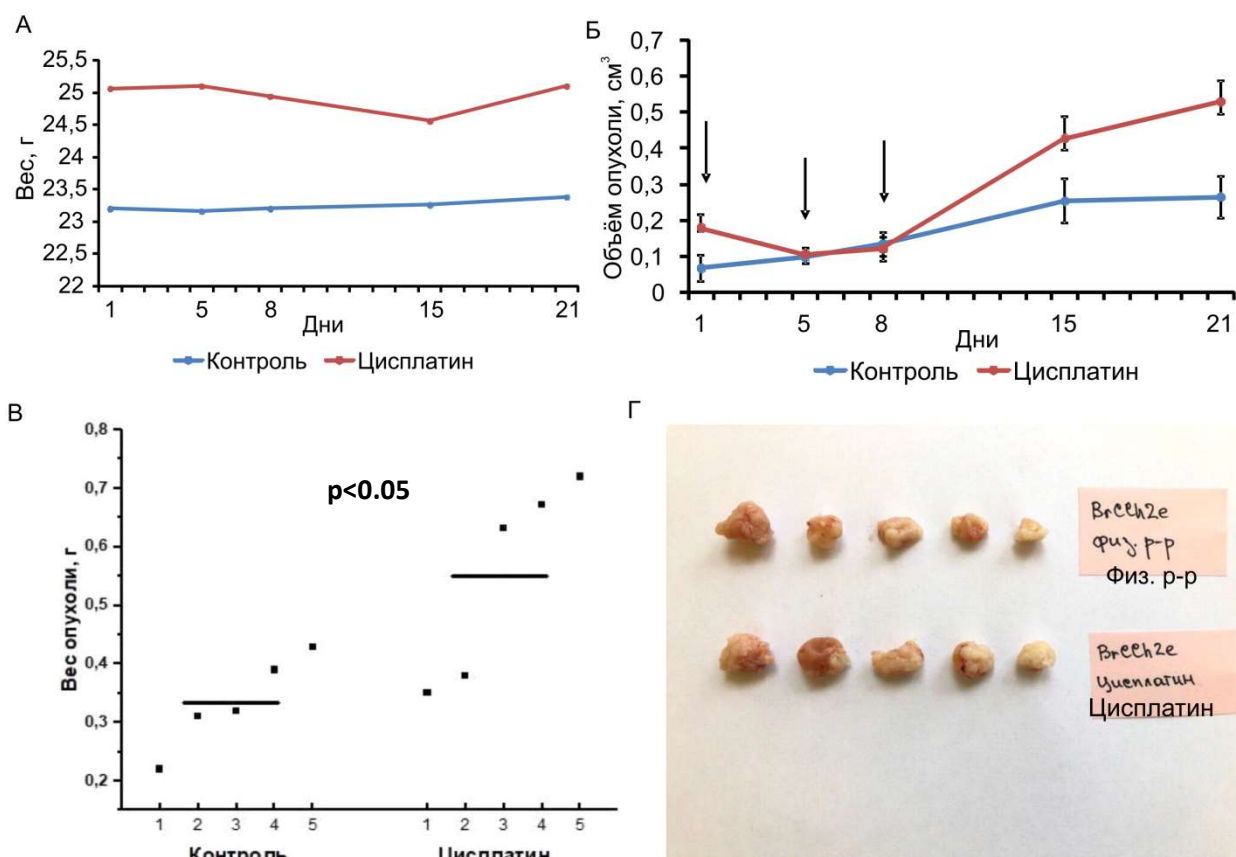
++ ярко выражен, + средне выражен, - не выражен

Клетки BrCCh4e характеризовались высоким уровнем белка Ki-67, что типично для низко дифференцированных опухолей. Известно, что во всех опухолях, которые дают метастазы, детектируют высокую экспрессию белка Ki-67, что хорошо согласуется с полученными данными [324].

### 3.5.2 Чувствительность опухоли BrCCh2e к цисплатину *in vivo*

Поскольку культура BrCCh2e давала рост опухоли на иммунодефицитных мышах, было важно сравнить чувствительность этой опухоли *in vivo* к препаратам с чувствительностью культур клеток *in vitro*. Клетки культуры BrCCh2e были трансплантированы подкожно ( $4 \times 10^6$  клеток на мышь) мышам линии SCID. Через 3 недели были сформированы две группы по 5 мышей для дальнейшего лечения: контрольная группа, получавшая 200 мкл физиологического раствора внутривентриально и группа, получавшая 200 мкл цисплатина (3.5 мг/кг) внутривентриально. В ходе эксперимента животных взвешивали для оценки токсичности исследуемых препаратов (Рис. 34, А). На Рис. 34, Б результаты исследования представлены в виде графиков зависимости изменения объема опухоли во времени. Видно, что после 3-й инъекции цисплатина не происходит торможения роста опухоли, а напротив, наблюдается рост опухолевого узла. Можно видеть, что средний вес опухоли в контрольной группе был достоверно меньше среднего веса опухоли в группе животных, получавших цисплатин ( $p < 0.05$ , U-критерий Манна-Уитни) (Рис. 34, В). Поскольку культура клеток BrCCh2e получена из опухоли пациента, прошедшего 4 курса комплексной химиотерапии циклофосфаном и доксорубицином, возможно при терапии опухоли BrCCh2e *in vivo* развилась также резистентность к цисплатину. В культуре клетки BrCCh2e демонстрировали устойчивость к доксорубицину и слабую чувствительность к цисплатину. Полученные данные позволяют предположить, что популяция резистентных клеток, по-видимому, имела более высокий индекс пролиферации относительно остальных

опухолевых клеток, что вело к селекции таких клеток *in vivo* и как результат к усилению роста опухолей в группе лечения цисплатином.



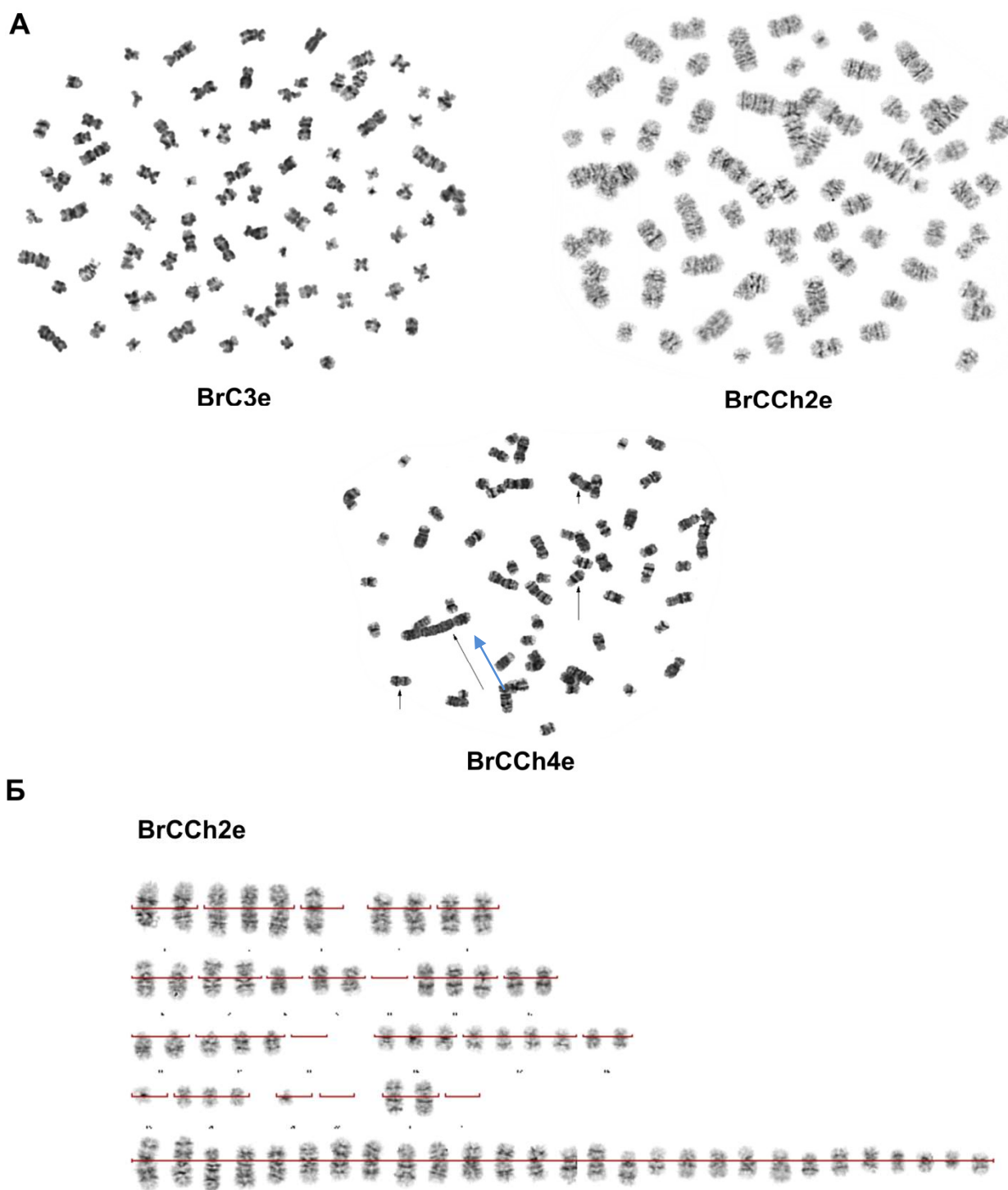
**Рис. 34.** Чувствительность опухоли BrcCh2e к цисплатину *in vivo*. **А.** Динамика веса мыши. **Б.** Динамика роста опухолей. Стрелками отмечены дни введения препарата. **В.** Вес опухолей в финальной точке эксперимента. **Г.** Извлеченные опухоли. Статистический анализ различия размеров опухолей между группами проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни, при  $p < 0.05$  различия считали достоверными.

Таким образом, получена модель опухоли, устойчивой к цисплатину – BrcCh2e, которая может быть использована при исследовании молекулярных механизмов развития лекарственной устойчивости, а также подходов, позволяющих преодолевать лекарственную резистентность.

### 3.6 Кариотип клеток туморогенных опухолевых культур молочной железы

Аномальные хромосомы являются одной из ключевых характеристик опухолевых клеток. Используя инкубацию с колхицином и окрашивание красителем Гимза с

предварительной обработкой трипсином (GTG-окрашивание) мы показали, что все опухолевые клеточные культуры содержат хромосомный набор, отличный от диплоидного.



**Рис. 35.** А. GTG-окрашенные метафазные хромосомы в опухолевых культурах клеток. Стрелками указаны одинаковые хромосомы. Синяя стрелка указывает на крупную дицентрическую хромосому. Б. Кариограмма BrCCh2e.

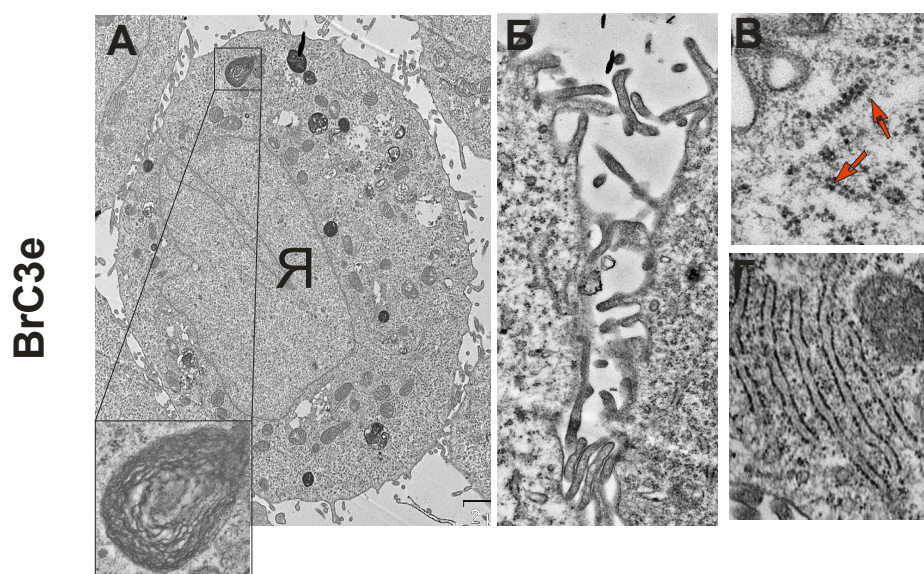
Анализ кариотипа проводили совместно с руководителем группы цитогенетики ИХБФМ СО РАН, к.б.н. Гайнер Т.А. В каждой клеточной культуре анализировали по 50 метафазных пластинок. Для анализа выбирали округлые отдельно лежащие пластинки и подсчитывали количество хромосом в каждой пластинке. Наиболее заметным изменением были множественные хромосомные перестройки, но около 50% хромосом в каждой пластинке имели GTG рисунок нормальных хромосом человека. Обнаружено, что анализируемые клеточные линии имеют женский псевдотриплоидный набор хромосом. Модальное число хромосом в клетках BrC3e составляло 79 с диапазоном от 67 до 91 (Рис. 35, А), в клетках BrCCh2e составляло 76 с диапазоном от 51 до 147 (Рис. 35, А и Б). Модальное количество хромосом в клетках BrCCh4e составляло 71 с диапазоном от 49 до 78. Помимо стандартных перестроек, клетки BrCCh4e содержат большую дицентрическую хромосому (Рис. 35, А). Мы наблюдали, что перегруппировки в некоторых хромосомах в различных метафазных пластинках имели одинаковое GTG-окрашивание. Эти данные позволяют предположить, что однажды возникающие в опухолевых клетках, хромосомные перестройки наследуются в раундах деления клеток. Однако, также наблюдаемые и уникальные хромосомные aberrации (Рис. 35, А, синяя стрелка) указывают на то, что в опухолевых клетках они могут возникать при каждом новом раунде клеточного деления.

Анеуплоидный набор хромосом с множественными сложными перестройками, наблюдаемый в исследуемых культурах, делает кариотипы нестабильными. Как правило, такие хромосомные перестройки происходят в результате ошибок процессов репликации, рекомбинации и цитокинеза. Дицентрические хромосомы довольно часто можно видеть в опухолевых клетках, и даже одна дицентрическая хромосома может стимулировать дальнейшую перестройку генома и неопластическую конверсию [325].

### **3.7 Ультраструктура туморогенных опухолевых клеток молочной железы**

В хорошо дифференцированных карциномах, которые представляют собой злокачественные эпителиальные опухоли, клетки имеют тенденцию к организации в эпителиальные структуры, а цитоплазма содержит характерные для нетрансформированных клеток компоненты продукты секреции клетки, кератин, гликоген и другие. В плохо дифференцированных/недифференцированных карциномах опухолевые клетки теряют свои эпителиальные свойства. Злокачественная трансформация также включает изменение размера и формы клеток, размера их ядер, гиперхроматизм ядер вследствие гиперплоидии, и повышенную митотическую активность. Эти изменения отражают также статус дифференцированности опухоли, являются ее индивидуальной характеристикой могут быть учтены при постановке диагноза [326].

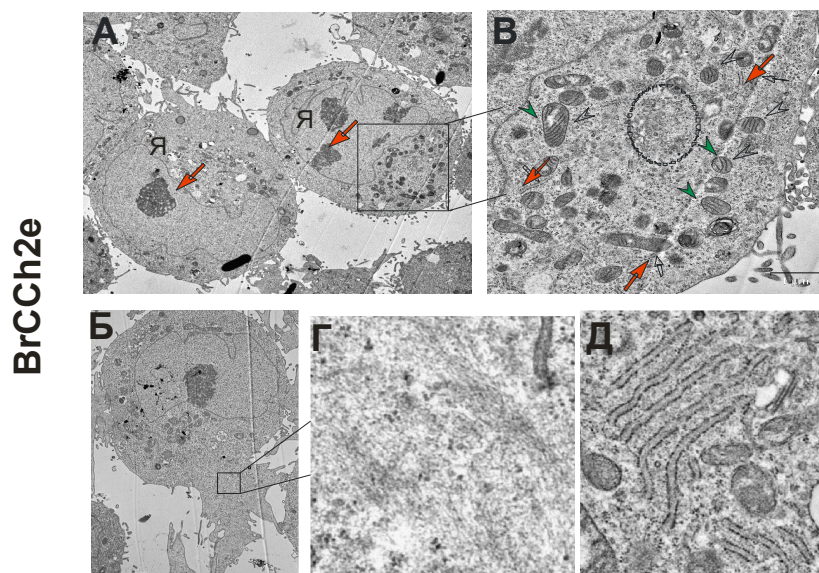
Ультраструктуру клеток опухолевых культур ЗОМЖ анализировали с помощью электронной микроскопии на ультратонких (работа выполнена с аспирантом ИХБФМ СО РАН Юнусовой А. Ю). Клетки культуры BrC3e имеют округлую форму с диаметром 15–16 мкм и содержат многочисленные выросты плазмалеммы (Рис. 36, А и Б). На поверхности плазматической мембраны клеток часто встречаются «опушенные ямки» - небольшие углубления плазмалеммы округлой формы со слоем «зубчиков» на цитоплазматической поверхности плазмалеммы. Данные структуры являются морфологическим признаком клатрин-зависимого эндоцитоза.



**Рис. 36.** Ультраструктура клеток BrC3e. **А.** Общий вид клетки BrC3e, ядро (Я), на врезке – миелиноподобная структура. **Б.** Поверхности двух соседних клеток с многочисленными выростами плазмолеммы. **В.** Полисомы в цитоплазме (показаны стрелками). **Г.** «Стопка» цистерн гранулярного ЭПС. Ультратонкие срезы.

Большинство клеток культуры BrCCh2e имеют округлую форму с диаметром 15–18 мкм. Зачастую эти клетки имеют широкие отростки (Рис. 37, А и Б), а также на поверхности плазмалеммы присутствуют редкие опушенные ямки и гладкомембранные фляжкообразные углубления. В ряде случаев соседние клетки плотно прилегают друг к другу, расстояние между клетками менее 10 нм. В цитоплазме клеток хорошо дифференцируются: рибосомы, ЭПР, аппарат Гольджи, митохондрии, ранние эндосомы, поздние эндосомы (мультивезикулярные тельца, МВТ), лизосомы, миелино-подобные структуры, ядра и волокна цитоскелета. В клетках отмечается большое количество митохондрий с немногочисленными пластинчатыми кристами и матриксом, электронная плотность

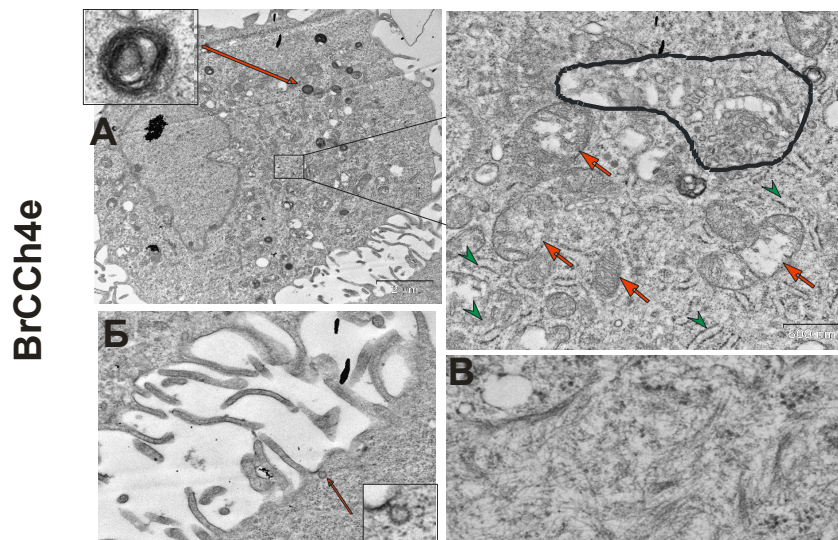
которого больше, чем у цитоплазмы (Рис. 37, В). Миелино-подобные структуры регистрируются не во всех клетках, их число значительно меньше, чем в клетках культуры BrC3e. На срезе одной клетки их число варьирует от 0 до 5. Компоненты цитоскелета в цитоплазме клеток представлены отдельными тонкими волокнами диаметром 5–10 нм или рыхлыми пучками таких волокон.



**Рис. 37.** Ультраструктура клеток BrCCh2e. **А.** Общий вид клеток BrCCh2e, ядра (Я) с крупными ядрышками (показаны стрелками), контуром обведен участок цитоплазмы с органеллами. **Б.** Клетка с широким отростком цитоплазмы. **В.** Фрагмент цитоплазмы клетки BrCCh2e – многочисленные митохондрии (показаны головками стрелок) локализуются вокруг аппарата Гольджи (обведён контуром), цистерны ЭПР показаны стрелками. **Г.** Промежуточные филаменты в цитоплазме клеток. **Д.** «стопка» цистерн гранулярного ЭПС. Ультратонкие срезы.

Все клетки культуры BrCCh4e имеют округлую форму и диаметр около 15 мкм (Рис. 38, А и Б). В ряде случаев клетки плотно прилежат друг к другу – расстояние между соседними клетками менее 10 нм. В цитоплазме этих клеток визуализируются рибосомы, ЭПР, аппарат Гольджи, митохондрии, эндосомы, мультивезикулярные тельца (МВТ), лизосомы, миелино-подобные структуры, ядра и компоненты цитоскелета. Миелино-подобные структуры регистрируются во всех клетках. На срезе одной клетки их число варьирует от 0 до 8 (Рис. 38, А).





**Рис. 38.** Ультраструктура клеток BrCCh4e. **А.** Общий вид клетки BrCCh4e; на врезке слева показана миелиноподобная структура; на врезке справа – фрагмент цитоплазмы клетки с митохондриями (показаны стрелками), цистернами гранулярного ЭПР (головками стрелок) и аппаратом Гольджи (обведен контуром). **Б.** Поверхности двух соседних клеток с многочисленными выростами плазмолеммы, на врезке – «опушенный» пузырьёк. **В.** Волокна и пучки волокон промежуточных филаментов. Ультратонкие срезы.

Образцы клеток BrC3e и BrCCh4e однородны и состоят из клеток одинаковой морфологии, тогда как в образце BrCCh2e встречаются клетки, в которых накапливается гликоген. В образцах клеток BrCCh2e и BrCCh4e отмечается большое количество клеток в состоянии митоза.

Анализируя особенности ультраструктуры опухолевых клеток, можно заключить, что морфологически клетки BrC3e, BrCCh2e и BrCCh4e имеют сходные размеры и фенотип недифференцированных опухолевых клеток.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

На сегодняшний день не существует единой клеточной и опухолевой модели на животных моделирующих опухолевую прогрессию. В связи с этим, обеспечение разнообразия клеточных и опухолевых моделей злокачественных новообразований остается актуальной задачей. В настоящей работе разработан метод получения первичных культур клеток молочной железы и эндометрия человека и показано, что неферментативный метод дезагрегации ткани является наиболее продуктивным для получения жизнеспособных культур с эпителиальным фенотипом. В качестве источника биологического материала для получения культур клеток использовали непосредственно образцы ткани опухолей, полученных при хирургической резекции и диагностическом выскабливании. Для сравнения ферментативных методов дезагрегации ткани использовали коллагеназу I типа и IV типа. В результате выполнения исследования получены 5 культур клеток эндометрия и 12 культур клеток молочной железы человека. Полученные культуры клеток ЗОЭ сохраняли паттерн рецепторов стероидных гормонов исходной опухоли, тогда как большинство культур клеток ЗОМЖ утрачивали рецепторы к эстрогенам и прогестерону.

Поскольку метастазирование представляет собой двухстадийный процесс, включающий стадии эпителиально-мезенхимального и мезенхимально-эпителиального перехода, полученные парные опухолевые культуры, представляющие мезенхимальное состояние и эпителиальное состояние клеток опухоли, применимы для изучения метастазирования опухолей молочной железы. Показано, что прохождение клетками МЭП ведет к значительному увеличению уровня Ki-67, что отражает повышенную пролиферативную активность эпителиальных опухолевых клеток. Таким образом, мезенхимальное и эпителиальное состояние клеток опухоли несет различную функциональную нагрузку: эпителиальные клетки обеспечивают высокий уровень пролиферации, а мезенхимальные - подвижность и инвазию.

Три из полученных культур клеток ЗОМЖ туморогенны действие при трансплантации мышам SCID. Вопреки ожиданиям, не удалось установить взаимосвязь между содержанием опухолевых стволовых клеток в культуре и её туморогенностью как для культур ЗОЭ, так и для культур ЗОМЖ. Модель метастазирующей в лимфоузлы средостения ЗОМЖ является уникальной опухолевой моделью, позволяющей исследовать молекулярные механизмы специфичности метастазирования и исследовать активность антиметастатических агентов.

Разработанный метод получения персональных клеточных культур из опухолевой ткани пациента будет полезен при разработке новых скрининговых методик персонализированной медицины. Полученные клеточные и опухолевые модели будут

полезны для исследователей, работающих в области клеточной биологии, канцерогенеза и исследования новых противоопухолевых препаратов.

## ВЫВОДЫ

1. Разработан метод получения первичных культур клеток из онкотрансформированной и нетрансформированной ткани молочной железы и эндометрия человека. Получено 5 культур клеток эндометрия и 12 культур клеток молочной железы человека. Показано, что ферментативный метод дезагрегации ткани является наиболее продуктивным для получения жизнеспособных культур с эпителиальным фенотипом. Разработан метод “импульсной гипоксии” для индукции мезенхимально-эпителиального перехода в опухолевых культурах клеток молочной железы человека *in vitro*.
2. Показано, что клетки полученных опухолевых культур с эпителиоподобным фенотипом содержат маркеры эпителиальных клеток E-кадгерин и EpCAM, а клетки культур с фибробластоподобным фенотипом маркеры мезенхимальных клеток – N-кадгерин, Mel-CAM, виментин, а также рецепторы эпидермальных факторов роста HER2, HER3 и EGFR.
  - Показано, что полученные опухолевые культуры клеток эндометрия и молочной железы содержат значительную долю опухолевых стволовых клеток с соответствующими фенотипами - фенотипом CD44<sup>-</sup>/CD24<sup>-</sup> для культур эндометрия и CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> для культур молочной железы.
3. Сравнение чувствительности клеток опухолевых культур эндометрия и молочной железы к противоопухолевым агентам показало, что
  - Культуры клеток с мезенхимальным фенотипом устойчивы к цисплатину, доксорубину, афинитору, паклитакселу, метатрексату и хлорокину.
  - Показано, что при обработке культур клеток молочной железы препаратом ИФН $\alpha$  изменение относительного уровня мРНК IFIT3 обратно пропорционально базовому уровню этой мРНК в клетках, и базовый уровень мРНК IFIT3 может отражать чувствительность клеток к иммуностимулирующим препаратам.
4. Показано, что среди полученных культур клеток злокачественных опухолей эндометрия и молочной железы человека культуры BrC3e, BrCCh2e и BrCCh4e туморогенны при трансплантации мышам линии SCID.
  - Гистологический анализ полученных опухолей показал, что опухолевые клетки формируют структуры, гомологичные структурам в молочной железе человека с признаками тканевого и клеточного атипизма.
  - Получена модель метастазирующей злокачественной опухоли молочной железы человека. При подкожной трансплантации мышам клеток BrCCh4e опухоль метастазирует в лимфоузлы средостения. Клетки BrCCh4e имеют фенотип малодифференцированных

опухолевых клеток с псевдотриплоидным набором хромосом и множественными абберациями.

- Опухоль BrCCh2e является моделью ЗОМЖ, устойчивой к цисплатину.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Nushtaeva A., Karpushina A., Ermakov M., Gulyaeva L., Gerasimov A., Sidorov S, Gayner T., Yunusova A., Tkachenko A., Richter V., Koval O. Establishment of primary human breast cancer cell lines using “pulsed hypoxia” method and development of metastatic tumor model in immunodeficient mice. // *Cancer Cell Int.* – 2019. – V. 19. – P. 46 (1-19). – doi:10.1186/s12935-019-0766-5
2. Nushtaeva A., Stepanov G., Semenov D., Zhuravlev E., Balahonova E, Gerasimov A., Sidorov S., Savelyev E., Kuligina E., Richter V., Koval O. Characterization of primary normal and malignant breast cancer cell and their response to chemotherapy and immunostimulatory agents. // *BMC Cancer.* – 2018. –V. 18. –N. 1. –P. 728 (1-11). – doi: 10.1186/s12885-018-4635-84
3. Koval O., Sakaeva G., Fomin A., Nushtaeva A., Semenov D., Kuligina E., Gulyaeva L., Gerasimov A., Richter V. Sensitivity of endometrial cancer cells from primary human tumour samples to new potential anticancer peptide lactaptin. // *J Cancer Res Ther.* – 2015. – V. 2. – P. 345-351. – doi: 10.4103/0973-1482.157301

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. van Staveren W.C.G., Solís D.Y.W., Hébrant A., Detours V., Dumont J.E., Maenhaut C. Human cancer cell lines: Experimental models for cancer cells in situ? For cancer stem cells? // *Biochim. Biophys. Acta BBA – Reviews on Cancer*. – 2009. – V. 1795 – № 2. – P. 92–103.
2. Vargo–Gogola T., Rosen J.M. Modelling breast cancer: one size does not fit all // *Nat. Rev. Cancer*. – 2007. – V. 7 – № 9. – P. 659–672.
3. Hynds R.E., Vladimirov E., Janes S.M. The secret lives of cancer cell lines // *Dis. Model. Mech.* – 2018. – V. 11 – № 11. – P. Dmm037366.
4. Ben–David U., Siranosian B., Ha G., Tang H., Oren Y., Hinohara K., Strathdee C.A., Dempster J., Lyons N.J., Burns R., et al. Genetic and transcriptional evolution alters cancer cell line drug response // *Nature*. – 2018. – V. 560 – № 7718. – P. 325–330.
5. Fang Y., Elahi A., Denley R.C., Rao P.H., Brennan M.F., Jhanwar S.C. Molecular characterization of permanent cell lines from primary metastatic and recurrent malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST) with underlying neurofibromatosis–1 // *Anticancer Res.* – 2009. – V. 29 – № 4. – P. 1255–1262.
6. Hakoziaki M., Hojo H., Sato M., Tajino T., Yamada H., Kikuchi S., Abe M. Establishment and characterization of a novel human malignant peripheral nerve sheath tumor cell line FMS–1 that overexpresses epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase–2 // *Virchows Arch.* – 2009. – V. 455 – № 6. – P. 517–526.
7. Sander K. Wilhelm Roux and the rest: Developmental theories 1885–1895 // *Roux's Arch. Dev. Biol.* – 1991. – V. 200 – № 6. – P. 297–299.
8. Harrison R.G., Greenman M.J., Mall F.P., Jackson C.M. Observations of the living developing nerve fiber // *Anat. Rec.* – 1907. – V. 1 – № 5. – P. 116–128.
9. Harrison R.G. The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement // *J. Exp. Zool.* – 1910. – V. 9 – № 4. – P. 787–846.
10. Carrel A., Lindbergh C.A. The culture of whole organs // *Science*. – 1935. – V. 81 – № 2112. – P. 621–623.
11. Sanford K.K., Earle W.R., Likely G.D. The growth in vitro of single isolated tissue cells // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1948. – V. 9 – № 3. – P. 229–246.
12. Scherer W.F., Syverton J.T., Gey G.O. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix // *J. Exp. Med.* – 1953. – V. 97 – № 5. – P. 695–710.
13. Jedrzejczak–Silicka M. Chapter 1: History of Cell Culture // *New Insights into Cell Culture Technology* / Gowder, S.J.T., ed. – 2017. – P. 1–43.

14. Enders J.F., Weller T.H., Robbins F.C. Cultivation of the Lansing Strain of Poliomyelitis Virus in Cultures of Various Human Embryonic Tissues // *Science*. – 1949. – V. 109 – № 2822. – P. 85–87.
15. Olovnikov A.M. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon // *J. Theor. Biol.* – 1973. – V. 41 – № 1. – P. 181–190.
16. Bodnar A.G., Ouellette M., Frolkis M., Holt S. E., Chiu C.P., Morin G.B., Harley C.B., Shay J.W., Lichtsteiner S., Wright W.E. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells // *Science*. – 1998. – V. 279 – № 5349. – P. 349–352.
17. Brown R.W., Henderson J.H. The Mass Production and Distribution of HeLa Cells at Tuskegee Institute 1953–55 // *J. Hist. Med. Allied Sci.* – 1983. – V. 38 – № 4. – P. 415–431.
18. Masters J.R. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly // *Nat. Rev. Cancer*. – 2002. – V. 2 – № 4. – P. 315–319.
19. Hayflick L. Mortality and immortality at the cellular level. A review // *Biochem. Biokhimiia*. – 1997. – V. 62 – № 11. – P. 1180–1190.
20. Sambrook J., Sharp P.A., Keller W. Transcription of simian virus 40 // *J. Mol. Biol.* – 1972. – V. 70 – № 1. – P. 57–71.
21. Huebner R.J., Todaro G.J. Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1969. – V. 64 – № 3. – P. 1087–1094.
22. Lundberg A. S., Randell S. H., Stewart S. A., Elenbaas B., Hartwell K. A., Brooks M. W., Fleming M. D., Olsen J. C., Miller S. W., Weinberg R. A. Immortalization and transformation of primary human airway epithelial cells by gene transfer // *Oncogene*. – 2002. – V. 21 – № 29. – P. 4577–4586.
23. Hayflick L. The future of ageing // *Nature*. – 2000. – V. 408 – № 6809. – P. 267–269.
24. Hayflick L., Moorhead P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains // *Exp. Cell Res.* – 1961. – V. 25 – № 3. – P. 585–621.
25. Freshney R.I. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications* / Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons Inc. – 2010. – P. 35–57
26. Tomlinson G.E., Chen T.T., Stastny V.A., Virmani A.K., Spillman M.A., Tonk V., Blum J.L., Schneider N.R., Wistuba I.I., Shay J.W., et al. Characterization of a breast cancer cell line derived from a germ-line BRCA1 mutation carrier // *Cancer Res.* – 1998. – V. 58 – № 15. – P. 3237–3242.
27. Finlay G.J., Baguley B.C. The use of human cancer cell lines as a primary screening system for antineoplastic compounds // *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* – 1984. – V. 20 – № 7. – P. 947–954.



28. Burdall S.E., Hanby A.M., Lansdown M.R. J., Speirs V. Breast cancer cell lines: friend or foe? // *Breast Cancer Res. BCR.* – 2003. – V. 5 – № 2. – P. 89–95.
29. Gillet N.A., Malani N., Melamed A., Gormley N., Carter R., Bentley D., Berry C., Bushman F.D., Taylor G.P., Bangham C.R.M. The host genomic environment of the provirus determines the abundance of HTLV-1-infected T-cell clones // *Blood.* – 2011. – V. 117 – № 11. – P. 3113–3122.
30. Castell J.V., Gómez-Lechón M.J. *Liver Cell Culture Techniques // Hepatocyte Transplantation / Dhawan, A.Hughes, R.D., eds. Totowa, NJ – 2009. – P. 35–46.*
31. Li F., Vijayasankaran N., Shen A. (Yijuan), Kiss R., Amanullah A. Cell culture processes for monoclonal antibody production // *mAbs.* – 2010. – V. 2 – № 5. – P. 466–479.
32. Cunningham D.E. Blocking resolution: How external states can prolong civil wars // *J. Peace Res.* – 2010. – V. 47 – № 2. – P. 115–127.
33. Francesco F.D., Mannucci S., Conti G., Prè E.D., Sbarbati A., Riccio M. A Non-Enzymatic Method to Obtain a Fat Tissue Derivative Highly Enriched in Adipose Stem Cells (ASCs) from Human Lipoaspirates: Preliminary Results // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – V. 19 – № 7. – P. 2061.
34. Mitra A., Mishra L., Li S. Technologies for deriving primary tumor cells for use in personalized cancer therapy // *Trends Biotechnol.* – 2013. – V. 31 – № 6. – P. 347–354.
35. Si L.-L., Lv L., Zhou W.-H., Hu W.-D. Establishment and identification of human primary lung cancer cell culture in vitro // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* – 2015. – V. 8 – № 6. – P. 6540–6546.
36. Garg A., Houlihan D.D., Aldridge V., Suresh S., Li K.K., King A.L., Sutaria R., Fear J., Bhogal R.H., Lalor P.F., et al. Non-enzymatic dissociation of human mesenchymal stromal cells improves chemokine-dependent migration and maintains immunosuppressive function // *Cytotherapy.* – 2014. – V. 16 – № 4. – P. 545–559.
37. Evans R.A. Soft tissue sarcoma: The enigma of local recurrence // *J. Surg. Oncol.* – 1993. – V. 53 – № 2. – P. 88–91.
38. Pei X.F., Noble M.S., Davoli M.A., Rosfjord E., Tilli M.T., Furth P.A., Russell R., Johnson M.D., Dickson R.B. Explant-cell culture of primary mammary tumors from MMTV-c-Myc transgenic mice // *Vitro Cell. Dev. Biol. – Anim.* – 2004. – V. 40 – № 1. – P. 14.
39. Ghosh S., Prasad M., Kundu K., Cohen L., Yegodayev K.M., Zorea J., Joshua B.-Z., Lasry B., Dimitstein O., Bahat-Dinur A., et al. Tumor Tissue Explant Culture of Patient-Derived Xenograft as Potential Prioritization Tool for Targeted Therapy // *Front. Oncol.* – 2019. – V. 9. – P.eCollection 2019
40. Okada Y., Momozawa Y., Sakaue S., Kanai M., Ishigaki K., Akiyama M., Kishikawa T., Arai Y., Sasaki T., Kosaki K., et al. Deep whole-genome sequencing reveals recent selection

signatures linked to evolution and disease risk of Japanese // *Nat. Commun.* – 2018. – V. 9 – № 1. – P. 1-10.

41. Namekawa T., Ikeda K., Horie-Inoue K., Inoue S. Application of Prostate Cancer Models for Preclinical Study: Advantages and Limitations of Cell Lines Patient-Derived Xenografts and Three-Dimensional Culture of Patient-Derived Cells // *Cells.* – 2019. – V. 8 – № 1. – P. 74.

42. Nguyen P.D., Gurevich D.B., Sonntag C., Hersey L., Alaei S., Nim H.T., Siegel A., Hall T.E., Rossello F.J., Boyd S.E., et al. Muscle Stem Cells Undergo Extensive Clonal Drift during Tissue Growth via Meox1-Mediated Induction of G2 Cell-Cycle Arrest // *Cell Stem Cell.* – 2017. – V. 21 – № 1. – P. 107–119.e6.

43. Serna V.A., Kurita T. Patient-derived xenograft model for uterine leiomyoma by sub-renal capsule grafting // *J. Biol. Methods.* – 2018. – V. 5 – № 2. – P.e91

44. Abualhassan N., Sapozhnikov L., Pawlick R.L., Kahana M., Pepper A. R., Bruni A., Gala-Lopez B., Kin T., Mitrani E., Shapiro A.M.J. Lung-Derived Microscaffolds Facilitate Diabetes Reversal after Mouse and Human Intraperitoneal Islet Transplantation // *PLOS ONE.* – 2016. – V. 11 – № 5. – P. E0156053.

45. Terada N., Shimizu Y., Kamba T., Inoue T., Maeno A., Kobayashi T., Nakamura E., Kamoto T., Kanaji T., Maruyama T., et al. Identification of EP4 as a Potential Target for the Treatment of Castration-Resistant Prostate Cancer Using a Novel Xenograft Model // *Cancer Res.* – 2010. – V. 70 – № 4. – P. 1606–1615.

46. Gao H., Korn J.M., Ferretti S., Monahan J.E., Wang Y., Singh M., Zhang C., Schnell C., Yang G., Zhang Y., et al. High-throughput screening using patient-derived tumor xenografts to predict clinical trial drug response // *Nat. Med.* – 2015. – V. 21 – № 11. – P. 1318–1325.

47. Ross A.M., Nandivada H., Ryan A.L., Lahann J. Synthetic substrates for long-term stem cell culture // *Polymer.* – 2012. – V. 53 – № 13. – P. 2533–2539.

48. Swain P. Basic Techniques and Limitations in Establishing Cell Culture: a Mini Review // *Adv. Anim. Vet. Sci.* — 2014. – V. 2 – № 4S. – P. 1–10.

49. Frahm B., Blank H.-C., Cornand P., Oelßner W., Guth U., Lane P., Munack A., Johannsen K., Pörtner R. Determination of dissolved CO<sub>2</sub> concentration and CO<sub>2</sub> production rate of mammalian cell suspension culture based on off-gas measurement // *J. Biotechnol.* – 2002. – V. 99 – № 2. – P. 133–148.

50. Lee W.-Y., Park H.-J., Lee R., Lee K.-H., Kim Y.-H., Ryu B.-Y., Kim N.-H., Kim J.-H., Kim J.-H., Moon S.-H., et al. Establishment and in vitro culture of porcine spermatogonial germ cells in low temperature culture conditions // *Stem Cell Res.* – 2013. – V. 11 – № 3. – P. 1234–1249.

51. Genzel Y., König S., Reichl U. Amino acid analysis in mammalian cell culture media containing serum and high glucose concentrations by anion exchange chromatography and integrated pulsed amperometric detection // *Anal. Biochem.* – 2004. – V. 335 – № 1. – P. 119–125.
52. Kwong P.J., Abdullah R.B., Wan Khadijah W.E. Increasing glucose in KSOMaa basal medium on culture Day 2 improves in vitro development of cloned caprine blastocysts produced via intraspecies and interspecies somatic cell nuclear transfer // *Theriogenology.* – 2012. – V. 78 – № 4. – P. 921–929.
53. Aden P., Paulsen R.E., Mæhlen J., Løberg E.M., Goverud I.L., Liestøl K., Lømo J. Glucocorticoids dexamethasone and hydrocortisone inhibit proliferation and accelerate maturation of chicken cerebellar granule neurons // *Brain Res.* – 2011. – V. 1418. – P. 32–41.
54. Mojica–Henshaw M.P., Jacobson P., Morris J., Kelley L., Pierce J., Boyer M., Reems J.–A. Serum–converted platelet lysate can substitute for fetal bovine serum in human mesenchymal stromal cell cultures // *Cytotherapy.* – 2013. – V. 15 – № 12. – P. 1458–1468.
55. Duval K., Grover H., Han L.–H., Mou Y., Pegoraro A.F., Fredberg J., Chen Z. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture // *Physiology.* – 2017. – V. 32 – № 4. – P. 266–277.
56. Torreggiani E., Rossini M., Bononi I., Pietrobon S., Mazzoni E., Iaquina M.R., Feo C., Rotondo J.C., Rizzo P., Tognon M., et al. Protocol for the long-term culture of human primary keratinocytes from the normal colorectal mucosa // *J. Cell. Physiol.* – 2019. – V. 234 – № 7. – P. 9895–9905.
57. Takeda M., Mizokami A., Mamiya K., Li Y.Q., Zhang J., Keller E.T., Namiki M. The establishment of two paclitaxel–resistant prostate cancer cell lines and the mechanisms of paclitaxel resistance with two cell lines // *The Prostate.* – 2007. – V. 67 – № 9. – P. 955–967.
58. Li Y., Zeng Y., Mooney S.M., Yin B., Mizokami A., Namiki M. Resistance to paclitaxel increases the sensitivity to other microenvironmental stresses in prostate cancer cells // *J. Cell. Biochem.* – 2011. – V. 112 – № 8. – P. 2125–2137.
59. Kodack D.P., Farago A.F., Dastur A., Held M.A., Dardaei L., Friboulet L., von Flotow F., Damon L.J., Lee D., Parks M., et al. Primary Patient–Derived Cancer Cells and Their Potential for Personalized Cancer Patient Care // *Cell Rep.* – 2017. – V. 21. – № 11. – P. 3298–3309.
60. Parajuli N., Doppler W. Precision–cut slice cultures of tumors from MMTV–neu mice for the study of the ex vivo response to cytokines and cytotoxic drugs // *Vitro Cell. Dev. Biol. – Anim.* – 2009. – V. 45 – № 8. – P. 442–450.
61. Lagaye S., Shen H., Saunier B., Nascimbeni M., Gaston J., Bourdoncle P., Hannoun L., Massault P.–P., Vallet–Pichard A., Mallet V., et al. Efficient replication of primary or culture hepatitis C virus isolates in human liver slices: A relevant *ex vivo* model of liver infection // *Hepatology.* – 2012. – V. 56 – № 3. – P. 861–872.

62. Kim J.B., Stein R., O'Hare M.J. Three-dimensional in vitro tissue culture models of breast cancer— a review // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2004. – V. 85 – № 3. – P. 281–291.
63. Misra S., Moro C.F., Del Chiaro M., Pouso S., Sebestyén A., Löhr M., Björnstedt M., Verbeke C.S. Ex vivo organotypic culture system of precision-cut slices of human pancreatic ductal adenocarcinoma // *Sci. Rep.* – 2019. – V. 9. – № 1. – P. 1–16.
64. Hoarau-Véchet J., Rafii A., Touboul C., Pasquier J. Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer–Microenvironment Interactions? // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – V. 19. – № 1. – P. 181.
65. Takagi T., Ishii K., Shibata S., Yasuda A., Sato M., Nagoshi N., Saito H., Okano H.J., Toyama Y., Okano H., et al. Schwann–Spheres Derived from Injured Peripheral Nerves in Adult Mice – Their In Vitro Characterization and Therapeutic Potential // *PLoS ONE.* – 2011. – V. 6 – № 6. – P. e21497.
66. Feder–Mengus C., Ghosh S., Reschner A., Martin I., Spagnoli G.C. New dimensions in tumor immunology: what does 3D culture reveal? // *Trends Mol. Med.* – 2008. – V. 14. – № 8. – P. 333–340.
67. Jorgensen C.F., Powell L.A., Lusk J.J., Bishop A.A. Assessing Landscape Constraints on Species Abundance: Does the Neighborhood Limit Species Response to Local Habitat Conservation Programs? // *PLoS ONE.* – 2014. – V. 9. – № 6. – P. e99339.
68. Kurosawa H. Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells // *J. Biosci. Bioeng.* – 2007. – V. 103. – № 5. – P. 389–398.
69. Kelm J. M., Ehler E., Nielsen L.K., Schlatter S., Perriard J.–C. Fussenegger M. Design of Artificial Myocardial Microtissues // *Tissue Eng.* – 2004. – V. 10. – № 1–2. – P. 201–214.
70. Ivascu A., Kubbies M. Rapid Generation of Single–Tumor Spheroids for High–Throughput Cell Function and Toxicity Analysis // *J. Biomol. Screen.* – 2006. – V. 11. – № 8. – P. 922–932.
71. Fang Y., Eglen R.M. Three–Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development // *SLAS Discov. Adv. Life Sci. RD.* – 2017. – V. 22. – № 5. – P. 456–472.
72. Smith B.H., Gazda L.S., Conn B. L., Jain K., Asina S., Levine D.M., Parker T.S., Laramore M.A., Martis P.C., Vinerean H.V., et al. Three–Dimensional Culture of Mouse Renal Carcinoma Cells in Agarose Macrobeads Selects for a Subpopulation of Cells with Cancer Stem Cell or Cancer Progenitor Properties // *Cancer Res.* – 2011. – V. 71. – № 3. – P. 716–724.
73. Caliarì S.R., Burdick J.A. A practical guide to hydrogels for cell culture // *Nat. Methods.* – 2016. – V. 13. – № 5. – P. 405–414.
74. Kleinman H.K., Martin G.R. Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity // *Semin. Cancer Biol.* – 2005. – V. 15. – № 5. – P. 378–386.

75. Kenny P. A., Lee G.Y., Myers C.A., Neve R.M., Semeiks J.R., Spellman P.T., Lorenz K., Lee E.H., Barcellos-Hoff M.H., Petersen O.W., et al. The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression // *Mol. Oncol.* – 2007. – V. 1. – № 1. – P. 84–96.

76. Rozario T., DeSimone D.W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view // *Dev. Biol.* – 2010. – V. 341. – № 1. – P. 126–140.

77. Orditura M., Della Corte C.M., Diana A., Ciaramella V., Franzese E., Famiglietti V., Panarese I., Franco R., Grimaldi A., Lombardi A., et al. Three dimensional primary cultures for selecting human breast cancers that are sensitive to the anti-tumor activity of ipatasertib or taselisib in combination with anti-microtubule cytotoxic drugs // *The Breast.* – 2018. – V. 41. – P. 165–171.

78. Wang C., Li J., Sinha S., Peterson A., Grant G. A., Yang F. Mimicking brain tumor-vasculature microanatomical architecture via co-culture of brain tumor and endothelial cells in 3D hydrogels // *Biomaterials.* – 2019. – V. 202. – P. 35–44.

79. Wang Q., Bhattacharya S., Mereness J. A., Anderson C., Lillis J.A., Misra R.S., Romas S., Huyck H., Howell A., Bandyopadhyay G., et al. A novel in vitro model of primary human pediatric lung epithelial cells // *Pediatr. Res.* – 2019. – V.197. –in press

80. Dairkee S.H., Paulo E.C., Traquina P., Moore D.H., Ljung B. M., Smith H. S. Partial enzymatic degradation of stroma allows enrichment and expansion of primary breast tumor cells // *Cancer Res.* – 1997. – V. 57. – № 8. – P. 1590–1596.

81. Dairkee S.H., Deng G., Stampfer M.R., Waldman F.M., Smith H. S. Selective cell culture of primary breast carcinoma // *Cancer Res.* – 1995. – V. 55. – № 12. – P. 2516–2519.

82. de Bengy A.-F., Forraz N., Danoux L., Berthelemy N., Cadau S., Degoul O., Andre V., Pain S., McGuckin C. Development of new 3D human ex vivo models to study sebaceous gland lipid metabolism and modulations // *Cell Prolif.* – 2019. – V. 52. – № 1. – P. e12524.

83. Yang Z.F., Ho D.W., Ng M.N., Lau C.K., Yu W.C., Ngai P., Chu P.W.K., Lam C.T., Poon R.T.P., Fan S. T. Significance of CD90+ Cancer Stem Cells in Human Liver Cancer // *Cancer Cell.* – 2008. – V. 13. – № 2. – P. 153–166.

84. Iliopoulos D., Hirsch H.A., Wang G., Struhl K. Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2011. – V. 108. – № 4. – P. 1397–1402.

85. Battula V.L., Shi Y., Evans K.W., Wang R.-Y., Spaeth E.L., Jacamo R.O., Guerra R., Sahin A.A., Marini F.C., Hortobagyi G., et al. Ganglioside GD2 identifies breast cancer stem cells and promotes tumorigenesis // *J. Clin. Invest.* – 2012. – V. 122. – № 6. – P. 2066–2078.

86. Stuelten C.H., Mertins S.D., Busch J.I., Gowens M., Scudiero D.A., Burkett M.W., Hite K.M., Alley M., Hollingshead M., Shoemaker R.H., et al. Complex Display of Putative Tumor Stem

Cell Markers in the NCI60 Tumor Cell Line Panel // *STEM CELLS*. – 2010. – V. 28. – № 4. – P. 649–660.

87. Gemei M., Mirabelli P., Di Noto R., Corbo C., Iaccarino A., Zamboli A., Troncone G., Galizia G., Lieto E., Del Vecchio L., et al. CD66c is a novel marker for colorectal cancer stem cell isolation and its silencing halts tumor growth in vivo: CD66c Involvement in Colon Cancer // *Cancer*. – 2013. – V. 119. – № 4. – P. 729–738.

88. Li C., Lee C.J., Simeone D.M. Identification of Human Pancreatic Cancer Stem Cells // *Cancer Stem Cells* / J.S. Yu. – Totowa NJ: Humana Press – 2009. – P. 161–173.

89. 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*. – 2012. – V. 337. – № 6095. – P. 730–735.

90. Weigelt B., Mackay A., A'hern R., Natrajan R., Tan D.S., Dowsett M., Ashworth A., Reis-Filho J.S. Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis // *Lancet Oncol.* – 2010. – V. 11. – № 4. – P. 339–349.

91. Baird R.D. Caldas C. Genetic heterogeneity in breast cancer: the road to personalized medicine? // *BMC Med.* – 2013. – V. 11. – № 1. – P. 151.

92. Dawson S.-J., Rueda O. M., Aparicio S., Caldas C. A new genome-driven integrated classification of breast cancer and its implications // *EMBO J.* – 2013. – V. 32. – № 5. – P. 617–628.

93. Rugo H.S., Rumble R.B., Macrae E., Barton D.L., Connolly H.K., Dickler M.N., Fallowfield L., Fowble B., Ingle J.N., Jahanzeb M., et al. Endocrine Therapy for Hormone Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Guideline // *J. Clin. Oncol.* – 2016. – V. 34. – № 25. – P. 3069–3103.

94. Burstein H.J., Lacchetti C., Anderson H., Buchholz T.A., Davidson N.E., Gelmon K.A., Giordano S.H., Hudis C.A., Solky A.J., Stearns V., et al. Adjuvant Endocrine Therapy for Women With Hormone Receptor-Positive Breast Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Focused Update // *J. Clin. Oncol.* – 2019. – V. 37. – № 5. – P. 423–438.

95. Harper M.J. Walpole A.L. A new derivative of triphenylethylene: effect on implantation and mode of action in rats // *J. Reprod. Fertil.* – 1967. – V. 13. – № 1. – P. 101–119.

96. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials // *The Lancet*. – 2005. – V. 365. – № 9472. – P. 1687–1717.

97. Tremont A., Lu J., Cole J.T. Endocrine Therapy for Early Breast Cancer: Updated Review // *Ochsner J.* – 2017. – V. 17. – № 4. – P. 405–411.

98. Zardavas D., Baselga J., Piccart M. Emerging targeted agents in metastatic breast cancer // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2013. – V. 10. – № 4. – P. 191–210.

99. Swain S. M., Kim S.-B., Cortés J., Ro J., Semiglazov V., Campone M., Ciruelos E., Ferrero J.-M., Schneeweiss A., Knott A., et al. Pertuzumabtrastuzumaband docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): overall survival results from a randomiseddouble-blindplacebo-controlledphase 3 study // *Lancet Oncol.* – 2013. – V. 14. – № 6. – P. 461–471.

100. Mokbel K., Patani N., Jiang W., Newbold R. Prognostic implications of carboxyl-terminus of Hsc70 interacting protein and lysyl-oxidase expression in human breast cancer // *J. Carcinog.* – 2010. – V. 9. – № 1. – P. 9.

101. Tenori L., Oakman C., Claudino W.M., Bernini P., Cappadona S., Nepi S., Biganzoli L., Arbushites M.C., Luchinat C., Bertini I., et al. Exploration of serum metabolomic profiles and outcomes in women with metastatic breast cancer: A pilot study // *Mol. Oncol.* – 2012. – V. 6. – № 4. – P. 437–444.

102. Yang L., Li Y., Bhattacharya A., Zhang Y. A recombinant human protein targeting HER2 overcomes drug resistance in HER2-positive breast cancer // *Sci. Transl. Med.* – 2019. – V. 11. – № 476. – P. eaav1620.

103. Keegan N.M., Gleeson J., Hennessy B.T., Morris P.G. PI3K inhibition to overcome endocrine resistance in breast cancer // *Expert Opin. Investig. Drugs.* – 2018. – V. 27. – № 1. – P. 1–15.

104. Lee H., Saini N., Howard E.W., Parris A.B., Ma Z., Zhao Q., Zhao M., Liu B., Edgerton S.M., Thor A.D., et al. Ganetespib targets multiple levels of the receptor tyrosine kinase signaling cascade and preferentially inhibits ErbB2-overexpressing breast cancer cells // *Sci. Rep.* – 2018. – V. 8. – № 1. – P. 1–14.

105. Kourie H.R., El Rassy E., Clatot F., de Azambuja E., Lambertini M. Emerging treatments for HER2-positive early-stage breast cancer: focus on neratinib // *OncoTargets Ther.* – 2017. – V. 10. – P. 3363–3372.

106. Eccles S.A., Aboagye E.O., Ali S., Anderson A.S., Armes J., Berditchevski F., Blaydes J.P., Brennan K., Brown N.J., Bryant H.E., et al. Critical research gaps and translational priorities for the successful prevention and treatment of breast cancer // *Breast Cancer Res.* – 2013. – V. 15. – № 5. – P. 1–37.

107. Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., Forman D. Global cancer statistics // *CA. Cancer J. Clin.* – 2011. – V. 61. – № 2. – P. 69–90.

108. Lépine J., Audet-Walsh E., Grégoire J., Têtu B., Plante M., Ménard V., Ayotte P., Brisson J., Caron P., Villeneuve L., et al. Circulating Estrogens in Endometrial Cancer Cases and Their Relationship with Tissular Expression of Key Estrogen Biosynthesis and Metabolic Pathways // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2010. – V. 95. – № 6. – P. 2689–2698.

109. Pratt W.B., Toft D.O. Steroid Receptor Interactions with Heat Shock Protein and Immunophilin Chaperones <sup>1</sup> // *Endocr. Rev.* – 1997. – V. 18. – № 3. – P. 306–360.
110. Fliss A.E., Benzeno S., Rao J., Caplan A.J. Control of estrogen receptor ligand binding by Hsp90 // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2000. – V. 72. – № 5. – P. 223–230.
111. Mylonas I. Prognostic significance and clinical importance of estrogen receptor alpha and beta in human endometrioid adenocarcinomas // *Oncol. Rep.* – 2010. – V. 24. – № 2. – P. 385–393.
112. Kharma B., Baba T., Mandai M., Matsumura N., Murphy S.K., Kang H.S., Yamanoi K., Hamanishi J., Yamaguchi K., Yoshioka Y., et al. Utilization of genomic signatures to identify high-efficacy candidate drugs for chemorefractory endometrial cancers: Fludarabine is a therapeutic candidate for refractory endometrial cancer // *Int. J. Cancer.* – 2013. – V. 133. – № 9. – P. 2234–2244.
113. Kong A., Collingwood M., Simera I., Williams C., Kitchener H. Adjuvant radiotherapy for Stage I endometrial cancer // *The Cochrane Database of Systematic Reviews* / под ред. The Cochrane Collaboration. – ChichesterUK: John Wiley & SonsLtd2001. – 2012. – V. 104. – № 21. – P.1625–1634.
114. Dizon D.S. Treatment options for advanced endometrial carcinoma // *Gynecol. Oncol.* – 2010. – V. 117. – № 2. – P. 373–381.
115. Kokka F., Brockbank E., Oram D., Gallagher C., Bryant A., Dickinson H.O. Hormone therapy for advanced or recurrent endometrial cancer // *Cochrane Database of Systematic Reviews* / под ред. The Cochrane Collaboration. – ChichesterUK: John Wiley & SonsLtd2009. – 2014. – V. 14. – № 12. – P.1–51.
116. Creutzberg C.L., van Stiphout R.G.P.M., Nout R.A., Lutgens L.C. H.W., Jürgenliemk-Schulz I.M., Jobsen J.J., Smit V.T.H.B.M., Lambin P. Nomograms for Prediction of Outcome With or Without Adjuvant Radiation Therapy for Patients With Endometrial Cancer: A Pooled Analysis of PORTEC–1 and PORTEC–2 Trials // *Int. J. Radiat. Oncol.* – 2015. – V. 91. – № 3. – P. 530–539.
117. Kunneman M., Pieterse A.H., Stiggelbout A.M., Nout R.A., Kamps M., Lutgens L.C.H.W., Paulissen J., Mattheussens O.J.A., Kruitwagen R.F.P.M., Creutzberg C.L. Treatment preferences and involvement in treatment decision making of patients with endometrial cancer and clinicians // *Br. J. Cancer.* – 2014. – V. 111. – № 4. – P. 674–679.
118. Slomovitz B.M., Jiang Y., Yates M.S., Soliman P. T., Johnston T., Nowakowski M., Levenback C., Zhang Q., Ring K., Munsell M. F., et al. Phase II Study of Everolimus and Letrozole in Patients With Recurrent Endometrial Carcinoma // *J. Clin. Oncol.* – 2015. – V. 33. – № 8. – P. 930–936.



119. Morice P., Leary A., Creutzberg C., Abu-Rustum N., Darai E. Endometrial cancer // *The Lancet*. – 2016. – V. 387. – № 10023. – P. 1094–1108.
120. Matulonis U., Vergote I., Backes F., Martin L.P., McMeekin S., Birrer M., Campana F., Xu Y., Egile C., Ghamande S. Phase II study of the PI3K inhibitor pilaralisib (SAR245408, XL147) in patients with advanced or recurrent endometrial carcinoma // *Gynecol. Oncol.* – 2015. – V. 136. – № 2. – P. 246–253.
121. Roche J. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer // *Cancers*. – 2018. – V. 10. – № 2. – P. 52.
122. Franco O.E., Shaw A.K., Strand D.W., Hayward S.W. Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis // *Semin. Cell Dev. Biol.* – 2010. – V. 21. – № 1. – P. 33–39.
123. Mueller M.-T., Hermann P.C., Heeschen C. Cancer stem cells as new therapeutic target to prevent tumour progression and metastasis // *Front. Biosci. Elite Ed.* – 2010. – V. 2. – P. 602–613.
124. Leyva-Illades D., McMillin M., Quinn M., Demorrow S. Cholangiocarcinoma pathogenesis: Role of the tumor microenvironment // *Transl. Gastrointest. Cancer*. – 2012. – V. 1. – № 1. – P. 71–80.
125. Anderberg C., Pietras K. On the origin of cancer-associated fibroblasts // *Cell Cycle Georget. Tex.* – 2009. – V. 8. – № 10. – P. 1461–1462.
126. Olumi A.F., Grossfeld G.D., Hayward S.W., Carroll P.R., Tlsty T.D., Cunha G.R. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium // *Cancer Res.* – 1999. – V. 59. – № 19. – P. 5002–5011.
127. Hayward S.W., Wang Y., Cao M., Hom Y.K., Zhang B., Grossfeld G.D., Sudilovsky D., Cunha G.R. Malignant transformation in a nontumorigenic human prostatic epithelial cell line // *Cancer Res.* – 2001. – V. 61. – № 22. – P. 8135–8142.
128. Wald O., Izhar U., Amir G., Kirshberg S., Shlomai Z., Zamir G., Peled A., Shapira O.M. Interaction between neoplastic cells and cancer-associated fibroblasts through the CXCL12/CXCR4 axis: Role in non-small cell lung cancer tumor proliferation // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2011. – V. 141. – № 6. – P. 1503–1512.
129. Le Bret S.C., Newgreen D.F., Thompson E.W., Ackland M.L. Induction of epithelial to mesenchymal transition in PMC42-LA human breast carcinoma cells by carcinoma-associated fibroblast secreted factors // *Breast Cancer Res.* – 2007. – V. 9. – № 1. – P. 1–15.
130. Gao M.-Q., Kim B.G., Kang S., Choi Y.P., Park H., Kang K.S., Cho N.H. Stromal fibroblasts from the interface zone of human breast carcinomas induce an epithelial-mesenchymal transition-like state in breast cancer cells in vitro // *J. Cell Sci.* – 2010. – V. 123. – № 20. – P. 3507–3514.

131. Giannoni E., Bianchini F., Masieri L., Serni S., Torre E., Calorini L., Chiarugi P. Reciprocal Activation of Prostate Cancer Cells and Cancer-Associated Fibroblasts Stimulates Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Stemness // *Cancer Res.* – 2010. – V. 70. – № 17. – P. 6945–6956.
132. Hay E.D. The mesenchymal cell's role in the embryo and the remarkable signaling mechanisms that create it // *Dev. Dyn.* – 2005. – V. 233. – № 3. – P. 706–720.
133. Dressler G.R. The cellular basis of kidney development // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 2006. – V. 22. – P. 509–529.
134. Nieto M.A., Huang R.Y.-J., Jackson R.A., Thiery J.P. EMT: 2016 // *Cell.* – 2016. – V. 166. – № 1. – P. 21–45.
135. Taube J.H., Herschkowitz J.I., Komurov K., Zhou A.Y., Gupta S., Yang J., Hartwell K., Onder T.T., Gupta P.B., Evans K.W., et al. Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2010. – V. 107. – № 35. – P. 15449–15454.
136. Quail D.F., Joyce J.A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis // *Nat. Med.* – 2013. – V. 19. – № 11. – P. 1423–1437.
137. Lamouille S., Xu J., Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2014. – V. 15. – № 3. – P. 178–196.
138. Craene B.D., Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression // *Nat. Rev. Cancer.* – 2013. – V. 13. – № 2. – P. 97–110.
139. Denayer S., Helsen C., Thorrez L., Haelens A., Claessens F. The Rules of DNA Recognition by the Androgen Receptor // *Mol. Endocrinol.* – 2010. – V. 24. – № 5. – P. 898–913.
140. Hugo H.J., Kokkinos M.I., Blick T., Ackland M.L., Thompson E.W., Newgreen D.F. Defining the E-Cadherin Repressor Interactome in Epithelial-Mesenchymal Transition: The PMC42 Model as a Case Study // *Cells Tissues Organs.* – 2011. – V. 193. – № 1–2. – P. 23–40.
141. Cano A., Diaz-Lopez A., Moreno-Bueno G. Role of microRNA in epithelial to mesenchymal transition and metastasis and clinical perspectives // *Cancer Manag. Res.* – 2014. – P. 205.
142. Burk U., Schubert J., Wellner U., Schmalhofer O., Vincan E., Spaderna S., Brabletz T. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells // *EMBO Rep.* – 2008. – V. 9. – № 6. – P. 582–589.
143. Kim N.H., Kim H.S., Li X.-Y., Lee I., Choi H.-S., Kang S.E., Cha S.Y., Ryu J.K., Yoon D., Fearon E.R., et al. A p53/miRNA-34 axis regulates Snail1-dependent cancer cell epithelial-mesenchymal transition // *J. Cell Biol.* – 2011. – V. 195. – № 3. – P. 417–433.

144. Gunasinghe N.P.A.D., Wells A., Thompson E.W., Hugo H.J. Mesenchymal–epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer // *Cancer Metastasis Rev.* – 2012. – V. 31. – № 3–4. – P. 469–478.
145. Li Z., Zhao J., Li Q., Yang W., Song Q., Li W., Liu J. KLF4 promotes hydrogen–peroxide–induced apoptosis of chronic myeloid leukemia cells involving the bcl–2/bax pathway // *Cell Stress Chaperones.* – 2010. – V. 15. – № 6. – P. 905–912.
146. Chen S., Chen X., Li W., Shan T., Lin W., Ma J., Cui X., Yang W., Cao G., Li Y., et al. Conversion of epithelial–to–mesenchymal transition to mesenchymal–to–epithelial transition is mediated by oxygen concentration in pancreatic cancer cells // *Oncol. Lett.* – 2018. – V. 15. – № 2. – P. 1–9.
147. Schito L., Semenza G.L. Hypoxia–Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression // *Trends Cancer.* – 2016. – V. 2. – № 12. – P. 758–770.
148. Choudhry H., Harris A.L. Advances in Hypoxia–Inducible Factor Biology // *Cell Metab.* – 2018. – V. 27. – № 2. – P. 281–298.
149. Yang W., Ma J., Zhou W., Cao B., Zhou X., Zhang H., Zhao Q., Hong L., Fan D. Reciprocal regulations between miRNAs and HIF–1 $\alpha$  in human cancers // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2019. – V. 76. – № 3. – P. 453–471.
150. Huang C.–H., Yang W.–H., Chang S.–Y., Tai S.–K., Tzeng C.–H., Kao J.–Y., Wu K.–J., Yang M.–H. Regulation of Membrane–Type 4 Matrix Metalloproteinase by SLUG Contributes to Hypoxia–Mediated Metastasis // *Neoplasia.* – 2009. – V. 11. – № 12. – P. 1371–IN14.
151. Serrano–Gomez S.J., Maziveyi M., Alahari S.K. Regulation of epithelial–mesenchymal transition through epigenetic and post–translational modifications // *Mol. Cancer.* – 2016. – V. 15. – № 1. – P. 1–14.
152. Ledford H. Cancer theory faces doubts // *Nature.* – 2011. – V. 472. – № 7343. – P. 273–273.
153. Tarin D. The Fallacy of Epithelial Mesenchymal Transition in Neoplasia // *Cancer Res.* – 2005. – V. 65. – № 14. – P. 5996–6001.
154. Thompson L., Chang B., Barsky S.H. Monoclonal origins of malignant mixed tumors (carcinosarcomas). Evidence for a divergent histogenesis // *Am. J. Surg. Pathol.* – 1996. – V. 20. – № 3. – P. 277–285.
155. Kalluri R., Zeisberg M. Fibroblasts in cancer // *Nat. Rev. Cancer.* – 2006. – V. 6. – № 5. – P. 392–401.
156. Gregory P.A., Bert A.G., Paterson E.L., Barry S.C., Tsykin A., Farshid G., Vadas M.A., Khew–Goodall Y., Goodall G.J. The miR–200 family and miR–205 regulate epithelial to

- mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1 // *Nat. Cell Biol.* – 2008. – V. 10. – № 5. – P. 593–601.
157. Storci G., Sansone P., Mari S., D’Uva G., Tavolari S., Guarnieri T., Taffurelli M., Ceccarelli C., Santini D., Chieco P., et al. TNF $\alpha$  up-regulates SLUG via the NF- $\kappa$ B/HIF1 $\alpha$  axis which imparts breast cancer cells with a stem cell-like phenotype // *J. Cell. Physiol.* – 2010. – V. 225. – № 3. – P. 682–691.
158. Blanco M.J., Moreno-Bueno G., Sarrio D., Locascio A., Cano A., Palacios J., Nieto M.A. Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas // *Oncogene.* – 2002. – V. 21. – № 20. – P. 3241–3246.
159. Yang J., Mani S.A., Donaher J.L., Ramaswamy S., Itzykson R.A., Come C., Savagner P., Gitelman I., Richardson A., Weinberg R.A. Twist: A Master Regulator of Morphogenesis Plays an Essential Role in Tumor Metastasis // *Cell.* – 2004. – V. 117. – № 7. – P. 927–939.
160. Kajiyama H., Shibata K., Terauchi M., Yamashita M., Ino K., Nawa A., Kikkawa F. Chemoresistance to paclitaxel induces epithelial–mesenchymal transition and enhances metastatic potential for epithelial ovarian carcinoma cells // *Int. J. Oncol.* – 2007. – V. 31. – № 2. – P. 277–283.
161. Yang A.D. Chronic Oxaliplatin Resistance Induces Epithelial–to–Mesenchymal Transition in Colorectal Cancer Cell Lines // *Clin. Cancer Res.* – 2006. – V. 12. – № 14. – P. 4147–4153.
162. Yu M., Bardia A., Wittner B.S., Stott S. L., Smas M.E., Ting D.T., Isakoff S.J., Ciciliano J. C., Wells M.N., Shah A.M., et al. Circulating Breast Tumor Cells Exhibit Dynamic Changes in Epithelial and Mesenchymal Composition // *Science.* – 2013. – V. 339. – № 6119. – P. 580–584.
163. Lawson D.A., Bhakta N.R., Kessenbrock K., Prummel K.D., Yu Y., Takai K., Zhou A., Eyob H., Balakrishnan S., Wang C.–Y., et al. Single–cell analysis reveals a stem–cell program in human metastatic breast cancer cells // *Nature.* – 2015. – V. 526. – № 7571. – P. 131–135.
164. Onder T.T., Gupta P.B., Mani S.A., Yang J., Lander E.S., Weinberg R.A. Loss of E–Cadherin Promotes Metastasis via Multiple Downstream Transcriptional Pathways // *Cancer Res.* – 2008. – V. 68. – № 10. – P. 3645–3654.
165. Hüsemann Y., Geigl J.B., Schubert F., Musiani P., Meyer M., Burghart E., Forni G., Eils R., Fehm T., Riethmüller G., et al. Systemic Spread Is an Early Step in Breast Cancer // *Cancer Cell.* – 2008. – V. 13. – № 1. – P. 58–68.
166. Ye X., Tam W.L., Shibue T., Kaygusuz Y., Reinhardt F., Ng Eaton E., Weinberg R.A. Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumour–initiating cells // *Nature.* – 2015. – V. 525. – № 7568. – P. 256–260.

167. Rhim A.D., Oberstein P.E., Thomas D.H., Mirek E.T., Palermo C.F., Sastra S.A., Dekleva E.N., Saunders T., Becerra C.P., Tattersall I.W., et al. Stromal Elements Act to Restrain Rather Than Support Pancreatic Ductal Adenocarcinoma // *Cancer Cell*. – 2014. – V. 25. – № 6. – P. 735–747.
168. Pantel K., Alix-Panabières C., Riethdorf S. Cancer micrometastases // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2009. – V. 6. – № 6. – P. 339–351.
169. Trimboli A.J., Fukino K., de Bruin A., Wei G., Shen L., Tanner S.M., Creasap N., Rosol T.J., Robinson M.L., Eng C., et al. Direct Evidence for Epithelial–Mesenchymal Transitions in Breast Cancer // *Cancer Res.* – 2008. – V. 68. – № 3. – P. 937–945.
170. Wang M.-T., Holderfield M., Galeas J., Delrosario R., To M.D., Balmain A., McCormick F.K. Ras Promotes Tumorigenicity through Suppression of Non-canonical Wnt Signaling // *Cell*. – 2015. – V. 163. – № 5. – P. 1237–1251.
171. Klein E.Y. Antimalarial drug resistance: a review of the biology and strategies to delay emergence and spread // *Int. J. Antimicrob. Agents*. – 2013. – V. 41. – № 4. – P. 311–317.
172. Hanahan D., Coussens L.M. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment // *Cancer Cell*. – 2012. – V. 21. – № 3. – P. 309–322.
173. Öhlund D., Elyada E., Tuveson D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound // *J. Exp. Med.* – 2014. – V. 211. – № 8. – P. 1503–1523.
174. Yu Y., Xiao C.-H., Tan L.-D., Wang Q.-S., Li X.-Q., Feng Y.-M. Cancer-associated fibroblasts induce epithelial–mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF- $\beta$  signalling // *Br. J. Cancer*. – 2014. – V. 110. – № 3. – P. 724–732.
175. Yang G., Rosen D. G., Zhang Z., Bast R.C., Mills G.B., Colacino J.A., Mercado-Uribe I., Liu J. The chemokine growth-regulated oncogene 1 (Gro-1) links RAS signaling to the senescence of stromal fibroblasts and ovarian tumorigenesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2006. – V. 103. – № 44. – P. 16472–16477.
176. Kim H., Choi J.-A., Kim J.-H. Ras Promotes Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )-induced Epithelial–Mesenchymal Transition via a Leukotriene B<sub>4</sub> Receptor-2-linked Cascade in Mammary Epithelial Cells // *J. Biol. Chem.* – 2014. – V. 289. – № 32. – P. 22151–22160.
177. Wu Y., Deng J., Rychahou P.G., Qiu S., Evers B.M., Zhou B.P. Stabilization of Snail by NF- $\kappa$ B Is Required for Inflammation-Induced Cell Migration and Invasion // *Cancer Cell*. – 2009. – V. 15. – № 5. – P. 416–428.
178. Li C.-W., Xia W., Huo L., Lim S.-O., Wu Y., Hsu J.L., Chao C.-H., Yamaguchi H., Yang N.-K., Ding Q., et al. Epithelial–Mesenchymal Transition Induced by TNF- Requires NF- $\kappa$ B-Mediated Transcriptional Upregulation of Twist1 // *Cancer Res.* – 2012. – V. 72. – № 5. – P. 1290–1300.

179. Lin E.Y., Nguyen A.V., Russell R.G., Pollard J. W. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy // *J. Exp. Med.* – 2001. – V. 193. – № 6. – P. 727–740.
180. Bonde A.-K., Tischler V., Kumar S., Soltermann A., Schwendener R.A. Intratumoral macrophages contribute to epithelial-mesenchymal transition in solid tumors // *BMC Cancer.* – 2012. – V. 12. – № 1. – P. 2–15.
181. Su S., Liu Q., Chen J., Chen J., Chen F., He C., Huang D., Wu W., Lin L., Huang W., et al. A Positive Feedback Loop between Mesenchymal-like Cancer Cells and Macrophages Is Essential to Breast Cancer Metastasis // *Cancer Cell.* – 2014. – V. 25. – № 5. – P. 605–620.
182. Chen J., Yao Y., Gong C., Yu F., Su S., Chen J., Liu B., Deng H., Wang F., Lin L., et al. CCL18 from Tumor-Associated Macrophages Promotes Breast Cancer Metastasis via PITPNM3 // *Cancer Cell.* – 2011. – V. 19. – № 4. – P. 541–555.
183. She L., Qin Y., Wang J., Liu C., Zhu G., Li G., Wei M., Chen C., Liu G., Zhang D., et al. Tumor-associated macrophages derived CCL18 promotes metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck // *Cancer Cell Int.* – 2018. – V. 18. – № 1. – P. 1–13.
184. Powell D.R., Huttenlocher A. Neutrophils in the Tumor Microenvironment // *Trends Immunol.* – 2016. – V. 37. – № 1. – P. 41–52.
185. Freisinger C.M., Huttenlocher A. Live Imaging and Gene Expression Analysis in Zebrafish Identifies a Link between Neutrophils and Epithelial to Mesenchymal Transition // *PLoS ONE.* – 2014. – V. 9. – № 11. – P. e112183.
186. Krishnamachary B., Zagzag D., Nagasawa H., Rainey K., Okuyama H., Baek J.H., Semenza G.L. Hypoxia-Inducible Factor-1-Dependent Repression of *E-cadherin* in von Hippel-Lindau Tumor Suppressor-Null Renal Cell Carcinoma Mediated by TCF3/ZFHX1A and ZFHX1B // *Cancer Res.* – 2006. – V. 66. – № 5. – P. 2725–2731.
187. Yang M.-H., Wu K.-J. TWIST activation by hypoxia inducible factor-1 (HIF-1): Implications in metastasis and development // *Cell Cycle.* – 2008. – V. 7. – № 14. – P. 2090–2096.
188. Valastyan S., Weinberg R.A. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms // *Cell.* – 2011. – V. 147. – № 2. – P. 275–292.
189. Micalizzi D.S., Farabaugh S.M., Ford H.L. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels Between Normal Development and Tumor Progression // *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* – 2010. – V. 15. – № 2. – P. 117–134.
190. Prasad S., Ramachandran S., Gupta N., Kaushik I., Srivastava S.K. Cancer cells stemness: A doorstep to targeted therapy // *Biochim. Biophys. Acta BBA – Mol. Basis Dis.* – 2019. – in press.

191. Lapidot T., Sirard C., Vormoor J., Murdoch B., Hoang T., Caceres–Cortes J., Minden M., Paterson B., Caligiuri M.A., Dick J.E. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice // *Nature*. – 1994. – V. 367. – № 6464. – P. 645–648.
192. Bonnet D., Dick J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell // *Nat. Med.* – 1997. – V. 3. – № 7. – P. 730–737.
193. Al–Hajj M., Wicha M.S., Benito–Hernandez A., Morrison S.J., Clarke M.F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2003. – V. 100. – № 7. – P. 3983–3988.
194. Elbasateeny S.S., Salem A.A., Abdelsalam W.A., Salem R.A. Immunohistochemical expression of cancer stem cell related markers CD44 and CD133 in endometrial cancer // *Pathol. – Res. Pract.* – 2016. – V. 212. – № 1. – P. 10–16.
195. Wojciechowski M., Krawczyk T., Śmigielski J., Malinowski A. CD44 expression in curettage and postoperative specimens of endometrial cancer // *Arch. Gynecol. Obstet.* – 2015. – V. 291. – № 2. – P. 383–390.
196. Kim Y., Joo K.M., Jin J., Nam D.–H. Cancer stem cells and their mechanism of chemo–radiation resistance // *Int. J. Stem Cells.* – 2009. – V. 2. – № 2. – P. 109–114.
197. Miranda–Lorenzo I., Dorado J., Lonardo E., Alcala S., Serrano A.G., Clausell–Tormos J., Cioffi M., Megias D., Zagorac S., Balic A., et al. Intracellular autofluorescence: a biomarker for epithelial cancer stem cells // *Nat. Methods.* – 2014. – V. 11. – № 11. – P. 1161–1169.
198. Liao T., Lehmann J., Sternstein S., Yay A., Zhang G., Matthießen A.E., Schumann S., Siemers F., Kruse C., Hundt J.E., et al. Nestin+ progenitor cells isolated from adult human sweat gland stroma promote reepithelialisation and may stimulate angiogenesis in wounded human skin ex vivo // *Arch. Dermatol. Res.* – 2019. – V. 311. – № 4. – P. 325–330.
199. Spizzo G., Obrist P., Ensinger C., Theurl I., Dünser M., Ramoni A., Gunsilius E., Eibl G., Mikuz G., Gastl G. Prognostic significance of Ep–CAM AND Her–2/neu overexpression in invasive breast cancer // *Int. J. Cancer.* – 2002. – V. 98. – № 6. – P. 883–888.
200. Shen J., Zhu Z. Catumaxomab rat/murine hybrid trifunctional bispecific monoclonal antibody for the treatment of cancer // *Curr. Opin. Mol. Ther.* – 2008. – V. 10. – № 3. – P. 273–284.
201. Maetzel D., Denzel S., Mack B., Canis M., Went P., Benk M., Kieu C., Papior P., Baeuerle P. A., Munz M., et al. Nuclear signalling by tumour–associated antigen EpCAM // *Nat. Cell Biol.* – 2009. – V. 11. – № 2. – P. 162–171.
202. Trzpis M., McLaughlin P.M.J., de Leij L.M.F.H., Harmsen M.C. Epithelial Cell Adhesion Molecule // *Am. J. Pathol.* – 2007. – V. 171. – № 2. – P. 386–395.
203. Liang Y.–K., Zeng D., Xiao Y.–S., Wu Y., Ouyang Y.–X., Chen M., Li Y.–C., Lin H.–Y., Wei X.–L., Zhang Y.–Q., et al. MCAM/CD146 promotes tamoxifen resistance in breast cancer

cells through induction of epithelial–mesenchymal transition decreased ER $\alpha$  expression and AKT activation // *Cancer Lett.* – 2017. – V. 386. – P. 65–76.

204. Kasimir–Bauer S., Hoffmann O., Wallwiener D., Kimmig R., Fehm T. Expression of stem cell and epithelial–mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells // *Breast Cancer Res.* – 2012. – V. 14. – № 1. – P. 1–19.

205. Scatena R., Bottoni P., Giardina B. Circulating tumour cells and cancer stem cells: A role for proteomics in defining the interrelationships between function phenotype and differentiation with potential clinical applications // *Biochim. Biophys. Acta BBA – Rev. Cancer.* – 2013. – V. 1835. – № 2. – P. 129–143.

206. Hodgkinson C.L., Morrow C.J., Li Y., Metcalf R.L., Rothwell D.G., Trapani F., Polanski R., Burt D.J., Simpson K.L., Morris K., et al. Tumorigenicity and genetic profiling of circulating tumor cells in small–cell lung cancer // *Nat. Med.* – 2014. – V. 20. – № 8. – P. 897–903.

207. Oskarsson T., Batlle E., Massagué J. Metastatic Stem Cells: Sources Niches and Vital Pathways // *Cell Stem Cell.* – 2014. – V. 14. – № 3. – P. 306–321.

208. Liu S., Cong Y., Wang D., Sun Y., Deng L., Liu Y., Martin–Trevino R., Shang L., McDermott S.P., Landis M.D., et al. Breast Cancer Stem Cells Transition between Epithelial and Mesenchymal States Reflective of their Normal Counterparts // *Stem Cell Rep.* – 2014. – V. 2. – № 1. – P. 78–91.

209. Thompson E.W., Haviv I. The social aspects of EMT–MET plasticity // *Nat. Med.* – 2011. – V. 17. – № 9. – P. 1048–1049.

210. 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., et al. The Epithelial–Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells // *Cell.* – 2008. – V. 133. – № 4. – P. 704–715.

211. Bednarz–Knoll N., Alix–Panabières C., Pantel K. Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies // *Cancer Metastasis Rev.* – 2012. – V. 31. – № 3–4. – P. 673–687.

212. Baumann H., Nudelman E., Watanabe K., Hakomori S. Neutral fucolipids and fucogangliosides of rat hepatoma HTC and H35 cells rat liver and hepatocytes // *Cancer Res.* – 1979. – V. 39. – № 7 Pt 1. – P. 2637–2643.

213. Wang X., Chen J., Li Q.K., Peskoe S.B., Zhang B., Choi C., Platz E.A., Zhang H. Overexpression of  $\alpha$  (16) fucosyltransferase associated with aggressive prostate cancer // *Glycobiology.* – 2014. – V. 24. – № 10. – P. 935–944.

214. Okeley N.M., Alley S.C., Anderson M. E., Boursalian T.E., Burke P.J., Emmerton K.M., Jeffrey S.C., Klussman K., Law C.–L., Sussman D., et al. Development of orally active



inhibitors of protein and cellular fucosylation // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2013. – V. 110. – № 14. – P. 5404–5409.

215. St. Hill C.A., Baharo–Hassan D., Farooqui M. C2–O–sLeX Glycoproteins Are E–Selectin Ligands that Regulate Invasion of Human Colon and Hepatic Carcinoma Cells // *PLoS ONE.* – 2011. – V. 6. – № 1. – P. e16281.

216. Shibue T., Weinberg R.A. Integrin 1–focal adhesion kinase signaling directs the proliferation of metastatic cancer cells disseminated in the lungs // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2009. – V. 106. – № 25. – P. 10290–10295.

217. Shibue T., Brooks M.W., Weinberg R.A. An Integrin–Linked Machinery of Cytoskeletal Regulation that Enables Experimental Tumor Initiation and Metastatic Colonization // *Cancer Cell.* – 2013. – V. 24. – № 4. – P. 481–498.

218. Brabletz T., Jung A., Reu S., Porzner M., Hlubek F., Kunz–Schughart L.A., Knuechel R., Kirchner T. Variable  $\beta$ –catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2001. – V. 98. – № 18. – P. 10356–10361.

219. Fischer K.R., Durrans A., Lee S., Sheng J., Li F., Wong S.T.C., Choi H., El Rayes T., Ryu S., Troeger J., et al. Epithelial–to–mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance // *Nature.* – 2015. – V. 527. – № 7579. – P. 472–476.

220. 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. – V. 527. – № 7579. – P. 525–530.

221. Scheel C., Eaton E.N., Li S.H.–J., Chaffer C.L., Reinhardt F., Kah K.–J., Bell G., Guo W., Rubin J., Richardson A.L., et al. Paracrine and Autocrine Signals Induce and Maintain Mesenchymal and Stem Cell States in the Breast // *Cell.* – 2011. – V. 145. – № 6. – P. 926–940.

222. Ni T., Li X.–Y., Lu N., An T., Liu Z.–P., Fu R., Lv W.–C., Zhang Y.–W., Xu X.–J., Grant Rowe R., et al. Snail1–dependent p53 repression regulates expansion and activity of tumour–initiating cells in breast cancer // *Nat. Cell Biol.* – 2016. – V. 18. – № 11. – P. 1221–1232.

223. Jolly M.K., Jia D., Boareto M., Mani S.A., Pienta K. J., Ben–Jacob E., Levine H. Coupling the modules of EMT and stemness: A tunable ‘stemness window’ model // *Oncotarget.* – 2015. – V. 6. – № 28. – P. 1–14.

224. Bierie B., Pierce S.E., Kroeger C., Stover D.G., Pattabiraman D.R., Thiru P., Liu Donaher J., Reinhardt F., Chaffer C.L., Keckesova Z., et al. Integrin– $\beta$ 4 identifies cancer stem cell–enriched populations of partially mesenchymal carcinoma cells // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2017. – V. 114. – № 12. – P. E2337–E2346.

225. Lerner C., Harrison D.E. 5-Fluorouracil spares hemopoietic stem cells responsible for long-term repopulation // *Exp. Hematol.* – 1990. – V. 18. – № 2. – P. 114–118.
226. Zhou S., Schuetz J.D., Bunting K.D., Colapietro A.-M., Sampath J., Morris J.J., Lagutina I., Grosveld G.C., Osawa M., Nakauchi H., et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype // *Nat. Med.* – 2001. – V. 7. – № 9. – P. 1028–1034.
227. Levina V., Marrangoni A.M., DeMarco R., Gorelik E., Lokshin A.E. Drug-Selected Human Lung Cancer Stem Cells: Cytokine Network Tumorigenic and Metastatic Properties // *PLoS ONE.* – 2008. – V. 3. – № 8. – P. e3077.
228. Dallas N.A., Xia L., Fan F., Gray M.J., Gaur P., van Buren G., Samuel S., Kim M.P., Lim S. J., Ellis L.M. Chemoresistant Colorectal Cancer Cells the Cancer Stem Cell Phenotype and Increased Sensitivity to Insulin-like Growth Factor-I Receptor Inhibition // *Cancer Res.* – 2009. – V. 69. – № 5. – P. 1951–1957.
229. Farmer P., Bonnefoi H., Anderle P., Cameron D., Wirapati P., Becette V., André S., Piccart M., Campone M., Brain E., et al. A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer // *Nat. Med.* – 2009. – V. 15. – № 1. – P. 68–74.
230. Byers L.A., Diao L., Wang J., Saintigny P., Girard L., Peyton M., Shen L., Fan Y., Giri U., Tumula P.K., et al. An Epithelial-Mesenchymal Transition Gene Signature Predicts Resistance to EGFR and PI3K Inhibitors and Identifies Axl as a Therapeutic Target for Overcoming EGFR Inhibitor Resistance // *Clin. Cancer Res.* – 2013. – V. 19. – № 1. – P. 279–290.
231. Wu P.-F., Lin C.-H., Kuo C.-H., Chen W.-W., Yeh D.-C., Liao H.-W., Huang S.-M., Cheng A.-L., Lu Y.-S. A pilot study of bevacizumab combined with etoposide and cisplatin in breast cancer patients with leptomeningeal carcinomatosis // *BMC Cancer.* – 2015. – V. 15. – № 1. – P. 299.
232. Escriva M., Peiro S., Herranz N., Villagrasa P., Dave N., Montserrat-Sentis B., Murray S. A., Franci C., Gridley T., Virtanen I., et al. Repression of PTEN Phosphatase by Snail1 Transcriptional Factor during Gamma Radiation-Induced Apoptosis // *Mol. Cell. Biol.* – 2008. – V. 28. – № 5. – P. 1528–1540.
233. Lu M., Marsters S., Ye X., Luis E., Gonzalez L., Ashkenazi A.E. E-Cadherin Couples Death Receptors to the Cytoskeleton to Regulate Apoptosis // *Mol. Cell.* – 2014. – V. 54. – № 6. – P. 987–998.
234. Saxena M., Stephens M.A., Pathak H., Rangarajan A. Transcription factors that mediate epithelial-mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters // *Cell Death Dis.* – 2011. – V. 2. – № 7. – P. e179–e179.

235. Zhang Z., Lee J.C., Lin L., Olivas V., Au V., LaFramboise T., Abdel-Rahman M., Wang X., Levine A.D., Rho J.K., et al. Activation of the AXL kinase causes resistance to EGFR-targeted therapy in lung cancer // *Nat. Genet.* – 2012. – V. 44. – № 8. – P. 852–860.
236. Kudo-Saito C., Shirako H., Takeuchi T., Kawakami Y. Cancer Metastasis Is Accelerated through Immunosuppression during Snail-Induced EMT of Cancer Cells // *Cancer Cell.* – 2009. – V. 15. – № 3. – P. 195–206.
237. Chen L., Gibbons D.L., Goswami S., Cortez M.A., Ahn Y.-H., Byers L.A., Zhang X., Yi X., Dwyer D., Lin W., et al. Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumour cell PD-L1 expression and intratumoral immunosuppression // *Nat. Commun.* – 2014. – V. 5. – № 1. – P. 1–24.
238. Massagué J. TGF $\beta$  signalling in context // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2012. – V. 13. – № 10. – P. 616–630.
239. Akhurst R.J., Hata A. Targeting the TGF $\beta$  signalling pathway in disease // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2012. – V. 11. – № 10. – P. 790–811.
240. Neuzillet C., Tijeras-Raballand A., Cohen R., Cros J., Faivre S., Raymond E., de Gramont A. Targeting the TGF $\beta$  pathway for cancer therapy // *Pharmacol. Ther.* – 2015. – V. 147. – P. 22–31.
241. Gherardi E., Birchmeier W., Birchmeier C., Woude G.V. Targeting MET in cancer: rationale and progress // *Nat. Rev. Cancer.* – 2012. – V. 12. – № 2 – P. 89–103.
242. Scagliotti G.V., Novello S., Pawel J. von. The emerging role of MET/HGF inhibitors in oncology // *Cancer Treat. Rev.* – 2013. – V. 39. – № 7. – P. 793–801.
243. Albini A., Sporn M.B. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention // *Nat. Rev. Cancer.* – 2007. – V. 7. – № 2. – P. 139–147.
244. Bargagna-Mohan P., Paranthan R.R., Hamza A., Dimova N., Trucchi B., Srinivasan C., Elliott G.I., Zhan C.-G., Lau D.L., Zhu H., et al. Withaferin A Targets Intermediate Filaments Glial Fibrillary Acidic Protein and Vimentin in a Model of Retinal Gliosis // *J. Biol. Chem.* – 2010. – V. 285. – № 10. – P. 7657–7669.
245. Thaiparambil J.T., Bender L., Ganesh T., Kline E., Patel P., Liu Y., Tighiouart M., Vertino P.M., Harvey R.D., Garcia A., et al. Withaferin A inhibits breast cancer invasion and metastasis at sub-cytotoxic doses by inducing vimentin disassembly and serine 56 phosphorylation // *Int. J. Cancer.* – 2011. – V. 129. – № 11 – P. 2744–2755.
246. Tanaka K.A.K., Suzuki K.G.N., Shirai Y M., Shibutani S.T., Miyahara M.S.H., Tsuboi H., Yahara M., Yoshimura A., Mayor S., Fujiwara T.K., et al. Membrane molecules mobile even after chemical fixation // *Nat. Methods.* – 2010. – V. 7. – № 11. – P. 865–866.

247. Gjerdrum C., Tiron C., Hoiby T., Stefansson I., Haugen H., Sandal T., Collett K., Li S., McCormack E., Gjertsen B. T., et al. Axl is an essential epithelial-to-mesenchymal transition-induced regulator of breast cancer metastasis and patient survival // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2010. – V. 107. – № 3. – P. 1124–1129.
248. Byers L., Gerber D., Peguero J., Micklem D., Yule M., Lorens J. B. A phase I/II and pharmacokinetic study of BGB324a selective AXL inhibitor as monotherapy and in combination with erlotinib in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) // *Eur. J. Cancer.* – 2016. – V. 69. – P. 18–19.
249. Sheridan C. First Axl inhibitor enters clinical trials // *Nat. Biotechnol.* – 2013. – V. 31. – № 9. – P. 775–776.
250. Tallman M.S., Altman J.K. How I treat acute promyelocytic leukemia // *Blood.* – 2009. – V. 114. – № 25. – P. 5126–5135.
251. Pattabiraman D.R., Bierie B., Kober K.I., Thiru P., Krall J.A., Zill C., Reinhardt F., Tam W.L., Weinberg R.A. Activation of PKA leads to mesenchymal-to-epithelial transition and loss of tumor-initiating ability // *Science.* – 2016. – V. 351. – № 6277. – P. 3680.
252. Polyak K., Weinberg R.A. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits // *Nat. Rev. Cancer.* – 2009. – V. 9. – № 4. – P. 265–273.
253. Schmidt J.M., Panzilius E., Bartsch H.S., Irmeler M., Beckers J., Kari V., Linnemann J.R., Dragoi D., Hirschi B., Kloo U.J., et al. Stem-Cell-like Properties and Epithelial Plasticity Arise as Stable Traits after Transient Twist1 Activation // *Cell Rep.* – 2015. – V. 10. – № 2. – P. 131–139.
254. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method // *Methods.* – 2001. – V. 25. – № 4. – P. 402–408.
255. Nagase H., Woessner J.F. Matrix metalloproteinases // *J. Biol. Chem.* – 1999. – V. 274. – № 31. – P. 21491–21494.
256. Garbe J.C., Bhattacharya S., Merchant B., Bassett E., Swisshelm K., Feiler H.S., Wyrobek A.J., Stampfer M.R. Molecular Distinctions between Stasis and Telomere Attrition Senescence Barriers Shown by Long-term Culture of Normal Human Mammary Epithelial Cells // *Cancer Res.* – 2009. – V. 69. – № 19. – P. 7557–7568.
257. Muz B., de la Puente P., Azab F., Azab A.K. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis and resistance to therapy // *Hypoxia.* – 2015. – P. 83.
258. Macias H., Hinck L. Mammary gland development: Mammary gland development // *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* – 2012. – V. 1. – № 4. – P. 533–557.

259. Santagata S., Thakkar A., Ergonul A., Wang B., Woo T., Hu R., Harrell J.C., McNamara G., Schwede M., Culhane A.C., et al. Taxonomy of breast cancer based on normal cell phenotype predicts outcome // *J. Clin. Invest.* – 2014. – V. 124. – № 2 – P. 859–870.
260. Viale G. The current state of breast cancer classification // *Ann. Oncol.* – 2012. – V. 23. – № suppl 10. – P. x207–x210.
261. Cardoso F., Senkus E., Costa A., Papadopoulos E., Aapro M., André F., Harbeck N., Aguilar Lopez B., Barrios C.H., Bergh J., et al. 4th ESO–ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 4)<sup>†</sup> // *Ann. Oncol.* – 2018. – V. 29. – № 8. – P. 1634–1657.
262. Ellis G., Whitehead M.A., Robinson D., O’Neill D., Langhorne P. Comprehensive geriatric assessment for older adults admitted to hospital // *Cochrane Database of Systematic Reviews* / под ред. The Cochrane Collaboration. – ChichesterUK: John Wiley & SonsLtd2006. – 2011. – V. 343. – P. 1–10.
263. Vishnupriya S., Surekha D., Sailaja K., Rao D., Padma T., Raghunadharao D. Association of CYP19 polymorphisms with breast cancer risk: A case–control study // *J. Nat. Sci. Biol. Med.* – 2014. – V. 5. – № 2. – P. 250.
264. Heldring N., Pawson T., McDonnell D., Treuter E., Gustafsson J.–Å., Pike A.C.W. Structural Insights into Corepressor Recognition by Antagonist–bound Estrogen Receptors // *J. Biol. Chem.* – 2007. – V. 282. – № 14. – P. 10449–10455.
265. Bulun S.E., Noble L.S., Takayama K., Michael M. D., Agarwal V., Fisher C., Zhao Y., Hinshelwood M.M., Ito Y., Simpson E.R. Endocrine disorders associated with inappropriately high aromatase expression // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 1997. – V. 61. – № 3–6. – P. 133–139.
266. Bulun S.E. Regulation of Aromatase Expression in Estrogen–Responsive Breast and Uterine Disease: From Bench to Treatment // *Pharmacol. Rev.* – 2005. – V. 57. – № 3. – P. 359–383.
267. Weihua Z., Saji S., Mäkinen S., Cheng G., Jensen E.V., Warner M., Gustafsson J.A. Estrogen receptor (ER) beta a modulator of ERalpha in the uterus // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2000. – V. 97. – № 11. – P. 5936–5941.
268. Saegusa M., Okayasu I. Changes in expression of estrogen receptors alpha and beta in relation to progesterone receptor and pS2 status in normal and malignant endometrium // *Jpn. J. Cancer Res. Gann.* – 2000. – V. 91. – № 5. – P. 510–518.
269. Simpson E.R. Genetic mutations resulting in estrogen insufficiency in the male // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 1998. – V. 145. – № 1–2. – P. 55–59.
270. Watanabe K., Sasano H., Harada N., Ozaki M., Niikura H., Sato S., Yajima A. Aromatase in human endometrial carcinoma and hyperplasia. Immunohistochemical in situ hybridization and biochemical studies // *Am. J. Pathol.* – 1995. – V. 146. – № 2. – P. 491–500.

271. Gargett C.E., Schwab K.E., Deane J.A. Endometrial stem/progenitor cells: the first 10 years // *Hum. Reprod. Update.* – 2015. – P. dmv051.
272. Ali S., Coombes R.C. Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance // *Nat. Rev. Cancer.* – 2002. – V. 2. – № 2. – P. 101–112.
273. Arkhipov A., Shan Y., Kim E.T., Dror R.O., Shaw D.E. Her2 activation mechanism reflects evolutionary preservation of asymmetric ectodomain dimers in the human EGFR family // *eLife.* – 2013. – V. 2. – P.e00708
274. Wolff A.C., Hammond M.E.H., Hicks D.G., Dowsett M., McShane L.M., Allison K.H., Allred D.C., Bartlett J.M.S., Bilous M., Fitzgibbons P., et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update // *J. Clin. Oncol.* – 2013. – V. 31. – № 31. – P. 3997–4013.
275. Piccart-Gebhart M.J., Procter M., Leyland-Jones B., Goldhirsch A., Untch M., Smith I., Gianni L., Baselga J., Bell R., Jackisch C., et al. Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer // *N. Engl. J. Med.* – 2005. – V. 353. – № 16. – P. 1659–1672.
276. Aceto N., Duss S., MacDonald G., Meyer D.S., Roloff T.-C., Hynes N.E., Bentires-Alj M. Co-expression of HER2 and HER3 receptor tyrosine kinases enhances invasion of breast cells via stimulation of interleukin-8 autocrine secretion // *Breast Cancer Res.* – 2012. – V. 14. – № 5. – P. 1–11.
277. Nielsen T.O. Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal-Like Subtype of Invasive Breast Carcinoma // *Clin. Cancer Res.* – 2004. – V. 10. – № 16. – P. 5367–5374.
278. Viale G., Rotmensz N., Maisonneuve P., Bottiglieri L., Montagna E., Luini A., Veronesi P., Intra M., Torrì R., Cardillo A., et al. Invasive ductal carcinoma of the breast with the “triple-negative” phenotype: prognostic implications of EGFR immunoreactivity // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2009. – V. 116. – № 2. – P. 317–328.
279. Suciù C., Muresan A., Cornea R., Suciù O., Dema A., Raica M. Semi-automated evaluation of Ki-67 index in invasive ductal carcinoma of the breast // *Oncol. Lett.* – 2014. – V. 7. – № 1. – P. 107–114.
280. Nishimura R., Osako T., Okumura Y., Hayashi M., Toyozumi Y., Arima N. Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer subtype and a predictor of recurrence time in primary breast cancer // *Exp. Ther. Med.* – 2010. – V. 1. – № 5. – P. 747–754.
281. Kidd M., Schally A.V., Pfragner R., Malfertheiner M.V., Modlin I.M. Inhibition of proliferation of small intestinal and bronchopulmonary neuroendocrine cell lines by using peptide analogs targeting receptors // *Cancer.* – 2008. – V. 112. – № 6. – P. 1404–1414.

282. Paik S., Tang G., Shak S., Kim C., Baker J., Kim W., Cronin M., Baehner F.L., Watson D., Bryant J., et al. Gene Expression and Benefit of Chemotherapy in Women With Node–Negative Estrogen Receptor–Positive Breast Cancer // *J. Clin. Oncol.* – 2006. – V. 24. – № 23. – P. 3726–3734.
283. Salvesen H.B., Iversen O.E., Akslen L.A. Prognostic Significance of Angiogenesis and *Ki-67 p53* and *p21* Expression: A Population–Based Endometrial Carcinoma Study // *J. Clin. Oncol.* – 1999. – V. 17. – № 5. – P. 1382–1382.
284. Vuoriluoto K., Haugen H., Kiviluoto S., Mpindi J.–P., Nevo J., Gjerdrum C., Tiron C., Lorens J.B., Ivaska J. Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H–Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer // *Oncogene.* – 2011. – V. 30. – № 12. – P. 1436–1448.
285. Goldhirsch A., Wood W.C., Coates A.S., Gelber R.D., Thürlimann B., Senn H.–J., Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011 // *Ann. Oncol.* – 2011. – V. 22. – № 8. – P. 1736–1747.
286. Kang Y., Massagué J. Epithelial–Mesenchymal Transitions // *Cell.* – 2004. – V. 118. – № 3. – P. 277–279.
287. Schnell U., Cirulli V., Giepmans B.N.G. EpCAM: Structure and function in health and disease // *Biochim. Biophys. Acta BBA – Biomembr.* – 2013. – V. 1828. – № 8. – P. 1989–2001.
288. Soysal S.D., Muenst S., Barbie T., Fleming T., Gao F., Spizzo G., Oertli D., Viehl C.T., Obermann E.C., Gillanders W.E. EpCAM expression varies significantly and is differentially associated with prognosis in the luminal B HER2+basal–like and HER2 intrinsic subtypes of breast cancer // *Br. J. Cancer.* – 2013. – V. 108. – № 7. – P. 1480–1487.
289. Lehmann J.M., Riethmüller G., Johnson J.P. MUC18a marker of tumor progression in human melanomashows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1989. – V. 86. – № 24. – P. 9891–9895.
290. Jang M.H., Kim H.J., Kim E.J., Chung Y.R., Park S.Y. Expression of epithelial–mesenchymal transition–related markers in triple–negative breast cancer: ZEB1 as a potential biomarker for poor clinical outcome // *Hum. Pathol.* – 2015. – V. 46. – № 9. – P. 1267–1274.
291. Hyun K.–A., Koo G.–B., Han H., Sohn J., Choi W., Kim S.–I., Jung H.–I., Kim Y.–S. Epithelial–to–mesenchymal transition leads to loss of EpCAM and different physical properties in circulating tumor cells from metastatic breast cancer // *Oncotarget.* – 2016. – V. 7. – № 17. – P. 24677–24687.

292. Kotb A.M., Hierholzer A., Kemler R. Replacement of E-cadherin by N-cadherin in the mammary gland leads to fibrocystic changes and tumor formation // *Breast Cancer Res.* – 2011. – V. 13. – № 5. – P. 1–16.
293. Moustakas A., Heldin C.-H. Mechanisms of TGF $\beta$ -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition // *J. Clin. Med.* – 2016. – V. 5. – № 7. – P. 63.
294. Liu Z., Semenza G.L., Zhang H. Hypoxia-inducible factor 1 and breast cancer metastasis // *J. Zhejiang Univ.-Sci. B.* – 2015. – V. 16. – № 1. – P. 32–43.
295. Chen S., Chen X., Li W., Shan T., Lin W., Ma J., Cui X., Yang W., Cao G., Li Y., et al. Conversion of epithelial-to-mesenchymal transition to mesenchymal-to-epithelial transition is mediated by oxygen concentration in pancreatic cancer cells // *Oncol. Lett.* – 2018. – V. 15. – № 5. – P.7144–7152.
296. Zagorianakou N., Ioachim E., Mitselou A., Kitsou E., Zagorianakou P., Stefanaki S., Makrydimas G., Agnantis N. J. Glycoprotein CD44 expression in normal hyperplastic and neoplastic endometrium. An immunohistochemical study including correlations with p53 steroid receptor status and proliferative indices (PCNA/MIB1) // *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* – 2003. – V. 24. – № 6. – P. 500–504.
297. Tsang J.Y.S., Huang Y.-H., Luo M.-H., Ni Y.-B., Chan S.-K., Lui P.C.W., Yu A.M.C., Tan P.H., Tse G.M. Cancer stem cell markers are associated with adverse biomarker profiles and molecular subtypes of breast cancer // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2012. – V. 136. – № 2. – P. 407–417.
298. Tsang J.Y. S., Huang Y.-H., Luo M.-H., Ni Y.-B., Chan S.-K., Lui P.C.W., Yu A.M.C., Tan P.H., Tse G.M. The role of CD44+/CD24-/low biomarker for screening diagnosis and monitoring of breast cancer // *Oncol. Rep.* – 2014. – V. 31. – № 3. – P. 1127–1132.
299. Idowu M.O., Kmiecik M., Dumur C., Burton R.S., Grimes M.M., Powers C.N., Manjili M.H. CD44+/CD24-/low cancer stem/progenitor cells are more abundant in triple-negative invasive breast carcinoma phenotype and are associated with poor outcome // *Hum. Pathol.* – 2012. – V. 43. – № 3. – P. 364–373.
300. Horimoto Y., Arakawa A., Sasahara N., Tanabe M., Sai S., Himuro T., Saito M. Combination of Cancer Stem Cell Markers CD44 and CD24 Is Superior to ALDH1 as a Prognostic Indicator in Breast Cancer Patients with Distant Metastases // *PLOS ONE.* – 2016. – V. 11. – № 10. – P. e0165253.
301. Kudesia R., Singer T., Caputo T.A., Holcomb K.M., Kligman I., Rosenwaks Z., Gupta D. Reproductive and oncologic outcomes after progestin therapy for endometrial complex atypical hyperplasia or carcinoma // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2014. – V. 210. – № 3. – P. 255.e1–255.e4.



302. Nekipelaya V.V., Semenov D.V., Potapenko M.O., Kuligina E.V., Kit Y., Romanova I.V., Richter V.A. Lactaptin is a human milk protein inducing apoptosis of MCF-7 adenocarcinoma cells // *Dokl. Biochem. Biophys.* – 2008. – V. 419. – P. 58–61.

303. Semenov D.V., Fomin A.S., Kuligina E.V., Koval O.A., Matveeva V.A., Babkina I.N., Tikunova N.V., Richter V.A. Recombinant Analogs of a Novel Milk Pro-Apoptotic Peptide Lactaptin and Their Effect on Cultured Human Cells // *Protein J.* – 2010. – V. 29. – № 3. – P. 174–180.

304. Koval O.A., Tkachenko A.V., Fomin A.S., Semenov D.V., Nushtaeva A.A., Kuligina E.V., Zavjalov E.L., Richter V.A. Lactaptin Induces p53-Independent Cell Death Associated with Features of Apoptosis and Autophagy and Delays Growth of Breast Cancer Cells in Mouse Xenografts // *PLoS ONE.* – 2014. – V. 9. – № 4. – P. e93921.

305. Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V // *J. Immunol. Methods.* – 1995. – V. 184. – № 1. – P. 39–51.

306. Nothnick W.B. The emerging use of aromatase inhibitors for endometriosis treatment // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – 2011. – V. 9. – № 1. – P. 87.

307. Vardy J., Dhillon H.M., Clarke S.J., Olesen I., Leslie F., Warby A., Beith J., Sullivan A., Hamilton A., Beale P., et al. Investigation of herb-drug interactions with ginkgo biloba in women receiving hormonal treatment for early breast cancer // *SpringerPlus.* – 2013. – V. 2. – № 1. – P. 126.

308. Llovet J.M., Sala M., Castells L., Suarez Y., Vilana R., Bianchi L., Ayuso C., Vargas V., Rodés J., Bruix J. Randomized controlled trial of interferon treatment for advanced hepatocellular carcinoma: Randomized controlled trial of interferon treatment for advanced hepatocellular carcinoma // *Hepatology.* – 2000. – V. 31. – № 1. – P. 54–58.

309. Uenishi T., Kubo S., Hirohashi K., Tanaka H., Shuto T., Yamamoto T., Tamori A., Hai S., Kinoshita H., Nishiguchi S. Relationship between response to previous interferon therapy and postoperative recurrence of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma // *Hepatol. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hepatol.* – 2002. – V. 24. – № 4. – P. 404–412.

310. E. Warren K.A., Young H. Interferon Therapy for Malignant Solid Tumors // *Curr. Drug Ther.* – 2010. – V. 5. – № 2. – P. 132–138.

311. Yang Y., Zhou Y., Hou J., Bai C., Li Z., Fan J., Ng I.O L., Zhou W., Sun H., Dong Q., et al. Hepatic IFIT3 predicts interferon- $\alpha$  therapeutic response in patients of hepatocellular carcinoma: Hepatobiliary Malignancies // *Hepatology.* – 2017. – V. 66. – № 1. – P. 152–166.

312. Legrier M.-E., Bièche I., Gaston J., Beurdeley A., Yvonnet V., Déas O., Thuleau A., Château-Joubert S., Servely J.-L., Vacher S., et al. Activation of IFN/STAT1 signalling predicts

response to chemotherapy in oestrogen receptor–negative breast cancer // *Br. J. Cancer.* – 2016. – V. 114. – № 2. – P. 177–187.

313. Zhao Y., Altendorf–Hofmann A., Pozios I., Camaj P., Däberitz T., Wang X., Niess H., Seeliger H., Popp F., Betzler C., et al. Elevated interferon–induced protein with tetratricopeptide repeats 3 (IFIT3) is a poor prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* – 2017. – V. 143. – № 6. – P. 1061–1068.

314. Xie G., Ji A., Yuan Q., Jin Z., Yuan Y., Ren C., Guo Z., Yao Q., Yang K., Lin X., et al. Tumour–initiating capacity is independent of epithelial–mesenchymal transition status in breast cancer cell lines // *Br. J. Cancer.* – 2014. – V. 110. – № 10. – P. 2514–2523.

315. Rahman M., Mohammed S. Breast cancer metastasis and the lymphatic system // *Oncol. Lett.* – 2015. – V. 10. – № 3. – P. 1233–1239.

316. Ding L., Ellis M.J., Li S., Larson D.E., Chen K., Wallis J. W., Harris C.C., McLellan M.D., Fulton R.S., Fulton L.L., et al. Genome remodelling in a basal–like breast cancer metastasis and xenograft // *Nature.* – 2010. – V. 464. – № 7291. – P. 999–1005.

317. Harrell J.C., Dye W.W., Allred D.C., Jedlicka P., Spoelstra N.S., Sartorius C.A., Horwitz K.B. Estrogen Receptor Positive Breast Cancer Metastasis: Altered Hormonal Sensitivity and Tumor Aggressiveness in Lymphatic Vessels and Lymph Nodes // *Cancer Res.* – 2006. – V. 66. – № 18. – P. 9308–9315.

318. Wright L.E., Ottewell P.D., Rucci N., Peyruchaud O., Pagnotti G. M., Chiechi A., Buijs J.T., Sterling J.A. Murine models of breast cancer bone metastasis // *BoneKEy Rep.* – 2016. – V. 5. – P. 804.

319. Kim I.S., Baek S.H. Mouse models for breast cancer metastasis // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2010. – V. 394. – № 3. – P. 443–447.

320. Holbro T., Beerli R.R., Maurer F., Koziczak M., Barbas C.F., Hynes N.E. The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2003. – V. 100. – № 15. – P. 8933–8938.

321. Reya T., Morrison S. J., Clarke M. F., Weissman I. L. Stem cell cancer and cancer stem cells // *Nature.* – 2001. – V. 414. – № 6859. – P. 105–111.

322. Charafe–Jauffret E., Ginestier C., Iovino F., Tarpin C., Diebel M., Esterni B., Houvenaeghel G., Extra J.–M., Bertucci F., Jacquemier J., et al. Aldehyde Dehydrogenase 1–Positive Cancer Stem Cells Mediate Metastasis and Poor Clinical Outcome in Inflammatory Breast Cancer // *Clin. Cancer Res.* – 2010. – V. 16. – № 1. – P. 45–55.

323. Irollo E., Pirozzi G. CD133: to be or not to be is this the real question? // *Am. J. Transl. Res.* – 2013. – V. 5. – № 6. – P. 563–581.

324. Vilar E., Salazar R., Pérez-García J., Cortes J., Öberg K., Tabernero J. Chemotherapy and role of the proliferation marker Ki-67 in digestive neuroendocrine tumors // *Endocr. Relat. Cancer*. – 2007. – V. 14. – № 2. – P. 221–232.

325. Gascoigne K.E., Cheeseman I.M. Induced dicentric chromosome formation promotes genomic rearrangements and tumorigenesis // *Chromosome Res.* – 2013. – V. 21. – № 4. – P. 407–418.

326. Van Marck V.L., Bracke M.E. Epithelial–Mesenchymal Transitions in Human Cancer // *Chapter 9: Rise and Fall of Epithelial Phenotype*. – BostonMA: Springer US2005. – 2005. – P.135–159.