

УДК 616-006.04

*А.А. Бриллиант¹, Ю.М. Бриллиант¹, С.В. Сазонов^{1,2},
С.А. Денисенко^{1,2}, С.М. Демидов^{1,2}, С.Л. Леонтьев¹*

**ALDH1A1 ПОЗИТИВНЫЕ КЛЕТКИ ОПУХОЛИ И ИХ ВЛИЯНИЕ
НА СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ NF-κB, PI3K PTEN, NOTCH, WNT, Hedgehog
В СЛУЧАЯХ ТРОЙНОГО НЕГАТИВНОГО И ГОРМОН РЕЦЕПТОР
НЕГАТИВНОГО HER2 ПОЗИТИВНОГО ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ
ПОДТИПОВ ИНВАЗИВНЫХ КАРЦИНОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

¹Институт медицинских клеточных технологий, г. Екатеринбург, Российская Федерация;

²Уральский государственный медицинский университет, г. Екатеринбург, Российская Федерация

*A.A. Brilliant¹, Y.M. Brilliant¹, S.V. Sazonov^{1,2},
S.A. Denisenko^{1,2}, S.M. Demidov^{1,2}, S.L. Leontiev¹*

**ALDH1A1 POSITIVE TUMOR CELLS AND THEIR EFFECT ON THE SIGNALING
PATHWAYS OF NF-κB, PI3K PTEN, NOTCH, WNT, Hedgehog IN CASES
OF TRIPLE NEGATIVE AND HORMONE RECEPTOR NEGATIVE HER2
POSITIVE IMMUNOHISTOCHEMICAL SUBTYPES OF BREAST CANCER**

¹Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg, Russian Federation;

²Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation

Резюме. *Целью исследования* стало изучить пул опухолевых стволовых клеток в разных иммуногистохимических подтипах инвазивной карциномы молочной железы. Проанализировать возможные изменения в экспрессии сигнальных путей NF-κB, PI3K PTEN, NOTCH, WNT, Hedgehog в клетках опухоли Тройного негативного и Гормон рецептор негативного HER2 позитивного подтипов. **Материалы и методы.** В работе использовался материал 110 случаев инвазивной карциномы молочной железы. Для определения стволовых клеток в опухолевой популяции исследовали наличие белка ALDH1A1 в клетках опухоли. Для распределения на иммуногистохимические подтипы, во всех случаях также были исследованы рецепторы стероидных гормонов ER, PR, HER-2/neu рецепторы, экспрессия белка Ki-67 а также экспрессия молекул сигнальных путей NF-κB, PI3K PTEN, NOTCH, WNT, Hedgehog. Для этого применялся иммуногистохимический метод. **Результаты.** Выявлено, что соотношение случаев разных иммуногистохимических подтипов отличается в группах с низким и высоким содержанием опухолевых стволовых клеток. При этом, в группе с высоким содержанием опухолевых стволовых клеток преобладают случаи Гормон-рецептор-негативного HER-2 позитивного и Тройного негативного подтипов (46 и 37% соответственно). Эти подтипы считаются наиболее неблагоприятными по прогнозу и ответу на химиотерапию. При этом, в 96% случаев Люминального А подтипа и в 100% случаев Люминального В подтипа опухолевые стволовые клетки выявлялись в незначительном количестве. Наибольшее число случаев, в которых выявлено более 10% опухолевых стволовых клеток в общем пуле опухолевых клеток, отно-

Abstract. *The aim of the research* was to study the pool of tumor stem cells in different immunohistochemical subtypes of infiltrative breast cancer. Analyze possible changes in the expression of the NF-κB, PI3K PTEN, NOTCH, WNT, Hedgehog signaling pathways in Triple Negative and Hormone receptor negative HER2 positive subtypes. **Materials and methods.** We used material from 110 cases of breast cancer. To determine the stem cells in the tumor population, the presence of ALDH1A1 protein in tumor cells was investigated. For distribution to immunohistochemical subtypes, the ER, PR, HER-2 / neu receptors, the expression of the Ki-67 protein and the expression of the NF-κB signaling molecules, PI3K PTEN, NOTCH, WNT, Hedgehog were also investigated in all cases. We used, an immunohistochemical method. **Results.** It was revealed that the ratio of cases of different immunohistochemical subtypes differs in the groups with low and high levels of tumor stem cells. At the same time, in the group with a high content of tumor stem cells, the cases of Hormone receptor-negative HER-2 positive and Triple negative subtypes prevail (46 and 37%, respectively). These subtypes are considered the most unfavorable for the prognosis and response to chemotherapy. At the same time, in 96% of cases of the Luminal A subtype and in 100% of the cases of the Luminal B subtype, tumor stem cells were detected in an insignificant number. The largest number of cases in which more than 10% of tumor stem cells were detected in the common pool of tumor cells were Hormone receptor negative HER-2 positive (20%), Hormone receptor positive HER-2 positive (12%) and Triple negative subtypes (17%), while in the last group all cases with a high level of expression of ALDH1A1 contained more than 50% of tumor stem cells in the

сились к Гормонрецептор негативному HER-2 позитивному (20%), Гормон-рецептор позитивному HER-2 позитивному (12%) и Тройной негативному подтипам (17%), при этом в последней группе все случаи с высоким уровнем экспрессии ALDH1A1 содержали более 50% опухолевых стволовых клеток в общем пуле опухолевых клеток. Выявлено перераспределение сигнальных путей в случаях Тройного негативного и Гормон рецептор негативного HER2 позитивного подтипов с высоким и низким содержанием клеток экспрессирующих ALDH1A1. **Заключение.** В результате проведенного исследования выявлено, что соотношение случаев разных иммуногистохимических подтипов отличается в группах с низким и высоким содержанием опухолевых стволовых клеток. При этом, в группе с высоким содержанием опухолевых стволовых клеток преобладают случаи Гормонрецепторнегативного HER-2 позитивного и Тройного негативного подтипов. В ходе исследования выявлены особенности распределения сигнальных путей NF-kB, PI3K PTEN, NOTCH, WNT, Hedgehog в Тройном негативном и Гормон рецептор негативном HER2 позитивном иммуногистохимических подтипах. Распределение сигнальных путей меняется в зависимости от наличия или отсутствия клеток с высокой экспрессией ALDH1A1.

Ключевые слова: рак молочной железы, опухолевые стволовые клетки, ALDH1A1, NF-kB, PI3K PTEN, NOTCH, WNT, Hedgehog

total pool of tumor cells. The redistribution of signaling pathways was detected in cases of Triple Negative and Hormone receptor negative HER2 positive subtypes with high and low content of cells expressing ALDH1A1. **Conclusion.** As a result of the study, it was found that the ratio of cases of different immunohistochemical subtypes differs in the groups with low and high levels of tumor stem cells. At the same time, in the group with a high content of tumor stem cells, the cases of Hormone receptor-negative HER-2 positive and Triple negative subtypes prevail. The study revealed the distribution of the signaling pathways NF-kB, PI3K PTEN, NOTCH, WNT, Hedgehog in the Triple Negative and Hormone receptor negative HER2 positive immunohistochemical subtypes. The distribution of signaling pathways varies depending on the presence or absence of cells with high ALDH1A1 expression.

Keywords: breast cancer, cancer stem cells, ALDH1A1, NF-kB, PI3K PTEN, NOTCH, WNT, Hedgehog

Конфликт интересов отсутствует.

There is no conflict of interest.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Сазонов Сергей Владимирович
prof-ssazonov@yandex.ru

Contact details of the corresponding author:
Sergey V. Sazonov
prof-ssazonov@yandex.ru

Дата поступления 08.04.2019

Received 08.04.2019

Образец цитирования:

Бриллиант А.А., Бриллиант Ю.М., Сазонов С.В., Денисенко С.А., Демидов С.М., Леонтьев С.Л. ALDH1A1 позитивные клетки опухоли и их влияние на сигнальные пути NF-KB, PI3K PTEN, NOTCH, WNT, Hedgehog в случаях тройного негативного и гормон рецептор негативного HER2 позитивного иммуногистохимических подтипов инвазивных карцином молочной железы. Вестник уральской медицинской академической науки. 2019, Том 16, № 1, с. 41–49, DOI: 10.22138/2500-0918-2019-16-1-41-49

For citation:

Brilliant A.A., Brilliant Y.M., Sazonov S.V., Denisenko S.A., Demidov S.M., Leontiev S.L. ALDH1A1 positive tumor cells and their effect on the signaling pathways of NF-Kb, PI3K PTEN, NOTCH, WNT, Hedgehog in cases of triple negative and hormone receptor negative HER2 positive immunohistochemical subtypes of breast cancer. Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science. 2019, Vol. 16, no. 1, pp. 41–49. DOI: 10.22138/2500-0918-2019-16-1-41-49 (In Russ)

На сегодняшний день метод химиотерапии карциномы молочной железы назначается в зависимости от молекулярного подтипа опухоли. Однако перспективным направлением считается терапия, мишенью которой является пул клеток, обладающих характеристиками стволовых. Такие клетки обладают неограниченной пролиферативной активностью и опухолевым потенциалом [1-7]. Остается неизученным вопрос влияния стволовых опухолевых клеток на процессы, происходящие в клетках опухолевой ткани. Этот вопрос важен, поскольку механизм действия большинства таргетных препаратов, применяемых для терапии карцином, сводится к блокированию сигнального каскада и остановке пролиферации опухолевых клеток.

В любом опухолевом процессе участвуют стволовые клетки [8]. Такие клетки фенотипически отличаются от клеток интактной ткани, но выделить их среди других опухолевых клеток достаточно сложно [9]. Для выявления опухолевых стволовых клеток необходимы маркеры, экспрессируемые только этими клетками. В процессе первых попыток выделения стволовых клеток среди опухолевого пула использовались клеточные маркеры CD44/CD24. Именно клетки с фенотипом CD44+/CD24 давали рост опухоли при переносе их в ткань иммуносупрессированной мыши [10]. Впоследствии выяснилось, что наибольшее число экспериментальных опухолей содержат стволовые клетки, экспрессирующие альдегиддегидрогеназу (ALDH). В связи с этим можно считать этот маркер наиболее удачным для выявления опухолевых стволовых клеток [11]. Увеличение экспрессии ALDH1A1 найдено в стволовой клеточной популяции множественной меланомы и острой миелоидной лейкемии [12, 13]. Подобные исследования проводились и для ткани молочной железы. Было доказано, что отдельные клетки, изолированные из ткани нормальной молочной железы и имеющие высокую активность ALDH1A1 обладают фенотипическими и функциональными характеристиками стволовых клеток, а ALDH1A1 позитивные клетки, изолированные из ткани карциномы молочной железы при культивировании дают популяцию опухолевых стволовых клеток [14].

Целью нашего исследования стало изучить пул опухолевых стволовых клеток в разных иммуногистохимических подтипах инвазивной карциномы молочной железы. Проанализировать возможные изменения в экспрессии сигнальных путей NF- κ B, PI3K PTEN, NOTCH, WNT, Hedgehog в клетках опухоли Тройного негативного и Гормон рецептор негативного HER2 позитивного подтипов.

Материал и методы

В качестве объекта исследования в работе использовался материал 110 случаев инвазивной карциномы молочной железы. Для определения стволовых клеток в опухолевой популяции исследовали наличие белка ALDH1A1 в клетках опухоли. Во всех случаях так-

же были исследованы рецепторы стероидных гормонов Estrogen receptor, Progesterone receptor, HER-2/neu рецепторы, а также экспрессия белка Ki-67. Для этого применялся иммуногистохимический метод.

Материал для исследования поставлялся из Свердловского областного онкологического диспансера (зав. патологоанатомическим отделением — Н.В. Казанцева, а также маммологического центра на базе ГКБ№40 (зав. центром — проф. С.М. Демидов), г. Екатеринбург.

Все иммуногистохимические исследования проводились в автостейнере “Ventana”, США. Для их проведения использовались положительно заряженные адгезивные стекла Superfrost Plus (Thermo scientific, Германия). Для определения экспрессии ALDH1A1 использовались антитела Rabbit Monoclonal Anti-Human ALDH1A1 (EP168) (Epitomics, США). Определение экспрессии HER-2/neu на клетках опухоли осуществлялось с помощью моноклональных антител Ventana anti-Her/2neu 4B5 Rabbit Monoclonal primary Antibody (Ventana, США), рецепторов эстрогена и прогестерона на ядрах клеток опухоли — с помощью моноклональных антител Confirm anti- Estrogen Receptor SP1 (Spring, США), Monoclonal Rb Anti-Progesterone Receptor SP2 (Spring, США) соответственно. Для определения ядерного индекса пролиферации опухоли использовались антитела Rb Anti-KI-67 SP6 (Spring, США).

Оценку экспрессии ALDH1A1 в каждом случае определяли по количеству окрашенных опухолевых клеток: 3+ (количество окрашенных клеток $\geq 50\%$), 2+ (количество окрашенных клеток меньше 50% но больше 10%), 1+ (количество окрашенных клеток $\leq 10\%$) [15,16].

Уровень экспрессии Estrogen receptor и Progesterone receptor определяли по шкале от 0 до 8 (Allred D.C. et al, 1998). Оценка уровней мембранной экспрессии HER-2/neu в опухолевых клетках производилась по шкале от 0 до 3+ (Bilous M. et al, 2003).

Наличие экспрессии молекул сигнальных путей NF- κ B, PI3K PTEN, NOTCH, WNT, Hedgehog производилось по шкале от 0 до 3+, где положительной считалась оценка (2+) и (3+).

Оценку реакции осуществляли на роботизированном микроскопе “Zeiss Imager M” (Германия).

Для статистической обработки полученных данных, а также построения соответствующих графиков и таблиц, использовали программные продукты «Statsoft Statistica 12», «MS Excel 2010». Достоверность различий сравниваемых показателей определяли по t-критерию Стьюдента, используемого для нормального распределения данных. Различия средних величин считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Исследованы 110 случаев инвазивной карциномы молочной железы. Анализ полученных результатов показал, что большинство карцином — 78 случа-

ев (70%) не экспрессируют ALDH1A1, следовательно, не содержат опухолевых стволовых клеток. Выявлено 19 случаев (17%) опухолей с уровнем ALDH1A1 на 1+, что свидетельствует о том, что такие карциномы содержат в своем пуле единичные стволовые клетки. Среди исследованных случаев только 6 (5%) оценены как 2+, т.е. менее половины опухолевых клеток изученной группы карцином относятся к стволовым. Выявлены 7 карцином (6%) случаев, в ткани которых содержится более чем 50% стволовых опухолевых клеток, такие случаи оценены как 3+ по уровню экспрессии ALDH1A1 (рис. 1).

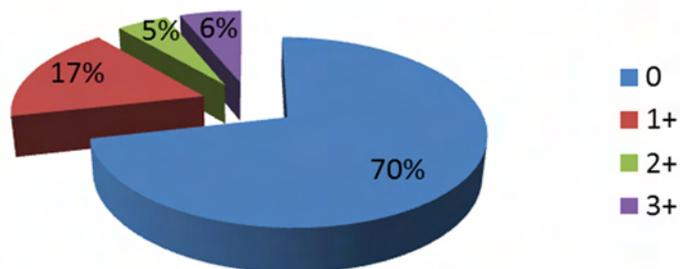


Рисунок 1. Распределение исследованных случаев инвазивной карциномы молочной железы в соответствии с экспрессией ALDH1A1 в клетках опухоли.
Figure 1. Distribution of cases carcinoma of the breast in accordance with the expression of ALDH1A1 in tumor cells.

Все случаи, исследованные на уровень экспрессии ALDH1A1, были разделены на две группы — с незначительным содержанием опухолевых стволовых клеток, в которую вошли случаи с экспрессией ALDH1A1, оцененные как 0 и 1+ (97 случаев), и с высоким содержанием опухолевых стволовых клеток, в которую вошли случаи с экспрессией ALDH1A1, оцененные как 2+ и 3+ (13 случаев).

В связи с гетерогенностью случаев рака молочной железы согласно иммуногистохимической классификации, предложенной в St. Gallen в 2015 году [9], все исследуемые случаи были разделены на иммуногистохимические подтипы: Люминальный А, Люминальный В, относящиеся к Гормонрецептор позитивному HER-2 негативному (ГРП HER-) подтипу, Гормонрецептор позитивный HER-2 позитивный (ГРП HER+), Гормонрецептор негативный HER-2 позитивный (ГРН HER+) и Тройной негативный подтипы. Распределение исследуемых случаев по иммуногистохимическим подтипам представлено на рисунке 2.

В большинстве случаев Люминального А подтипа (75%) не обнаружена экспрессия ALDH1A1. В 21% случаев в ткани карциномы изучаемого подтипа единичные клетки экспрессировали ALDH1A1 (случаи, оцененные как 1+). В 4% случаев более 50% опухолевых клеток данного подтипа экспрессировали ALDH1A1 (оценка 3+). Не выявлено ни одного случая с уровнем экспрессии ALDH1A1 2+ (табл. 1).

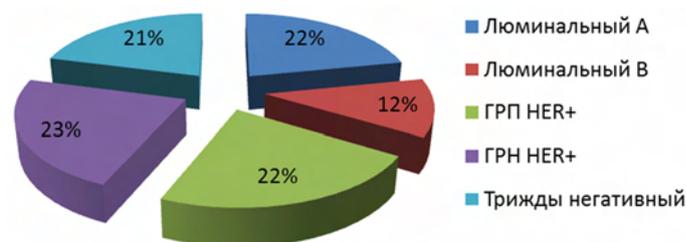


Рисунок 2. Распределение случаев инвазивной карциномы молочной железы по иммуногистохимическим подтипам.

Figure 2. Distribution of cases of breast cancer by immunohistochemical subtypes.

Таблица 1

Особенности распределения случаев Люминального А подтипа инвазивной карциномы молочной железы по уровню экспрессии ALDH1A1

Table 1

Features of the distribution of cases of Luminal A subtype of breast cancer according to the expression level of ALDH1A1

Общее количество случаев	Распределение случаев по уровню экспрессии ALDH1A1			
	0	1+ (количество окрашенных клеток ≤10%)	2+ (количество окрашенных клеток >10% и <50%)	3+ (количество окрашенных клеток ≥50%)
24	18 (75%)	5 (21%)	0 (0%)	1 (4%)

При исследовании Люминального В подтипа большинство (77%) карцином не имели в своем пуле клеток с экспрессией ALDH1A1. Единичные клетки экспрессировали ALDH1A1 почти в четверти (23%) случаев и были оценены как 1+ по экспрессии ALDH1A1. Не обнаружено случаев с уровнем экспрессии ALDH1A1 на 2+ и 3+ (табл. 2).

Таблица 2

Особенности распределения случаев Люминального В подтипа инвазивной карциномы молочной железы по уровню экспрессии ALDH1A1

Table 2

Features of the distribution of cases of Luminal B subtype of breast cancer according to the expression level of ALDH1A1

Общее количество случаев	Распределение случаев по уровню экспрессии ALDH1A1			
	0	1+ (количество окрашенных клеток ≤10%)	2+ (количество окрашенных клеток >10% и <50%)	3+ (количество окрашенных клеток ≥50%)
13	10 (77%)	3 (23%)	0 (0%)	0 (0%)

При анализе данных, полученных в результате изучения экспрессии ALDH1A1 Гормонрецептор позитивного HER-2 позитивного подтипа, большинство случаев (72%) не имели в своем пуле опухолевых клеток, экспрессирующих ALDH1A1. 16% случаев оценены как 1+ по уровню экспрессии ALDH1A1, 12% — как 2+ по уровню экспрессии ALDH1A1. В данной группе исследования не обнаружены случаи с оценкой 3+ (табл. 3).

Таблица 3

Особенности распределения случаев Гормонрецептор позитивного HER-2 позитивного подтипа инвазивной карциномы молочной железы по уровню экспрессии ALDH1A1

Table 3

Features of the distribution of cases of hormone receptor positive HER-2 positive subtype of breast cancer according to the expression level of ALDH1A1

Общее количество случаев	Распределение случаев по уровню экспрессии ALDH1A1			
	0	1+ (количество окрашенных клеток ≤10%)	2+ (количество окрашенных клеток >10% и <50%)	3+ (количество окрашенных клеток ≥50%)
25	18 (72%)	4 (16%)	3 (12%)	0 (0%)

При изучении Гормонрецептор негативного HER-2 позитивного подтипа в 14 случаях не выявлена экспрессия ALDH1A1. В 6 (24%) случаях экспрессия ALDH1A1 была оценена как 1+, в 3 (12%) случаях — как 2+, в 2 (8%) случаях — как 3+ (табл. 4).

Таблица 4

Особенности распределения случаев Гормонрецептор негативного HER-2 позитивного подтипа инвазивной карциномы молочной железы по уровню экспрессии ALDH1A1

Table 4

Features of the distribution of cases of hormone receptor negative HER-2 positive subtype of breast cancer according to the expression level of ALDH1A1

Общее количество случаев	Распределение случаев по уровню экспрессии ALDH1A1			
	0	1+ (количество окрашенных клеток ≤10%)	2+ (количество окрашенных клеток >10% и <50%)	3+ (количество окрашенных клеток ≥50%)
25	14 (56%)	6 (24%)	3 (12%)	2 (8%)

При исследовании Тройного негативного подтипа инвазивной карциномы молочной железы, 18 (79%) случаев опухоли не содержат в своём пуле ALDH1A1 позитивных клеток. В данном подтипе отсутствуют случаи, оцененные как 2+ по экспрессии ALDH1A1.

Случаи опухоли с оценкой 1+ по экспрессии ALDH1A1 составляют 4%, (3+) — 17% (табл. 5).

Таблица 5

Особенности распределения случаев Тройного негативного подтипа инвазивной карциномы молочной железы по уровню экспрессии ALDH1A1

Table 5

Features of the distribution of triple negative subtype of breast cancer according to the expression level of ALDH1A1

Общее количество случаев	Распределение случаев по уровню экспрессии ALDH1A1			
	0	1+ (количество окрашенных клеток ≤10%)	2+ (количество окрашенных клеток >10% и <50%)	3+ (количество окрашенных клеток ≥50%)
23	18 (79%)	1 (4%)	0 (0%)	4 (17%)

Таблица 6

Экспрессия ALDH1A1 в разных иммуногистохимических подтипах инвазивной карциномы молочной железы

Table 6

Expression of ALDH1A1 in different immunohistochemical subtypes of breast cancer

	0	1+	2+	3+
Люминальный А	75%	21%	0	4%
Люминальный В	77%	23%	0	0
ГРП (HER+)	72%	16%	12%	0
ГРН (HER+)	56%	24%	12%	8%
Тройной негативный	79%	4%	0%	17%

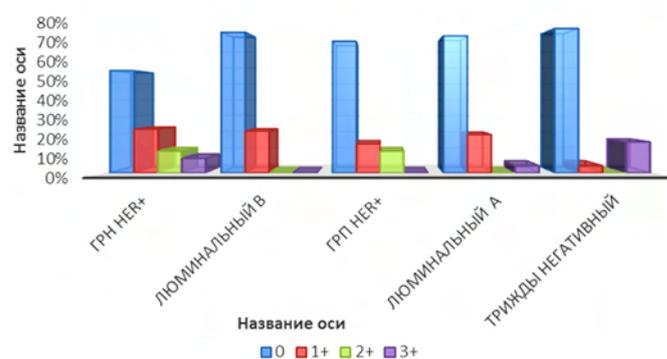


Рисунок 3. Распределение случаев разных иммуногистохимических подтипов инвазивной карциномы молочной железы по уровню экспрессии ALDH1A1
Figure 3. Distribution of cases of different immunohistochemical subtypes of breast cancer according to the expression level of ALDH1A1

При сравнении полученных данных (табл. 6, рис. 3) видно, что наибольший процент карцином с высоким содержанием в своём пуле опухолевых стволовых клеток, оцениваемый по высокому уровню экспрес-

сии ALDH1A1 (на 3+) относится к группе опухолей Тройного негативного подтипа. Наименьший уровень экспрессии отмечался в группе Гормонрецептор-позитивных опухолей с наличием экспрессии стероидных рецепторов (0-4%). Таким образом, большинство опухолей, в которых более 50% опухолевых клеток экспрессируют ALDH1A1 и являются опухолевыми стволовыми клетками, относятся к Тройному негативному подтипу, отличающимся наиболее агрессивным течением, сложными схемами терапии и неблагоприятным исходом.

Проанализировав случаи инвазивной карциномы молочной железы с количеством опухолевых стволовых клеток 10-50% от общего пула опухолевых клеток (уровень экспрессии ALDH1A1 на 2+), обнаружено, что большинство таких случаев относятся к Гормонрецептор позитивному HER-2 позитивному и Гормонрецептор негативному HER-2 позитивному подтипам, в то же время другие исследованные подтипы не содержат случаев, оцененных как 2+ по экспрессии ALDH1A1. Такая особенность может быть связана с тем, что случаи указанных подтипов отличаются от других наличием экспрессии рецепторов HER-2/neu на мембране опухолевых клеток.

Кроме того, выявлено, что в группе случаев оцененных как 1+ по экспрессии ALDH1A1, т.е. с наличием единичных стволовых опухолевых клеток в опухолевом пуле, опухоли Тройного негативного подтипа встречались в 4-5 раз реже, чем опухоли других иммуногистохимических подтипов (4% от всех случаев группы опухолей Тройной негативного подтипа). При этом число случаев (в %) Люминального А, Люминального В и Гормон-рецептор-негативного HER-2 позитивного подтипов достоверно не отличалось (21-24% от всех случаев исследуемых групп).

При анализе данных, полученных в результате сравнения групп с отсутствием экспрессии ALDH1A1 (уровень экспрессии 0), выявлено, что наименьшее количество случаев (56%) относилось к Гормонрецептор-негативному HER-2 позитивному подтипу. Таким образом, практически в половине всех карцином молочной железы со сверхэкспрессией HER-2/neu и отсутствием экспрессии рецепторов стероидных гормонов (44%) присутствуют опухолевые стволовые клетки.

Для анализа экспрессии сигнальных путей NF-kB, PI3K PTEN, NOTCH, WNT, Hedgehog были отобраны два иммуногистохимических подтипа, в которых количество ALDH1A1 позитивных клеток максимально — Гормонрецепторнегативный HER-2 позитивный и Тройной негативный подтип.

Обнаружено, что сигнальные пути NF-kB, PI3K характерны для всех случаев с высоким содержанием опухолевых стволовых клеток. Сигнальный путь PTEN более характерен для тройного негативного подтипа (обнаружен в 33% случаев), в ГРН her2+ подтипе встречается лишь в 9% случаев. Каскады NOTCH, WNT характерны более для Гормон рецептор негатив-

ного HER-2 гиперэкспрессированного (36% случаев), тогда как в тройном негативном подтипе эти сигнальные пути выявлены лишь в 11% случаев. Сигнальный путь Hedgehog при исследовании случаев с высоким содержанием клеток, экспрессирующих ALDH1A1 не обнаружен (табл. 7).

Таблица 7
Случаи с высоким содержанием ALDH1A1 позитивных клеток

Table 7
Cases with a high content of ALDH1A1 positive cells

	NNF-kB B	PI3K 3K	PTPTEN N	NOTNOTCH H	WNT	Hedgehog
Тройной негативный	100%	100%	33%	11%	11%	0%
ГРН HER2+	100%	100%	9%	36%	36%	0%

При оценке экспрессии сигнальных путей в случаях с низким содержанием ALDH1A1 позитивных клеток были выявлены некоторые отличия от группы с высокой экспрессией ALDH1A1. Стоит отметить, что в группе с низким содержанием позитивных ALDH1A1 клеток, сигнальный путь NOTCH менее выражен в случаях Гормонрецепторнегативного HER-2 позитивного подтипа (30% и случаев), тогда как количество случаев Тройного негативного подтипа с данным каскадом возросло до 25%. PTEN, как и в группе с высоким содержанием ALDH1A1 позитивных клеток, преобладает в Тройном негативном подтипе, однако разница в экспрессии данного каскада между двумя исследуемыми иммуногистохимическими подтипами уменьшилась (20 и 11% случаев соответственно). Дальнейшее исследование показало важное отличие, между группами с высоким и низким содержанием ALDH1A1 позитивных клеток, а именно наличие экспрессии сигнального пути Hedgehog. В группе с низким содержанием ALDH1A1 позитивных клеток этот сигнальный путь выявлен (более характерен для Тройного негативного подтипа, 14% случаев против 7% в ГРН HER2+ подтипа) (табл. 8).

Таблица 8
Случаи с низким содержанием ALDH1A1 позитивных клеток

Table 8
Cases with a low content of ALDH1A1 positive cells

	NNF-kB B	PI3K 3K	PTEN N	NOTNOTCH H	WNT	Hedgehog
Тройной негативный	100%	98%	20%	25%	33%	14%
ГРН HER2+	100%	100%	11%	30%	27%	7%

Заключение

В результате проведенного исследования выявлено, что соотношение случаев разных иммуногистохимических подтипов отличается в группах с низким и высоким содержанием опухолевых стволовых клеток. При этом, в группе с высоким содержанием опухолевых стволовых клеток преобладают случаи Гормон-

рецепторнегативного HER-2 позитивного и Тройного негативного подтипов (46 и 37% соответственно) [17, 18]. Эти подтипы считаются наиболее неблагоприятными по прогнозу и ответу на химиотерапию [19]. Выявлено, что в Люминальном А и Люминальном В подтипах в пуле опухолевых клеток практически не содержится опухолевых стволовых клеток. Только 4% случаев Люминального А подтипа содержали более 50% опухолевых стволовых клеток. В 96% случаев Люминального А подтипа и в 100% случаев Люминального В подтипа опухолевые стволовые клетки не выявлялись или выявлялись в незначительном количестве ($\leq 10\%$ от общего пула опухолевых клеток). Наибольшее число случаев, в которых выявлено более 10% опухолевых стволовых клеток в общем пуле опухолевых клеток (случаи с высоким уровнем экспрессии ALDH1A1 на 2+ и 3+), относились к Гормонрецептор негативному HER-2 позитивному (20%), Гормонрецептор позитивному HER-2 позитивному (12%) подтипам, т.е. к случаям с экспрессией рецептора HER-2/neu, а также к случаям Тройного негативного подтипа (17%), при этом в последней группе все случаи с высоким уровнем экспрессии ALDH1A1 содержали более 50% опухолевых стволовых клеток в общем пуле опухолевых клеток.

В ходе исследования выявлены особенности распределения сигнальных путей NF- κ B, PI3K PTEN, NOTCH, WNT, Hedgehog в Тройном негативном и Гормон рецептор негативном HER2 позитивном иммуногистохимических подтипах.

Группа случаев с высоким содержанием клеток, экспрессирующих ALDH1A1, отличается от группы с низким содержанием клеток, экспрессирующих ALDH1A1, отсутствием экспрессии сигнального пути Hedgehog, более выраженными различиями в распределении сигнальных путей PTEN и NOTCH в исследованных подтипах. Сигнальный путь WNT более характерен для группы с высоким содержанием клеток, экспрессирующих ALDH1A1, Гормонрецептор негативного HER2 позитивного иммуногистохимического подтипа. В группе с низким содержанием клеток, экспрессирующих ALDH1A1, обнаружено перераспределение WNT каскада. Большее количество случаев относится к Тройному негативному иммуногистохимическому подтипу.

Работа выполнена в рамках государственного задания УГМУ № 056-00151-18-00

ЛИТЕРАТУРА:

1. Reya T., Morrison S.J., Carke M.F., et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-11.
2. Brilliant A.A., Brilliant Yu.M., Sazonov S.V. Characteristics of the relation between epithelial-mesenchymal transition and proliferative activity in breast carcinomas. *European Journal of Cancer*. 2013. T. 49. № S2. С. 216.
3. Мнихович М.В., Мидибер К.Ю., Галлямова А.Р. и др. Иммуногистохимическая оценка экспрессии кадгерин-катенинового комплекса при раке молочной железы. *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2017, 6 (1), 63-68.
4. Бриллиант Ю.М., Бриллиант А.А., Сазонов С.В. Эпителиальные кадгерин и ассоциированные с ним молекулы при инвазивном дольковом раке молочной железы. *Архив патологии*. 2017, 1 (79), 12-18.
5. Сазонов С.В., Бриллиант А.А., Бриллиант Ю.М. Связь состояния пролиферативных процессов и особенностей рецепторного аппарата опухолевых клеток карциномы молочной железы. *Гены и клетки*. 2017, 12 (4), 76-81.
6. Засадкевич Ю.М., Сазонов С.В. Роль молекулы клеточной адгезии E-кадгерина в онтогенезе человека в норме и патологии. *Морфология*. 2014, 5 (146), 78-82.
7. Засадкевич Ю.М., Бриллиант А.А., Сазонов С.В. Роль кадгерин в норме и при развитии рака молочной железы. *Архив патологии*. 2015, 3 (77), 57-64.

REFERENCES:

1. Reya T., Morrison S.J., Carke M.F., et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-11.
2. Brilliant A.A., Brilliant Yu.M., Sazonov S.V. Characteristics of the relation between epithelial-mesenchymal transition and proliferative activity in breast carcinomas. *European Journal of Cancer*. 2013. V. 49. No. S2. p. 216.
3. Mnichovich, M.V., Midiber, K.Yu., Gallyamova, A.R. and others. Immunohistochemical evaluation of expression of cadherin-catenin complex in breast cancer. *Journal of Anatomy and Histopathology*. 2017, No. 6 (1), pp. 63-68. (In Russ.)
4. Brilliant Yu.M., Brilliant A.A., Sazonov S.V. Epithelial cadherins and associated molecules in invasive lobular breast cancer. *Archive of pathology*. 2017, No. 1 (79), pp. 12-18. (In Russ.)
5. Sazonov S.V., Brilliant A.A., Brilliant Yu.M. Relationship of proliferative processes and features of the receptor apparatus of breast carcinoma tumor cells. *Genes and cells*. 2017, 12 (4), 76-81. (In Russ.)
6. Zasadkevich Yu.M., Sazonov S.V. The role of the cell adhesion molecule of E-cadherin in human ontogenesis is normal and pathological. *Morphology*. 2014, 5 (146), 78-82. (In Russ.)
7. Zasadkevich Yu.M., Brilliant A.A., Sazonov S.V. The role of cadherin in normal and in the development of breast cancer. *Archive of pathology*. 2015, No. 3 (77), pp. 57-64. (In Russ.)

8. Collins A.T., Berry P.A., Hyde C., et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *NJCancer Res.* 2005; 65(23):10946-51.
9. Jinesh G., Willis D.L., Kamat A.M. Bladder Cancer Stem Cells: Biological and Therapeutic Perspectives. *Current Stem Cell Research & Therapy* 2014; 9(2):1-13.
10. Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A., et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 3983-8.
11. Ginestier C., Hur M.H., Charafe-Jauffret E., et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 555-67.
12. Pearce D.J., Taussig D., Simpson C., et al. Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples. *Stem Cells* 2005; 23(6):752-60.
13. Гребнев Д.Ю., Маклакова И.Ю., Ястребов А.П. Перспектива использования стволовых клеток для активации кроветворения в условиях возрастной инволюции на фоне воздействия ионизирующего излучения. *Успехи геронтологии.* 2014. Т. 27. № 2. С. 348-352.
14. Ginestier C., Hur M.H., Charafe-Jauffret E., et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell.* 2007; 1(5): 555-567.
15. Morimoto K., Kim S.J., Tanei T., et al. Stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1-positive breast cancers are characterized by negative estrogen receptor, positive human epidermal growth factor receptor type 2, and high Ki67 expression. *Cancer Sci.* 2009; 100(6):1062-8.
16. Сазонов С.В., Леонтьев С.Л., Бриллиант А.А. Опыт работы референс-лаборатории по HER2/neu тестированию карциномы молочной железы в Свердловской области. *Вестник Уральской медицинской академической науки.* 2013. № 1 (43). С. 56-60.
17. Бриллиант А.А., Бриллиант Ю.М., Сазонов С.В., Особенности величины пула ALDH1+ опухолевых стволовых клеток в иммуногистохимических подтипах инвазивного рака молочной железы. *Вестник Уральской медицинской академической науки.* 2018. Т. 15. №3. С. 413-420.
18. Sazonov S., Brilliant A., Brilliant Y. Proliferation of cancer stem cells in triple negative breast cancer. *The Breast Journal*, 2017, Vol. 32, Supp. 1: 29-30.
19. Семиглазов В.Ф., Палтуев Р.М., Манихас А.Г. и др. Клинические рекомендации РООМ по диагностике и лечению рака молочной железы, Санкт-Петербург, 2015.
8. Collins A.T., Berry P.A., Hyde C., et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *NJCancer Res.* 2005; 65(23):10946-51.
9. Jinesh G., Willis D.L., Kamat A.M. Bladder Cancer Stem Cells: Biological and Therapeutic Perspectives. *Current Stem Cell Research & Therapy* 2014; 9(2):1-13.
10. Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A., et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 3983-8.
11. Ginestier C., Hur M.H., Charafe-Jauffret E., et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 555-67.
12. Pearce D.J., Taussig D., Simpson C., et al. Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples. *Stem Cells* 2005; 23(6):752-60.
13. Grebnev D.Yu., Maklakova I.Yu., Yastrebov A.P. The prospect of using stem cells to activate blood formation in conditions of age involution against the background of exposure to ionizing radiation. *Successes of gerontology.* 2014. Vol. 27. No. 2. P. 348-352. (In Russ.)
14. Ginestier C., Hur M.H., Charafe-Jauffret E., et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell.* 2007; 1(5): 555-567.
15. Morimoto K., Kim S.J., Tanei T., et al. Stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1-positive breast cancers are characterized by negative estrogen receptor, positive human epidermal growth factor receptor type 2, and high Ki67 expression. *Cancer Sci.* 2009; 100(6):1062-8.
16. Sazonov S.V., Leontyev S.L., Brilliant A.A. Experience of the reference laboratory for HER2 / neu testing of breast carcinoma in the Sverdlovsk region. *Bulletin of the Ural Medical Academic Science.* 2013. No. 1 (43). pp. 56-60. (In Russ.)
17. Brilliant A.A., Brilliant Yu.M., Sazonov S.V. Features of the ALDH1 + pool of tumor stem cells in immunohistochemical subtypes of invasive breast cancer. *Bulletin of the Ural Medical Academic Science.* 2018. T. 15. No. 3. Pp. 413-420. (In Russ.)
18. Sazonov S., Brilliant A., Brilliant Y. Proliferation of cancer stem cells in triple negative breast cancer. *The Breast Journal*, 2017, Vol. 32, Supp. 1: 29-30.
19. Semiglazov V.F., Paltuev R.M., Semiglazov V.V., Dashyan G.A., Semiglazova T.Y., Krivorotko P.V., Nikolaev K.S. General St. Gallen-2015 guidelines for the treatment of early breast cancer (adapted by the experts of the Russian Society of Breast Oncologists). *Women Reproductive System Tumors.* 2015;11(3):43-60. (In Russ.)

Авторы

Бриллиант Александр Александрович
Институт медицинских клеточных технологий
Кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник
Российская Федерация, 620000, г. Екатеринбург, ул. Вилонова, 76а
alex_brilliant@mail.ru

Бриллиант Юлия Михайловна

Институт медицинских клеточных технологий
Кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник
Российская Федерация, 620000, г. Екатеринбург, ул. Вилонова, 76а
yulkat@bk.ru

Сазонов Сергей Владимирович

Уральский государственный медицинский университет
Доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой
Российская Федерация, 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, 3
prof-ssazonov@yandex.ru

Денисенко Светлана Александровна

Уральский государственный медицинский университет
Кандидат биологических наук, ассистент кафедры
Российская Федерация, 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, 3
kiparis1983@mail.ru

Демидов Сергей Михайлович

Уральский государственный медицинский университет
Доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой онкологии
Российская Федерация, 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, 3
professordemidov@yandex.ru

Леонтьев Сергей Леопольдович

Институт медицинских клеточных технологий,
Доктор медицинских наук, профессор, директор Института медицинских клеточных технологий
Российская Федерация, 620000, г. Екатеринбург, ул. Вилонова, 76а
ls.04@yandex.ru

Authors

Aleksandr A. Brilliant
Institute of Medical Cell Technologies,
Cand.Sci. (Bio.), Senior Researcher
Russian Federation, 620000, Vilonova str., 76a,
Yekaterinburg
alex_brilliant@mail.ru

Yulia M. Brilliant

Institute of Medical Cell Technologies,
Cand.Sci. (Med.), Researcher
Russian Federation, 620000, Vilonova str., 76a,
Yekaterinburg
yulkat@bk.ru

Sazonov Sergey V.

Ural State Medical University
Dr. Sci. (Med.), Professor, the Head of the Department of histology, cytology and embryology of Ural State Medical University, Head of the laboratory of pathomorphology of Institute of Medical Cell Technologies
Russian Federation, 620000, Vilonova str., 76a,
Yekaterinburg
prof-ssazonov@yandex.ru

Svetlana A. Denisenko

Ural State Medical University
Cand. Sci. (Bio), Researcher
Russian Federation, 620028 Repina str.,3, Yekaterinburg
kiparis1983@mail.ru

Sergey M. Demidov

Government Budget Educational Organization «Ural State Medical University» of Ministry of Healthcare of Russian Federation
Dr. Sci. (Med.), Professor, the Head of the department of oncology
Russian Federation, 620028 Repina str.,3, Yekaterinburg
professordemidov@yandex.ru

Sergey L. Leontiev

Institute of Medical Cell Technologies,
Healthcare of Russian Federation
Dr. Sci. (Med.), Professor, the Head of Institute of Medical Cell Technologies ls.04@yandex.ru