

ФГБУ НИИ онкологии
СО РАМН, г. Томск

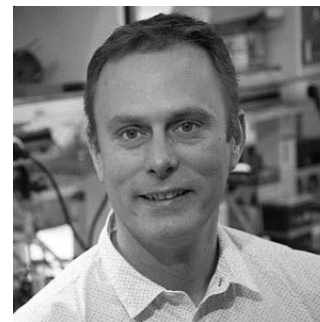
ОСНОВНЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ В ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ ОНКОЛОГИИ В 2012 ГОДУ

Н.В. Чердынцева, Н.В. Литвяков, Е.В. Денисов

*Знаменательно,
что именно в 2012 году
молекулярными онкологами
получены неоспоримые
доказательства
существования стволовых
клеток опухоли*

Лауреатами Нобелевской премии 2012 года в области физиологии и медицины стали John Gurdon (Gurdon Institute, UK) и Shinya Yamanaka (Gladstone Institute of Cardiovascular Disease, USA, and Kyoto University, Japan) за достижения в изучении стволовых клеток, а именно за «открытие возможности перепрограммирования дифференцированных клеток в плюрипотентные» [1]. 40 лет назад, в 1962 году, J. Gurdon провел успешные эксперименты по выращиванию головастика из клетки (икринки) шпорцевой лягушки, в которую вместо собственного разрушенного ядра было имплантировано ядро «взрослой» (дифференцированной) клетки кишечника головастика. Этот результат показал возможность обратимости дифференцировки и послужил началом эры клонирования. Больше трех десятилетий спустя, в 2007 году, S. Yamanaka удалось получить из дифференцированных фибробластов плюрипотентные стволовые клетки, изменив уровень экспрессии генов *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*, а затем снова дифференцировать их в зрелые клетки различных тканей [39]. Это открытие дало ученым инструмент регуляции стволовых и дифференцированных клеток. Одним из важнейших практически значимых эффектов работы Яманаки в этическом плане является то, что нет необходимости работать со стволовыми клетками, полученными из эмбрионов, так как они могут быть заменены индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками. Важность этих исследований для онкологии связана с перспективой доказательства возможности образования опухолевых стволовых клеток (ОСК) из соматических, поиска маркеров ОСК и молекулярных мишеней для разработки методов их избирательного уничтожения в опухолях. Также появилась практическая перспектива создания банка индуцированных плюрипотентных стволовых клеток для онкологических больных с целью заместительной терапии.

Знаменательно, что именно в 2012 году молекулярными онкологами получены неоспоримые доказательства существования стволовых клеток опухоли. Прямое подтверждение концепции ОСК явилось одним из самых значительных успехов фундаментальной онкологии в 2012 году.



Cedric Blanpain

Нобелевские лауреаты
2012 года в области
физиологии и медицины:



John B. Gurdon



Shinya Yamanaka

Раковые стволовые клетки

Популярная гипотеза о том, что многие опухоли поддерживаются стволовыми раковыми клетками, подобно тому, как обычные стволовые клетки строят нормальные ткани, до сего года подтверждалась лишь косвенными методами. Сортировка клеток по поверхностным маркерам и последующая имплантация разных их субпопуляций мышам позволила выявить клетки, дающие начало новым опухолям, и именно они рассматривались как стволовые. Однако возможность изменения свойств и поведения клеток при трансплантации в новом микроокружении оставляла открытым вопрос о физиологической судьбе этих клеток в «родном» микроокружении, и действительно ли эти клетки могут дать в нем начало новым опухолям. Cédric Blanpain (Université Libre de Bruxelles, Belgium), научным кредо которого является «увидеть, чтобы поверить», усовершенствовал генетическую технологию анализа гистогенеза (lineage tracing), что позволило выявить паттерн клеток, делящихся в ткани, то есть в условиях их естественного микроокружения, и наблюдать динамику процесса в микроскоп. За это исследование С. Blanpain был включен в число 10 известных ученых, отмеченных журналом «Nature» за выдающиеся научные достижения в 2012 году. Предложенный им методический подход позволил непосредственно в ткани, в привычном физиологическом окружении, наблюдать возникновение опухолей из определенных популяций клеток, которые можно с уверенностью считать стволовыми опухолевыми клетками. Процесс формирования опухоли удалось проследить независимо трем группам ученых на разных моделях – опухолях мозга, кожи и кишки. Полученные результаты, более подробное описание которых приведено ниже, подтвердили, что небольшая популяция стволовых клеток ответственна за рост опухоли, но справедливо ли это для других опухолей – пока судить рано. Однако уже сейчас можно говорить о возможном изменении парадигмы химиотерапии, когда для оценки эффективности химиотерапии важно будет знать не столько уменьшение объема опухоли, а то, насколько лекарственное средство воздействует на «причинную» популяцию (клон) клеток – стволовых клеток, способных возобновлять рост опухоли после лечения [5]. Направленное токсическое воздействие на стволовые клетки опухоли может стать той «волшебной пулей», которая позволит уничтожить опухоль.

Немного об истории вопроса

В настоящее время существует две основных теории развития злокачественной опухоли. Согласно стохастической (клональной) теории в опухолевые клетки могут трансформироваться любые соматические клетки, при этом все они являются потенциально клоногенными и могут давать начало новой опухоли, а опухолевая прогрессия осуществляется в результате появления клонов, которые приобретают преимущество благодаря онкогенным мутациям или эпигенетической модификации. По иерархической теории, опухоль развивается из ство-

ловых клеток организма, и они, превращаясь в опухолевые стволовые клетки, формируют ограниченную субпопуляцию размножающихся клеток, которые и обеспечивают рост и развитие опухоли. Каждая из теорий основывается на неоспоримых событиях опухолевого роста и имеет право на существование, более того, обе они подразумевают формирование клональных субпопуляций в пределах одного новообразования и могут дополнять друг друга.

Стволовые клетки – это клетки различных органов и тканей, которые способны к асимметричному делению, при этом, одна из дочерних клеток остается стволовой, а другая дает начало специализированным клеткам того или иного типа. Так происходят обновление и регенерация тканей. Термин «стволовая клетка» был введен в науку в 1909 году российским ученым Александром Александровичем Максимовым (<http://ru.wikipedia.org/wiki/>) – так он назвал клетки крови, которые способны дать начало нескольким другим типам клеток. В 1960-е годы была продемонстрирована возможность развития из клеток костного мозга клеток крови, а в 1981-м году американский биолог Мартин Эванс впервые выделил из зародыша мыши плюрипотентные стволовые клетки (способные развиваться в клетки разного типа). В 1998 году американским ученым Дж. Герхарту и Дж. Томпсону впервые удалось получить культуры эмбриональных стволовых клеток, способных развиваться в зрелые клетки различных типов. В 1999 году журнал Science признал открытие стволовых клеток третьим по значимости событием в биологии после открытия двойной спирали ДНК и программы «Геном человека».

Опухолевые стволовые клетки дают начало иерархии идентичных родительским клеткам, сохраняющих онкогенный потенциал (самовоспроизведение), и клеток, которые «уходят» в дифференцировку, при этом последние могут иметь значительную фенотипическую и функциональную вариабельность, формируя внутриопухолевую гетерогенность. Впервые концепция опухолевых стволовых клеток высказана в 1977 году для миелоидного лейкоза и некоторых нейробластом [18]. Методом лимитирующих разведений культур опухолевых клеток при трансплантации была показана редкая субпопуляция клеток острого миелобластного лейкоза, не более 0,01-1% от общего числа опухолевых клеток, которая могла индуцировать лейкемию у иммунодефицитных мышей. Впоследствии опухолевые стволовые клетки были найдены во многих солидных опухолях животных и человека [43]. Доля стволовых клеток в солидных опухолях может сильно варьировать, отражая их биологическое и функциональное разнообразие, а также злокачественный потенциал опухоли [21]. В частности, распределение ОСК

в опухоли молочной железы связано с ее молекулярным подтипом – наибольшая частота отмечается при «трижды негативном» подтипе, который имеет неблагоприятный прогноз [8, 26]. Мета-анализ 12 исследований показал, что уровень CD133+ ОСК в опухоли может быть перспективным прогностическим фактором при колоректальном раке [45]. При повышенной частоте ОСК опухоли хуже отвечают на химио- и лучевую терапию, а сами стволовые клетки оказываются химиорезистентными, так как находятся в состоянии покоя (не пролиферируют), и в них высоко экспрессированы гены множественной лекарственной устойчивости. Кроме того, ОСК могут претерпевать адаптивные изменения и в процессе лекарственной терапии, усиливая устойчивость к химиопрепаратам. Таким образом, жизнеспособность концепции опухолевых стволовых клеток подтверждается ее клинической пользой. В настоящее время активно разрабатываются таргетные препараты, направленные непосредственно на ОСК [7, 17, 43].

Прямые доказательства существования опухолевых стволовых клеток

В работе коллектива С. Blanpain изучалось развитие индуцированных (канцерогеном ДМБА – диметилбен(а) антраценом и промотором ТРА) плоскоклеточных карцином кожи мышей [11]. Чтобы иметь возможность наблюдать поведение индивидуальных клеток, их маркировали особым образом. Мышам трансфецировали генетическую конструкцию K14CREER/Rosa-YFP, которая активируется при введении тамоксифена, и при этом экспрессируется флуоресцирующий белок YFP (yellow fluorescent protein). Стволовые клетки кожи и их потомки у этих мышей, при введении тамоксифена, продуцировали белок YFP и флуоресцировали под действием ультрафиолета желтым светом. Изучив в динамике развитие плоскоклеточной карциномы, исследователи установили, что папилломы, образующиеся на первом этапе канцерогенеза, состоят из потомков стволовых клеток кожи. При дальнейшей трансформации папилломы в плоскоклеточную карциному стволовые клетки, по-видимому, уже опухолевые стволовые клетки, начинают бесконтрольно и активно делиться, и некоторые участки опухоли составляют потомки одной-единственной стволовой клетки. Таким образом, в данной работе напрямую было показано, что образование папиллом и плоскоклеточных карцином происходит за счет стволовых клеток.

Группой исследователей под руководством проф. Luis Parada (University of Texas Southwestern Medical Center, USA) была выдвинута рабочая гипотеза, предполагавшая, что нейральные стволовые клетки, из которых образовались опухолевые стволовые клетки, являются родоначальниками мультиформной глиомы [6]. Исследователи получили генетически трансформированную линию мышей, у которых развивались спонтанные глиомы, и нейральные стволовые клетки этих мышей были маркированы двумя способами. Во-первых, они экспрессиро-

вали флуоресцентный белок GFP (Нобелевская премия по химии 2008 г. за открытие и изучение зеленого флуоресцентного белка медузы *Aequorea victoria* (green fluorescent protein, GFP)), который позволял с помощью флуоресцентного микроскопа отличать их от других клеток. Во-вторых, они могли быть селективно убиты при помощи лекарства от герпеса – ганцикловира, поскольку экспрессировали ген тимидинкиназы вируса простого герпеса, при этом ганцикловир был совершенно безвреден для других клеток, как здоровых, так и опухолевых.

Исследователи выяснили, что при развитии глиомы только небольшое количество клеток в опухоли светится зеленым, т.е. в опухоли есть стволовые клетки и они родственны нейральным стволовым клеткам. Мышам провели химиотерапию препаратом темодал, который обладает селективностью в отношении пролиферирующих клеток. После химиотерапии оказалось, что часть опухолевых клеток выжила, и опухоль снова начала расти. Выжившими клетками были светящиеся зеленым стволовые клетки опухоли, они начали активно размножаться и восстанавливать объем опухоли, при этом хорошо была заметна асимметричность деления стволовых клеток – половина их дочерних клеток уже не светилась зеленым, т.е. не была стволовыми и подвергалась определенной дифференцировке. Тем не менее, для того чтобы однозначно доказать роль стволовых клеток в развитии глиомы, нужно было продемонстрировать, что в отсутствие фактора нет и изменений, которые он вызывает. Исследователи при помощи ганцикловира убили нейральные стволовые клетки у мышей еще в молодом возрасте, и у этих мышей злокачественные глиомы в процессе онтогенеза не развивались. Это достаточно четко свидетельствует о том, что нейральные стволовые клетки являются родоначальниками развития злокачественной глиомы, и подтверждает рабочую гипотезу ученых.

Третья группа исследователей (University Medical Center Utrecht, Netherlands) выполнила изящную работу на модели кишечной аденомы, которая развивается у мутантных мышей [32]. Для маркировки клеток использовали многоцветный CRE (cAMP response element) репортер R26R-Confetti, который позволяет выявить стволовые клетки слизистой кишечника. После введения тамоксифена они и их потомки светятся одним из четырех цветов: красным, синим, зеленым или желтым. Через 24 дня исследователи второй раз ввели животным тамоксифен. После второго введения тамоксифена делящиеся стволовые клетки (только делящиеся) и их новые потомки перекрашивались в другой цвет: если клетка при первом введении была красной, то после второго введения она становилась синей и наоборот, а если была зеленой, то становилась желтой и наоборот. Через 2 дня после второго введения тамоксифена исследователи увидели (рис. 1а), что практически все клетки опухоли – одного цвета, т.е. опухоль составили потомки одной группы клеток (которые окрасились изначально в один цвет). Небольшая группа клеток через 2 дня после второй инъекции тамок-

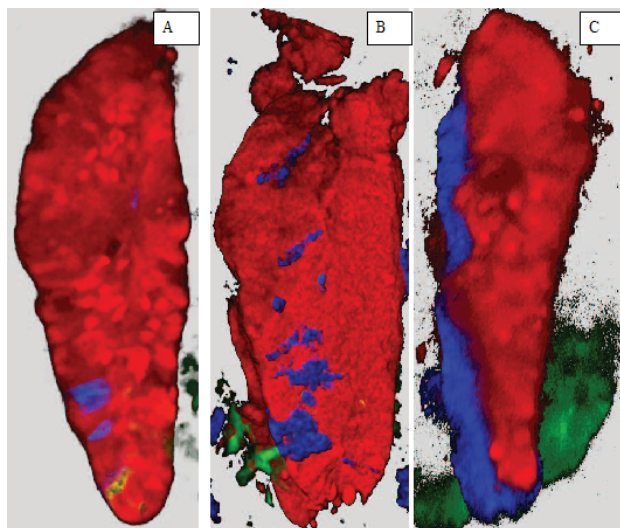


Рис.1. Исследование динамики развития аденом кишечника при помощи методики R26R–Confetti:

А – 24 дня после первой инъекции тамоксифена и два дня после второй инъекции тамоксифена. На рисунке видна основная масса клеток опухоли красного цвета и небольшая субпопуляция пролиферирующих стволовых клеток, которые после второй инъекции тамоксифена перекрасились в синий цвет.

В – 24 дня после первой инъекции тамоксифена и 6 дней после второй инъекции тамоксифена. На рисунке видно увеличение числа потомков, перекрашенных в синий цвет, после второй инъекции тамоксифена, пролиферирующих стволовых клеток.

С – 24 дня после первой инъекции тамоксифена и 24 дня после второй инъекции тамоксифена. Хорошо видно дальнейшее увеличение числа потомков, перекрашенных в синий цвет, пролиферирующих стволовых клеток.

Рисунок взят из оригинальной статьи Schepers et al. 2012 с упрощениями [32].

сифена поменяла цвет, и это свидетельствует о том, что только эти клетки в опухоли сохраняют способность размножаться и стволовые свойства. На представленном в работе рисунке хорошо заметно, что через 6 дней и 24 дня после второго введения тамоксифена увеличивается количество потомков перекрашенных стволовых клеток (рис. 1b и c). Это показывает, что рост опухоли обеспечивается ограниченной субпопуляцией стволовых клеток.

Таким образом, все три работы четко показали наличие опухолевых стволовых клеток в опухоли трех различных локализаций и гистотипов. Было наглядно подтверждено, что основная масса клеток опухоли являются потомками этих опухолевых стволовых клеток, и, судя по локализации последних, они происходят из нормальных стволовых клеток. Эти работы являются очень серьезной вехой в развитии фундаментальной онкологии и крупным шагом в понимании механизмов канцерогенеза и прогрессии опухолей. Данные исследования стимулируют научную общественность к интенсивным исследованиям ОСК, результаты которых, несомненно, будут иметь высокую клиническую значимость.

Уже сейчас появляются работы, которые ставят под сомнения происхождение ОСК только от нормальных

стволовых клеток ткани. Исследования Нобелевского лауреата S. Yamanaka указывают на возможность образования в организме опухолевых стволовых клеток из соматических клеток [39]. В исследовании Friedmann-Morvinski et al. показано, что предшественниками мультиформной глиомы могут быть не только нейральные стволовые клетки, но и дифференцированные «взрослые» нейроны и астроциты, которые трансформировали при помощи онкогенов лентивирусов. При исследовании *in vitro* вирус-трансформированные астроциты и нейроны приобретали свойства стволовых клеток и образовывали сферические культуры, т.е. под влиянием онкогенов происходит обратная дифференцировка взрослых нейронов до уровня стволовых клеток [14]. Российскими исследователями было показано, что одним из возможных регуляторов ОСК может выступать VEGF, ингибция которого ассоциирована с уменьшением их доли в опухоли [23].

В этом году опубликованы результаты исследования, проясняющего механизмы асимметричного деления стволовых клеток, когда одна дочерняя клетка остается стволовой, а вторая проходит дифференцировку. До сих пор считалось, что молекулы гистонов, стабилизирующих пространственную структуру ДНК, распределяются по двум дочерним клеткам случайным образом. В работе Tran et al. показано, что при делении стволовой клетки в дочерней клетке, которая затем останется стволовой, селективно накапливаются предсуществующие H3 гистоны, а в клетку, которая пойдет по пути дифференцировки, переходят вновь синтезированные гистонные белки. Биологический смысл такого разделения становится понятным, если принять во внимание, что аминокислотные остатки в гистонах могут подвергаться ацетилированию, и это, в свою очередь, может эпигенетически регулировать активность генов. При асимметричном делении клетка, которая останется стволовой, сохраняет эпигенетическую информацию материнской клетки, а дочерняя клетка, вступившая на путь дифференцировки, подвергается эпигенетическому перепрограммированию за счет вновь синтезированных гистонов [41]. Это исследование показывает важность эпигенетической регуляции в функционировании стволовых клеток и позволяет предположить, что эпигенетические нарушения являются одним из первых этапов трансформации нормальной стволовой клетки в опухолевую стволовую клетку.

Метастазирование – еще одна проблема, которая рассматривается с точки зрения опухолевых стволовых клеток. Полагают, что в опухолях эпителиального происхождения ОСК могут активно превращаться в мезенхимальные клетки (в результате эпителиально-мезенхимального перехода), приобретая способность к инвазии и метастазированию, а в местах метастазирования (так называемых метастатических нишах) реверсировать в эпителиальные клетки, образуя очаги вторичного опухолевого роста [40].

При помощи методов полногеномного секвенирования (next-generation sequencing, NGS) были проанализированы геномы первичной опухоли и ее метастазов на

модели метастазирующей медуллобластомы человека и мыши. Оказалось, что метастазы и первичная опухоль имеют небольшое количество общих мутаций, но метастазы у одной и той же мыши или больного имели много сходных мутаций. Авторы приходят к выводу, что метастазы образуются из редких клеток гетерогенной первичной опухоли (предположительно опухолевых стволовых клеток), а затем и в первичной опухоли, и в метастазах независимо накапливаются новые мутации [47].

На пути к пониманию природы внутриопухолевой гетерогенности

Наличие в пределах одной опухоли опухолевых клеток с различными биологическими характеристиками принято обозначать внутриопухолевой гетерогенностью. Такое опухолевое разнообразие является основной преградой на пути к высокоэффективной диагностике онкологических заболеваний, успешному прогнозу и лечению. Первые работы, описывающие внутриопухолевое разнообразие, появились почти сорок лет назад, но именно 2012-й год можно считать переломным в понимании его природы.

Эволюционное древо опухоли. Клональная гипотеза опухолевого процесса [29], дополненная моделью естественного отбора Чарльза Дарвина, говорит о том, что опухолевая прогрессия является результатом повышения генетической нестабильности в первичном клоне, приобретения клеточными субпопуляциями новых генетических нарушений, и, поскольку они обладают конкурентными преимуществами в условиях селективного давления внешних факторов, происходит обособление их в дочерние субклоны [13]. Концепцию “драйверных” мутаций и мутаций “пассажира” рассматривают в качестве важнейшего компонента данной модели канцерогенеза. Мутации, повышающие приспособленность опухолевых клеток, называют драйверными, тогда как нейтральные или негативные нарушения – пассажирами. Все сказанное применимо и для понимания природы внутриопухолевой гетерогенности. Подтверждением служит исследование Charles Swanton с коллегами, которые провели молекулярно-генетический анализ различных участков первичной опухоли почки и ее метастазов. Они установили, что из всего пула найденных мутаций почти две трети не были представлены в каждом из проанализированных образцов, т.е. только 30-35% мутаций были общими для всех образцов из разных участков одной и той же опухоли. Наблюдалась гетерогенность и по драйверным мутациям: различные мутантные варианты *SETD2*, *KDM5C*, *mTOR* и ряда других генов присутствовали в разных опухолевых сегментах, а *SETD2* – и в метастазах. Лишь мутация гена опухолевого супрессора *VHL* была обнаружена во всех образцах [15]. Стоит отметить, что инактивация гена *VHL* специфична для опухолей почки [42], при этом спектр его мутаций, часть из которых описана впервые российскими исследователями [53], разнообразен.

В другом исследовании с помощью секвенирования и микроматричного анализа были исследованы геномы 100

опухолей молочной железы и идентифицированы драйверные мутации в 40 различных генах. Эти нарушения представлены в 73 различных комбинациях, а количество комбинаций в пределах одной опухоли варьировало от 1 до 6. Авторы полагают, что эти драйверные мутации могли быть как первичными, так и вторичными. Однако содержание нескольких драйверных мутаций указывало на поликлональность опухоли [35].

Единый клональный предшественник был описан для субклонов опухолевых клеток глиобластомы [38]. На модели острого миелоидного лейкоза показана эволюция первичного клона в рецидивирующий субклон [9]. Продемонстрирована клональность вторичного острого миелоидного лейкоза и предшествующего ему миелодиспластического синдрома, при этом прогрессия в острую стадию лейкоза сопровождалась сохранением первичного клона и появлением нового субклона, несущего десятки-сотни новых мутаций [44]. Клональное формирование опухолей описано в других исследованиях [12; 22; 33; 52], часть из которых будет рассмотрена ниже.

Представленные результаты подтверждают, что опухолевый процесс и развитие внутриопухолевой гетерогенности действительно носят клональный характер и подобны растущему дереву или эволюционному дереву жизни Ч. Дарвина (рис. 2A-D). Мутации, существующие во всех опухолевых клетках (ствол и все ветви дерева), получили название “первичные драйверные мутации” или, согласно определению других ученых, – “древние”, “публичные”, “стволовые”, “убиквитарные” или мутации-“основатели” [3, 16, 34, 37]. Такие мутации являются основным триггером опухолевой трансформации нормальных клеток и приводят к образованию первичного опухолевого клона. Генетическая нестабильность, создаваемая первичными драйверными мутациями, приводит к появлению новых нарушений в опухолевых клетках, часть из которых придает определенные селективные преимущества, проявляющиеся в появлении новых более жизнеспособных дочерних субклонов. Для обозначения такого рода нарушений был предложен термин “вторичная драйверная” или “полуприватная” мутация. Такие мутации детектируются только в конкретных опухолевых участках (или ветвях дерева). Основное генетическое разнообразие опухоли обусловлено мутациями-“пассажирами”, определяющимися в одиночных опухолевых клетках (рис. 2C). “Перенос” технологии секвенирования на одиночные клетки позволил подойти вплотную к изучению редких опухолевых субклонов, то есть мутаций “пассажира” [20, 48], и оспариванию вопроса об их нейтральной роли в опухолевом процессе, в частности в эффективности терапии [13]. Предполагается, что клональная архитектура опухоли как модели “растущего дерева” представлена тремя основными типами: “пальма”, “каштан” и “баобаб” (рис. 2D). Опухоли, подобные пальмовому дереву, демонстрируют высокое содержание первичных драйверных мутаций и, тем самым, хороший терапевтический ответ. Напротив, опухоли по типу баобаб характеризуются большим генетическим разнообразием

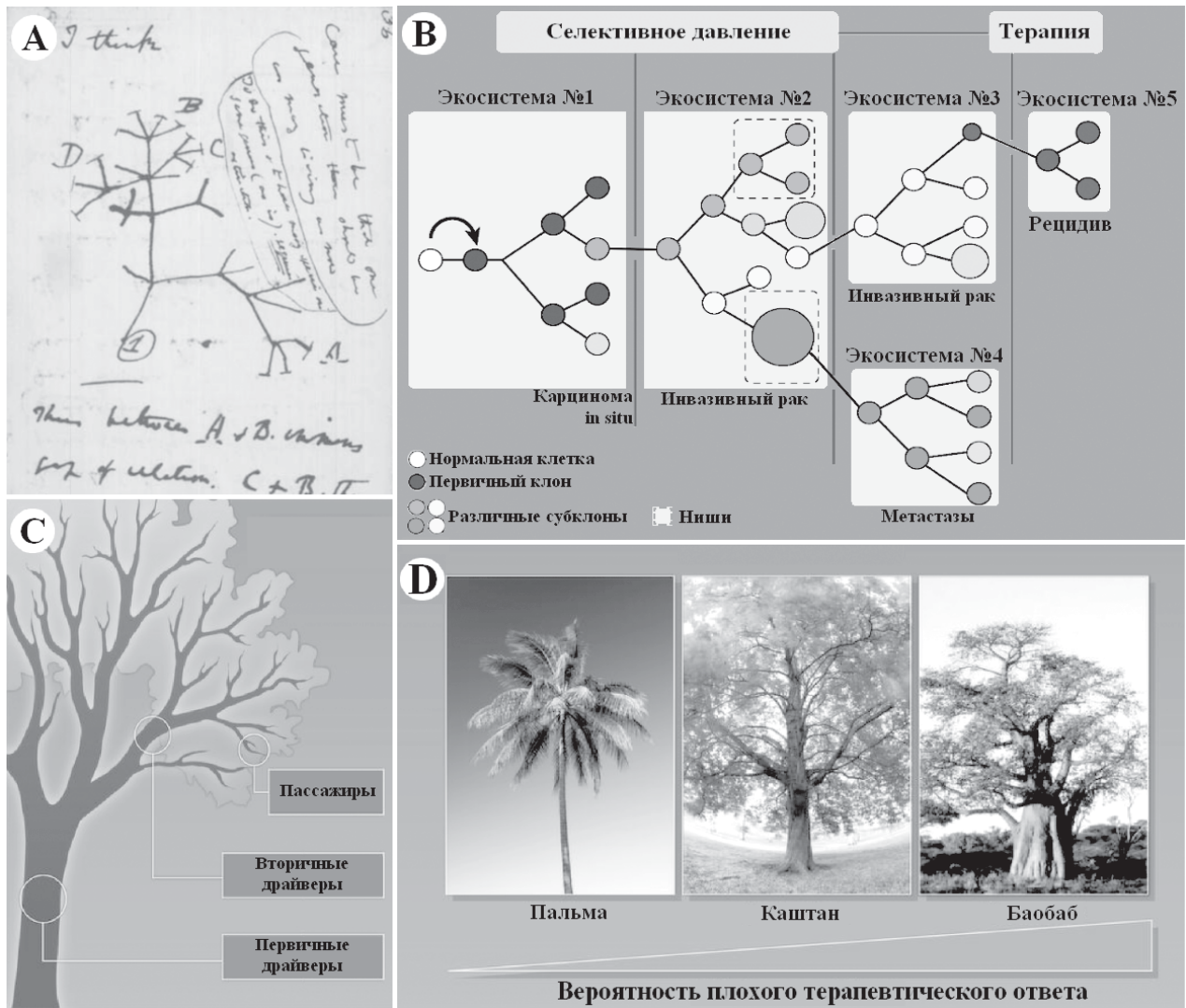


Рис.2. Эволюционное древо опухоли и формирование внутриопухолевой гетерогенности: А – зарисовка эволюционного древа жизни из блокнота Ч. Дарвина. **В** – эволюционное древо опухоли. **С** – опухолевый процесс на примере растущего дерева. **Д** – различные типы клональной архитектуры опухолей (адаптировано и модифицировано из [16, 49]).

разием (основная доля мутаций – вторичные драйверы и пассажиры) и резистентностью к терапии. Вероятность ответа опухолей-“каштанов” на лечение занимает среднее положение между предыдущими типами [49].

Внутриопухолевая гетерогенность как средство адаптации опухоли к меняющимся условиям окружающей среды. Гетерогенная опухоль должна рассматриваться как динамическая система, популяционный состав которой может меняться при изменении селективного давления микроокружения, терапии и т.д. так, что редкие клеточные субклоны могут становиться доминантными [13]. Данный тезис находит поддержку в следующих исследованиях. Опухолевая эволюция в линии “множественная миелома – рецидивы – вторичная плазмоклеточная лейкемия” сопровождалась изменением клонального состава под селективным давлением проводимой терапии [12]. В другом исследовании описано два первичных клона множественной миеломы, процентное соотношение дочерних субклонов которых изменялось коренным образом после полного курса терапии.

Субклон, который практически не выявлялся на начальном этапе роста миеломы ввиду малой частоты встречаемости, эволюционировал в доминантный и давал начало плазмоклеточной лейкемии [22]. Подобные результаты были получены при изучении прогрессии хронической лимфоцитарной лейкемии, однако между исследуемыми больными, относящимися к одной прогностической группе и получающими одно и то же лечение, наблюдались отличия в изменениях количества и представленности различных опухолевых субклонов. Весьма вероятно, что селективное давление опухолевого микроокружения было специфическим для каждого индивидуума [33].

Последнее предположение подтверждается результатами эксперимента, показавшего, что разнообразие клонального ландшафта опухоли не обязательно связано с генетическими нарушениями в самих клетках. Ксенотрансплантаты опухолевых клеток колоректального рака, меченные флюоресцентным белком GFP лентивируса, демонстрировали наличие пяти опухолевых клонов,

сходных генетически, но различных функционально. Интересно, что их количественное соотношение изменялось при назначении химиотерапии, как это уже описывалось выше в других работах. В частности, уменьшалась доля доминантного и повышалось содержание редкого клонов, причем последний при ранних пассажах характеризовался “покоящимся” состоянием [24]. Гетерогенная опухоль должна рассматриваться как экосистема, где даже редкие субклоны играют свою роль в жизни всей опухоли (рис. 2В). Данное утверждение предполагает, что опухолевые субклоны, занимая различные ниши в пределах опухолевого микроокружения, формируют единую систему (опухоль), жизнеспособность которой превосходит таковую у отдельно взятых клеточных субпопуляций; при этом взаимоотношения между субклонами могут носить конкурентный, выгодный для одной или двух сторон характер [13].

Внутриопухолевая гетерогенность проявляется на разных уровнях: генетическом (вариации числа копий генов, мутации в соматических клетках), эпигенетическом, фенотипическом, морфологическом, на уровне клональных предшественников не только опухоли, но и стромальных элементов, а также на уровне структурно-функциональных свойств опухолевого микроокружения [3].

Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность инвазивного протокового рака молочной железы была недавно описана российскими исследователями [51; 50]. Они выявили закономерный тип внутриопухолевой морфологической гетерогенности при самой распространенной форме рака молочной железы (РМЖ) – инвазивной протоковой карциноме. Такая фенотипическая гетерогенность обусловлена пятью различными типами морфологических структур (тубулярные, солидные, трабекулярные, альвеолярные структуры и дискретные группы опухолевых клеток), отражающими пространственное расположение опухолевых клеток. Тубулярные структуры образованы клетками, стоящими в один или два ряда и формирующими подобие трубок. Сплошные структуры представляют собой поля разной величины и формы, включающие сотни клеток. Трабекулярные структуры формируются двумя, тремя рядами клеток, располагающихся в строде. Альвеолярные структуры представляют собой скопления опухолевых клеток либо округлой, либо слегка неправильной формы. Количество опухолевых клеток в пределах данных структур варьирует от 5-6 до 25. Дискретные группы представлены как отдельными клетками, так и группами по 2-5 опухолевых клеток (рис.3). Количество различных типов

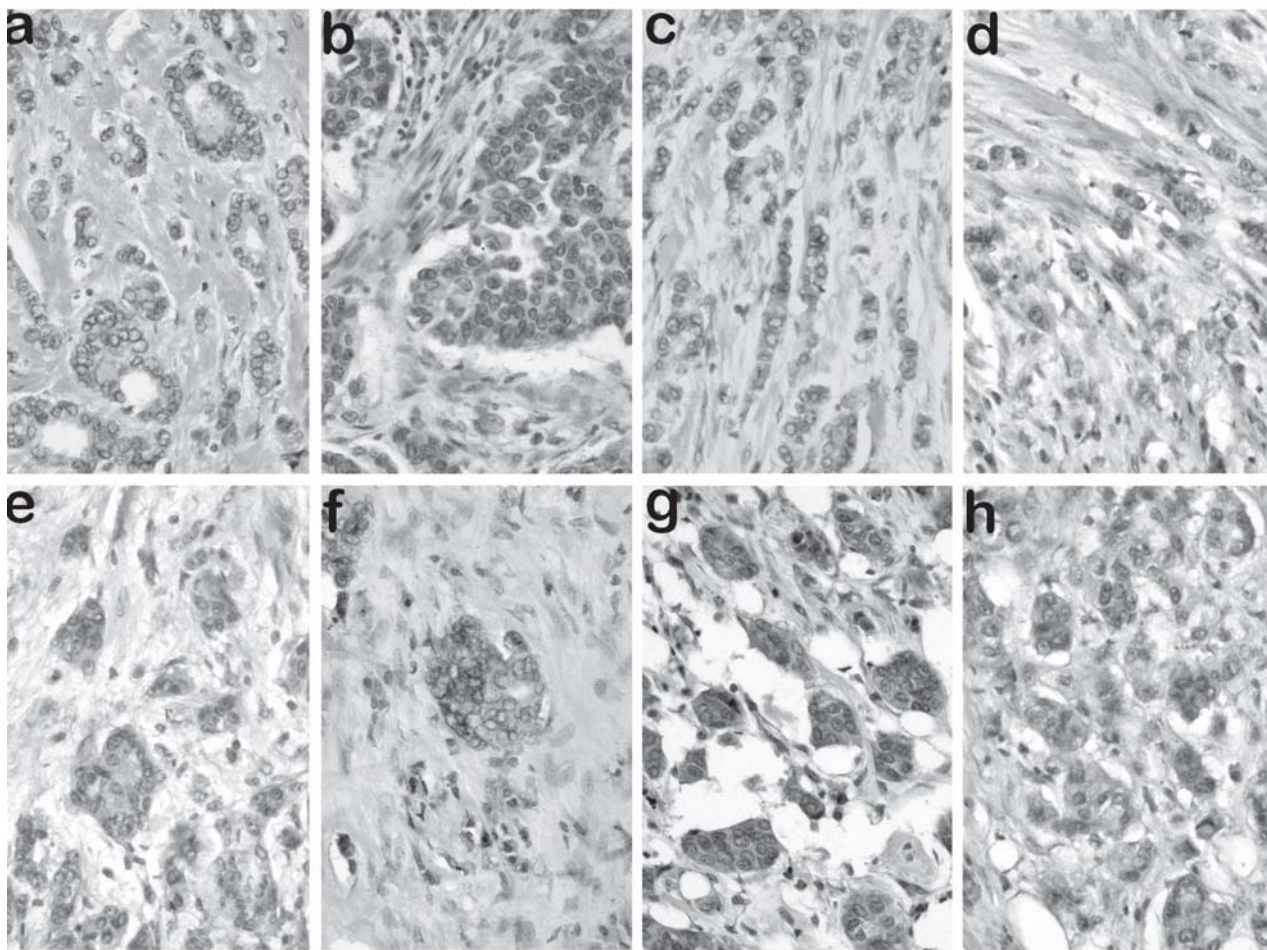


Рис.3. Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность инвазивного протокового рака молочной железы [51].

Представлены тубулярные (а), сплошные (b), трабекулярные (c), различные варианты альвеолярных структур (e-h) и дискретные группы опухолевых клеток (d).

морфологических структур в опухоли хотя и варьирует от случая к случаю, но связано с частотой лимфогенного метастазирования и зависит от молекулярного подтипа рака молочной железы. На большом клиническом материале показано, что присутствие альвеолярных структур в опухолях молочной железы связано с высокой вероятностью лимфогенного метастазирования, с повышением в ходе химиотерапии уровня экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости и, как следствие, с низкой эффективностью проводимого лечения [25, 50, 51].

Феномен внутриопухолевой гетерогенности является ведущей причиной прогрессии опухоли и ее резистентности к лекарственному лечению, поэтому понимание его механизмов откроет новые горизонты в терапии опухолей. Селективное накопление резистентных к химиотерапии клеток является одной из основных причин ее неэффективности. Оказалось, что таргетные препараты также индуцируют изменения в опухоли, препятствующие успешному лечению. Так, у больных немелкоклеточным раком легкого после лечения ингибиторами тирозинкиназы в 50% случаев появлялась мутация, предотвращающая доступность киназного домена для таргетного препарата, но драйверная мутация (в гене *EGFR*) сохранялась. Более того, в ряде случаев наблюдалась гистологическая трансформация аденокарциномы в мелкоклеточный рак легкого, и эти клетки отвечали на соответствующую терапию. Одним из возможных путей преодоления гетерогенности может быть использование комбинации препаратов, которые одновременно воздействуют на ключевые мутантные клоны, элиминируя их, в то время как в процессе конвенциональной химиотерапии (ХТ) часто выживают и становятся доминантными агрессивные клоны. Следует сказать, что принцип подбора комбинаций может быть различным, например, воздействие на делящиеся и находящиеся в покое клетки, клетки в гипоксических и оксигенированных участках опухоли, разные клеточные структуры, клетки с разными мутациями, либо с нарушением различных патогенетически значимых сигнальных путей и т.д., и т.п., и уже сейчас есть примеры удачных комбинаций, однако такой подход представляется достаточно эмпирическим и непродуктивным, пока не будут определены приоритетные мишени, ответственные за прогрессию той или иной опухоли [3].

Репрограммирование опухолевого микроокружения как подход к терапии опухолей

Опухоль, как биологический объект, не ограничена паренхиматозным компонентом (собственно опухолевыми клетками и опухолевыми стволовыми клетками), но содержит огромный репертуар нормальных клеток, включающий стромальные, воспалительные иммунокомпетентные клетки, экстраклеточный матрикс, сосудистые компоненты, мезенхимальные стволовые клетки и коммитированные предшественники стромальных клеток. Вме-

сте взятые, они создают опухолевое микроокружение и в тесном взаимодействии между собой обеспечивают условия для опухолевого роста и прогрессии. Клетки опухолевого микроокружения вносят активный вклад в канцерогенез, и, по-видимому, этим можно объяснить разное биологическое поведение опухолей одной гистологической принадлежности у разных индивидуумов в результате взаимодействия разных сочетаний эпителиального и «стромального» фенотипов. Такое представление об опухоли, как сложно организованной многокомпонентной системе, делает перспективными исследования по разработке новых подходов к терапии рака на основе поиска мишеней не только в клетках опухоли, но и среди компонентов микроокружения.

Подтверждением важности микроокружения в определении биологических свойств опухоли могут служить результаты экспериментального исследования коллектива ученых под руководством John Dick (University of Toronto, Canada). Считалось обоснованным представление, что опухоль имеет генетически различные клоны, которые при трансплантации различаются по биологическому поведению (способность к рецидивам, метастазированию, резистентность к ХТ). Однако канадские ученые на модели многократных последовательных трансплантаций субклонов от одной первоначальной линии клеток колоректального рака выявили особенности их биологического поведения, связанные с продолжительностью жизни клонов, временем возникновения опухолей, наличием дремлющего состояния, способностью рецидивировать, резистентностью к препаратам платины. При использовании полногеномного секвенирования авторы показали, что эти особенности не сопровождались генетическими изменениями клонов, то есть все трансплантаты генетически не отличались от исходных клеток. Эпигенетические изменения также поддерживались в течение многих пассажей одного клона. Это свидетельствует о функциональной гетерогенности клеток, имеющих общее генетическое происхождение, которая, очевидно, обусловлена условиями микроокружения [24].

Таким образом, злокачественные свойства (фенотип) клеток опухоли приобретаются не только в результате изменения генома клетки, но и под влиянием микроокружения [19]. С другой стороны, генетические и эпигенетические изменения в клетках стромы при опухолевой прогрессии могут выступать как маркеры прогноза и мишени для терапии. В настоящее время для лечения РМЖ используется три типа препаратов, направленных против мишеней опухолевого микроокружения: ингибиторы ароматазы, агенты, модулирующие ангиогенез, и ингибиторы рецепторов HER2/neu. Проблема высокой токсичности такого рода препаратов обусловлена тем, что мишени широко присутствуют в нормальных тканях, что нарушает их гомеостаз при противоопухолевой ХТ. Новым направлением терапии может быть «репрограммирование» микроокружения, которое индуцировало бы нормализацию его фенотипа и функций, тем самым ингибируя процессы опухолевой промоции и прогрессии.

Клинические наблюдения и экспериментальные данные свидетельствуют, что в качестве таких «репрограммирующих» воздействий могут выступать конвенциональная ХТ, эпигенетическая терапия (ингибиторы гистоновой деацетилазы), а также метромная терапия, предполагающая частое или постоянное введение малых доз химиопрепаратов. В число событий, происходящих в стромах при указанных воздействиях, прежде всего, входят восстановление иммунного ответа на клетки опухоли, ингибция ангиогенеза, индукция «дремлющего» состояния опухолевых клеток, ассоциированные с противоопухолевым эффектом [30, 31].

Гипотеза «прениш» объясняет избирательность гематогенного метастазирования

Все больше экспериментальных и клинических данных свидетельствуют о том, что способность опухоли к отдаленному метастазированию определяется не только и не столько свойствами самих клеток опухоли, сколько условиями микроокружения в сайтах метастазирования. Гипотеза «семян и почвы», выдвинутая еще в начале 20 века Steven Paget, получила развитие в работах David Lyden, сформулировавшим концепцию «ниш», согласно которой в органах-мишенях отдаленного метастазирования последовательно формируются преметастатическая ниша, микрометастатическая и далее макрометастатическая (собственно метастаз) ниши [27]. Преметастатическая ниша характеризуется наличием костно-мозговых гемопоэтических и стромальных клеток-предшественников, создающих необходимое для развития микрометастазов стромальное микроокружение, в которое заселяются опухолевые клетки на этапе формирования микрометастаза. Принципиально важное значение стромы подтверждается наблюдениями реверсии метастатического фенотипа клеток опухоли или неспособности микрометастазов превращаться в макрометастазы при отсутствии соответствующих условий стромального микроокружения [46; 4]. Однако до недавнего времени оставался открытым вопрос, чем именно обуславливается избирательность гематогенного метастазирования большинства опухолей в такие органы, как печень, легкие и головной мозг.

Пониманию процессов метастазирования опухолей способствует интересная работа российских исследователей, предложивших гипотезу «прениш», которая предполагает наличие специфических физиологических условий, необходимых для реализации метастатической программы опухоли, в тех сайтах, где впоследствии формируются гематогенные метастазы. Авторы определяют «пренишу» как совокупность клеточных и молекулярных условий *in situ* в месте будущего развития метастаза до поступления в него костно-мозговых клеток-предшественников. В качестве принципиально важного отмечается тот факт, что указанным выше «типичным» сайтам метастазирования присуще общее свойство, а именно, наличие пула органоспецифических макрофагов и спо-

собность эндотелия интенсивно привлекать миелоидные клетки-предшественники, особенно в условиях хронического воспаления. Исходя из этого, авторы полагают, что «основой "прениши" является активация эндотелия микроциркуляторного русла органов-мишеней в очаге будущего метастаза в условиях хронического персистирующего продуктивного воспаления, которое может быть индуцировано поступающими из первичной опухоли цитокинами и независимо от нее» [54]. Подтверждение гипотезы прениш откроет дополнительные возможности регуляции (ингибции) метастатического процесса путем разработки схем противовоспалительной терапии у определенного контингента пациентов.

В качестве косвенного экспериментального доказательства гипотезы можно привести данные Lopamudra Das Roy, который показал усиление процессов метастазирования РМЖ в легкие и костный мозг у мышей в условиях такого патологического состояния, как артрит. Гиперэкспрессия провоспалительных факторов при артрите на уровне микроокружения инициируется под влиянием продуцируемого опухолью фактора стволовых клеток (stem cell factor, SCF), через c-Kit рецептор. Оказалось, что сигнальный путь SCF/c-Kit активирован у мышей с РМЖ, болеющих артритом, по сравнению с теми мышами, у которых не было артрита. Использование ингибитора c-Kit совместно с целекоксибом (celecoxib, препарат для лечения ревматоидного артрита) приводило к ингибции отдаленного метастазирования [2].

Генетические полиморфизмы: новые данные о вкладе в опухолевую прогрессию и резистентность к терапии

В полногеномных исследованиях было обнаружено, что полиморфизм rs6983276 в энхансерном элементе онкогена MYC на хромосоме 8q24, регулирующий его экспрессию, более тесно ассоциирован с плохим исходом злокачественного процесса, чем другие обнаруженные в этом регионе полиморфизмы. В оригинальных исследованиях на трансгенных мышах была экспериментально подтверждена его высокая функциональная значимость для формирования опухолей. Мыши, которых нокаутировали по Myc-335 регуляторному элементу, содержащему указанный полиморфизм, показывали существенно сниженный уровень Myc транскриптов в кишечных криптах и резистентность к канцерогенезу, индуцированному мутациями в гене APC (adenomatosis polyposis coli) [36].

Резистентность к ингибитору тирозинкиназ иматинибу. Ингибиторы тирозинкиназ применяются для лечения хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ) и немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), однако ответ на них варьирует у разных индивидуумов, что может быть связано с генетической модификацией. Действительно, был обнаружен интронный полиморфизм (делеция 2903 пар оснований) в гене, кодирующем BCL2-like 11 (BIM), проапоптотический белок семейства BCL2,

индуцирующий апоптоз опухолей, для которых тирозинкиназная активность является ведущим сигнальным путем онкогенеза. Указанный полиморфизм, обнаруженный только у индивидов восточно-азиатского происхождения (с частотой 12,3%), приводит к потере проапоптотической активности синтезируемого белка, что и объясняет механизм резистентности клеточных линий лейкоза и НМРЛ с наличием этого полиморфизма к тирозинкиназным ингибиторам (в частности, иматинибу). На больших когортах пациентов с ХМЛ была подтверждена значимость полиморфизма как фактора устойчивости к терапии ингибиторами тирозинкиназы. Однако эта резистентность может быть преодолена путем использования ВНЗ-миметика. Таким образом, определение полиморфизма позволит индивидуализиро-

вать терапию, применяя ВНЗ-миметик у пациентов с наличием резистентности [28].

В 2012 году в рамках исследования международного Консорциума по изучению модификаторов BRCA1/2 (Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2, CIMBA) показано, что полиморфизм гена *IRS1* (insulin receptor substrate 1), влияющий на сигнальный путь инсулина, в 2 раза повышает риск развития РМЖ и рака яичников у носителей мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* [10].

Благодарности

Данная работа выполнена при поддержке грантов Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашения 8291, 8595, 16.740.11.0606 и 16.120.11.1259-МК.

Литература

1. "The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012". Nobelprize.org. 14 Feb 2013 http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2012/.
2. Link Between Inflammation and Breast Cancer Metastases Identified, May Be Treatable. AACR Annual Meeting 2012. <http://www.aacr.org/home/public—media/aacr-press-releases.aspx?d=2748&elq=5a2856d8e8704aba94208f3005985e47>.
3. Bhatia S, Frangioni JV, Hoffman RM, Iafrate AJ, Polyak K. The challenges posed by cancer heterogeneity // Nat Biotechnol. – 2012. – Vol.30. – P.604-610.
4. Bidard F.C., Pierga J.Y., Vincent-Salomon A, Poupon MF. A "class action" against the microenvironment: do cancer cells cooperate in metastasis? // Cancer Metastasis Rev. – 2008. – Vol.27. – P.5-10.
5. Chen J, Li Y, Yu T.S., McKay RM, Burns DK, Kernie S.G., Parada L.F. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy // Nature. – 2012. – Vol.488. – P.522-526.
6. Chen J, Li Y, Yu T.S., McKay RM, Burns DK, Kernie S.G., Parada L.F. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy // Nature. – 2012. – Vol.488. – P.522-526.
7. Clayton S, Mousa SA. Therapeutics formulated to target cancer stem cells: Is it in our future? // Cancer cell international. – 2011. – Vol.11. – P.7.
8. de Beza F.F., Caetano P., Gerbard R., Alvarenga CA., Gomes M., Paredes J., Schmitt F. Cancer stem cells markers CD44, CD24 and ALDH1 in breast cancer special histological types // Journal of Clinical Pathology. – 2012. – DOI: 10.1136/jclinpath-2012-201169.
9. Ding L, Ley TJ, Larson DE, Miller CA, Koboldt D.C., Welch J.S., Ritchey JK, Young MA, Lamprecht T, McLellan M.D., McMichael J.F., Wallis J.W., Lu C, Shen D, Harris C.C., Dooling DJ, Fulton RS, Fulton LL, Chen K, Schmidt H, Kalicki-veizer J, Magrini VJ, Cook L, McGrath S.D., Vickery T.L., Wendl M.C., Heath S, Watson MA, Link D.C., Tomasson M.H., Shannon W.D., Payton J.E., Kulkarni S., Westervelt P, Walter M.J., Graubert TA, Mardis E.R., Wilson R.K., DiPersio J.F. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing // Nature. – 2012. – Vol.481. – P.506-510.
10. Ding Y.C., McGuffog L, Healey S, Friedman E, Laitman Y, Paluch-Shimon S, Kaufman B, Liljegren A, Lindblom A, Olsson H, Kristofferson U, Stenmark-Askmal M, Melin B, Domchek S.M., Nathanson K.L., Rebbeck T.R., Jakubowska A, Lubinski J, Jaworska K, Durda K, Gronwald J, Huzarski T, Cybulski C, Byrski T, Osorio A, Cajal T.R., Stavropoulou AV, Benitez J, Hamann U, Rookus M, Aalfs C.M., de Lange J.L., Meijers-Heijboer H.E., Oosterwijk J.C., van Asperen C.J., Gomez Garcia E.B., Hoogerbrugge N, Jager A, van der Luijt R.B., Easton D.F., Peock S, Frost D, Ellis S.D., Platte R, Fineberg E, Evans D.G., Lalloo F, Izatt L, Lees R, Adlard J, Davidson R, Eccles D, Cole T, Cook J, Brewer C, Tischkowitz M, Godwin A.K., Pathak H, Stoppa-Lyonnet D, Sinilnikova O.M., Mazoyer S, Barjhoux L, Leone M, Gauthier-Villars M, Caux-Moncoutier V, de Pauw A, Hardouin A, Bertbet P, Dreyfus H, Ferrer S.F., Collonge-Rame MA, Sokolowska J, Buys S, Daly M, Miron A, Terry M.B., Chung W, John E.M., Southey M, Goldgar D, Singer C.F., Tea M.K., Gschwanter-Kaulich D, Fink-Retter A, Hansen T.V., Ejertsen B, Johannsson O.T., Offit K, Sarrel K, Gaudet M.M., Vijai J, Robson M, Piedmonte M.R., Andrews L, Cobn D, DeMars L.R., DiSilvestro P, Rodriguez G, Toland A.E., Montagna M, Agata S, Imyanitov E, Isaacs C, Janavicius R, Lazaro C, Blanco I, Ramus S.J., Sucheston L, Karlan B.Y., Gross J, Ganz PA, Beattie M.S., Schmutzler R.K., Wappenschmidt B, Meindl A, Arnold N, Niederacher D, Preisler-Adams S, Gadzicki D, Varon-Mateeva R, Deissler H, Gebrig A, Sutter C, Kast K, Nevanlinna H, Aittomaki K, Simard J, Spurdle A.B., Beesley J, Chen X, Tomlinson G.E., Weitzel J, Garber J.E., Olopade O.I., Rubinstein W.S., Tung N, Blum J.L., Narod SA, Brummel S, Gillen D.L., Lindor N, Fredericksen Z, Pankratz V.S., Couch F.J., Radice P, Peterlongo P, Greene M.H., Loud J.T., Mai P.L., Andrulis I.L., Glendon G, Ozelik H, Gerdes AM, Thomassen M, Jensen U.B., Skytte A.B., Caligo MA, Lee A, Chenevix-Trench G, Antoniou A.C., Neubausen S.L. A nonsynonymous polymorphism in *IRS1* modifies risk of developing breast and ovarian cancers in *BRCA1* and ovarian cancer in *BRCA2* mutation carriers // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. – 2012. – Vol.21. – P.1362-1370.

11. Driessens G, Beck B, Caauwe A, Simons B.D, Blanpain C. Defining the mode of tumour growth by clonal analysis // Nature. – 2012. – Vol.488. – P.527-530.
12. Egan J.B, Sbi C.X, Tembe W, Christoforides A, Kurdoglu A, Sinari S, Middha S, Asmann Y, Schmidt J, Braggio E, Keats J.J, Fonseca R, Bergsagel P.L, Craig D.W, Carpten J.D, Stewart A.K. Whole-genome sequencing of multiple myeloma from diagnosis to plasma cell leukemia reveals genomic initiating events, evolution, and clonal tides // Blood. – 2012. – Vol.120. – P.1060-1066.
13. Fisher R, Pusztai L, Swanton C. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics // Br J Cancer. – 2013. – DOI: 10.1038/bjc.2012.581.
14. Friedmann-Morvinski D, Bushong E.A, Ke E, Soda Y, Marumoto T, Singer O, Ellisman M.H, Verma I.M. Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice // Science. – 2012. – Vol.338. – P.1080-1084.
15. Gerlinger M, Rowan A.J, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald N.Q, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos C.R, Nobadani M, Eklund A.C, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal P.A, Swanton C. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing // N Engl J Med. – 2012. – Vol.366. – P.883-892.
16. Greaves M, Maley C.C. Clonal evolution in cancer // Nature. – 2012. – Vol.481. – P.306-313.
17. Grotenhuis B, Wijnhoven B, van Lanschot J. Cancer stem cells and their potential implications for the treatment of solid tumors // Journal of Surgical Oncology. – 2012. – Vol.106. – P.209-215.
18. Hamburger A.W, Salmon S.E. Primary Bioassay of Human Tumor Stem Cells // Science. – 1977. – Vol.197. – P.461-463.
19. Hanahan D, Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation // Cell. – 2011. – Vol.144. – P.646-674.
20. Hou Y, Song L, Zhu P, Zhang B, Tao Y, Xu X, Li F, Wu K, Liang J, Shao D, Wu H, Ye X, Ye C, Wu R, Jian M, Chen Y, Xie W, Zhang R, Chen L, Liu X, Yao X, Zheng H, Yu C, Li Q, Gong Z, Mao M, Yang X, Yang L, Li J, Wang W, Lu Z, Gu N, Laurie G, Bolund L, Kristiansen K, Wang J, Yang H, Li Y, Zhang X. Single-cell exome sequencing and monoclonal evolution of a JAK2-negative myeloproliferative neoplasm // Cell. – 2012. – Vol.148. – P.873-885.
21. Joshua B, Kaplan M.J, Doweck I, Pai R, Weissman I.L, Prince M.E, Ailles L.E. Frequency of cells expressing CD44, a head and neck cancer stem cell marker: correlation with tumor aggressiveness // Head & neck. – 2012. – Vol.34. – P.42-49.
22. Keats J.J, Chesi M, Egan J.B, Garbitt V.M, Palmer S.E, Braggio E, Van Wier S, Blackburn P.R, Baker A.S, Dispenzieri A, Kumar S, Rajkumar S.V, Carpten J.D, Barrett M, Fonseca R, Stewart A.K, Bergsagel P.L. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma // Blood. – 2012. – Vol.120. – P.1067-1076.
23. Khromova N, Kopnin P, Rybko V, Kopnin B.P. Downregulation of VEGF-C expression in lung and colon cancer cells decelerates tumor growth and inhibits metastasis via multiple mechanisms // Oncogene. – 2012. – Vol.31. – P.1389-1397.
24. Kreso A, O'Brien C.A, van Galen P, Gan O, Notta F, Brown A.M, Ng K, Ma J, Wienholds E, Dunant C, Pollett A, Gallinger S, McPherson J, Mullighan C.G, Shibata D, Dick J.E. Variable Clonal Repopulation Dynamics Influence Chemotherapy Response in Colorectal Cancer // Science. – 2012. – Vol.339. – P.543-548.
25. Litviakov N.V, Denisov E.V, Zavyalova M.V, Perelmutter V.M, Vtorushin S.V, Tsyganov M.M, Gerashchenko T.S, Garbukov E.Y, Slonimskaya E.M, Cherdyntseva N.V. Intratumoral morphological heterogeneity of breast cancer: neoadjuvant chemotherapy efficiency and drug resistance gene expression // Int J Cancer. – under review.
26. Liu T, Sun B, Zhao X, Zhao X, Sun T, Gu Q, Yao Z, Dong X, Zhao N, Liu N. CD133+ cells with cancer stem cell characteristics associates with vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer // Oncogene. – 2012. – DOI: 10.1038/onc.2012.85.
27. Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Wu Y, Hicklin D, Zhu Z, Hackett N.R, Crystal R.G, Moore M.A, Hajar K.A, Manova K, Benezra R, Rafii S. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth // Nat Med. – 2001. – Vol.7. – P.1194-1201.
28. Ng K.P, Hillmer A.M, Chuah C.T, Juan W.C, Ko T.K, Teo A.S, Ariyaratne P.N, Takahashi N, Sawada K, Fei Y, Soh S, Lee W.H, Huang J.W, Allen J.C, Jr, Woo X.Y, Nagarajan N, Kumar V, Thalamuthu A, Poh W.T, Ang A.L, Mya H.T, How G.F, Yang L.Y, Koh L.P, Chowbay B, Chang C.T, Nadarajan V.S, Chng W.J, Than H, Lim L.C, Gob Y.T, Zhang S, Poh D, Tan P, Seet J.E, Ang M.K, Chau N.M, Ng Q.S, Tan D.S, Soda M, Isobe K, Nothen M.M, Wong T.Y, Shahab A, Ruan X, Cacheux-Rataboul V, Sung W.K, Tan E.H, Yatabe Y, Mano H, Soo R.A, Chin T.M, Lim W.T, Ruan Y, Ong S.T. A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer // Nat Med. – 2012. – Vol.18. – P.521-528.
29. Nowell P.C. The clonal evolution of tumor cell populations // Science. – 1976. – Vol.194. – P.23-28.
30. Place A.E, Jin H.S, Polyak K. The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment // Breast Cancer Res. – 2011. – Vol.13. – P.227.
31. Polyak K, Vogt P.K. Progress in breast cancer research // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2012. – Vol.109. – P.2715-2717.
32. Schepers A.G, Snippert H.J, Stange D.E, van den Born M, van Es J.H, van de Wetering M, Clevers H. Lineage tracing reveals Lgr5+ stem cell activity in mouse intestinal adenomas // Science Signalling. – 2012. – Vol.337. – P.730.
33. Schub A, Becq J, Humpbray S, Alexa A, Burns A, Clifford R, Feller S.M, Grocock R, Henderson S, Khrebtkova I, Kingsbury Z, Luo S, McBride D, Murray L, Menju T, Timbs A, Ross M, Taylor J, Bentley D. Monitoring chronic lymphocytic leukemia progression by whole genome sequencing reveals heterogeneous clonal evolution patterns // Blood. – 2012. – Vol.120. – P.4191-4196.
34. Shibata D. Cancer. Heterogeneity and tumor history // Science. – 2012. – Vol.336. – P.304-305.

35. Stephens PJ, Tarpey PS, Davies H, Van Loo P, Greenman C, Wedge D.C., Nik-Zainal S, Martin S, Varela I, Bignell G.R., Yates L.R., Papaemmanuil E, Beare D, Butler A, Cheverton A, Gamble J, Hinton J, Jia M, Jayakumar A, Jones D, Latimer C, Lau K.W., McLaren S, McBride D.J., Menzies A, Mudie L, Raine K, Rad R, Chapman M.S., Teague J, Easton D, Langerod A, Lee M.T., Shen C.Y., Tee B.T., Huimin B.W., Broeks A, Vargas A.C., Turasbuli G, Martens J, Fatima A, Miron P, Chin S.F., Thomas G, Boyault S, Mariani O, Lakshani S.R., van de Vijver M, van 't Veer L, Foekens J, Desmedt C, Sotiriou C, Tutt A, Caldas C, Reis-Filho J.S., Aparicio S.A., Salomon A.V., Borresen-Dale A.L., Richardson A.L., Campbell P.J., Futreal P.A., Stratton M.R. The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer // *Nature*. – 2012. – Vol.486. – P.400-404.
36. Sur I.K., Hallikas O, Vabarautio A, Yan J, Turunen M, Enge M, Taipale M, Karhu A, Aaltonen LA, Taipale J. Mice lacking a Myc enhancer that includes human SNP rs6983267 are resistant to intestinal tumors // *Science*. – 2012. – Vol.338. – P.1360-1363.
37. Swanton C. Intratumor Heterogeneity: Evolution through Space and Time // *Cancer Res*. – 2012. – Vol.72. – P.4875-4882.
38. Szerlip N.J., Pedraza A, Chakravarty D, Azim M, McGuire J, Fang Y, Ozawa T, Holland E.C., Huse J.T., Jhanwar S, Leversha M.A., Mikkelsen T, Brenman C.W. Intratumoral heterogeneity of receptor tyrosine kinases EGFR and PDGFRA amplification in glioblastoma defines subpopulations with distinct growth factor response // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2012. – Vol.109. – P.3041-3046.
39. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors // *Cell*. – 2007. – Vol.131. – P.861-872.
40. Thiery J.P., Acloque H, Huang R.Y.J., Nieto M.A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease // *Cell*. – 2009. – Vol.139. – P.871-890.
41. Tran V, Lim C, Xie J, Chen X. Asymmetric Division of Drosophila Male Germline Stem Cell Shows Asymmetric Histone Distribution // *Science*. – 2012. – Vol.338. – P.679-682.
42. Vaziri S.A., Tavares E.J., Golsbayan A.R., Rini B.I., Aydin H, Zhou M, Sercia L, Wood L, Ganapathi M.K., Bukowski R.M., Ganapathi R. Differing von hippel lindau genotype in paired primary and metastatic tumors in patients with clear cell renal cell carcinoma // *Front Oncol*. – 2012. – Vol.2. – P.51.
43. Visvader J.E., Lindeman G.J. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions // *Nature Reviews Cancer*. – 2008. – Vol.8. – P.755-768.
44. Walter M.J., Shen D, Ding L, Shao J, Koboldt D.C., Chen K, Larson D.E., McLellan M.D., Dooling D, Abbott R, Fulton R, Magrini V, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, O'Laughlin M, Fan X, Grillo M, Witowski S, Heath S, Frater J.L., Eades W, Tomasson M, Westervelt P, DiPersio J.F., Link D.C., Mardis E.R., Ley T.J., Wilson R.K., Graubert T.A. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia // *N Engl J Med*. – 2012. – Vol.366. – P.1090-1098.
45. Wang K, Xu J, Zhang J, Huang J. Prognostic role of CD133 expression in colorectal cancer: a meta-analysis // *BMC Cancer*. – 2012. – Vol.12. – P.573.
46. Weiss L. Metastatic inefficiency: intravascular and intraperitoneal implantation of cancer cells // *Cancer Treat Res*. – 1996. – Vol.82. – P.1-11.
47. Wu X, Northcott P.A., Dubuc A, Dupuy A.J., Shib D.J., Witt H, Croul S, Bouffet E, Fults D.W., Eberhart C.G., Garzia L, Van Meter T, Zagzag D, Jabado N, Schwartzentruber J, Majewski J, Scheetz T.E., Pfister S.M., Korshunov A, Li X.N., Scherer S.W., Cho Y.J., Akagi K, MacDonald T.J., Koster J, McCabe M.G., Sarver A.L., Collins V.P., Weiss W.A., Largaespada D.A., Collier L.S., Taylor M.D. Clonal selection drives genetic divergence of metastatic medulloblastoma // *Nature*. – 2012. – Vol.482. – P.529-533.
48. Xu X, Hou Y, Yin X, Bao L, Tang A, Song L, Li F, Tsang S, Wu K, Wu H, He W, Zeng L, Xing M, Wu R, Jiang H, Liu X, Cao D, Guo G, Hu X, Gui Y, Li Z, Xie W, Sun X, Shi M, Cai Z, Wang B, Zhong M, Li J, Lu Z, Gu N, Zhang X, Goodman L, Bolund L, Wang J, Yang H, Kristiansen K, Dean M, Li Y. Single-cell exome sequencing reveals single-nucleotide mutation characteristics of a kidney tumor // *Cell*. – 2012. – Vol.148. – P.886-895.
49. Yap TA, Gerlinger M, Futreal P.A., Pusztai L, Swanton C. Intratumor heterogeneity: seeing the wood for the trees // *Sci Transl Med*. – 2012. – Vol.4. – P.127ps110.
50. Zavyalova M.V., Denisov E.V., Tashireva L.A., Gerashchenko T.S., Litviakov N.V., Skryabin N.A., Vtorushin S.V., Telegina N.S., Slonimskaya E.M., Cherdyntseva N.V., Perelmutter V.M. Phenotypic drift as a cause for intratumoral morphological heterogeneity of invasive ductal breast carcinoma not otherwise specified // *BioResearch Open Access*. – 2013. – DOI: 10.1089/biores.2012.0278.
51. Zavyalova M.V., Perelmutter V.M., Vtorushin S.V., Denisov E.V., Litviakov N.V., Slonimskaya E.M., Cherdyntseva N.V. The presence of alveolar structures in invasive ductal NOS breast carcinoma is associated with lymph node metastasis // *Diagn Cytopathol*. – 2011. – DOI: 10.1002/dc.21852.
52. Бабаян А.Ю., Андреева Ю.Ю., Залетаев Д.В., Немцова М.В. Клональное происхождение множественных очагов рака мочевого пузыря // *Архив патологии*. – 2012. – Т.74. – С.44-50.
53. Михайленко Д.С., Григорьева Е.С., Русаков И.Г., Курынин Р.В., Попов А.М., Петерс М.В., Матвеев В.В., Яковлева Е.С., Носов Д.А., Любченко Л.Н., Тюлядин С.А., Стрельников В.В., Залетаев Д.В. Локализация точковых мутаций в кодирующей части гена VHL при светлоклеточном раке почки // *Молекулярная биология*. – 2012. – Т.46. – С.71-81.
54. Перельмутер В.М., Манских В.Н. Прениша как отсутствующее звено концепции метастатических ниш, объясняющее избирательное метастазирование злокачественных опухолей и форму метастатической болезни // *Биохимия*. – 2012. – Т.77. – С.130-139.