DOI: 10.21870/0131-3878-2016-25-4-31-47

Рак молочной железы и опухолевые стволовые клетки. Обзор

Смирнова И.А., Енилеева А.А., Матчук О.Н., Замулаева И.А.

МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, Обнинск

В последние годы продемонстрировано существование опухолевых стволовых клеток (ОСК) в злокачественных новообразованиях различной локализации и стабильных линиях опухолевых клеток человека и животных. Рак молочной железы был первой солидной опухолью, в которой установлено наличие ОСК. Точная идентификация ОСК молочной железы является сложной и до конца не решённой проблемой, что связано со значительной гетерогенностью и пластичностью этой фракции клеток. К настоящему времени накоплен значительный массив экспериментальных данных о биологической природе ОСК молочной железы. Эта фракция клеток характеризуется более высокой резистентностью к действию редкоизионизирующего излучения и ряда химиопрепаратов по сравнению с остальными клетками опухоли. В данном обзоре проанализирована возможность применения полученных знаний о резистентности ОСК к противоопухолевым воздействиям, молекулярно-клеточных особенностях ОСК и их прогностическом значении в клинической практике для улучшения результатов лечения больных со злокачественными новообразованиями молочной железы. Клинические данные о связи ОСК молочной железы с формированием резистентности к противоопухолевым воздействиям, включая лучевую терапию, пока немногочисленны, но свидетельствуют о перспективности дальнейшей работы в этом направлении.

Ключевые слова: *рак молочной железы, внутриопухолевая гетерогенность, опухолевые стволовые клетки, CD44, CD24, противоопухолевая терапия, прогноз, радиорезистентность, ионизирующее излучение, химиорезистентность.*

Введение

Экспериментальные и клинические исследования, проводимые в последние годы, подтверждают, что злокачественные новообразования, включая рак молочной железы (РМЖ), содержат опухолевые клетки с различными биологическими свойствами. Было показано, что туморогенной активностью обладает лишь небольшая по численности группа клеток, которые называют опухолевыми стволовыми клетками (ОСК) [1]. Обычно ОСК составляют менее 1-5% от всех опухолевых клеток. ОСК обладают способностью инициировать развитие опухолей у иммунодефицитных мышей и воспроизводить гетерогенность исходной опухоли из-за их способности к самоподдержанию и дифференцировке в отличие от остальных (не стволовых) клеток. ОСК демонстрируют некоторые особенности, которые могут иметь большое значение для возникновения и развития опухолевого процесса [2]. Они обладают высокой способностью к клональной эволюции, инвазии, стимулируют формирование кровеносных сосудов, что способствует прогрессии опухоли и метастазированию [3]. В настоящее время появляется всё больше данных о гетерогенности самой субпопуляции ОСК [4-6], позволяющих предположить, что генетически и эпигенетически различные ОСК являются предшественниками субклонов, которые образуют опухолевую массу. Эти данные с новых позиций объясняют гетерогенность опухоли и неэффективность системной терапии.

В последние годы отмечается неуклонное увеличение числа публикаций (в основном, зарубежных) по различным проблемам, связанным с ОСК, включая их молекулярно-клеточные

Смирнова И.А. – вед. научн. сотр., д.м.н.; Енилеева А.А. – научн. сотр.; Матчук О.Н. – научн. сотр.; Замулаева И.А.* – зав. отделом, д.б.н., проф. МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России.

*Контакты: 249036, Калужская обл., Обнинск, ул. Королева, 4. Тел.: +7 (484) 399-71-88; e-mail: zamulaeva@mail.ru.

особенности, чувствительность к противоопухолевым воздействиям, механизмы радио- и химиорезистентности, прогностическое значение, методы направленной элиминации этих клеток. Учитывая это обстоятельство, целью данного обзора является систематизация результатов экспериментальных и клинических исследований ОСК, а также оценка возможности применения полученных знаний в повседневной клинической практике для улучшения отдалённых результатов лечения больных РМЖ.

Основная часть

Нормальные и опухолевые стволовые клетки

Предположение о том, что опухоли могут происходить из клеток со свойствами стволовых, было сделано более 100 лет тому назад. Однако экспериментальное подтверждение этого предположения появилось относительно недавно [1], и в последнее время гипотеза ОСК получает всё новые доказательства благодаря достижениям в области молекулярной и клеточной биологии. В соответствии с гипотезой ОСК в её первоначальном виде, опухоли возникают из стволовых клеток нормальных тканей или их ближайших потомков, которые приобретают способность к безграничному самообновлению. Важную роль в функционировании как нормальных, так и опухолевых стволовых клеток, включая пролиферацию и дифференцировку, играет микросреда (ниша или строма стволовой клетки), в которой находится клетка. Основная роль ниши – поддержание стволовых клеток в состоянии функционального покоя и, при необходимости, активация последних посредством регуляторных сигнальных молекул [7]. Как и нормальные стволовые клетки, ОСК имеют свою нишу, которая выполняет ту же функцию, что и микроокружение нормальной стволовой клетки. В последние годы появились сведения, что частично и терминально дифференцированные клетки опухоли под влиянием различных факторов (в том числе под воздействием средств специального лечения) могут стать источником вторичных ОСК, которые значительно отличаются от материнских ОСК.

После активации стволовых клеток (как нормальных, так и опухолевых) происходит асимметричное деление. Когда ОСК подвергаются асимметричному делению, появляются две дочерние клетки, одна из которых является точной копией оригинальной ОСК и способна инициировать развитие опухоли, а другая обладает ограниченным потенциалом к самообновлению, но высокой скоростью пролиферации. Таким образом, опухоли содержат клетки, которые сохраняют ключевые свойства стволовых клеток, и большое количество быстро делящихся клеток, формирующих основную массу опухоли. Необходимо учитывать, что ОСК, как и нормальные стволовые клетки, большую часть своего существования находятся в состоянии пролиферативного покоя, что обуславливает их резистентность к лучевому воздействию и цитостатикам (наряду с другими причинами, рассмотренными ниже). Так как цитостатики и лучевая терапия в большинстве случаев действуют на пролиферирующие клетки, то вполне закономерно, что ОСК устойчивы к этим видам лечения. Оставшиеся после консервативной терапии ОСК могут служить причиной возникновения рецидивов и метастазов, снижая, тем самым, основные показатели эффективности лечения онкологических заболеваний – общую и безрецидивную выживаемость больных. Молекулярно-клеточные основы лекарственной и радиационной резистентности ОСК представляют значительный интерес и в последние годы являются предметом интенсивных экспериментальных исследований.

Маркеры ОСК РМЖ (ОСК-М)

Впервые стволовые клетки РМЖ были проспективно выделены в 2003 г. Al-Hajj M. et al. [1], которые обнаружили в 8 из 9 случаев РМЖ человека небольшую субпопуляцию клеток, обладающих значительно более высокой туморогенностью (способностью давать начало новой опухоли при ксенотрансплантации в организм иммунодефицитных мышей) по сравнению с основной массой опухолевых клеток. На поверхности этих клеток выявлена высокая экспрессия эпителиального специфического антигена (ESA⁺), маркера CD44 (CD44⁺) и отсутствие или низкая экспрессия CD24 (CD24^{-low}). В дальнейшем многочисленные работы подтвердили высокую туморогенную активность CD44⁺CD24^{-low} клеток, выделяемых из различного биологического материала (первичных культур и стабильных клеточных линий РМЖ *in vitro*, биопсийного, операционного материала, первичных и серийных ксенотрансплантатов опухолевой ткани молочной железы). Кроме того, выяснилось, что клетки с таким иммунофенотипом характеризуются особым профилем генной экспрессии, который во многом сходен с таковым стволовых клеток нормальных тканей. В настоящее время иммунофенотипирование по CD44/CD24 широко используется в экспериментальных и клинических исследованиях ОСК-М. Однако следует отметить, этим не исчерпывается разнообразие поверхностных маркеров кластеров дифференцировки, антитела к которым могут применяться для выявления ОСК-М [8]. Среди этих маркеров надо упомянуть CD49f ($\alpha 6$ интегрин), CD29 ($\beta 1$ интегрин), CD133 (проминин-1), CD55, CD61 и пр., использующиеся в комбинации друг с другом или с CD44, CD24.

Применяются и другие методы идентификации ОСК-М, в том числе, функциональные тесты на способность к исключению из клеток липофильных флуоресцентных красителей (например, Хёхст 33342) вследствие высокой экспрессии АТФ-связывающих транспортёров на клеточной мембране ОСК (так называемый метод «side population», SP), способность формировать сфероиды при культивировании *in vitro* в среде без сыворотки, но в присутствии специальных факторов, способность долго удерживать особые химические метки вследствие низкой пролиферативной активности, а также тест на активность альдегиддегидрогеназы-1 (ALDH1). Стволовые клетки РМЖ, как и злокачественных опухолей многих других локализаций (лёгкое, прямая кишка, голова-шея, предстательная железа), имеют высокую активность ALDH1 – фермента детоксикации, который регулирует окисление внутриклеточных альдегидов и играет важную роль в дифференцировке стволовых клеток.

Согласно многочисленным исследованиям, клетки, выделенные по вышеописанным критериям, обладают высокой туморогенной активностью, способностью самообновляться и воспроизводить гетерогенность исходной опухоли, т.е. удовлетворяют признакам ОСК в соответствии с определением Американской ассоциации раковых исследований [9]. Вместе с тем, до сих пор отсутствуют доказательства того, что каждая клетка, выделенная согласно критериям ОСК, обладает туморогенной активностью, т.е. способна формировать опухоль в организме иммунодефицитного животного. Это означает, что вышеупомянутые методы и подходы позволяют выделить лишь фракцию клеток, обогащённую ОСК, которые в различных литературных источниках называют также стволоподобными (stem-like), туморогенными (tumorigenic) или опухоль-инициирующими (tumor-initiating) клетками. Кроме того, идентификация ОСК осложняется гетерогенностью и пластичностью самой субпопуляции этих клеток [10]. Так, например, оказалось, что ОСК могут подвергаться динамическим переходам от эпителиального к мезенхимальному

состоянию (эпителиально-мезенхимальная трансзиция – ЭМТ) и наоборот (МЭТ). Причём $CD44^+CD24^-$ и $ALDH1^+$ клеточные субпопуляции идентифицируют анатомически разные ОСК-М с различными профилями генной экспрессии, характерными для ЭМТ и МЭТ соответственно [11]. Интересно, что $CD44^+CD24^-$ ОСК находятся в состоянии пролиферативного покоя и локализуются на инвазивном крае первичной опухоли, а $ALDH1^+$ ОСК пролиферируют и находятся в её центральной части. Ещё одним обстоятельством, осложняющим идентификацию ОСК, является возможность дедифференцировки не стволовых опухолевых клеток, которая может быть спонтанной или индуцированной с помощью различных агентов [12]. В последнее время накапливается всё больше данных о существовании динамического равновесия между субпопуляциями стволовых и не стволовых клеток и о том, что это равновесие сохраняется не только за счёт регуляции асимметричного деления и дифференцировки ОСК (в соответствии с первоначальным вариантом гипотезы ОСК), но и за счёт перехода части не стволовых клеток в пул стволовых [13, 14]. Такой переход является, по-видимому, редким событием в интактных опухолях/клеточных культурах РМЖ, но может происходить чаще под влиянием различных факторов, включая воздействие ионизирующего излучения. По всей видимости, ключевую роль в этом процессе играет ЭМТ, контролируемая сетью микроРНК и факторами микроокружения [15, 16]. В результате ЭМТ опухолевые клетки приобретают свойства, ассоциированные с процессом метастазирования: высокую подвижность, способность к инвазии и повышенную устойчивость к апоптозу.

Резистентность ОСК-М к лекарственной терапии

Результаты экспериментальных исследований на клеточных культурах *in vitro* со всей определённостью свидетельствуют о более высокой резистентности ОСК-М ко многим химиопрепаратам (доксорубицин, метотрексат, цисплатин, паклитаксель и др.), которые используются в традиционных схемах химиотерапии РМЖ, по сравнению с остальными опухолевыми клетками [17-19]. Уже выяснены многие молекулярно-клеточные механизмы высокой химиорезистентности ОСК, но и в настоящее время продолжается интенсивное исследование этой проблемы, поскольку именно понимание данных механизмов лежит в основе разработки новых противоопухолевых средств, направленных на элиминацию ОСК. Установлено, что высокая химиорезистентность ОСК связана с такими свойствами этих клеток, как:

- низкая пролиферативная активность, позволяющая избегать гибели при использовании большинства противоопухолевых препаратов, мишенью которых являются быстро пролиферирующие клетки;
- высокая экспрессия АТФ-связывающих кассетных транспортёров, в том числе ABCG2, обеспечивающих обратное выведение многих лекарственных препаратов (таксанов, ингибиторов топоизомераз, антиметаболитов) из клетки;
- высокая активность различных ферментов инактивации противоопухолевых препаратов, включая ALDH, который производит детоксикацию циклофосфамида, доксорубицина, паклитакселя и др.;
- особый ответ на повреждения ДНК, которые индуцирует большинство химиопрепаратов, и более высокая эффективность целого ряда способов их репарации по сравнению с остальными клетками;

- гиперэкспрессия и сверхактивация сигнальных путей (Notch, Hedgehog, Wnt, PI3K/AKT и др.), обеспечивающих выживаемость клеток и снижающих апоптотическую гибель после различных стрессорных воздействий, включая химиотерапевтическое.

Сохранение субпопуляции ОСК после химиотерапевтических воздействий может быть связано не только с высокой химиорезистентностью этих клеток благодаря указанным выше механизмам, но также с дедифференцировкой части не стволовых клеток и переходом в пул ОСК под влиянием этих воздействий [17]. Более того, к механизмам химиорезистентности ОСК, обнаруженным на внутриклеточном и популяционном уровнях, в условиях *in vivo* подключаются и другие механизмы, связанные с влиянием различных факторов микроокружения на ОСК. Среди многочисленных примеров такого влияния, которых становится в последнее время всё больше и больше, можно отметить взаимодействие CD44 (рецептор гиалуронана, высокоэкспрессирующийся на плазматической мембране ОСК) с его лигандом (гиалуронан – один из основных компонентов внеклеточного матрикса), что приводит к активации ряда внутриклеточных сигнальных путей и регуляторов (PKC ϵ , JNK, c-Src, Nanog, Stat-3, c-Jun, Oct4, Sox2, Twist), способствующих выживанию клеток [20, 21].

В связи с вышеизложенным анализ роли стволовых клеток РМЖ в клиническом течении, эффективности лечения и исходе заболевания представляет особый интерес. У больных РМЖ выявлена корреляционная связь между высоким содержанием в первичной опухоли CD44⁺CD24^{-/low} клеток и наличием отдалённых метастазов, особенно в костях. В работе [21] высокая доля CD44⁺CD24^{-/low} ОСК (более 10%) обнаружена более чем у 80% больных с метастазами. При этом в отсутствие метастазов высокая доля ОСК отмечалась значительно реже: примерно у 60% больных трижды негативным (ER⁻PrR⁻HER2⁻) РМЖ и у 25-40% больных остальными молекулярными подтипами РМЖ (ER⁺PrR⁺HER2⁺ и HER2⁺). В работе Honeth G. et al. [22] также сравнивалось относительное количество ОСК в опухолях с различными молекулярными подтипами РМЖ в группе пациенток, которые не получали неоадъювантную химиолучевую терапию. Результаты исследования показали, что опухоли, относящиеся к прогностически наиболее неблагоприятному трижды негативному молекулярному подтипу, содержат самое высокое количество CD44⁺CD24^{-/low} ОСК. По-видимому, количество ОСК можно рассматривать не только как показатель прогноза течения заболевания, но и учитывать при выборе тактики лечения больных РМЖ.

В работах [23, 24] продемонстрировано многократное повышение относительного количества CD44⁺CD24^{-/low} ОСК после проведения нескольких курсов химиотерапии по стандартным схемам по сравнению с этим показателем до лечения, как и следовало ожидать, исходя из химиорезистентности этих клеток. Интересно, что в последней из цитируемых работ была показана способность лапатиниба снижать процент CD44⁺CD24^{-/low} клеток при использовании в качестве неоадъювантной терапии у пациентов с HER2⁺ РМЖ, хотя и статистически незначимо. В клинической практике HER2⁺ РМЖ связан с лучшим ответом на лечение антрациклинами, но выживание ОСК может быть причиной развития рецидива РМЖ после лечения. Вероятно, лапатиниб может быть использован для воздействия на ОСК в комбинации с химиотерапевтическими препаратами.

В ряде исследований оценивалось прогностическое значение ALDH1 – другого маркера ОСК-М. В большинстве работ показано, что высокое содержание этого фермента или его высокая активность в опухолевых клетках ассоциируется с резистентностью последних к цитостатикам и

неблагоприятным прогнозом течения РМЖ. Так, например, в исследовании Alamgeer M. et al. [25] определено прогностическое значение экспрессии ALDH1 в клетках РМЖ до лечения и после 4 циклов таксановой терапии. Оказалось, что отсутствие экспрессии ALDH1 до лечения статистически значимо ассоциировано с полной регрессией первичного очага, а наличие экспрессии в не отвечающих на терапию опухолях – с низкой общей выживаемостью. Более того, выяснилось, что повышение экспрессии ALDH1 после химиотерапии отмечается именно в группе резистентных опухолей. В недавнем исследовании Kida K. et al. [26] на большом клиническом материале показано, что экспрессия этого фермента в опухолевых клетках до лечения, обнаруженная иммуногистохимически в 21% новообразований, ассоциирована с низкими показателями общей и безрецидивной выживаемости больных РМЖ. Полная регрессия опухоли после неoadъювантной химиотерапии отмечалась примерно в 2 раза реже в ALDH1⁺ случаях, чем у остальных больных. Причём эта закономерность сохранялась в подгруппе больных с трижды негативным РМЖ, продемонстрировавшим более высокую химиорезистентность и более высокую экспрессию ALDH1. Лишь в единичных работах не удалось показать прогностического значения экспрессии маркеров ОСК [27], что подчёркивает необходимость дальнейших исследований.

Ответ ОСК-М на гормонотерапию

Появляется всё больше данных, свидетельствующих о значении ОСК в развитии устойчивости к гормональной терапии при РМЖ. Недавно субпопуляция ER⁺PrR⁺CD44⁺CK5⁺ клеток, которые имеют свойства ОСК, была найдена в ER⁺PrR⁺ ксенотрансплантатах РМЖ [28]. Интересно, что лечение с использованием тамоксифена или фулвестранта приводило к селективному обогащению ER⁺PrR⁺CD44⁺CK5⁺ субпопуляции, тогда как количество ER⁺PrR⁺ клеток уменьшалось. Можно полагать, что субпопуляция ER⁺PrR⁺CD44⁺CK5⁺ клеток, устойчивая к гормональной терапии по причине отсутствия соответствующих рецепторов, может играть важную роль при неблагоприятном исходе лечения ER⁺ РМЖ. Сходные данные были получены при исследовании культуры клеток РМЖ линии T57D после инкубации с тамоксифеном и биоптатов РМЖ после неoadъювантной гормонотерапии больных с помощью этого же препарата [29].

Радиочувствительность ОСК-М

Большинство авторов, занимающихся проблемой гетерогенности опухолевых клеток с позиции концепции ОСК, приходят к заключению о более высокой радиорезистентности ОСК по сравнению с остальной массой опухолевых клеток [30-34]. Следует отметить, что это заключение базируется на многочисленных данных литературы и результатах собственных исследований ОСК, идентифицированных в различных клеточных линиях *in vitro* по иммунофенотипу или способности откачивать флуоресцентные красители (метод SP) после воздействия редкоионизирующего излучения, которое используется в традиционных схемах радиотерапии. В доступной нам литературе данные о чувствительности ОСК-М к плотноионизирующему излучению отсутствуют. В то же время имеются обнадеживающие данные о влиянии этого типа ионизирующего излучения на ОСК в культурах клеток из опухолей других локализаций. В частности, нами была продемонстрирована одинаково высокая чувствительность опухолевых стволовых и не стволовых клеток меланомы к нейтронному излучению в условиях *in vitro* [35], а в работе [36] показано повышение чувствительности ОСК в двух клеточных культурах рака лёгкого к протонному излучению по сравнению с γ -излучением. Дальнейшее изучение радиочувствительности

ОСК-М к разным видам ионизирующих излучений представляется весьма перспективным, причём не только в условиях *in vitro*, но и *in vivo*.

Постепенно накапливаются данные о роли ОСК в ответе РМЖ на лучевую терапию. В целом, немногочисленные пока исследования демонстрируют устойчивость и относительное накопление ОСК после проведения лучевой терапии, а также прогностическое значение этих клеток в отношении длительности безрецидивной и общей выживаемости больных после радиотерапии [37-39], что хорошо согласуется с результатами экспериментальных исследований.

Несколько механизмов могут быть ответственны за это явление, в том числе состояние пролиферативного покоя ОСК, высокая эффективность репарации радиационных повреждений ДНК, особое состояние редокс-системы в этих клетках, а также гиперэкспрессия и сверхактивация сигнальных путей, обеспечивающих выживаемость клеток после радиационного воздействия [30, 32, 34, 40]. В исследовании [34] был показан низкий уровень активных форм кислорода (АФК), которые наблюдались в маммосферах, полученных из опухолей молочной железы человека и мыши. Как известно, АФК создают одно- и двуниевые разрывы ДНК, которые могут быть причиной гибели клеток, поэтому снижение уровня АФК может способствовать выживаемости ОСК после проведения лучевой терапии. Кроме того, было обнаружено, что ОСК избыточно экспрессируют гены, участвующие в антиоксидантной защите. Было показано, что ОСК-М не только выживают после облучения, но и сохраняют способность к самообновлению в течение нескольких поколений, что проявляется в повышенной способности к образованию сфероидов после проведения фракционированной лучевой терапии [38].

Кроме вышеупомянутых механизмов радиорезистентности ОСК, выявленных, в основном, в условиях *in vitro*, на тканевом уровне могут существовать дополнительные механизмы радиорезистентности этой субпопуляции, связанные с особенностями их микроокружения, например, с возможным расположением в гипоксических зонах опухоли и участием гипоксия-индуцируемых факторов в поддержании этой субпопуляции [41].

Влияние ОСК на клинические результаты лечения больных РМЖ

Ряд исследований свидетельствует о возможной роли ОСК в формировании резистентности РМЖ к лечению вследствие сохранения их жизнеспособности после химио-, радио- и/или гормонотерапии. В частности, было проанализировано влияние экспрессии ALDH1 на клинический результат лечения пациентов с РМЖ. При трижды негативных опухолях молочной железы была показана значимая корреляция экспрессии ALDH1 с таким неблагоприятным клиническим показателем, как вовлечение в опухолевый процесс лимфатических узлов [42]. В ряде случаев экспрессия ALDH1 была ассоциирована с HER2-позитивным статусом. В дополнение к этому, экспрессия ALDH1 продемонстрировала корреляцию с системным метастазированием и снижением выживаемости пациентов с отёчно-инфильтративной формой РМЖ. Эти данные свидетельствуют о том, что экспрессия маркеров ОСК может коррелировать не только с более агрессивным течением болезни, но также с известными молекулярными подтипами РМЖ с неблагоприятным прогнозом. Было установлено, что ALDH1⁺, CD44⁺CD24^{-/low} фенотипы ассоциированы с агрессивным молекулярным подтипом – базальноподобным РМЖ, и встречаются чаще в мутантных по BRCA1 опухолях. Было показано, что изоформы CD44 могут быть по-разному экспрессированы в отдельных подгруппах РМЖ, и высказано предположение, что молекула CD44 может быть частью программы прогрессирования опухоли, которая приводит к развитию от-

дельных молекулярных подтипов [22]. Роль ОСК в биологическом поведении агрессивных опухолей является областью активных исследований, как и механизмы, которые лежат в основе терапевтической резистентности стволовых клеток РМЖ и инициации ими опухолевой прогрессии. При этом следует заметить, что свойства ОСК во многом зависят от микроокружения, поэтому результаты, полученные на экспериментальных и клинических моделях, могут значительно отличаться.

Наличие корреляционной связи между количеством стволовых клеток РМЖ в первичной опухоли, течением заболевания и эффективностью его лечения позволяет предположить, что ОСК-М играют ключевую роль в биологии данного заболевания, и требуют разработки новых методов лечения, направленных на элиминацию этих клеток, например, путём воздействия на мембранные маркеры, прерывания внутриклеточных сигнальных путей и изменения состава и функций микроокружения.

Терапия, направленная на ОСК

Предшествующие исследования показали, что ОСК-М составляют небольшую по численности субпопуляцию, которая проявляет устойчивость к лекарственным препаратам, радиоизирующему излучению и одновременно может являться источником нового роста опухоли. Эти обстоятельства определяют необходимость поиска средств/способов, направленных на элиминацию этой небольшой, но очень важной субпопуляции опухолевых клеток. В последние годы наблюдается быстрый рост числа публикаций по этой проблеме, при этом используются различные агенты, воздействующие, в основном, на молекулярные пути регуляции и самообновления ОСК.

Одним из возможных способов является воздействие на поверхностные маркеры ОСК, например, CD44 с помощью специфических антител P245, введение которых в организм мышей приводит к блокированию роста ксенотрансплантатов РМЖ человека. Показана также способность CD8⁺ Т-клеток, специфически узнающих изоформу ALDH1A1, уменьшать число ОСК, ингибировать рост ксенотрансплантатов и метастазирование в организме иммунодефицитных мышей, а также увеличивать продолжительность жизни животных [43]. Эти данные свидетельствуют о том, что сочетание химиотерапевтических препаратов со специфическими антителами или с Т-клеточной направленной иммунотерапией, которая избирательно воздействует на маркеры ОСК, может иметь потенциальное преимущество.

Другой возможный способ элиминации ОСК связан с воздействием на Notch-сигнальный путь, который представляет привлекательную терапевтическую мишень из-за aberrантной экспрессии внутриклеточного домена Notch при внутрипротоковом (инвазивном и не инвазивном) РМЖ. Были проанализированы многие методы блокирования Notch-сигнального пути, прежде всего, использование ингибиторов γ -секретазы (GSI) – фермента, необходимого для активации этого пути; использование антител к лигандам Notch рецепторов, генетическое ингибирование Notch с помощью малых РНК; иммунотерапия с помощью цитотоксических лимфоцитов. Несмотря на системную токсичность и невысокую специфичность (из-за того, что субстратом для γ -секретазы являются несколько десятков различных молекул в дополнение к Notch рецепторам), GSI в настоящее время проходят клинические исследования для лечения распространённого РМЖ.

Мишенями для ОСК-направленной терапии могут быть также PI3K/Akt, mTOR и Wnt-сигнальные пути, вовлечённые в регуляцию ОСК-М. На экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo* показана способность ингибиторов mTOR различных классов (рапамицин, эверолимус, микроРНК miR-99a и др.) подавлять субпопуляцию ОСК-М и её опухолевую активность как при одиночном применении таких ингибиторов, так и в комбинации с известными противоопухолевыми агентами, включая тамоксифен, летрозол, цисплатин, ионизирующее излучение [44-46]. Кроме того, на сингенной мышинной модели РМЖ было показано, что введение Akt-ингибитора перифозина приводит к уменьшению количества ОСК, ингибированию роста опухолей и повышает чувствительность ОСК к лучевому воздействию [47]. Важно, что эти ингибиторы не влияют на дифференцированные клетки и нормальные ткани, что может способствовать их применению в комбинации с химиотерапевтическими препаратами для повышения эффективности последних. Однако эффективность и безопасность применения данных ингибиторов у пациентов должны быть изучены в клинических исследованиях.

Как упоминалось ранее, одной из характерных особенностей ОСК является устойчивость к апоптозу. Высказано предположение, что антиапоптотические белки могут играть важную роль в выживании ОСК. В работе Piggott L. et al. [48] показано, что генетическая супрессия антиапоптотического белка c-FLIP с помощью малых интерферирующих РНК (siRNA) избирательно воздействует на ОСК-М, выявляемые в клеточных культурах *in vitro* с помощью функциональных тестов по критериям образования маммосфер и активности ALDH1. Происходит повышение чувствительности ОСК-М к известному индуктору апоптоза TRAIL, причём независимо от статуса гормональных рецепторов и экспрессии HER2. В условиях *in vivo* установлено подавление опухолевого роста на 80%, а метастазирования на 98% при комбинированном применении TRAIL и специфических c-FLIP siRNA. Важно отметить, что было продемонстрировано отсутствие токсичности этого воздействия в отношении не опухолевых клеточных линий. В другом исследовании было показано, что конститутивно активная мутантная форма проапоптотического гена *Bik* (*BikDD*) снижает количество ОСК-М и их клоногенную способность в клеточных линиях РМЖ *in vitro*, ксенотрансплантатах опухолей человека и мышинных опухолях *in vivo* без токсического воздействия на нормальные клетки [49]. Кроме того, было установлено, что *BikDD* оказывает синергическое действие в комбинации с лапатинибом при HER2-позитивном фенотипе опухолевых клеток и с паклитакселем – при HER2-негативном фенотипе. Эти результаты показывают, что *BikDD* может повысить терапевтическую эффективность и лапатиниба, и традиционной химиотерапии без серьёзных побочных эффектов.

Разработка новых способов направленной доставки противоопухолевых препаратов в ОСК – ещё один перспективный подход к элиминации этих клеток при минимальном воздействии на нормальные ткани [50]. Хотя это направление исследований начало развиваться совсем недавно, уже достигнуты заметные успехи при применении полимерных наноконтейнеров и мицелл различной химической структуры, нагруженных доксорубицином, тиоридазином, паклитакселем, салиномицином, siRNA или miRNA, специфически выключающих гены, ответственные за резистентность ОСК. В качестве векторных молекул, обеспечивающих связывание наночастиц с ОСК-М, используются различные антитела и лиганды (например, антитела к CD44 и гиалуроновая кислота), специфичные для маркеров или рецепторов на поверхности этих клеток. Однако следует отметить, что эти исследования находятся на доклинической стадии.

Несмотря на важное значение таких разработок и обнадеживающие результаты, следует учитывать возможность дедифференцировки не стволовых клеток, которая может усиливаться под влиянием различных противоопухолевых воздействий, как отмечалось выше. Поэтому изолированное воздействие на ОСК может быть, в конечном итоге, недостаточно эффективным, особенно при распространённых формах злокачественных опухолей. Очевидно, что одновременное удаление как субпопуляции ОСК, так и остальных опухолевых клеток (не ОСК), а также использование ингибиторов дедифференцировки может быть наиболее эффективной стратегией лечения.

Заключение

В заключение следует отметить, что концепция ОСК имеет важное значение не только для понимания механизмов канцерогенеза, но и для развития противоопухолевой терапии. Появляется всё больше доклинических доказательств того, что ОСК-М способствуют развитию резистентности РМЖ к химио- и лучевой терапии. Клинические данные о связи ОСК-М с формированием резистентности к противоопухолевым воздействиям пока немногочисленны, но свидетельствуют о перспективности дальнейшей работы в этом направлении. В последние годы стало понятно, что разработка более эффективных методов лечения для преодоления терапевтической резистентности может включать также одновременное воздействие и на ОСК. Анализ литературы свидетельствует об интенсивном исследовании этой проблемы на основе новых фундаментальных знаний о природе ОСК и молекулярно-биологических особенностях этой небольшой по численности, но очень важной субпопуляции опухолевых клеток. Результаты доклинических исследований, опубликованных на сегодняшний день, являются перспективными, но они до сих пор не были внедрены в практику в полном объёме, потому что эффективность новых препаратов для таргетного воздействия на ОСК должна быть ещё подтверждена в клинических исследованиях. Можно надеяться, что ОСК-направленная терапия не будет оказывать влияния на нормальные дифференцированные клетки и может быть использована в клинической практике в сочетании с химиотерапевтическими препаратами из-за ограниченной токсичности. Однако эффективность комбинированного действия на опухоль средств/способов элиминации ОСК с традиционными химиотерапевтическими препаратами, молекулярной таргетной или лучевой терапией изучена недостаточно. Дальнейшие исследования необходимы для уточнения роли ОСК при РМЖ и выяснения эффективности ОСК-направленной терапии при этой патологии.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 15-15-10013) в части анализа данных литературы о механизмах радио-, химиорезистентности ОСК и разработки средств направленного на них воздействия.

Литература

1. **Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A., Morrison S.J., Clarke M.F.** Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 3983-3988.
2. **Nguyen L.V., Vanner R., Dirks P., Eaves C.J.** Cancer stem cells: an evolving concept //Nat. Rev. Cancer. 2012. V. 12, N 2. P. 133-143.
3. **Wicha M.S.** Cancer stem cells and metastasis: Lethal seeds //Clin. Cancer. Res. 2006. V. 12. P. 5606-5607.
4. **Poleszczuk J., Hahnfeldt P., Enderling H.** Evolution and phenotypic selection of cancer stem cells //PLoS. Comput. Biol. 2015. V. 11, N 3. e1004025.
5. **Xie X., Teknos T.N., Pan Q.** Are all cancer stem cells created equal? //Stem Cells Transl. Med. 2014. V. 3, N 10. P. 1111-1115.
6. **Mannello F.** Understanding breast cancer stem cell heterogeneity: time to move on to a new research paradigm //BMC Med. 2013. V. 11. P. 169.
7. **Martinez-Climent J.A., Andreu E.J., Prosper F.** Somatic stem cells and the origin of cancer //Clin. Transl. Oncol. 2006. V. 8. P. 647-663.
8. Mammary stem cells. Methods and protocols /Ed.: M. del Mar Vivanco. New York: Springer (Humana Press), 2015. 275 p.
9. **Clarke M.F., Dick J.E., Dirks P.B., Eaves C.J., Jamieson C.H., Jones D.L., Visvader J., Weissman I.L., Wahl G.M.** Cancer stem cells-perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells //Cancer Res. 2006. V. 66. P. 9339-9344.
10. **Wang A., Chen L., Li C., Zhu Y.** Heterogeneity in cancer stem cells //Cancer Lett. 2015. V. 357. P. 63-68.
11. **Liu S., Cong Y., Wang D., Sun Y., Deng L., Liu Y., Martin-Trevino R., Shang L., McDermott S.P., Landis M.D., Hong S., Adams A., D'Angelo R., Ginestier C., Charafe-Jauffret E., Clouthier S.G., Birnbaum D., Wong S.T., Zhan M., Chang J.C., Wicha M.S.** Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts //Stem Cell Reports. 2013. V. 2. P. 78-91.
12. **Iliopoulos D., Hirsch H.A., Wang G., Struhl K.** Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. P. 1397-1402.
13. **Yang G., Quan Y., Wang W., Fu Q., Wu J., Mei T., Li J., Tang Y., Luo C., Ouyang Q., Chen S., Wu L., Hei T.K., Wang Y.** Dynamic equilibrium between cancer stem cells and non-stem cancer cells in human SW620 and MCF-7 cancer cell populations //Br. J. Cancer. 2012. V. 106. P. 1512-1519.
14. **Klevebring D., Rosin G., Ma R., Lindberg J., Czene K., Kere J., Fredriksson I., Bergh J., Hartman J.** Sequencing of breast cancer stem cell populations indicates a dynamic conversion between differentiation states in vivo //Breast Cancer Res. 2014. V. 16. R72.
15. **Tang J., Li Y., Wang J., Wen Z., Lai M., Zhang H.** Molecular mechanisms of microRNAs in regulating epithelial-mesenchymal transitions in human cancers //Cancer Lett. 2016. V. 371. P. 301-313.
16. **Luo M., Brooks M., Wicha M.S.** Epithelial-mesenchymal plasticity of breast cancer stem cells: implications for metastasis and therapeutic resistance //Curr. Pharm. Des. 2015. V. 21. P. 1301-1310.
17. **Zhao J.** Cancer stem cells and chemoresistance: The smartest survives the raid //Pharmacol. Ther. 2016. V. 160. P. 145-158.
18. **Chuthapisith S., Eremin J., El-Sheemey M., Eremin O.** Breast cancer chemoresistance: emerging importance of cancer stem cells //Surg. Oncol. 2010. V. 19. P. 27-32.
19. **Матчук О.Н., Саенко А.С.** Влияние редкоизирующего излучения и химиопрепаратов на опухолевые стволовые клетки (SP) меланомы В16 и аденокарциномы молочной железы MCF-7 //Радиация и риск. 2013. Т. 22, № 2. С. 67-76.
20. **Williams K., Motiani K., Giridhar P.V., Kasper S.** CD44 integrates signaling in normal stem cell, cancer stem cell and (pre)metastatic niches //Exp. Biol. Med. (Maywood). 2013. V. 238. P. 324-338.

21. **Gerhard R., Ricardo S., Albergaria A., Gomes M., Silva A.R., Logullo Â.F., Cameselle-Teijeiro J.F., Paredes J., Schmitt F.** Immunohistochemical features of claudin-low intrinsic subtype in metaplastic breast carcinomas //Breast. 2012. V. 21. P. 354-360.
22. **Honeth G., Bendahl P.O., Ringner M., Saal L.H., Gruvberger-Saal S.K., Lövgren K., Grabau D., Fernö M., Borg Å., Hegardt C.** The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors //Breast Cancer Res. 2008. V. 10. R53.
23. **Creighton C.J., Li X., Landis M., Dixon J.M., Neumeister V.M., Sjolund A., Rimm D.L., Wong H., Rodriguez A., Herschkowitz J.I., Fan C., Zhang X., He X., Pavlick A., Gutierrez M.C., Renshaw L., Larionov A.A., Faratian D., Hilsenbeck S.G., Perou C.M., Lewis M.T., Rosen J.M., Chang J.C.** Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. P. 13820-13825.
24. **Li X., Lewis M.T., Huang J., Gutierrez C., Osborne C.K., Wu M.-F., Hilsenbeck S.G., Pavlick A., Zhang X., Chamness G.C., Wong H., Rosen J., Chang J.C.** Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy //J. Natl. Cancer Inst. 2008. V. 100. P. 672-679.
25. **Alamgeer M., Ganju V., Kumar B., Fox J., Hart S., White M., Harris M., Stuckey J., Prodanovic Z., Schneider-Kolsky M.E., Watkins D.N.** Changes in aldehyde dehydrogenase-1 expression during neoadjuvant chemotherapy predict outcome in locally advanced breast cancer //Breast Cancer Res. 2014. V. 16, N 2. R44.
26. **Kida K., Ishikawa T., Yamada A., Shimada K., Narui K., Sugae S., Shimizu D., Tanabe M., Sasaki T., Ichikawa Y., Endo I.** Effect of ALDH1 on prognosis and chemoresistance by breast cancer subtype //Breast Cancer Res. Treat. 2016. V. 156, N 2. P. 261-269.
27. **Neumeister V., Agarwal S., Bordeaux J., Camp R.L., Rimm D.L.** In situ identification of putative cancer stem cells by multiplexing ALDH1, CD44, and cytokeratin identifies breast cancer patients with poor prognosis //Am. J. Pathol. 2010. V. 176. P. 2131-2138.
28. **Horwitz K.B., Dye W.W., Harrell J.C., Kabos P., Sartorius C.A.** Rare steroid receptor-negative basal-like tumorigenic cells in luminal subtype human breast cancer xenografts //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. P. 5774-5779.
29. **Kabos P., Haughian J.M., Wang X., Dye W., Finlayson C., Elias A., Horwitz K.B., Sartorius C.A.** Cytokeratin 5 positive cells represent a steroid receptor negative and therapy resistant subpopulation in luminal breast cancers //Breast Cancer Res. Treat. 2011. V. 128. P. 45-55.
30. **Dubrovskaya A.** Report on the International Workshop «Cancer stem cells: The mechanisms of radioresistance and biomarker discovery» //Int. J. Radiat. Biol. 2014. V. 90. P. 607-614.
31. **Diehn M., Clarke M.** Cancer stem cells and radiotherapy: new insights into tumor radioresistance //J. Natl. Cancer Inst. 2006. V. 98, N 24. P. 1755-1757.
32. **Rycaj K., Tang D.G.** Cancer stem cells and radioresistance //Int. J. Radiat. Biol. 2014. V. 90, N 8. P. 615-621.
33. **Замулаева И.А., Матчук О.Н., Селиванова Е.И., Андреев В.Г., Липунов Н.М., Макаренко С.А., Жаворонков Л.П., Саенко А.С.** Увеличение количества опухолевых стволовых клеток под воздействием редкоизирующего излучения //Радиационная биология. Радиоэкология. 2014. Т. 54, № 3. С. 256-264.
34. **Phillips T.M., McBride W.H., Pajonk F.** The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation //J. Natl. Cancer Inst. 2006. V. 98. P. 1777-1785.
35. **Матчук О.Н., Замулаева И.А., Селиванова Е.И., Липунов Н.М., Пронюшкина К.А., Ульяненко С.Е., Лычагин А.А., Смирнова С.Г., Орлова Н.В., Саенко А.С.** Чувствительность клеток SP линии меланомы В16 к действию редко- и плотноизирующего излучений //Радиационная биология. Радиоэкология. 2012. Т. 52, № 3. С. 261-267.

36. **Zhang X., Lin S.H., Fang B., Gillin M., Mohan R., Chang J.Y.** Therapy-resistant cancer stem cells have differing sensitivity to photon versus proton beam radiation //J. Thorac. Oncol. 2013. V. 8, N 12. P. 1484-1491.
37. **Williams K.E., Bundred N.J., Landberg G., Clarke R.B., Farnie G.** Focal adhesion kinase and Wnt signaling regulate human ductal carcinoma in situ stem cell activity and response to radiotherapy //Stem Cells. 2015. V. 33, N 2. P. 327-341.
38. **Lagadec C., Vlashi E., Delia Donna L., Meng Y., Dekmezian C., Kim K., Pajonk F.** Survival and self-renewing capacity of breast cancer initiating cells during fractionated radiation treatment //Breast Cancer Res. 2010. V. 12. R13.
39. **Qiu Y., Pu T., Guo P., Wei B., Zhang Z., Zhang H., Zhong X., Zheng H., Chen L., Bu H., Ye F.** ALDH(+)/CD44(+) cells in breast cancer are associated with worse prognosis and poor clinical outcome //Exp. Mol. Pathol. 2016. V. 100. P. 145-150.
40. **Матчук О.Н., Замулаева И.А., Ковалев О.А., Саенко А.С.** Механизмы радиорезистентности клеток SP культуры мышиной меланомы B16 //Цитология. 2013. Т. 55, № 8. С. 553-559.
41. **Yun Z., Lin Q.** Hypoxia and regulation of cancer cell stemness //Adv. Exp. Med. Biol. 2014. V. 772. P. 41-53.
42. **Reuben J.M., Lee B.N., Gao H., Cohen E.N., Mego M., Giordano A., Wang X., Lodhi A., Krishnamurthy S., Hortobagyi G.N., Cristofanilli M., Lucci A., Woodward W.A.** Primary breast cancer patients with high risk clinicopathologic features have high percentages of bone marrow epithelial cells with ALDH activity and CD44CD241o cancer stem cell phenotype //Eur. J. Cancer. 2011. V. 47. P. 1527-1536.
43. **Visus C., Wang Y., Lozano-Leon A., Ferris R.L., Silver S., Szczepanski M.J., Brand R.E., Ferrone C.R., Whiteside T.L., Ferrone S., DeLeo A.B., Wang X.** Targeting ALDHbright human carcinoma-initiating cells with ALDH1A1-specific CD8+ T Cells //Clin. Cancer Res. 2011. V. 17. P. 6174-6184.
44. **Karthik G.M., Ma R., Lövrot J., Kis L.L., Lindh C., Blomquist L., Fredriksson I., Bergh J., Hartman J.** mTOR inhibitors counteract tamoxifen-induced activation of breast cancer stem cells //Cancer Lett. 2015. V. 367, N 1. P. 76-87.
45. **Liu Y., Zhang X., Liu J., Hou G., Zhang S., Zhang J.** Everolimus in combination with letrozole inhibit human breast cancer MCF-7/Aro stem cells via PI3K/mTOR pathway: an experimental study //Tumour Biol. 2014. V. 35, N 2. P. 1275-1286.
46. **Lai Y., Yu X., Lin X., He S.** Inhibition of mTOR sensitizes breast cancer stem cells to radiation-induced repression of self-renewal through the regulation of MnSOD and Akt //Int. J. Mol. Med. 2016. V. 37, N 2. P. 369-377.
47. **Korkaya H., Paulson A., Charafe-Jauffret E., Ginestier C., Brown M., Dutcher J.e, Clouthier S.G., Wicha M.S.** Regulation of mammary stem/progenitor cells by PTEN/Akt/beta-catenin signaling //PLoS Biol. 2009. V. 7. e1000121.
48. **Piggott L., Omidvar N., Marti-Perez S., Eberl M., Clarkson R.** Suppression of apoptosis inhibitor c-FLIP selectively eliminates breast cancer stem cell activity in response to the anticancer agent, TRAIL //Breast Cancer Res. 2011. V. 13. R88.
49. **Lang J.Y., Hsu J.L., Meric-Bernstam F., Chang C.-J., Wang Q., Bao Y., Yamaguchi H., Xie X., Woodward W.A., Yu D., Hortobagyi D.N., Hung M.-C.** BikDD eliminates breast cancer initiating cells and synergizes with lapatinib for breast cancer treatment //Cancer Cell. 2011. V. 20. P. 341-356.
50. **Malhi S., Gu X.** Nanocarrier-mediated drugs targeting cancer stem cells: an emerging delivery approach //Expert Opin. Drug. Deliv. 2015. V. 12, N 7. P. 1177-1201.

Breast cancer and tumor stem cells. Review

Smirnova I.A., Enileeva A.A., Matchuk O.N., Zamulaeva I.A.

A. Tsyb MRRC, Obninsk

In recent years the existence of cancer stem cells (CSCs) was demonstrated in malignant tumors of various localizations, animal and human stable tumor cell lines. Breast cancer was the first solid tumor, in which the presence of CSCs was revealed. The first evidence of the existence of CSCs was revealed in breast. Identification of breast CSCs is a complex problem because of their heterogeneity and plasticity. By this moment, a significant body of experimental data on the biological nature of breast CSCs has been accumulated. This cell fraction is characterized by a higher resistance to the action of low-LET radiation and chemotherapy compared to other tumor cells. In this review we analyze the possibility of applying the acquired knowledge about the CSC resistance to antitumor agents, molecular-cellular features of CSCs and its prognostic value in clinical practice to improve the results of treatment of patients with breast malignant tumors. Clinical data on the relationship of breast CSCs with the formation of resistance to anticancer treatment, including radiation therapy, are not yet numerous, but indicate the prospects of further work in this direction.

Key words: *breast cancer, intratumor heterogeneity, tumor stem cells, CD44, CD24, antitumor therapy, prognosis, radioresistance, ionizing radiation, chemoresistance.*

References

1. **Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A., Morrison S.J., Clarke M.F.** Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 2003, vol. 100, pp. 3983-3988.
2. **Nguyen L.V., Vanner R., Dirks P., Eaves C.J.** Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat. Rev. Cancer*, 2012, vol. 12, no. 2, pp. 133-143.
3. **Wicha M.S.** Cancer stem cells and metastasis: Lethal seeds. *Clin. Cancer Res.*, 2006, vol. 12, pp. 5606-5607.
4. **Poleszczuk J., Hahnfeldt P., Enderling H.** Evolution and phenotypic selection of cancer stem cells. *PLoS Comput. Biol.*, 2015, vol. 11, no. 3, e1004025.
5. **Xie X., Teknos T.N., Pan Q.** Are all cancer stem cells created equal? *Stem Cells Transl. Med.*, 2014, vol. 3, no. 10, pp. 1111-1115.
6. **Mannello F.** Understanding breast cancer stem cell heterogeneity: time to move on to a new research paradigm. *BMC Med.*, 2013, vol. 11, p. 169.
7. **Martinez-Climent J.A., Andreu E.J., Prosper F.** Somatic stem cells and the origin of cancer. *Clin. Transl. Oncol.*, 2006, vol. 8, pp. 647-663.
8. **Mammary stem cells. Methods and protocols.** Ed.: M. del Mar Vivanco. New York, Springer (Humana Press), 2015. 275 p.
9. **Clarke M.F., Dick J.E., Dirks P.B., Eaves C.J., Jamieson C.H., Jones D.L., Visvader J., Weissman I.L., Wahl G.M.** Cancer stem cells-perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.*, 2006, vol. 66, pp. 9339-9344.
10. **Wang A., Chen L., Li C., Zhu Y.** Heterogeneity in cancer stem cells. *Cancer Lett.*, 2015, vol. 357, pp. 63-68.
11. **Liu S., Cong Y., Wang D., Sun Y., Deng L., Liu Y., Martin-Trevino R., Shang L., McDermott S.P., Landis M.D., Hong S., Adams A., D'Angelo R., Ginestier C., Charafe-Jauffret E., Clouthier S.G., Birnbaum D., Wong S.T., Zhan M., Chang J.C., Wicha M.S.** Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts. *Stem Cell Reports*, 2013, vol. 2, pp. 78-91.

Smirnova I.A. – Lead. Researcher, MD; **Enileeva A.A.** – Researcher; **Matchuk O.N.** – Researcher; **Zamulaeva I.A.*** – Head of Dep., D. Sc., Biol., Professor. A. Tsyb MRRC.

*Contacts: 4 Korozyov str., Obninsk, Kaluga region, Russia, 249036. Tel.: +7 (484) 399-71-88; e-mail: zamulaeva@mail.ru.

12. **Iliopoulos D., Hirsch H.A., Wang G., Struhl K.** Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, vol. 108, pp. 1397-1402.
13. **Yang G., Quan Y., Wang W., Fu Q., Wu J., Mei T., Li J., Tang Y., Luo C., Ouyang Q., Chen S., Wu L., Hei T.K., Wang Y.** Dynamic equilibrium between cancer stem cells and non-stem cancer cells in human SW620 and MCF-7 cancer cell populations. *Br. J. Cancer*, 2012, vol. 106, pp. 1512-1519.
14. **Klevebring D., Rosin G., Ma R., Lindberg J., Czene K., Kere J., Fredriksson I., Bergh J., Hartman J.** Sequencing of breast cancer stem cell populations indicates a dynamic conversion between differentiation states in vivo. *Breast Cancer Res.*, 2014, vol. 16, R72.
15. **Tang J., Li Y., Wang J., Wen Z., Lai M., Zhang H.** Molecular mechanisms of microRNAs in regulating epithelial-mesenchymal transitions in human cancers. *Cancer Lett.*, 2016, vol. 371, pp. 301-313.
16. **Luo M., Brooks M., Wicha M.S.** Epithelial-mesenchymal plasticity of breast cancer stem cells: implications for metastasis and therapeutic resistance. *Curr. Pharm. Des.*, 2015, vol. 21, pp. 1301-1310.
17. **Zhao J.** Cancer stem cells and chemoresistance: The smartest survives the raid. *Pharmacol. Ther.*, 2016, vol. 160, pp. 145-158.
18. **Chuthapisith S., Eremin J., El-Sheemey M., Eremin O.** Breast cancer chemoresistance: emerging importance of cancer stem cells. *Surg. Oncol.*, 2010, vol. 19, pp. 27-32.
19. **Matchuk O.N., Saenko A.S.** Irradiation and chemotherapy drug effects on cancer stem cells (SP) of melanoma B16 and breast adenocarcinoma MCF-7. *Radiatsiya i risk – Radiation and Risk*, 2013, vol. 22, no. 2, pp. 67-76. (In Russian).
20. **Williams K., Motiani K., Giridhar P.V., Kasper S.** CD44 integrates signaling in normal stem cell, cancer stem cell and (pre)metastatic niches. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, 2013, vol. 238, pp. 324-338.
21. **Gerhard R., Ricardo S., Albergaria A., Gomes M., Silva A.R., Logullo Â.F., Cameselle-Teijeiro J.F., Paredes J., Schmitt F.** Immunohistochemical features of claudin-low intrinsic subtype in metaplastic breast carcinomas. *Breast*, 2012, vol. 21, pp. 354-360.
22. **Honeth G., Bendahl P.O., Ringner M., Saal L.H., Gruvberger-Saal S.K., Lövgren K., Grabau D., Fernö M., Borg Å., Hegardt C.** The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Res.*, 2008, vol. 10, R53.
23. **Creighton C.J., Li X., Landis M., Dixon J.M., Neumeister V.M., Sjolund A., Rimm D.L., Wong H., Rodriguez A., Herschkowitz J.I., Fan C., Zhang X., He X., Pavlick A., Gutierrez M.C., Renshaw L., Larionov A.A., Faratian D., Hilsenbeck S.G., Perou C.M., Lewis M.T., Rosen J.M., Chang J.C.** Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, vol. 106, pp. 13820-13825.
24. **Li X., Lewis M.T., Huang J., Gutierrez C., Osborne C.K., Wu M.-F., Hilsenbeck S.G., Pavlick A., Zhang X., Chamness G.C., Wong H., Rosen J., Chang J.C.** Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2008, vol. 100, pp. 672-679.
25. **Alamgeer M., Ganju V., Kumar B., Fox J., Hart S., White M., Harris M., Stuckey J., Prodanovic Z., Schneider-Kolsky M.E., Watkins D.N.** Changes in aldehyde dehydrogenase-1 expression during neoadjuvant chemotherapy predict outcome in locally advanced breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 2014, vol. 16, no. 2, R44.
26. **Kida K., Ishikawa T., Yamada A., Shimada K., Narui K., Sugae S., Shimizu D., Tanabe M., Sasaki T., Ichikawa Y., Endo I.** Effect of ALDH1 on prognosis and chemoresistance by breast cancer subtype. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2016, vol. 156, no. 2, pp. 261-269.
27. **Neumeister V., Agarwal S., Bordeaux J., Camp R.L., Rimm D.L.** In situ identification of putative cancer stem cells by multiplexing ALDH1, CD44, and cytokeratin identifies breast cancer patients with poor prognosis. *Am. J. Pathol.*, 2010, vol. 176, pp. 2131-2138.

28. **Horwitz K.B., Dye W.W., Harrell J.C., Kabos P., Sartorius C.A.** Rare steroid receptor-negative basal-like tumorigenic cells in luminal subtype human breast cancer xenografts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, vol. 105, pp. 5774-5779.
29. **Kabos P., Haughian J.M., Wang X., Dye W., Finlayson C., Elias A., Horwitz K.B., Sartorius C.A.** Cytokeratin 5 positive cells represent a steroid receptor negative and therapy resistant subpopulation in luminal breast cancers. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2011, vol. 128, pp. 45-55.
30. **Dubrovskaya A.** Report on the International Workshop «Cancer stem cells: The mechanisms of radioresistance and biomarker discovery». *Int. J. Radiat. Biol.*, 2014, vol. 90, pp. 607-614.
31. **Diehn M., Clarke M.** Cancer stem cells and radiotherapy: new insights into tumor radioresistance. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2006, vol. 98, no. 24, pp. 1755-1757.
32. **Rycak K., Tang D.G.** Cancer stem cells and radioresistance. *Int. J. Radiat. Biol.*, 2014, vol. 90, no. 8, pp. 615-621.
33. **Zamulaeva I.A., Matchuk O.N., Selivanova E.I., Andreev V.G., Lipunov N.M., Makarenko S.A., Zhavoronkov L.P., Saenko A.S.** Uvelichenie kolichestva opuholevykh stvolovykh kletok pod vozdeystviem redkoionizirujushhego izlucheniya [Increase in the number of cancer stem cells after exposure to low-LET radiation]. *Radiatsionnaya biologija. Radioekologija – Radiat. Biol. Radioecol.*, 2014, vol. 54, no. 3, pp. 256-264.
34. **Phillips T.M., McBride W.H., Pajonk F.** The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2006, vol. 98, pp. 1777-1785.
35. **Matchuk O.N., Zamulaeva I.A., Selivanova E.I., Lipunov N.M., Pronjushkina K.A., Ul'janenko S.E., Lychagin A.A., Smirnova S.G., Orlova N.V., Saenko A.S.** Chuvstvitel'nost' kletok SP linii melanomy B16 k dejstvu redko- i plotnoionizirujushhego izlucheniya [Increase in the number of cancer stem cells after exposure to low-LET radiation]. *Radiatsionnaya biologija. Radioekologija – Radiat. Biol. Radioecol.*, 2012, vol. 52, no. 3, pp. 261-267.
36. **Zhang X., Lin S.H., Fang B., Gillin M., Mohan R., Chang J.Y.** Therapy-resistant cancer stem cells have differing sensitivity to photon versus proton beam radiation. *J. Thorac. Oncol.*, 2013, vol. 8, no. 12, pp. 1484-1491.
37. **Williams K.E., Bundred N.J., Landberg G., Clarke R.B., Farnie G.** Focal adhesion kinase and Wnt signaling regulate human ductal carcinoma in situ stem cell activity and response to radiotherapy. *Stem Cells*, 2015, vol. 33, no. 2, pp. 327-341.
38. **Lagadec C., Vlashi E., Delia Donna L., Meng Y., Dekmezian C., Kim K., Pajonk F.** Survival and self-renewing capacity of breast cancer initiating cells during fractionated radiation treatment. *Breast Cancer Res.*, 2010, vol. 12, R13.
39. **Qiu Y., Pu T., Guo P., Wei B., Zhang Z., Zhang H., Zhong X., Zheng H., Chen L., Bu H., Ye F.** ALDH(+)/CD44(+) cells in breast cancer are associated with worse prognosis and poor clinical outcome. *Exp. Mol. Pathol.*, 2016, vol. 100, pp. 145-150.
40. **Matchuk O.N., Zamulaeva I.A., Kovalev O.A., Saenko A.S.** Mehanizmy radiorezistentnosti kletok SP kul'tury myshinoj melanomy B16 [Radioresistance mechanisms of side population cells in mouse melanoma cell line B16]. *Citologija – Cytology*, 2013, vol. 55, no. 8, pp. 553-559.
41. **Yun Z., Lin Q.** Hypoxia and regulation of cancer cell stemness. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2014, vol. 772, pp. 41-53.
42. **Reuben J.M., Lee B.N., Gao H., Cohen E.N., Mego M., Giordano A., Wang X., Lodhi A., Krishnamurthy S., Hortobagyi G.N., Cristofanilli M., Lucci A., Woodward W.A.** Primary breast cancer patients with high risk clinicopathologic features have high percentages of bone marrow epithelial cells with ALDH activity and CD44CD241o cancer stem cell phenotype. *Eur. J. Cancer*, 2011, vol. 47, pp. 1527-1536.
43. **Visus C., Wang Y., Lozano-Leon A., Ferris R.L., Silver S., Szczepanski M.J., Brand R.E., Ferrone C.R., Whiteside T.L., Ferrone S., DeLeo A.B., Wang X.** Targeting ALDHbright human carcinoma-initiating cells with ALDH1A1-specific CD8+ T Cells. *Clin. Cancer Res.*, 2011, vol. 17, pp. 6174-6184.

44. **Karthik G.M., Ma R., Lövrot J., Kis L.L., Lindh C., Blomquist L., Fredriksson I., Bergh J., Hartman J.** mTOR inhibitors counteract tamoxifen-induced activation of breast cancer stem cells. *Cancer Lett.*, 2015, vol. 367, no. 1, pp. 76-87.
45. **Liu Y., Zhang X., Liu J., Hou G., Zhang S., Zhang J.** Everolimus in combination with letrozole inhibit human breast cancer MCF-7/Aro stem cells via PI3K/mTOR pathway: an experimental study. *Tumour Biol.*, 2014, vol. 35, no. 2, pp. 1275-1286.
46. **Lai Y., Yu X., Lin X., He S.** Inhibition of mTOR sensitizes breast cancer stem cells to radiation-induced repression of self-renewal through the regulation of MnSOD and Akt. *Int. J. Mol. Med.*, 2016, vol. 37, no. 2, pp. 369-377.
47. **Korkaya H., Paulson A., Charafe-Jauffret E., Ginestier C., Brown M., Dutcher J., Clouthier S.G., Wicha M.S.** Regulation of mammary stem/progenitor cells by PTEN/Akt/beta-catenin signaling. *PLoS Biol.*, 2009, vol. 7, e1000121.
48. **Piggott L., Omidvar N., Marti-Perez S., Eberl M., Clarkson R.** Suppression of apoptosis inhibitor c-FLIP selectively eliminates breast cancer stem cell activity in response to the anticancer agent, TRAIL. *Breast Cancer Res.*, 2011, vol. 13, R88.
49. **Lang J.Y., Hsu J.L., Meric-Bernstam F., Chang C.-J., Wang Q., Bao Y., Yamaguchi H., Xie X., Woodward W.A., Yu D., Hortobagyi D.N., Hung M.-C.** BikDD eliminates breast cancer initialing cells and synergizes with lapatinib for breast cancer treatment. *Cancer Cell*, 2011, vol. 20, pp. 341-356.
50. **Malhi S., Gu X.** Nanocarrier-mediated drugs targeting cancer stem cells: an emerging delivery approach. *Expert Opin. Drug. Deliv.*, 2015, vol. 12, no. 7, pp. 1177-1201.