

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ СОМАТО-СТВОЛОВОГО ПЕРЕХОДА И МАКРОФАГ-  
АССОЦИИРОВАННЫХ ГЕНОВ В ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

Ю.А. Небова, М.К. Ибрагимова, М.М. Цыганов

Научный руководитель: д.б.н. Н.В. Литвяков

Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

E-mail: [julia.nebova@gmail.com](mailto:julia.nebova@gmail.com)

**EXPRESSION OF SOMATIC-STEM TRANSITION GENES AND MACROPHAGE-ASSOCIATED  
GENES IN BREAST TUMOR**

J.A. Nebova, M.K. Ibragimova, M.M. Tsyganov

Scientific Supervisor: Dr. N.V. Litviakov

Tomsk State University, Russian, Tomsk, Lenina str., 36, 634050

E-mail: [julia.nebova@gmail.com](mailto:julia.nebova@gmail.com)

**Abstract.** *In a study of breast cancer of 68 patients before and after neoadjuvant chemotherapy, overexpression in the residual tumor of 14/16 genes of the somato-stem transition was shown in patients with metastases that subsequently developed. This confirms our hypothesis about the important role of activation of the ability to somato-stem transition for tumor metastasis, which occurs under the influence of neoadjuvant chemotherapy. A new prognostic factor has been established, which makes it possible to predict the occurrence of hematogenous metastases with a sensitivity of 69%, a specificity of 94%, and a diagnostic accuracy of 82%.*

**Введение.** Системная химиотерапия прочно вошла в арсенал противоопухолевых методов, однако при ее применении у 20–40% онкологических больных наблюдается прогрессирующее злокачественное заболевание, основной причиной которого является клональная экспансия минорных резистентных клонов. В 2015–2016 гг. при исследовании клональной эволюции опухоли молочной железы в процессе предоперационной (неоадьювантной) химиотерапии (проект РФФИ №15-04-03091 в лаборатории онковирусологии НИИ онкологии Томского НИМЦ впервые было показано, что появление в процессе НАХТ или сохранение в резидуальной опухоли после химиотерапии опухолевых клонов, несущих амплификации в 2-х и более регионах: 5p, 6p, 7q, 8q, 9p, 9q, 10p, 13q, 16p, 18q, 19p, 19q, сопряжено со 100% гематогенным метастазированием. Другими словами, был выявлен абсолютный прогностический фактор для рака молочной железы, который позволяет со 100% эффективностью прогнозировать исход заболевания [1, 2]. Также установлено, что для формирования морфофенотипа опухоли принципиальное значение имеют особенности взаимодействия опухоли и микроокружения в контексте формирования опухолевой экосистемы. Риск метастазирования определяется как биологическими характеристиками опухоли, так и свойствами микроокружения в первичном очаге, а также локальными и системными факторами, влияющими на формирование метастатических ниш. В этой связи следует уделить особое внимание опухолеассоциированным макрофагам (ОАМ), являющимся основными клетками врожденного иммунитета, которые регулируют взаимоотношения инфильтрирующих иммунокомпетентных клеток с

опухолевыми клетками и с другими компонентами микроокружения, пролиферацию опухолевых клеток, ангиогенез, а также могут вовлекаться в реализацию ответа на химиотерапию [3].

Целью данного исследования являлось изучение экспрессии генов сомато-стволового перехода (5p15.33 *TERT*; 6p21.31 *OCT3*; 7q32.1 *SMO*; 8q24.21 *MYC*; 8q11.21 *SNAI2*; 9p21.2 *MOB3B*; 9q22.33 *TGFBR1*; 9q31.2 *KLF4*; 10p11.23 *BMII*; 10p13 *VIM*; 13q12.2 *FLT3*; 16p11.2 *LAT*; 18q21.1 *SMAD2*; 19p13.3 *LMNB2*; 19p13.13 *KLF1* и 19q13.2 *TGF-β1*) и макрофаг-ассоциированных генов (1p13.2 *YKL39*; 17q12 *CCL18*; 17p13.1 *CD68*; 10p12.33 *CD206*) в опухоли молочной железы.

**Материалы и методы.** Анализ производился на основе материала 68 больных РМЖ с морфологически верифицированным диагнозом и клинической стадией ПА – ПИВ (T<sub>1-4</sub>N<sub>0-3</sub>M<sub>0</sub>) люминального В, триждынегативного и HER2-позитивного молекулярных подтипов, в возрасте 26-68 лет (средний возраст 47,43 ± 0,78 лет). Больные получали 2-4 курса неoadъювантной химиотерапии (НАХТ) по схемам FAC (5-fluorouracil 600 мг/м<sup>2</sup>, adriamycin 50 мг/м<sup>2</sup> и cyclophosphamide 600 мг/м<sup>2</sup> один раз в 3 недели), САХ (cyclophosphamide 100 мг/м<sup>2</sup> внутримышечно, adriamycin 30 мг/м<sup>2</sup> внутривенно, xeloda 1200 мг/м<sup>2</sup> перорально), монотерапия таксотером (100 мг/м<sup>2</sup> часовая инфузия в день), СМХ (cyclophosphamide 100 мг/м<sup>2</sup> внутримышечно, methotrexate 30 мг/м<sup>2</sup> внутривенно, xeloda 1200 мг/м<sup>2</sup> перорально). Через 3-5 недель после НАХТ проводилась операция в объеме радикальной или подкожной мастэктомии, радикальной резекции, секторальной резекции с аксиллярной лимфаденэктомией или другого вида органосохранной операции, затем больным проводили 2 курса адъювантной химиотерапии по схеме FAC, а лучевая терапия и/или гормональное лечение назначались по показаниям. У 14/62 (22%) больных в течение 5-ти лет после лечения развились гематогенные метастазы.

РНК из биопсии опухоли до лечения и операционного материала после НАХТ выделяли при помощи наборов RNeasy mini kit plus (Qiagen, Germany). Экспрессию генов сомато-стволового перехода оценивали при помощи метода обратнo-транскриптазной ПЦР в режиме реального времени (qPCR) с оригинальными праймерами и зондами по технологии TaqMan. Амплификации локусов 5p, 6p, 7q, 8q, 9p, 9q, 10p, 13q, 16p, 18q, 19p, 19q определяли при помощи микроматрицы CytoScan HD Array (Affymetrix, USA).

**Результаты.** Было установлено влияние на уровень экспрессии отдельных генов сомато-стволового перехода в опухоли до лечения и после НАХТ возраста больных, рецепторного статуса и молекулярного подтипа (экспрессия гена *OCT3* в резидуальной опухоли больных моложе 45 лет статистически значимо выше, чем у пациенток старше 45 лет (p=0,0189)). В опухоли рецептор (ER и PR) позитивных больных до лечения и после НАХТ значимо выше экспрессия генов теломеразы и *TGFβ1* по сравнению с ER- и PR-негативными больными. У больных люминальным В РМЖ уровень экспрессии генов *MYC* и *TGFβ1* в биопсии выше, чем у больных HER2-позитивным РМЖ. Также, была выявлена корреляция между экспрессией генов сомато-стволового перехода и макрофаг-ассоциированными генами в опухоли до лечения: уровень экспрессии генов *FLT3* и *KLF1* статистически значимо выше у больных с CCL18+, чем у больных с CCL18- (p=0,0160; p=0,0212). Аналогично, уровень экспрессии генов *MYC*, *SNAI2*, *MOB3B* и *VIM* значимо выше в CD206+ опухолях, по сравнению с CD206-; наблюдается сниженный уровень экспрессии гена *KLF1* в опухолях, обладающих морфофенотипами YKL39+CCL18+ и YKL39+CCL18-, по отношению к опухолям с морфофенотипом YKL39-CCL18- (p=0,0359; p=0,0376).

До проведения лечения количество гиперэкспрессированных генов сомато-стволового перехода в опухоли у больных без метастазов и с метастазами не различается и составляет 6/16 (38%) и 7/16 (44%), соответственно. После проведения НАХТ в остаточной резидуальной опухоли у больных без метастазов количество гиперэкспрессированных генов сомато-стволового перехода остается прежним, в то время как у больных с развившимися впоследствии метастазами после проведения НАХТ количество гиперэкспрессированных генов увеличивается в два раза и составляет 14/16 (88%). Это подтверждает нашу гипотезу о важной роли активации способности к сомато-стволовому переходу для метастазирования опухолей, причем в данном случае активация происходит под действием неоадьювантной химиотерапии. Была установлена предиктивная значимость экспрессии генов *TGFBR1* и *KLF1* в опухоли молочной железы до лечения. При уровне экспрессии гена *TGFBR1* меньше 0,8 плохой ответ на НАХТ отмечается только у 6 из 39 (15%) больных, в то время при экспрессии больше 0,8 у 13 из 21 (62%) больных отмечается отсутствие ответа на НАХТ (по критерию Фишера  $p=0,0004$ ). Если в опухоли до лечения ген *KLF1* не экспрессируется, то 13/24 (54%) не отвечают на химиотерапию, при ненулевой экспрессии гена *KLF1* только 6/36 (17%) не отвечают на НАХТ (по критерию Фишера  $p=0,004$ ). Одновременная гиперэкспрессия генов *OCT3*, *LAT* и *LNMB2* в остаточной резидуальной опухоли после НАХТ сопряжена с неблагоприятным исходом. При гиперэкспрессии в остаточной резидуальной опухоли трех генов *OCT3*, *LAT* и *LNMB2* у 11/16 больных (69%) развиваются гематогенные метастазы. При гипоекспрессии хотя бы одного из этих генов 5-ти летняя безметастатическая выживаемость составляет 94% (34/36) (по критерию Фишера  $p=0,000004$ ). Чувствительность прогноза метастазирования составляет 69%, специфичность 94%, диагностическая точность 82%.

**Заключение.** Таким образом, показана гиперэкспрессия в резидуальной опухоли после НАХТ генов сомато-стволового перехода у больных с развившимися впоследствии метастазами. Предиктивная значимость экспрессии генов *KLF1* и *TGFBR1* в опухоли до лечения позволяет прогнозировать непосредственную эффективность НАХТ. Установлен новый прогностический фактор, который позволяет прогнозировать возникновение гематогенных метастазов чувствительностью 69%, специфичностью 94% и диагностической точностью 82%.

Работа поддержана грантом РФФИ 17-15-01203.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ибрагимова М.К., Цыганов М.М., Литвяков Н.В. Естественная и химио-индуцированная клональная эволюция опухоли // Биохимия. – 2017. – Т. 82. – № 4. – С. 572-586.
2. Litviakov N., Cherdyntseva N., Ibragimova M., Tsyganov M., Doroshenko A., Kazantseva P., Kzhyshkowska J., Slonimskaya E. (2016). The clonal evolution of a breast tumor during neoadjuvant chemotherapy and metastasis. *Annals of Oncology*, no. 27, pp. 299.
3. Чердынцева Н.В., Митрофанова И.В., Булдаков М.А., Стахеева М.Н., Патышева М.Р., Завьялова М.В., Кжышковска Ю.Г. Макрофаги и опухолевая прогрессия: на пути к макрофаг-специфичной терапии // Бюллетень сибирской медицины. – 2018. – Т. 16. – №. 4. – С. 61-74.