

РАК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: ПОЛИКЛОНАЛЬНОСТЬ, КАК ФАКТ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ПРОТИВООПУХОЛЕВОМУ ЛЕЧЕНИЮ

Логина В.И., Набока М.В.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Авторы:

Логина Виктория Ивановна, студентка 5 курса педиатрического факультета, 538 группы ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России. toru160400@gmail.com

Набока Максим Владимирович, ассистент кафедры онкологии, лучевой терапии ДПО ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России nabokamax@mail.ru

Автор, ответственный за переписку:

Логина Виктория Ивановна, студентка 5 курса педиатрического факультета, 538 группы ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России. toru160400@gmail.com

DOI: 10.61634/2782-3024-2023-11-49-56

Резюме. В данном обзоре приведены данные литературы по вопросу поликлональности, как фактора возникновения резистентности к противоопухолевому лечению. Рак молочной железы является гетерогенным заболеванием, и типирование опухолей имеет первостепенное значение для достижения хороших клинических результатов. Хотя принято стратифицировать и лечить опухоли молочной железы как единое целое, результаты исследований внутриопухолевой гетерогенности и раковых стволовых клеток повышают вероятность того, что в опухоли могут сосуществовать сразу несколько подтипов рака молочной железы. Определенная роль принадлежит пластичности в динамических преобразованиях между подтипами рака молочной железы, клинические последствия которой будут заключаться в необходимости применения комбинированных терапевтических стратегий, которые учитывают отдельные формы заболевания и их пластичность. Соответственно, совершенствование технологий одноклеточного секвенирования будет иметь решающее значение для диагностики и стратификации отдельных подтипов заболевания вплоть до клеточного уровня.

Ключевые слова: внутриопухолевая гетерогенность, пластичность, рак молочной железы, раковые стволовые клетки

BREAST CANCER: POLYCLONALITY AS A FACT OF RESISTANCE TO ANTITUMOR TREATMENT.

Loginova V.I., Naboka M.V.

Omsk State Medical University

Summary. In this review the data of literature on the issue of polyclonality as a factor of resistance to antitumor treatment are given. Breast cancer is a heterogeneous disease and tumor typing is of paramount importance to achieve good clinical outcomes. Although it is common to stratify and treat breast tumors as a single entity, findings of intratumoral heterogeneity and cancer stem cell research raise the possibility that multiple breast cancer subtypes may coexist in a tumor. Plasticity plays a role in the dynamic transformation between breast cancer subtypes, the clinical implications of which will be the need for combination therapeutic strategies that take into account individual disease forms and their

plasticity. Accordingly, improvements in single-cell sequencing technologies will be crucial for the diagnosis and stratification of individual disease subtypes down to the cellular level.

Keywords: intratumor heterogeneity, plasticity, breast cancer, cancer stem cells

Введение.

Рак молочной железы (РМЖ) — это гетерогенное заболевание, включающее в себя множество молекулярных и морфологических подтипов [1-4]. По этой причине необходим индивидуальный подход, чтобы добиться наилучших результатов у пациентов при назначении методов лечения.

Гистологическая классификация рака молочной железы, основанная главным образом на экспрессии рецептора эстрогена (ER), рецептора прогестерона (PR) и рецептора ERBB2 (HER2), оказалась полезной и заложила основу для классификации рака молочной железы. Фактически, рак молочной железы является прототипом опухоли, в которой первоначальная молекулярная классификация привела к улучшению результатов, направляя назначение таргетных терапевтических средств, таких как гормональная терапия (например Тамоксифен) и HER2-таргетная терапия (например, трастузумаб). В то время как гистологическая типирование все еще является обычной практикой, технологические достижения выявили дополнительные сложности с появлением по меньшей мере пяти различных молекулярных подтипов (люминальный А, люминальный В, обогащенных Her2, базальный и нормальный), основанных на кластеризации экспрессии генов [1]. Основываясь на этом, комбинированный геномный / транскриптомный анализ рака молочной железы привел к выявлению десяти различных подтипов рака молочной железы на основе интегрированных кластеров [2]. В соответствии с этими достижениями также были предприняты усилия по дальнейшему выделению некоторых из установленных гистологических подтипов для ER-негативного и тройного негативного рака молочной железы [5, 6]. Эти исследования выявили по

крайней мере четыре различных подтипа ER-негативного рака молочной железы и шесть тройных негативных подтипов рака молочной железы соответственно. Прогресс, достигнутый в этих областях, подчеркивает сложность дифференцировки подтипов рака молочной железы, и вполне вероятно, что в будущем будут обнаружены более точные характеристики, основанные на новых параметрах (например, метаболитах). Примечательно, однако, что существует разрыв между методами исследования и современной клинической практикой. Хотя внутреннее подтипирование рака молочной железы используется в исследовательских целях уже более десяти лет [7], геномные тесты PAM50 (например, Prosigna) не использовались специально в клинике для определения подтипов рака молочной железы. С другой стороны, также было бы крайне важно иметь возможность идентифицировать и постоянно разрабатывать таргетную терапию, чтобы соответствовать и улучшать результаты каждого возникающего подтипа. Прогресс в способности точно идентифицировать подтипы рака молочной железы, наряду с доступностью терапевтических средств, направленных против «ахиллесовой пяты» каждого подтипа рака молочной железы, может затем обеспечить более персонализированные подходы, соответствующие прецизионной онкологии. Здесь мы рассматриваем текущие данные, подтверждающие идею сосуществования нескольких подтипов рака молочной железы внутри опухоли, с акцентом на пластичность физиологических функций как движущую силу возникновения различных видов рака молочной железы. Следовательно, мы обсуждаем клинические последствия сосуществующих подтипов рака

молочной железы и перспективную роль одноклеточного секвенирования в обеспечении возможности диагностики рака молочной железы на клеточном уровне. Одноклеточное секвенирование - подход, позволяющий получить данные о последовательности ДНК отдельных клеток с помощью секвенирования и, следовательно, выявлять различия между отдельными клетками одноклеточных организмов, органов, тканей и клеточных субпопуляций многоклеточных организмов. Подход позволяет анализировать функциональные особенности клетки в контексте микроокружения. Секвенирование генома единичной клетки включает несколько шагов: выделение одной клетки, полногеномная амплификация, создание библиотек и секвенирование ДНК с использованием методов секвенирования нового поколения.

Основная часть. Применяемая в настоящее время гистологическая классификация опухолей молочной железы была принята в 2011 г. в Лионе на заседании рабочей группы по опухолям молочной железы в составе Международного агентства по изучению рака (International Agency for Research on Cancer — IARC). Согласно современной классификации, опухоли молочной железы подразделяются на: 1.Эпителиальные 2.Мезенхимальные 3. Фиброэпителиальные 4.Опухоли соска 5. Лимфомы 6. Метастатические опухоли 7. Опухоли молочной (грудной железы) у мужчин 8. Клинические типы (воспалительная карцинома и билатеральная карцинома молочной железы).

Концепция раковых стволовых клеток (РСК) существует уже много десятилетий [8] и все еще развивается [9]. Ключевым принципом, который остается неизменным, является функциональная гетерогенность с точки зрения способности инициировать опухоль. [9-11] При раке молочной железы, хотя опухолевые клетки организованы

иерархически, где РСК проявляют признаки стволовых / прогениторных клеток [12], существует пластичность, которая позволяет приобретать признаки РСК объемными опухолевыми клетками [13,14]. Соответственно, возможно, что динамические преобразования в результате дифференцировки и пластичности могут привести к образованию опухолей с клетками, которые соответствуют различным состояниям дифференцировки. [15, 16] Из-за пластичности опухолевых клеток терапевтические стратегии должны будут учитывать все типы клеток в иерархической структуре опухоли, а не только одни РСК, поскольку вновь возникающие популяции РСК могут возникать из объемных опухолевых клеток [17, 18].

Также стоит отметить, что иерархические структуры в опухолях молочной железы не обязательно должны ограничиваться бинарной организацией, состоящей из РСК и опухолевых клеток. Вероятен континуум состояний дифференцировки, которые отражают нормальную иерархию молочной железы и приводят к иерархической гетерогенности в опухолях молочной железы [11, 14]. В связи с этим в нескольких независимых исследованиях наблюдалось наличие минимально перекрывающихся различных популяций РСК в опухолях на основе экспрессии установленных маркеров РСК, таких как CD44 hi / CD24-, ALDH +, CD133+ или CD29 hi/CD61+ [19, 20-22]. Гетерогенность наблюдаемых популяций РСК может быть отражением разнообразия нормальных стволовых / прогениторных клеток молочной железы, которые регулируются пространственно и во времени [30-31]. Это согласуется с мнением о том, что могут существовать “ориентированные на мезенхиму РСК молочной железы” и “эпителиальные РСК молочной железы”, которые более похожи на стволовые клетки молочной железы взрослых

(AMASC) и фетальные маски (FMASC), соответственно [23, 31]. Хотя общее мнение в парадигме РСК заключается в том, что клетки с наименее дифференцированным состоянием (на вершине иерархии) будут демонстрировать наиболее злокачественные признаки (например, повышенный онкогенный потенциал), это может быть обобщением, которое не обязательно должно быть верным в каждом случае. На самом деле, есть сообщения о более дифференцированных люминальных клетках рака молочной железы, обладающих такой же способностью инициировать опухоль, что и базальные / стволовые клетки рака молочной железы [24, 25]. Кроме того, понимание внутренних и нишевых факторов, которые регулируют каждое из нормальных состояний стволовых / прогениторных клеток молочной железы, может пролить свет на уязвимость отдельных популяций РСК. Это особенно важно, поскольку имеются указания на то, что различные РСК могут иметь различную восприимчивость к таргетной терапии против РСК-ассоциированных путей, таких как Notch, Stat3 и TGF-бета [26, 27, 32]. В целом концепция РСК вызвала необходимость учета внутриопухолевой гетерогенности, когда дело доходит до назначения терапевтических средств [11, 28]. Тем не менее, появление отдельных популяций РСК молочной железы, которые могут сосуществовать внутри одной опухоли, усугубляет эту сложность [29, 30]. В более широком смысле, те же основополагающие принципы классификации опухолей для учета межопухолевой гетерогенности могут применяться для руководства назначением терапевтических средств при гетерогенных РСК молочной железы и иерархической гетерогенности внутри опухоли. Однако ключевым отличием будет требование диагностики опухолей молочной железы на клеточном уровне, а не опухоли как объемного образования.

Идея о том, что каждый отдельный подтип рака молочной железы соответствует состоянию дифференцировки клеток молочной железы, представляет собой точку конвергенции между нормальной биологией молочной железы и биологией рака молочной железы [31, 32]. Хотя раковые клетки определенного состояния дифференцировки могут быть только 'кариатурами' и не совсем похожи на своих нормальных аналогов [4], способность распознавать наиболее похожее состояние дифференцировки все же может быть полезной, как и при стратификации пациентов на основе внутренних молекулярных подтипов [1]. Концептуально, если это применимо к наблюдению иерархической гетерогенности / гетерогенных популяций РСК в опухолях молочной железы [13, 17, 18], можно сделать вывод, что множественные подтипы рака молочной железы могут сосуществовать внутри опухоли. Более того, если мы предположим, что иерархическая гетерогенность / гетерогенные популяции РСК существуют в динамическом равновесии, которое определяется главным образом дифференцировкой и пластичностью, возможно, что опухоли молочной железы состоят из смеси взаимопревращающихся подтипов рака молочной железы.

Существуют исследования, подтверждающие факт того, что клетки рака молочной железы могут преобразовываться между различными подтипами заболевания. Неотъемлемой частью этого понятия является исследование, в котором изогенные клетки MCF-7 (эпителиоподобная клеточная линия, полученная из инвазивной аденокарциномы протоков молочной железы человека) контекстуально отображали паттерны экспрессии генов либо просветных клеточных линий, либо базальных клеточных линий, вводимых внутрипротково через соски или в

жировой ткани молочной железы самок мышей SCID / Beige соответственно [30]. Это подчеркивает возможность пластичности подтипа рака молочной железы [32] и роль микроокружения опухоли в его регуляции. Совсем недавно было показано, что Ror2 (альтернативный сигнальный рецептор Wnt) отрицательно регулирует отдельные субпопуляции с низким содержанием клаудина в опухолях молочной железы с TP53-нулем, которые были классифицированы как базальноподобные [29]. Это исследование иллюстрирует сосуществование клаудин-низких и базальноподобных подтипов в опухолях и потенциал пластичности между ними посредством балансирования канонической и альтернативной передачи сигналов Wnt [18]. Исследования циркулирующих опухолевых клеток у пациентов с первичными опухолями молочной железы, классифицированными как ER +/- Her2, также указывают на потенциальную пластичность подтипа рака молочной железы [30]. Изолированные циркулирующие опухолевые клетки, которые были Her2+ и Her2-, демонстрировали различные фенотипы и терапевтическую уязвимость, но были пластичными и способными к взаимоконверсии, иллюстрируя пластичность экспрессии Her2, одного из трех маркеров, часто используемых при гистологической стратификации подтипов [32]. Все эти примеры иллюстрируют обратимые преобразования при подтипах рака молочной железы.

В случае сравнения первичных опухолей и соответствующих метастазов будут существовать пространственные и временные факторы, которые потенциально могут повлиять на переключение подтипов. Хорошо документировано, что биопсии из разделенных областей опухоли демонстрируют заметное субклональное разнообразие [31]. Продольные

исследования, которые включают последовательную оценку множественных биопсий тканей и жидкостей, также отражают изменения в субклональных популяциях, которые соответствуют прогрессированию заболевания и дифференциальным ответам на терапию [28]. Важно отметить, что имеются доказательства, демонстрирующие внутреннее переключение подтипов при метастазах рака молочной железы в мозг по сравнению с первичными опухолями [29]. В этом конкретном исследовании молекулярные изменения в Her2 и переключение внутреннего подтипа на обогащенные Her2 подтипы могут быть связаны с метастазированием в мозг, что указывает на то, что микросреда мозга может способствовать прогрессированию злокачественных новообразований, вызванных Her2. В отдельном исследовании классификация подтипов PAM50 из 123 парных первичных и метастатических опухолей молочной железы показала, что переключение подтипов действительно происходит преимущественно в тех случаях, когда первичные опухоли были классифицированы как люминальные А, люминальные В или обогащенные Her2 [20], хотя эти переключения подтипов могут быть вызваны другими механизмами, такими как клональная эволюция, а не пластичность. Несмотря на это, имеются данные об иерархической модели метастазирования рака молочной железы [31]. Анализ отдельных клеток метастатических клеток указывает на паттерн экспрессии генов стволовых клеток в инициации метастазирования, которое сопровождается дифференцировкой в более похожие на просветы клетки, которые приводят к прогрессированию метастатического заболевания [21]. Если мы рассматриваем иерархическую неоднородность в опухолях молочной железы как кульминацию различных подтипов заболевания, прямым

клиническим следствием будет применение аналогичных стратегий классификации в соответствии с гетерогенностью, наблюдаемой между пациентами. Следовательно, комбинации соответствующих терапевтических средств, которые наиболее эффективны для каждого из выявленных подтипов, могут быть использованы вместе, чтобы свести к минимуму вероятность рецидива устойчивых остаточных популяций. С учетом этой точки зрения было показано, что трастузумаб при адьювантном введении может ограничить прогрессирование ER + /Her2-ксенотрансплантированных опухолей просвета[22].

Стоит отметить, что, хотя мы уделили особое внимание негенетическим механизмам как движущей силе гетерогенности подтипов рака молочной железы внутри опухоли, весьма вероятно, что могут быть генетические основы. Как указывалось в других источниках, [4, 32] клональная эволюция и иерархическая гетерогенность не являются взаимоисключающими моделями и, вероятно, одновременно оказывают свое влияние на опухоли молочной железы. В этом представлении о множественных подтипах рака молочной железы подразумевается потенциальная возможность взаимодействия между различными типами заболеваний, что в целом относится к внутриопухолевой гетерогенности (т.е. генетической клональной гетерогенности, эпигенетической гетерогенности и гетерогенности, обусловленной шумом), которые были подробно рассмотрены [4, 32]. Эти взаимодействия могут быть кооперативными, разрушительными или нейтральными по своей природе, и были изящно показаны случаи "альтруистических" клонов, которые поддерживают рост опухолей молочной железы в целом [20-22]. Кроме того, кооператив между различными типами клеток также может стимулировать

инвазию и метастазирование [18]. При опухолях молочной железы, вызванных MMTV-РyMT (наиболее часто используемая модель для изучения прогрессирования и метастазирования опухоли молочной железы), было показано, что скопления клеток просвета проникают вместе с главными клетками, которые экспрессируют K14 и проявляют базальные признаки [28]. Интересно, что в этом случае взаимодействующие типы клеток могут взаимно преобразовываться в ответ на внеклеточный матрикс и попадать в кровотоки в виде кластеров до образования метастазов [29]. Следовательно, знание сущностей, присутствующих в опухоли, также может быть информативным, поскольку взаимодействие между подтипами заболевания может привести к непредвиденным свойствам (т. е. целое больше, чем сумма его частей).

Несмотря на потенциальные преимущества подтипирования рака молочной железы на клеточном уровне, существуют определенные практические проблемы, связанные с реализацией этой концепции. Последние достижения в области одноклеточного секвенирования могут помочь в решении этих проблем и, возможно, способствовать их реализации. Решающее значение для этого может иметь адаптация этих технологий к существующим рабочим процессам в диагностике рака молочной железы (например, обычный патологический анализ тканей, зафиксированных в парафине, с формалином (FFPE), или выделение РСК из жидких биоптатов), а именно, одноклеточное секвенирование ДНК / РНК, одноклеточные эпигеномные методы (например, HI-C, ATAC-seq), массовая цитометрия, визуализация методом массовой цитометрии, мультиплексированная ионно-лучевая визуализация (MIBI) и методы гибридизации с мультиплексированным флуоресцентным штрихкодированием - это быстро развивающиеся методы,

которые могут быть инструментальными и техническими аспектами [20-24].

Заключение.

Таким образом, рак молочной железы может состоять из нескольких внутриопухолевых подтипов, и эти отдельные формы заболевания потенциально могут быть динамичными из-за пластичности клеток рака молочной железы. Применение одноклеточного секвенирования в

диагностических целях будет иметь важное значение в таком сценарии и может обеспечить лучшее руководство при расшифровке комбинаторных схем лечения. Тем не менее, стоит отметить, что существует существенный разрыв между методами исследования и современной клинической практикой. Таким образом, все еще существуют практические и технические проблемы, которые необходимо решать.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abdelmoula WM, et al. Data-driven identification of prognostic tumor subpopulations using spatially mapped t-SNE of mass spectrometry imaging data. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(43):12244-12249.
2. Al-Hajj M, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *PNAS.* 2013;100(7):3983-3988.
3. Bendall SC, Nolan GP. From single cells to deep phenotypes in cancer. *Nat Biotechnol.* 2012;30(7)
4. Bheda P, Schneider R. Epigenetics reloaded: the single-cell revolution. *Trends Cell Biol.* 2014;24(11):712-23.
5. Boras-Granic K, et al. Embryonic cells contribute directly to the quiescent stem cell population in the adult mouse mammary gland. *Breast Cancer Res.* , 2014;16(6):487.
6. Brooks MD, et al. Therapeutic Implications of Cellular Heterogeneity and Plasticity in Breast Cancer. *Cell Stem Cell.* 2015;17(3):260-71.
7. Bussard KM, et al. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res.* . 2016;18(1):84.
8. Cejalvo JM, et al. Intrinsic Subtypes and Gene Expression Profiles in Primary and Metastatic Breast Cancer. *Cancer Res* 2017.
9. Cheung KJ, et al. Collective invasion in breast cancer requires a conserved basal epithelial program. *Cell.* 2013;155(7):1639-51.
10. Cheung KJ, et al. Polyclonal breast cancer metastases arise from collective dissemination of keratin 14-expressing tumor cell clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(7)
11. Cleary AS, et al. Tumour cell heterogeneity maintained by cooperating subclones in Wnt-driven mammary cancers. *Nature.* 2014;508(7494):113-7.
12. Curtis C, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature.* 2012;486(7403):346-52.
13. Davis FM, et al. Single-cell lineage tracing in the mammary gland reveals stochastic clonal dispersion of stem/progenitor cell progeny. *Nat Commun.* 2016;7:13053.
14. De Visser KE, et al. Developmental stage-specific contribution of LGR5(+) cells to basal and luminal epithelial lineages in the postnatal mammary gland. *J Pathol.* 2012;228(3):300-9.
15. Di Palma S, Bodenmiller B. Unraveling cell populations in tumors by single-cell mass cytometry. *Curr Opin Biotechnol.* 2015;31:122-9.
16. Fu NY, et al. Identification of quiescent and spatially restricted mammary stem cells that are hormone responsive. *Nat Cell Biol.* 2017;19(3):164-176.
17. Furth J, Kahn M. The transmission of leukemia of mice with a single cell. *Am. J. Cancer.* 2017;31:276-282.
18. Gao H, et al. Multi-organ Site Metastatic Reactivation Mediated by Non-canonical Discoidin Domain Receptor 1 Signaling. *Cell.* 2016;166(1):47-62.
19. Giesen C, et al. Highly multiplexed imaging of tumor tissues with subcellular resolution by mass cytometry. *Nat Methods.* 2014;11(4):417-22.
20. Hirata E, et al. Intravital imaging reveals how BRAF inhibition generates drug-tolerant microenvironments with high integrin β 1/FAK signaling. *Cancer Cell.* 2015;27(4):574-88.
21. Ignatiadis M, et al. Liquid biopsy-based clinical research in early breast cancer: The EORTC 90091-10093 Treat CTC trial. *Eur J Cancer.* 2016;63:97-104.
22. Ithimakin S, et al. HER2 drives luminal breast cancer stem cells in the absence of HER2 amplification: implications for efficacy of adjuvant trastuzumab. *Cancer Res.* . 2013;73(5): 1635-46
23. Jordan NV, et al. HER2 expression identifies dynamic functional states within circulating breast cancer cells. *Nature.* 2016;537(7618):102-106.
24. Kim J, et al. Tumor initiating but differentiated luminal-like breast cancer cells are highly invasive in the absence of basal-like activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(16):6124-9.
25. Lapidot T, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* 2012;367:645-648.
26. Lawson DA, et al. Single-cell analysis reveals a stem-cell program in human metastatic breast cancer cells. *Nature.* 2015;526(7571):131-5.

27. Lehmann BD, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.* 2012;121(7):2750-67.
28. Liu S, et al. Breast Cancer Stem Cells Transition between Epithelial and Mesenchymal States Reflective of their Normal Counterparts. *Stem Cell Reports.* 2014;2(1):78-91.
29. Lloyd-Lewis B, et al. Mammary Stem Cells: Premise, Properties, and Perspectives. *Trends Cell Biol* 2017
30. Luo M, et al. Mammary epithelial-specific ablation of the focal adhesion kinase suppresses mammary tumorigenesis by affecting mammary cancer stem/progenitor cells. *Cancer Res.* . 2019;69(2):466-74.
31. Ly A, et al. High-mass-resolution MALDI mass spectrometry imaging of metabolites from formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Nat Protoc.* 2016;11(8):1428-43.
32. Marusyk A, et al. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat Rev Cancer.* 2012;12(5):323-34