

Л.З. Поліщук
Т.А. Магась

Інститут експериментальної
патології, онкології
і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького
НАН України, Київ, Україна

ІНВАЗІЙНИЙ ФРОНТ КАРЦИНОМ: МОРФОЛОГІЧНІ ТА МОЛЕКУЛЯРНІ ОСОБЛИВОСТІ, АСОЦІАЦІЯ З ПРОГРЕСУВАННЯМ ПУХЛИННОГО РОСТУ

Ключові слова: інвазійний фронт пухлини, інвазія, адгезія, міграція, молекулярні механізми, пухлинне брунькування (*tumor budding*), діагностичне і прогностичне значення.

Метою огляду є аналіз сучасних наукових відомостей щодо структурних і функціональних особливостей інвазійного фронту пухлин як зони активного формування інвазійного та метастатичного фенотипу пухлинних клітин (ПК) на кордоні з прилеглою сполучною тканиною. Показана складність і взаємозумовленість молекулярно-генетичних, біохімічних і цитоморфологічних змін ПК, асоційованих з активацією їхньої інвазії — кардинального етапу прогресування пухлинного процесу. Важливою морфологічною характеристикою інвазійного фронту пухлин є наявність кластерів ПК з фенотипом пухлинного брунькування, який розглядають як маркер між- та інтрапухлинної гетерогенності та морфологічний критерій для оцінки агресивності пухлин епітеліального генезу.

Багаторічними системними дослідженнями пухлинного росту на етапах ініціації, промоції та прогресії встановлено динамічні зв'язки між молекулярно-генетичними, морфологічними та клінічними особливостями неоплазій [1]. В останні роки все більшу увагу привертають дослідження механізмів формування інвазійних властивостей пухлинних клітин (ПК). Показано, що інвазійність є необхідною складовою прогресування пухлинного процесу; водночас описано значну інтра- та міжпухлинну гетерогенність ПК за цією ознакою, що пов'язано з комплексом багатьох факторів та має важливе значення для клональної варіабельності і просторової локалізації ПК в органі, особливостей їх проліферації та віддаленого розповсюдження для резистентності пухлин до лікувальних впливів [2–6]. Встановлено, що високий проліферативний потенціал та інвазія ПК через базальну мембрану (БМ), подальша їх міграція в прилеглу та віддалені тканини є окремими, але взаємно пов'язаними характеристиками пухлинного росту, що відображають прогресування пухлин. Під час інвазії ПК набувають нової ознаки — пластичності (яка є характерною як для ракових, так і ембріональних тканин) з включенням програм епітеліально-мезенхімального (ЕМП) та мезенхімально-епітеліального переходу (МЕП) [7–11].

У кінці ХХ століття було сформульовано поняття «інвазійний фронт пухлини» (ІФП) [12]. ІФП — це зона пухлинного росту на кордоні з прилеглою сполучною тканиною, для якої характерні десмоплазія, наявність пухлиноасоційованих фіброblastів, макрофагів, нейтрофілів, лімфоцитів та інших клітин. На думку деяких авторів, структурно-функціональні особливості ІФП можуть відображати агресивність пухлини і, відповідно, її прогноз краще, ніж

характеристики інших зон неопластичного осередку, і вказувати на індивідуальні особливості прогресування процесу та взаємодії між пухлиною та організмом [11–14]. Останніми роками з'являються роботи, в яких описано появу на початкових етапах інвазії ПК із осередка *Ca in situ* кластерів клітин із фенотипом «пухлинного брунькування» (*tumor budding/tumour bud phenotype* — ТВ). Цей морфологічний феномен пов'язаний з відщепленням однієї або кількох ПК від осередку малігнізації в навколишню строму у зоні ІФП [15, 16].

Метою нашого огляду є аналіз сучасних відомостей щодо структурних та функціональних особливостей ІФП як зони активного формування інвазійного та метастатичного фенотипу ПК на кордоні з прилеглою сполучною тканиною.

У локальному пухлинному процесі виділено принаймні два етапи: перший (неінвазійний) характеризується розвитком осередка малігнізованих клітин (*Ca in situ*), другий — інвазією ПК через БМ в прилеглу строму. Умовно можна виділити декілька стадій інвазії [17]. Першій стадії притаманно послаблення міжклітинних зв'язків внаслідок зменшення міжклітинних контактів і порушення міжклітинної адгезії. На другій стадії активуються фактори, які забезпечують мобільність ПК та їх контакт із міжклітинним матриксом; на третій — підвищується експресія інтегринів, що сприяє кращому прикріпленню клітин до структурних компонентів міжклітинного матриксу (ламінину, колагену, фібронектину). Надалі відбувається міграція ПК в органі та їх метастазування у регіонарні лімфатичні вузли та інші тканини. Описані стадії відображають складний багаторівневий патофізіологічний процес пухлинного прогресування, в якому відбуваються зміни низки характеристик ПК, пов'язаних із пластичністю

та генетичною нестабільністю останньої [14, 18]. Такі зміни залежать як від генезу пухлини, так і від низки інших факторів, у тому числі від стану системи сполучної тканини, метаболічного мікрооточення ПК, наявності запалення, роль яких при пухлинному рості продемонстрована у роботах класиків онкології академіків О.О. Богомольця, Р.Є. Кавецького та у сучасних дослідженнях [19–21].

Молекулярно-генетичні та морфологічні зміни як самих ПК, так і навколишнього середовища зумовлюють різні типи інвазійного росту. Виділяють індивідуальну інвазію поодинокими клітинами, колективну (групову) інвазію у вигляді клітинних пластів, відростків, комплексів та змішану форму інвазії. В експериментальних дослідженнях виявляють ще амебоподібний тип міграції ПК. Колективна форма інвазії спостерігається не тільки при пухлинному рості, але й при деяких фізіологічних процесах, зокрема морфогенезі та регенерації тканин [22]. Усі типи інвазії ПК пов'язані з порушеннями гомотипової (між клітинами одного генезу) або гетеротипової (між ПК та стромою) адгезії і можуть зумовлювати індивідуальні особливості пухлинного росту, зокрема його злоякісність [22–24]. Одним із чинників, який може впливати на тип інвазійного росту клітин ІФП, є щільність стромального компонента. За умови низької щільності екстрацелюлярного матриксу колективна та амебоподібна інвазія більш інтенсивні, натомість за умови високої щільності екстрацелюлярного матриксу більш ефективною є інвазія поодиноких ПК. Це пояснюють властивостями окремих клітин, які звільняють собі місце для руху за рахунок підвищення експресії протеаз, а також різною активністю утворення фокальних контактів зі стромою залежно від рівня гіпоксія-індуцибельного фактора-1 α (HIF-1 α) [23, 25].

Різноманітні типи інвазії є підтвердженням пластичності механізмів міграції ПК, які зараз детально досліджуються при ЕМП, МЕР та мезенхімально-амебоподібному переході (МАП). Значення ЕМП та МЕР у прогресії неопластичних процесів (у тому числі при формуванні ТВ-фенотипу ПК) детально описано у літературі [9, 11, 14, 26]. МАП притаманний фібробластоподібним клітинам, які можуть округлятися і рухатися як амеби за рахунок утворення протрузі цитоплазми. Порівняння швидкості міграції клітин за мезенхімальним та амебоподібним типом визначає перевагу останнього [24]. Механізми і причини МАП остаточно не визначені, встановлено лише, що при амебоподібному русі ПК відсутні фокальні контакти до позаклітинного матриксу.

У зону ІФП ПК первинного пухлинного осередку потрапляють через БМ, стан якої має важливе значення для інвазії. Так, при *Ca in situ* молочної залози, за умови незначних порушень структури БМ (зниження чіткості її контуру), кількість інвазованих у сполучну тканину ПК не перевищує 19%, тоді як за відсутності БМ інвазія ПК збільшується до 81% [27]. У зоні інвазії ПК з'являються ознаки

лізису не тільки БМ, але і міжклітинного матриксу. На прикладі раку молочної залози (РМЗ) показано, що окремі ПК відділяються від паренхіми преінвазійного осередку, мігрують між міоепітеліальними клітинами, через БМ або через розриви останньої. Характерною ознакою преінвазійних карцином молочної залози є фокальні розриви міоепітелію, які за розмірами більші за загальну площу трьох ПК. Такі розриви відмічають майже у 15% зразків операційного матеріалу, їх частота у різних ділянках пухлини варіабельна і коливається від повної відсутності до значного розповсюдження (іноді до $\frac{1}{3}$ поверхні БМ) [28].

ПК ІФП притаманний ряд молекулярних змін. Зокрема, показано, що у деградації БМ, інвазії та міграції ПК (включаючи клітини з фенотипом ТВ), прогресуванні пухлинного росту задіяна низка мікроРНК (miR): miR-9, -20a, -21, -106a, -181b, -200, -203. Загалом є відомості про зв'язок згаданих вище процесів у ІФП зі змінами експресії (за типом down- або up-регуляції) 11 мікроРНК як у ПК, так і у клітинах мікрооточення. При раку підшлункової залози (РПЗ), товстої кишки (РТК) важливу роль відводять, зокрема, down-регуляції у ПК miR-200 (-200b та -200c). Є дані про відмінності у експресії аналогічних мікроРНК у ПК центрального осередку пухлини і ІФП, а також про зв'язок спрямованості та ступеня змін експресії деяких мікроРНК у стромі із віддаленістю від центру новоутворення [11, 27–33]. Заслужує на увагу подібність спектра задіяних у формуванні ІФП мікроРНК та переліку мікроРНК, експресія яких змінюється при ЕМП (miR-9, -21, -181, -200, -203, -210) [8].

З погляду аналізу молекулярно-біологічних особливостей ІФП становлять значний інтерес результати дослідження РМЗ щодо експресії CD44 (маркер адгезії) і CD90 (маркер стовбурових клітин жирової тканини). Встановлено, що за експресією цих молекул ПК по периферії пухлини відрізняються від ПК у її центрі. По периферії пухлин (на кордоні з CD90⁺ стромою) ПК мають фенотип базальноподібних клітин CD44⁺/CD90⁺, тоді як клітини у центральних зонах — фенотип нормальних люмінальних клітин CD44⁺/CD90⁻ [34]. Відмічена також варіабельність експресії CD44 у стромі, яка була меншою як навколо окремих пухлинних гнізд, так і в інтра-туморальній стромі [35]. Слід відзначити, що CD44 і його ізоформи є мультимодальними сигнальними молекулами, основними рецепторами гіалуронану (гіалуронової кислоти), зв'язок з яким має надзвичайне значення для проникнення клітин у позаклітинний матрикс [36]. Гіалуронан (основний компонент матриксу нормальної сполучної тканини) відіграє важливу роль у гідродинаміці тканин, а також у процесах проліферації та міграції клітин. Порушення зв'язків гіалуронану з рецепторними макромолекулами сприяють промоції злоякісного фенотипу клітин, змінам експресії і функцій мікроРНК, можуть брати участь у феноменах хіміо- та радіоре-

зистентності ракових стовбурових клітин. Існують також дані, що за особливих змін гіалуронан сприяє проліферації неприкріплених ПК [36–40]. В останні роки широкого обговорення набувають питання взаємодії гіалуронану з його рецепторами (CD44, RHAMM) з погляду ролі як в інвазії клітин і прогресуванні раку, так і у регуляції запалення, зокрема при РМЗ [41, 42].

В ІФП багатьох епітеліальних неоплазій відзначені зміни експресії трансмембранного гепаран-сульфатного протеоглікану клітинної поверхні Syndecan-1 (SDC1/CD138), який бере участь у багатьох клітинно-клітинних і клітинно-матриксних взаємодіях і, таким чином, у процесах проліферації, інвазії та метастазування, апоптозу ПК, а також пухлинного ангіогенезу [43]. Показано, що Syndecan-1 залучається у стимуляцію ракових стовбурових або тумор-ініціюючих клітин при рецидивах пухлинного росту та метастазуванні [44]. В окремих дослідженнях показано клінічне значення змін експресії Syndecan-1 в ІФП: кореляція зі ступенем злоякісності плоскоклітинного раку ротової порожнини [45]; несприятливе прогностичне значення щодо виживаності хворих на рак сечового міхура [46].

Серед інших молекулярних маркерів ІФП заслуговують на увагу протеїни галектин-1 і Cdc42 (Cell division control protein 42). Галектин-1 визначається в ядрах, цитоплазмі клітин, клітинній мембрані та екстрацелюлярному матриксі; бере участь у клітинно-клітинних і клітинно-матриксних взаємодіях, а також у регуляції проліферації. Його експресія асоційована з активацією матричних металопротеїназ (ММП)-9 та -14 і розвитком інвадоподій у клітинах [47, 48]. Протеїн Cdc42 експресується у багатьох пухлинах епітеліального генезу (РМЗ, РТК, рак легені (РЛ), рак шийки матки), задіяний у проліферації та міграції клітин за рахунок утворення філоподій. Його сумісна дія з галектином-1 зумовлює збільшення мобільності та інвазії ПК [49–51].

Ще один молекулярний маркер ІФП — контактин, експресія якого призводить до ремодуляції актинового скелета ПК, деградації екстрацелюлярного матриксу, набуття клітинами інвазійного фенотипу [52, 53]. До макромолекул, що регулюють інвазію і міграцію ПК ІФП, належить також протеїн Мена (4 ізоформи), залучений у регуляцію клітинної рухливості. Однією з ключових властивостей Мена є контроль «геометрії» актинових сіток у клітинах. Протеїни такого типу також контролюють адгезійні контакти кадгеринів, а як відомо, порушення адгезії змінює статус клітин від стабільного до рухливого, що підвищує здатність до інвазії та метастазування [54]. Порушення клітинної адгезії та динаміки формування мікротрубочок відбувається за збільшення експресії гена *RhoA*, який регулює форму, полярність та рухливість клітин в ІФП, що продемонстровано на прикладі раку передміхурової залози [55]. В інших дослідженнях зроблено акцент не лише на зменшенні експресії низки молекул

міжклітинної адгезії, але й на паралельних змінах в ІФП експресії *TP53*, секретії протеолітичних ензимів, а також на збільшенні клітинної проліферації та ініціації ангіогенезу [52, 56].

Значні порушення міжклітинної адгезії в ІФП, які проявляються у більшій (порівняно з центральним неопластичним осередком) дисоціації ПК, можуть бути зумовлені не тільки особливостями останніх, але і дією позаклітинних регуляторних макромолекул, які ремодулюють строму. Значну роль у процесах структурно-функціонального ремодельовання стромы ІФП (зокрема при РМЗ) відводять гіпоксія-індуцибельному фактору HIF-1 α та ММП, які залучаються у деградацію колагену шляхом зв'язування і взаємодії з низкою цитокінів, інтегринів, факторів росту, індукторів апоптозу, впливаючи таким чином на диференціацію ПК, їх адгезію та міграцію [57, 58]. Слід зауважити, що особливості реалізації перелічених чинників у межах ІФП епітеліальних злоякісних пухлин потребують більш детального вивчення.

Відокремлення ПК з осередку пухлини можна віднести до першого етапу складного біологічного процесу — інвазійно-метастатичного каскаду, прояви якого можуть мати значну між- та інтра-туморальну гетерогенність, визначаючи агресивність пухлинного росту [59, 60]. Клінічне значення мікроінвазії продемонстровано, зокрема, при аналізі показників виживаності хворих на РМЗ *in situ*: 3-річна виживаність без проявів захворювання за наявності мікроінвазії у зоні *Ca in situ* була меншою (89,5%), ніж за відсутності мікроінвазії (97,1%; $p = 0,009$) [61].

Таким чином, для ІФП характерна комплексність змін клітинних структур і екстрацелюлярного матриксу, їх синхронна взаємодія, яка може визначати селекцію ПК з інвазійно-міграційними властивостями та подальшу спрямованість пухлинного процесу — його стагнацію або прогресування. Гетерогенність молекулярного фенотипу ПК, міжклітинної адгезії, особливості взаємодії ПК і стромы в ІФП можуть бути причиною різного туморогенного потенціалу.

Окремого аналізу заслуговує морфологічний феномен ТВ. ТВ — це невеликі (від 1 до 4–5 клітин) кластери менш диференційованих ПК з відсутністю просвітів між ними і кровоносних судин. ТВ розташовуються не тільки у стромі ІФП, але і поза ним; ТВ утворюються шляхом інвазії ПК за межі БМ, яка оточує пухлинний осередок, і спостерігається у солідних пухлинах різного генезу (РТК, РМЗ, РПЗ, РЛ, рак ендометрія, шийки матки, стравоходу). Показано, що ТВ-клітини змінюють свою форму, трансформуючись як у круглі, так і веретеноподібні [62–69].

За локалізацією ТВ поділяють на пери- та інтра-туморальні. Їх частота у пухлинах і прилеглий стромі значно коливається. Наприклад, при раку стравоходу перитуморальні ТВ визначали у кількості 2–593, інтра-туморальні — 1–656 на 10 полів зору

мікроскопа ($\times 20$). Найбільша кількість ТВ асоціювалася з низьким ступенем диференціювання, розповсюдження пухлини, метастазами у лімфатичні вузли. Порівняння кількості ТВ з рецидивуванням захворювання і тривалістю життя пацієнтів виявило достовірний кореляційний зв'язок цих показників [69].

Більша частота ТВ асоціюється не тільки з розповсюдженням раку і виживаністю, але і з генетичними змінами у ПК. Характерною ознакою виявилася комбінація молекулярних маркерів *SNAIL1/ZEB1/ β -catenin*, експресія яких корелювала з кількістю ТВ, що може свідчити про існування budding-промотуючого профілю ПК та наявність певних відмінностей ТВ від інших («спокійних») клітин пухлини. Зокрема, показано, що клітинні кластери, які відщеплюються від пухлинного осередку або «розсовують» БМ, характеризуються мікросателітною нестабільністю, аберацією генів, мутацією онкогена *KRAS*, змінами експресії гена-супресора *PTEN*, атипичною експресією і локалізацією білків *c-erbB2* та Е-кадгерину. Перелічені зміни можуть сприяти посиленню проліферації, інвазії та мобільності ПК. У ТВ спостерігають також втрату інгібіторних впливів, локальне підвищення доступу ростових факторів, розвиток гіпоксії. Перелічені особливості можуть сприяти посиленню проліферації, інвазії та мобільності ПК, проліферації клітин-попередників або стовбурових клітин. Суттєве значення може мати прямий контакт пухлина-строма, при якому визначається експресія стромальних ММП, а також зміни експресії низки молекул, які можуть зумовлювати ЕМП [15, 65, 66, 70].

Хоча механізми зв'язку формування ТВ з ЕМП потребують подальшого вивчення, існує припущення, що наявність ТВ у пухлинах (РМЗ, РПЗ, РТК, РЛ) може відображати процес ЕМП. Встановлено, зокрема, що при РМЗ у виникненні ТВ (як і у прогресії та метастазуванні) відіграє роль зміна метилювання промоторів генів *TWIST1/TWIST2* і експресії відповідних транскрипційних факторів. Припускають, що в епітеліальних пухлинах ПК ІФП і стромальні клітини у безпосередньому мікрооточенні ТВ експресують репресорні транскрипційні фактори (*SNAIL1*, *ZEB1*, *ZEB2*), які задіяні в ЕМП, і, таким чином, формують ЕМП-ТВ-фенотип ПК [9, 15, 16, 62]. З іншого боку, є відомості, що велика кількість ТВ асоціюється з високим ступенем локальної запальної інфільтрації і наявністю некротичних осередків у пухлинах. Тому не можна виключити значення в індукції ЕМП і хронічного запалення, яким часто супроводжується розвиток епітеліальних пухлин [41, 42, 71].

Важливими є результати досліджень клінічного значення ТВ. У 2013 р. висунуто припущення, що ТВ є ранньою ознакою інвазії та метастатичного розповсюдження ПК РТК [72]. Підтвердженням цієї думки стали результати дослідження ТВ у біоптатах РТК (до неoad'ювантної терапії хворих). Ви-

явлено, що кількість ТВ достовірно залежала від стадії захворювання, наявності місцевих та віддалених метастазів і судинної інвазії. Це дало авторам підставу рекомендувати визначення ТВ у пухлинах як клінічно важливий маркер [73].

З метою визначення ТВ як маркера статусу лімфатичних вузлів у хворих на інвазійний РМЗ проведено дослідження, в якому продемонстровано, що значна кількість ТВ у біоптатах пухлин до операції та у видалених пухлинах корелювала з метастазами РМЗ у лімфатичні вузли та інвазією ПК у судини. На підставі цього висловлено припущення про можливість предиктивної оцінки метастатичного фенотипу пухлин РМЗ за кількістю інтратуморальних ТВ в ІФП. До характеристик, які свідчать про метастатичний потенціал клітин ТВ, відносять їх підвищену проліферативну активність, подальше утворення окремих пухлинних осередків, здатність до інвазії у вже існуючі судини або у васкулярні структури, що можуть генеруватися самими ТВ-клітинами. Прояву перелічених властивостей ТВ можуть сприяти фокальні розриви БМ пухлинного вузла, особливо за її лімфоцитарної інфільтрації [64, 70].

Кількісна оцінка ТВ може бути корисною і для прогнозування виживаності при злоякісних новоутвореннях. Про це свідчать показники 5-річної виживаності хворих на РТК: 65 і 91% відповідно у хворих з великою та невеликою кількістю ТВ у пухлинах [62]. За даними багатфакторного аналізу ризик смерті від колоректального раку за наявності >10 ТВ у гістологічному препараті збільшується у 2,6 раза [74]. Суттєве діагностичне і прогностичне значення кількості ТВ у пухлинах відзначено у хворих на рак різного генезу: РМЗ [64, 70, 75], РЛ (при діаметрі пухлини <2 см) [76], РПЗ [77], РТК [73, 74, 78–84]. Звертається увага на можливість визначення ТВ у біоптатах з метою предиктивної оцінки метастазів у лімфатичних вузлах [85].

Майже всі дослідники ТВ вказують на їх легку ідентифікацію у гістологічних препаратах пухлин. Загалом формується думка, що наявність інтрапухлинних ТВ як допоміжного прогностичного чинника може бути включено в комплекс показників для оцінки виживаності хворих. Але при такому аналізі, як підкреслюють деякі автори, необхідно враховувати і значення запалення у змінах стромального компонента пухлин [86].

Поряд із вищевикладеним на сьогодні питання можливості практичного використання підрахунку ТВ залишається відкритим. Інтернаціональне протиракове агентство (Union for International Cancer Control's — UICC) оцінює показник кількості ТВ як допоміжний морфологічний параметр, але його клінічне впровадження у діагностичну роботу поки що ускладнено через відсутність чітких кількісних значень для інтерпретації частоти ТВ залежно від морфології, стадії, ступеня диференціювання та гетерогенності пухлин різного генезу. Це диктує необхідність подальшого дослідження ТВ з розробкою

кількісних параметрів і системи оцінки (score) (подібної таким при РМЗ — Scharf-Bloom-Richardson's histological grading system, або Nottingham grading system) для стратифікації пухлин і визначення вагомості ТВ як індивідуального показника інвазійного росту та ступеня агресивності карциноми.

Таким чином, ІФП — це зона взаємопов'язаних процесів як у пухлинній, так і сполучній тканині, що оточує пухлинний осередок. Такі процеси проявляються молекулярно-генетичними, біохімічними і цитоморфологічними змінами, які спрямовані на активацію інвазії ПК. Остання координується і коригується взаємодією механізмів міжклітинної адгезії з ремодуляцією екстрацелюлярного матриксу, дією ростових факторів і цитокінів, які впливають на пластичність, інвазійність і міграцію ПК. Морфологічною ознакою початкової інвазії клітин в ІФП є ТВ, що розглядається як важлива ознака структурної та функціональної гетерогенності ПК, їх вірогідної дисемінації з первинного пухлинного осередку з подальшим розвитком рецидивів та метастазів. Враховуючи, що характер інвазії та кількість ТВ можуть бути додатковими діагностично-прогностичними критеріями агресивності пухлинного росту, акцент подальших досліджень має бути зроблений на визначенні характерних особливостей пухлин різного гістогенезу саме в ІФП, а також особливостей мікрооточення у цій зоні. Результати подальших комплексних досліджень у цьому напрямі сприятимуть оптимізації предиктивної оцінки прогнозу захворювання і персоналізації терапії хворих на рак.

ПОДЯКА

Автори висловлюють щирю подяку доктору медичних наук, професору З.Д. Савцовій за плідну дискусію, корисні зауваження і уважне ставлення.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Vasiliev YM. Reorganizations of molecular morphology of epithelial and conjunctive tissue cells in normal morphogenesis and carcinogenesis. *Biochemistry (Moscow)* 2008; **73** (5): 656–60 (in Russian).
- Chekhun VF, Sherban SD, Savgova ZD. Tumor heterogeneity — dynamical state. *Oncology* 2012; **14** (1): 4–12 (in Russian).
- Burrell RA, McGranahan N, Bartek J, Swanton C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature* 2013; **501**: 338–45.
- Marusyk A, Polyak K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta* 2010; **1805** (1): 105–17.
- Gerashchenko TS. Intra-tumor morphological heterogeneity of breast cancer and its relation to the expression of drug stability. Thesis of MD. Tomsk 2017. 24 p.
- Yang YL, Chu JY, Wang MR. Tumor genetic heterogeneity. *Yi Chuan* 2013; **35** (1): 1–9.
- Ma N. Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science* 2013. doi: 10.1126/science.1234850.
- Wu MJ, Chen YS, Kim MR, Chang CJ. Regulation of epithelial plasticity and cancer stemness via microRNAs. *J Mol Genet Med* 2016; **10**: 212. doi:10.4172/1747-0862.1000212.
- Galván J A, Zlobec I, Wartenberg M, et al. Expression of E-cadherin repressors SNAIL, ZEB1 and ZEB2 by tumour and stromal cells influences tumour-budding phenotype and suggests heterogeneity of stromal cells in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2015; **112** (12): 1944–50.
- Hu Z, Sun R, Curtis C. A population genetics perspective on the determinants of intra-tumor heterogeneity. *Biochim Biophys Acta* 2017; **1867** (2): 109–26.
- Paterson EL, Kazenwadel J, Bert AG, et al. Down-regulation of the miRNA-200 family at the invasive front of colorectal cancers with degraded basement membrane indicates EMT is involved in cancer progression. *Neoplasia* 2013; **15**: 180–91.
- Bryne M, Boysen M, Alfsen CG, et al. The invasive front of carcinomas. The most important area for tumour prognosis? *Anticancer Res* 1998; **18** (6B): 4757–64.
- Berezhnaya NM, Chekhun VF. Physiological system of conjunctive tissue and oncogenesis. II. Extracellular matrix and metastasis. *Oncology* 2016; **18** (3): 164–76 (in Russian).
- Bronsart P, Enderle-Ammour K, Bader M, et al. Cancer cell invasion and EMT marker expression — a three-dimensional study of the human cancer-host interface. *J Pathol* 2014; **234**: 410–22.
- Grigore AD, Jolly MK, Jia D, et al. Tumor budding: the name is EMT. Partial EMT. *J Clin Med* 2016; **5** (5): 51. doi: 10.3390/jcm5050051.
- Niwa Y, Yamada S, Koike M, et al. Epithelial to mesenchymal transition correlates with tumor budding and predicts prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol* 2014; **110** (6): 764–9.
- Anichkov NM. Tumor invasion. Stages of invasion of tumor cells. <http://meduniver.com/Medical/gistologia/1051.html> MedUniver.
- Pietras K, Ostman A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res* 2010; **316** (8): 1324–3.
- Osinsky S, Vaupel P. Tumor microphysiology. Kiev, Naukova Dumka 2009. 256 p. (in Russian).
- Berezhnaya NM, Chekhun VF. Physiological system of conjunctive tissue and oncogenesis. I. Role of cellular components of stroma in tumor development. *Oncology* 2016; **18** (1): 4–14 (in Russian).
- Vasilenko IV, Kondratyuk RB. Parenchymatous-stromal interrelations in tumors and their specifics in stomach cancer of intestinal and diffuse types. *Oncology* 2006; **8** (1): 7–12 (in Russian).
- Friedl P, Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; **10**: 445–57.
- Alexandrova A.Yu. Evolution of cell interactions with extracellular matrix in carcinogenesis. *Biochemistry (Moscow)* 2008; **73** (7): 915–24 (in Russian).
- Krahmal NV, Zavyalova MV, Denisov EB, et al. Invasion of tumor epithelial cells: mechanisms and manifestations. *Fena Naturale* 2015; **7** (2): 18–30 (in Russian).
- Bos R, Zhong H, Colleen F, et al. Levels of hypoxia-inducible factor-1 α during breast carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2001; **93** (4): 309–14.
- Karlsson MC, Gonzalez SF, Welin J, Fuxe J. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis through the lymphatic system. *Mol Oncol* 2017; **11** (7): 781–91.
- Gwak JM, Kim HJ, Kim EJ, et al. MicroRNA-9 is associated with epithelial-mesenchymal transition, breast cancer stem cell phenotype, and tumor progression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2014; **147** (1): 39–49.
- Bandyopadhyay S, Mitra R, Maulik U, et al. Development of the human cancer microRNA network. *Science* 2010; **1**: 6. doi: 10.1186/1758-907X-1-6.
- Kunej T, Godnic I, Horvat S, et al. Cross talk between microRNA and coding cancer genes. *Cancer J* 2012; **18** (3): 223–31.
- Karamitopoulou E, Haemmig S, Baumgartner U, et al. MicroRNA dysregulation in the tumor microenvironment influences the phenotype of pancreatic cancer. *Mod Pathol* 2017; **30** (8): 1116–25.

31. **Knudsen KN, Lindebjerg J, Nielsen BS, et al.** MicroRNA-200b is downregulated in colon cancer budding cells. *PLoS One* 2017; **12** (5): e0178564.
32. **Xie N, Wang C, Zhuang Z, et al.** Decreased miR-320a promotes invasion and metastasis of tumor budding cells in tongue squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2016; **7** (40): 65744–57.
33. **Luo D, Wilson GM, Harvel N, et al.** A systematic evaluation of miRNA: mRNA interactions involved in the migration and invasion of breast cancer cells. *J Translat Med* 2013; **11**: 57.
34. **Donnenberg VS, Donnenberg AD, Zimmerlin L, et al.** Localization of CD44 and CD90 positive cells to the invasive front of breast tumors. *Cytometry B Clin Cytom* 2010; **78** (5): 287–301.
35. **Almendo V, Fuster G.** Heterogeneity of breast cancer: etiology and clinical relevance. *Clin Transl Oncol* 2011; **13** (11): 767–73.
36. **Toole BP, Hascall VC.** Hyaluronan and tumor growth. *Am J Pathol* 2002; **161** (3): 745–7.
37. **Bourguignon LY, Shiina M, Li JJ.** Hyaluronan-CD44 interaction promotes oncogenic signaling, microRNA functions, chemoresistance, and radiation resistance in cancer stem cells leading to tumor progression. *Adv Cancer Res* 2014; **123**: 255–75.
38. **Orian-Rousseau V, Sleeman J.** CD44 is a multidomain signaling platform that integrates extracellular matrix cues with growth factor and cytokine signals. *Adv Cancer Res* 2014; **123**: 231–54.
39. **Thapa R, Wilson GD.** The importance of CD44 as a stem cell biomarker and therapeutic target in cancer. *Stem Cells Int* 2016; **208**: 7204.
40. **Yan Y, Zuo X, Wei D.** Concise Review: Emerging role of CD44 in cancer stem cells: a promising biomarker and therapeutic target. *Stem Cells Transl Med* 2015; **4** (9): 1033–43.
41. **Schwertfeger KL, Cowman MK, Telmer PG, et al.** Hyaluronan, inflammation, and breast cancer progression. *Front Immunol* 2015; **8** (6): 236.
42. **Misra S, Hascall VC, Markwald RR, Ghatak S.** Interactions between hyaluronan and its receptors (CD44, rhamm) regulate the activities of inflammation and cancer. *Front Immunol* 2015; **6** (6): 201.
43. **Palaiologou M, Delladetsima I, Tiniakos D.** CD138 (syndecan-1) expression in health and disease. *Histol Histopathol* 2014; **29** (2): 177–89.
44. **Gharbaran R.** Advances in the molecular functions of syndecan-1 (SDC1/CD138) in the pathogenesis of malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 2015; **94** (1): 1–17.
45. **Kurokawa S, Zhang M, Matsumoto S, et al.** Reduced syndecan-1 expression (CD138) is correlated with the histological grade of malignancy at the deep invasive front in oral squamous cell carcinoma. *Oral Pathol Med* 2006; DOI: 10.1111/j.1600–0714.2006.00412.x.
46. **Szarvas T, Reis H, Kramer G, et al.** Enhanced stromal syndecan-1 expression is an independent risk factor for poor survival in bladder cancer. *Hum Pathol* 2014; **45** (4): 674–82.
47. **Cousin JM, Cloninger MJ.** The Role of Galectin-1 in Cancer Progression, and Synthetic Multivalent Systems for the Study of Galectin-1. *Int J Mol Sci* 2016; **17** (9): pii: E1566. doi: 10.3390/ijms17091566.
48. **Ito K, Stannard K, Gabutero E, et al.** Galectin-1 as a potential target for cancer therapy: role in the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev* 2012; **31** (3–4): 763–78.
49. **Stengel K, Zheng Y.** Cdc42 in oncogenic transformation, invasion, and tumorigenesis. *Cell Signalling* 2011; **23** (9): 1415–23.
50. **Arias-Romero LE, Chernoff J.** Targeting Cdc42 in cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2013; **17** (11): 1263–73.
51. **Ye H, Zhang Y, Geng L, Li Z.** Cdc42 expression in cervical cancer and its effects on cervical tumor invasion and migration. *Int J Oncol* 2015; **46** (2): 757–63.
52. **Sharma M, Sah P, Sharma SS, Radhakrishnan R.** Molecular changes in invasive front of oral cancer. *J Oral Maxillofac Pathol* 2013; **17** (2): 240–7.
53. **Park SY, Gonen M, Kim HJ, et al.** Cellular and genetic diversity in the progression of in situ human breast carcinomas to an invasive phenotype. *J Clin Invest* 2010; **120**: 636–44.
54. **Goswami S, Philippar U, Sun D, et al.** Identification of invasion specific splice variants of the cytoskeletal protein Mena present in mammary tumor cells during invasion *in vivo*. *Clin Exp Metastasis* 2009; **26** (2): 153–9.
55. **Chen W, Delongchamps NB, Mao K, et al.** High RhoA expression at the tumor front in clinically localized prostate cancer and association with poor tumor differentiation. *Oncol Lett* 2016; **11** (2): 1375–81.
56. **Kato K, Kawashiri S, Tanaka A, et al.** Predictive value of measuring p53 labeling index at the invasive front of oral squamous cell carcinomas. *Pathol Oncol Res* 2008; **14**: 57–61.
57. **Bos R, Zhong H, Colleen F, et al.** Levels of hypoxia-inducible factor-1 α during breast carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2001; **93** (4): 309–14. <https://biomolecula.ru/articles/mikromkn-umenshaiut-shum-ekspressii-genov>.
58. **Rogova LN, Shesrernina NV, Zamechnik TV, et al.** Matrix metalloproteinases, their role in physiological and pathological processes (Review). *Vestn Novyh Med Technol* 2011; **18** (2): 86–92 (in Russian).
59. **Ng CK, Pemberton HN, Reis-Filho JS.** Breast cancer intratumor genetic heterogeneity: causes and implications. *Expert Rev Anticancer Ther* 2012; **12** (8): 1021–32.
60. **Beca F, Polyak K.** Intratumor heterogeneity in breast cancer. *Adv Exp Med Biol* 2016; **882**: 169–89.
61. **Fang Y, Wu J, Wang W, et al.** Biologic behavior and long-term outcomes of breast ductal carcinoma *in situ* with microinvasion. *Oncotarget* 2016; **27** (39): 64182–90.
62. **Dawson H, Lugli A.** Molecular and pathogenetic aspects of tumor budding in colorectal cancer. *Front Med (Lausanne)* 2015; **10** (2): 11.
63. **Graham RP, Vierkant RA, Tillmans LS, et al.** Tumor budding in colorectal carcinoma: confirmation of prognostic significance and histologic cutoff in a population-based cohort. *Am J Surg Pathol* 2015; **39** (10): 1340–6.
64. **Salhia B, Trippel M, Pfaltz K, Tapia C.** High tumor budding stratifies breast cancer with metastatic properties. *Breast Cancer Res Treat* 2015; **150** (2). DOI: 10.1007/s10549-015-3333-3.
65. **Wartenberg M, Centeno I, Haemmig S, et al.** PTEN alterations of the stromal cells characterise an aggressive subpopulation of pancreatic cancer with enhanced metastatic potential. *Eur J Cancer* 2016; **65**: 80–90.
66. **Morales-Oyarvide V, Mino-Kenudson M.** High-grade lung adenocarcinomas with micropapillary and/or solid patterns: a review. *Curr Opin Pulm Med* 2014; **20** (4): 317–23.
67. **Koyuncuoglu M, Okyay E, Saatli B, et al.** Tumor budding and E-Cadherin expression in endometrial carcinoma: Are they prognostic factors in endometrial cancer? *Gynecol Oncol* 2012; **125**: 208–13.
68. **Huang B, Cai J, Xia Xu X, Wang Z.** High-grade tumor budding stratifies early-stage cervical cancer with recurrence risk. *Plos One* 2016; **11** (11): e0166311.
69. **Nowak JA, Agoston A, Zheng Y, et al.** Tumor budding is a predictor of nodal metastasis and tumor recurrence in T1 esophageal adenocarcinoma. *Mod Pathol* 2013; **26**: 169A.
70. **Zhang XC, Hashemi SS, Yousefi M, et al.** Atypical expression of c-erbB2 in cell clusters overlying focally disrupted breast myoepithelial cell layers: a potential sign for increasing cell motility and invasion. *Int J Biol Sci* 2008; **4**: 259–69.
71. **Khalafalla FG, Khan MW.** Inflammation and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic ductal adenocarcinoma: fighting against multiple opponents. *Cancer Growth Metastasis* 2017; doi: 10.1177/1179064417709287. eCollection 2017.
72. **Jiang B, Mason J, Jewett AA, et al.** Cell budding from normal appearing epithelia: a predictor of colorectal cancer metastasis? *Int J Biol Sci* 2013; **9** (1): 119–33.
73. **Rogers AC, Gibbons D, Hanly AM, et al.** Prognostic significance of tumor budding in rectal cancer biopsies before neo-adjuvant therapy. *Mod Pathol* 2014; **27**: 156–62.

74. **Graham RP, Vierkant RA, Tillmans LS, et al.** Tumor budding in colorectal carcinoma: confirmation of prognostic significance and histologic cutoff in a population-based cohort. *Am J Surg Pathol* 2015; **39** (10): 1340–6.

75. **Gujam FJA, McMillan DC, Mohammed ZMA, et al.** The relationship between tumour budding, the tumour microenvironment and survival in patients with invasive ductal breast cancer. *Br J Cancer* 2015; **113**: 1066–74.

76. **Yamaguchi Y, Ishii G, Kojima M, et al.** Histopathologic features of the tumor budding in adenocarcinoma of the lung. *J Thor Oncol* 2010; **5** (9): 1361.

77. **Kohler I, Bronsert P, Timme S, et al.** Detailed analysis of epithelial-mesenchymal transition and tumor budding identifies predictors of long-term survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2015; **30** (Suppl 1): 78–84.

78. **Lugli A, Vlainic T, Giger O, et al.** Intratumoral budding as a potential parameter of tumor progression in mismatch repair-proficient and mismatch repair-deficient colorectal cancer patients. *Hum Pathol* 2011; **42**: 1833–40.

79. **Wang LM, Kevans D, Mulcahy H, et al.** Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* 2009; **33**: 134–41.

80. **Guzinska-Ustymowicz K.** The role of tumour budding at the front of invasion and recurrence of rectal carcinoma. *Anticancer Res* 2005; **25** (2B): 1269–72.

81. **Koelzer VH, Zlobec I, Lugli A.** Tumor budding in colorectal cancer-ready for diagnostic practice? *Hum Pathol* 2016; **47** (1): 4–19.

82. **Markl B, Markl M, Schaller T, et al.** A new simple morphology-based risk score is prognostic in stage I/II colon cancers. *Cancer Med* 2016; **5** (7): 1492–501.

83. **Zhang S, Zhang D, Yang Z, Zhang X.** Tumor budding, micropapillary pattern, and polyploidy giant cancer cells in colorectal cancer: current status and future prospects. *Stem Cells Int* 2016; **2016**: 4810734. doi: 10.1155/2016/4810734.

84. **Kai K, Aishima S, Aoki S, et al.** Cytokeratin immunohistochemistry improves interobserver variability between unskilled pathologists in the evaluation of tumor budding in T1 colorectal cancer. *Pathol Int* 2016; **66**: 75–82.

85. **Zlobec I, Hädrich M, Dawson H, et al.** Intratumoural budding (ITB) in preoperative biopsies predicts the presence of lymph node and distant metastases in colon and rectal cancer patients. *Br J Cancer* 2014; **110**: 1008–13.

86. **Max N, Harbaum L, Pollheimer MJ, et al.** Tumour budding with and without admixed inflammation: two different sides of the same coin? *Br J Cancer* 2016; **114** (4): 368–71.

INVASIVE FRONT OF CARCINOMA: MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR FEATURES, ASSOCIATION WITH PROGRESS OF TUMOR GROWTH

L.Z. Polishchuk, T.A. Magas

Summary. *The aim of the review is to analyze the current data of structural and functional features of the invasive tumor front as an active formation zone of the invasive and metastatic phenotype of tumor cells at the border with the surrounding connective tissue. The complexity and mutual dependence of molecular, genetic, biochemical and cytomorphological changes of the tumor cells, associated with the activation of their invasion — the cardinal stage of the progression of the tumor process, is shown. An important morphological characteristic of invasive tumor front is the presence of tumor budding cluster of tumor cells that are considered as markers of inter- and intratumor heterogeneity and a morphological criterion for assessing the aggressiveness of tumors of the epithelial genesis.*

Key Words: invasive tumor front, invasion, adhesion, migration, molecular mechanisms, tumor budding, diagnostic and prognostic value.

Адреса для листування:

Поліщук Л.З.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

E-mail: lzpol@i.ua

Одержано: 10.10.2017