Министерство образования и науки Российской Федерации
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (НИ ТГУ)
Институт биологии, экологии, почвоведения, сельского и лесного хозяйства
(Биологический институт)
Кафедра цитологии и генетики

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ В ГЭК

Руководитель ООП
докт. биол. наук, директор
_____ Д.С. Воробьев
«13» мая 2019 г.

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА БАКАЛАВРА

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ, ВОВЛЕЧЕННЫЕ В ИНВАЗИЮ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

по основной образовательной программе подготовки бакалавров
направление подготовки 06.03.01 – Биология

Новиков Никита Михайлович

Руководитель ВКР
канд.биол.наук
_____ Е.В.Денисов
подпись
«13» мая 2019 г.

Автор работы
студент группы № 01501
_____ Н.М.Новиков
подпись

Томск – 2019

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 3
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР 5
1.1 Генетические основы канцерогенеза 5
1.2 Инвазия и метастазирование 8
1.2.1 Метастазирование и активация программы инвазии 8
1.2.2 Способы движения опухолевых клеток 10
1.2.3 Молекулярные механизмы клеточной миграции 14
1.2.4 Пластичность опухолевых клеток 16
1.2.5 Инвазия и микроокружение опухоли 17
1.3 Генетические аспекты инвазии и метастазирования 18
2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 21
2.1 Материал исследования 21
2.2 Методы исследования 22
2.2.1 Выделение ДНК 22
2.2.2 Анализ качества и количества образцов ДНК 23
2.2.3 Подготовка ДНК-библиотек для полноэкзомного секвенирования 24
2.2.4 Секвенирование ДНК-библиотек 28
2.2.5 Биоинформатическая и статистическая обработка данных полноэкзомного секвенирования 29
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ 30
3.1 Мутационный ландшафт опухолей с индивидуальной и коллективной инвазией 30
3.2 Сигнальные пути в опухолях с индивидуальной и коллективной инвазией 34
3.3 Генетические нарушения в опухолях с индивидуальной инвазией: вовлеченность в движение опухолевых клеток 37
ВЫВОДЫ 42
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 43

ВВЕДЕНИЕ

Метастазирование является основной причиной смерти от онкологических заболеваний. Ежегодно от метастазов рака молочной железы (РМЖ) умирает примерно 500 тысяч больных (WHO). Несмотря на значительные успехи, достигнутые в понимании молекулярных процессов и основ метастазирования, этот процесс все еще остается по большей части неизученным (Lambert et al., 2017). Исследование метастатического каскада, поиск новых молекулярных мишеней для дальнейшей разработки таргетных препаратов является приоритетной задачей молекулярной онкологии (Masoud & Pages, 2017).

Инвазия – это первый этап метастатического каскада, проявляющийся в миграции клеток опухоли из первичного очага в прилежащие ткани через базальную мембрану. Инвазия опухолевых клеток сопровождается разрушением внеклеточного матрикса. Выделяют два типа инвазивного роста злокачественно измененных клеток – коллективную и индивидуальную инвазию (Friedl et al., 2011).

Индивидуальная инвазия – процесс направленного движения одиночных или небольших групп опухолевых клеток (Krakhmal et al., 2015). Индивидуальная инвазия представляет наибольший интерес для изучения, так как является признаком агрессивного течения злокачественных новообразований и ассоциирована с высокой вероятностью лимфогенного и гематогенного метастазирования (Che et al., 2017).

Способ миграции зависит от микроокружения опухоли и, вероятно, от молекулярных перестроек в раковых клетках. Эпигенетические нарушения, регулирующие процесс метастазирования, описаны в литературе. Однако информация о генетических мутациях, вовлеченных в процесс миграции опухолевых клеток, практически отсутствует. Вероятно, это связано с отсутствием эффективной модели *in vivo* для изучения механизмов опухолевой инвазии. Тем не менее, с развитием технологий массивного параллельного секвенирования изучение генетического ландшафта опухолей и его роли в инвазивном росте вышло на новый уровень. Уже проведен сравнительный анализ экзома опухолевых клеток из первичного очага, циркулирующих в крови опухолевых клеток, а так же отдаленных метастазов (Krøigård et al., 2018). Данное исследование было направлено на анализ генетических нарушений, которые опухолевые клетки приобретают при развертывании программы метастатического каскада. Однако в

литературе отсутствует информация о генетических особенностях опухолей, демонстрирующих разные типы инвазивного роста. Анализ генома (экзома) опухолевых клеток, двигающихся индивидуально или коллективно, позволит идентифицировать генетические нарушения, связанные с агрессивной индивидуальной инвазией, и потенциальные молекулы-мишени, воздействуя на которые, можно будет предотвратить метастазирование опухоли.

Цель исследования: поиск генетических нарушений, ассоциированных с индивидуальным вариантом инвазивного роста опухолей молочной железы.

Задачи исследования:

1. Провести сравнительный анализ мутационного ландшафта опухолей с индивидуальным и коллективным вариантами инвазивного роста.
2. Оценить выраженность сигнальных путей, вовлеченных в движение клеток, в опухолях с индивидуальным и коллективным вариантами инвазивного роста.
3. Найти генетические нарушения, уникальные для индивидуального варианта инвазивного роста и оценить их потенциальный вклад в движение опухолевых клеток.

Автор выражает благодарность сотрудникам НИИ онкологии Томского НИМЦ за помощь в выполнении данной работы и за предоставленный исследуемый материал.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Генетические основы канцерогенеза

Рак (злокачественная опухоль) – это группа заболеваний, характеризующихся появлением быстро делящихся злокачественных клеток, которые способны к внедрению в прилежащие ткани и метастазированию в отдаленные органы с образованием вторичных очагов поражения. Рак является основной причиной смерти в мире. Согласно данным ВОЗ, количество смертей от злокачественных опухолей в 2018 году составило примерно 9.6 миллионов.

Согласно общепринятой на данный момент теории канцерогенеза, развитие большинства типов рака генетически детерминировано. Злокачественная трансформация и опухолевая прогрессия определяются множеством этиологических агентов, таких как радиация, вирусы и химические факторы. Все эти агенты так или иначе воздействуют на генетический аппарат клетки, вызывая изменения в геноме, ведущие к нарушению механизмов контроля пролиферации и апоптоза (Hanahan & Weinberg, 2000). Таким образом, появление опухоли и ее прогрессия обеспечиваются различными генетическими и эпигенетическими изменениями. Мутации в генах, обеспечивающих пролиферативное преимущество для злокачественно измененных клеток, могут происходить как в соматических клетках самого организма, так и наследственно передаваться от родителей (наследственная предрасположенность) (Vogelstein & Kinzler, 2004).

Гены, которые способны стимулировать образование злокачественной опухоли, получили название онкогенов. Онкогены в подавляющем большинстве участвуют в регуляции клеточной пролиферации и клеточного цикла, и мутации таких генов ведут к малигнизации нормальных клеток. Нарушения (транслокации, амплификации и миссенс-мутации) в онкогенах происходят в одном и том же месте в различных типах опухоли, и часто затрагивают один и тот же кодон или же кластер кодонов. Подобные мутации индуцируют экспрессию онкогенов и повышают активность кодируемых ими белков. Активирующей мутации даже в одном аллеле онкогена вполне достаточно для обеспечения пролиферативного преимущества мутантной клетки по сравнению с другими (Vogelstein & Kinzler, 2004). В случае с РМЖ наиболее известными онкогенами являются *ErbB2*, *MYC*, *PIK3CA* и *CCND1* (Lee & Muller, 2010).

Гены, мутации которых ведут к ослаблению негативного контроля пролиферации и нарушениям апоптоза, называются генами-супрессорами опухоли (онкосупрессорами). Мутации онкосупрессоров могут происходить по всей длине гена, и приводить к различным нарушениям – от миссенс-мутаций, ведущих к появлению функционально измененного белка, до значительных делеций или инсерций, ведущих к возникновению укороченных вариантов белка (Vogelstein & Kinzler, 2004). Ген-супрессор опухоли должен быть полностью «выключен», чтобы приводить к увеличению пролиферативного потенциала мутантной клетки, то есть оба аллеля онкосупрессора должны быть функционально неактивны. Подобное явление может обеспечиваться делецией интактного аллеля (феномен потери гетерозиготности), при этом мутантный аллель остается один в геноме и обеспечивает формирование мутантного фенотипа (Ryland et al., 2015). В случае с РМЖ наиболее известными генами-супрессорами опухоли являются *TP53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *RB1* и *PTEN* (Lee & Muller, 2010).

Третий класс генов, которые играют важнейшую роль в опухолевой трансформации и прогрессии, получил название генов стабильности, или «стражей», «смотрителей» генома. В этот класс включены гены, ответственные за репарацию ДНК и поддержание целостности хромосом в процессе митоза. Основной функцией генов этого класса является поддержание стабильности генома, поскольку мутации в них приводят к увеличению геномной нестабильности в клетке. Как и в случае с онкосупрессорами, в ходе эволюции опухоли гены-«стражи» генома, как правило, инактивируются за счёт появления мутаций в обоих аллелях (Vogelstein & Kinzler, 2004).

Генетическая нестабильность, обеспечиваемая нарушениями работы «стражей» генома, является универсальной характеристикой всех видов злокачественных опухолей. Частота случайных мутаций чрезвычайно низка, что входит в противоречие с частотой возникновения раковых заболеваний. Для объяснения этого противоречия была предложена гипотеза мутаторного фенотипа. На самых ранних этапах канцерогенеза происходят такие изменения нормальной клетки, которые приводят к резкому повышению частоты мутаций. Мутации в генах стабильности генома приводят к резкому скачку генетической, или геномной, нестабильности. Геномная нестабильность является причиной и основой эволюции раковых заболеваний, она обеспечивает их генетическую, физиологическую и морфологическую гетерогенность, ведет к увеличению клонального разнообразия злокачественно измененных клеток (Yao & Dai, 2014).

Помимо описанного разделения на онкогены и гены-супрессоры, в литературе так же выделяют и два типа мутаций. Драйверные мутации, происходящие преимущественно в генах, ответственных за изменение пролиферативного потенциала, дают опухолевым клеткам преимущество по сравнению с нормальными клетками. Мутации-пассажиры не дают подобных преимуществ, но могут фенотипически проявляться при изменении окружающих условий. В основном именно мутации-пассажиры обеспечивают генетическое разнообразие и, соответственно, генетическую гетерогенность опухоли (Pon et al., 2015).

Драйверные гены могут содержать в себе не только драйверные мутации, но и мутации-пассажиры. Так, ген *APC* содержит разнообразные мутации при колоректальном раке, но только мутации, “усекающие” продукт этого гена с N-конца, являются драйверными (Fodde, 2002). Различные статистические методы применяются для того, чтобы различить драйверные и пассажирские мутации. В определенных случаях статистика не является необходимой для идентификации типа мутации. Так, например, хорошо известные гены-супрессоры опухолевого роста *TP53* и *KRAS* очень часто мутированы во многих видах рака, и представляют собой своего рода «горы» мутационного ландшафта. Тем не менее, большая часть генетических нарушений в опухоли встречается намного реже, и представляет собой «холмы» мутационного ландшафта. Таким образом, определять драйверные мутации и драйверные гены лишь на основании частоты мутирования не представляется возможным. Тем не менее, абсолютно ясно, что онкогены и супрессоры опухолевого роста являются драйверами, просто исходя из определения «драйверности». Было предложено «правило 20/20», при котором ген считается онкогеном, если >20% известных мутаций этого гена находятся в повторяющейся среди разных опухолей позиции и являются миссенс-мутациями; ген считается опухолевым супрессором, если >20% известных мутаций этого гена инактивируют его (Vogelstein et al., 2013).

Классические эпидемиологические и современные молекулярно-генетические исследования указывают на то, что для развития солидных опухолей необходимо от 5 до 8 нарушений в драйверных генах. Достаточно хорошо процесс трансформации нормальной ткани в опухолевую был изучен на модели колоректального рака; однако полученные данные справедливы и для других типов карцином (Takami et al., 1995). В здоровой клетке происходит случайная мутация в гене-«привратнике», которая способствует приобретению преимущества над остальными клетками ткани. Последующие мутации в

онкогенах, генах-супрессорах и генах-«стражах» генома усиливают пролиферацию опухоли, обеспечивая активный рост, генетическую нестабильность и появление гетерогенности. Последний этап эволюции опухоли характеризуется появлением у злокачественных клеток способности к внедрению (инвазии) в окружающие ткани через разрушение базальной мембраны и распространению по организму человека, т.е. метастазированию (Vogelstein et al., 2013).

1.2 Инвазия и метастазирование

1.2.1 Метастазирование и активация программы инвазии

Инвазия и метастазирование опухолевых клеток были выделены как одни из ключевых признаков раковых заболеваний (Hanahan & Weinberg, 2011). Метастазирование является финальным актом опухолевой прогрессии. Метастазы расселяются по всему организму, проникают в отдаленные ткани и органы, образуют вторичные очаги поражения, что приводит к смерти от тяжелой органной недостаточности. Понимание глубинных механизмов, лежащих в основе метастатического расселения опухолевых клеток, чрезвычайно важно для дальнейшей разработки лекарственных препаратов и успешного лечения онкологических заболеваний (Jiang et al., 2015).

Метастатический каскад является комплексным процессом, состоящим из нескольких этапов, через которые должна пройти опухолевая клетка на пути в орган-мишень: инвазия в прилежащие ткани, интравазация в кровеносные сосуды, выживание и циркуляция в кровотоке, экстравазация и последующая колонизация органа с образованием вторичного очага (Рисунок 1). Помимо основного процесса, метастазирование так же включает и подготовку органа к заселению опухолевыми клетками, то есть образование преметастатических ниш (Valastyan & Weinberg, 2011).

Первым этапом метастатического каскада опухоли является инвазия. Морфологически инвазия проявляется в отделении клеток от общего массива опухоли, приобретении ими способности к аномально высокой подвижности и внедрению в окружающие ткани через базальную мембрану (Sahai, 2005). Группы или слои клеток, находящиеся непосредственно на переднем крае инвазирующей опухоли и обладающие наибольшим метастатическим потенциалом, обладают наиболее агрессивными

свойствами и составляют так называемый инвазивный фронт (Bànkfalvi & Piffkò, 2000). Механизмы, необходимые для распространения опухолевых клеток, активно работают именно на границе опухоли и нормальной ткани, и включают в себя приобретение или потерю молекул адгезии, секрецию протеолитических ферментов, инициацию ангиогенеза и усиление клеточной пролиферации (Rivera & Venegas, 2014).

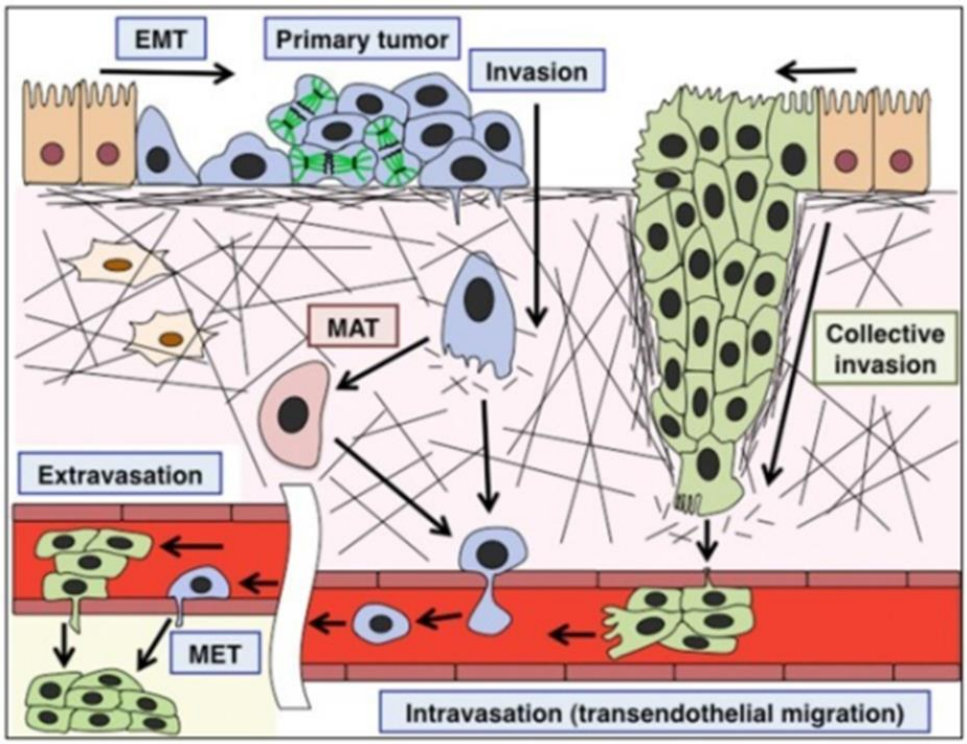


Рисунок 1 – Модель опухолевой инвазии и метастазирования (Kawauchi, 2012).

Примечание: EMT – эпителиально-мезенхимальный переход, MAT – мезенхимально-амебоидный переход (МАП).

Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) рассматривается как ключевой механизм запуска метастатического каскада. Этот процесс характерен для различных видов карцином, в том числе и для РМЖ, и характеризуется потерей клеткой эпителиальных характеристик и приобретением мезенхимального фенотипа (Kalluri & Weinberg, 2009). ЭМП наделяет клетки карцином не только повышенной подвижностью, но и способствует их иммортализации, предотвращает апоптоз, делает клетки резистентными к химио- и радиотерапии (Thiery et al., 2009). Одним из ключевых признаков ЭМП является уменьшение экспрессии или сайленсинг Е-кадгерина, являющегося важным компонентом межклеточных контактов. Последующая активация мезенхимальных маркеров – виментина и N-кадгерина – приводит к перестройкам актинового цитоскелета. Изменение экспрессии эпителиальных и мезенхимальных

маркеров обеспечивается транскрипционными факторами Snail/SNAI1, Slug/SNAI2, SIP1/ZEB2 и Twist. Таким образом, клетки, подвергшиеся ЭМП, утрачивают связь друг с другом, отделяются от эпителиального слоя и приобретают способность к движению (Thiery et al., 2009). Гибридный, или частичный ЭМП – явление, при котором опухолевые клетки могут иметь одновременно как эпителиальные, так и мезенхимальные характеристики. Гибридный ЭМП в основном характерен для опухолевых кластеров, представляющих собой вариант коллективной инвазии (Jolly et al., 2015).

Известны другие механизмы, запускающие опухолевую инвазию в прилежащие ткани. Для клеток меланомы описано явление коллективно-амебоидного перехода (КАП), при котором опухолевые клетки отделяются от опухолевого массива и приобретают амебоидный, а не мезенхимальный, фенотип (Hegerfeldt et al., 2002). Известно, что КАП способствуют факторы, индуцирующие гипоксию (в частности, HIF1), что сопровождается уменьшением экспрессии Е-кадгерина (Lehmann S. et al., 2017). Тем не менее, процесс КАП на сегодняшний день слабо изучен.

Опухолевые клетки используют для миграции те же механизмы, что и нормальные клетки. Здоровые клетки организма способны передвигаться коллективно и индивидуально, используя мезенхимальный или амебоидный тип миграции. Злокачественные клетки под влиянием различных внешних и внутренних факторов приобретают способность к движению (Friedl P., 2004).

1.2.2 Способы движения опухолевых клеток

В зависимости от молекулярных перестроек в клетках и влияния микроокружения на опухоль злокачественные клетки способны мигрировать индивидуально или коллективно (Рисунок 2) (Pandya et al., 2017).

Коллективная миграция – это процесс движения физически и функционально связанных между собой опухолевых клеток. Этот тип миграции доминирует при РМЖ, колоректальном раке и раке эндометрия (van Zijl et al., 2011). Коллективная инвазия опухолевых клеток может проходить в виде кластеров, коротких тяжей, цепочек, широких полей и дуктул (Friedl & Alexander, 2011).

У коллективно движущейся группы клеток выделяют ведущий или лидирующий край и задний фронт. Клетки на переднем крае, так называемые клетки-лидеры, имеют выраженный мезенхимальный фенотип, активно экспрессируют протеазы и интегрины и формируют псевдоподии. Клетки заднего фронта, или клетки-последователи, поддерживают межклеточные контакты и опосредованно участвуют в процессе миграции (Friedl & Alexander, 2011).

Ключевыми характеристиками любой формы коллективной миграции являются следующие: сохранение межклеточных связей в процессе движения, поддержание полярности и работы цитоскелета, необходимых для передачи механических усилий между клетками, и ремоделирование внеклеточного матрикса (Friedl & Gilmour, 2009).

1) Межклеточная адгезия. Связь между клетками обеспечивается обширным набором белков, среди которых наиболее важную роль играют кадгерины, интегрины и белки IgSF CAM (Friedl & Gilmour, 2009).

   Кадгерины являются ключевыми молекулами, участвующими в поддержании эпителиальных межклеточных контактов. Как уже было сказано выше, для опухолевых клеток в состоянии ЭМП характерны серьезные изменения в экспрессии, прежде всего, эпителиального (E-кадгерин), и нейронального кадгеринов (N-кадгерин). Потеря E-кадгерина может в некоторых случаях компенсироваться другими молекулами адгезии, однако, несомненно, он играет важнейшую роль в поддержании коллективной миграции (Martinez-Rico et al., 2010). Интегрины являются трансмембранными рецепторами, основная функция которых – связь клетки и внеклеточного матрикса (Barczyk et al., 2010). Тем не менее, они так же играют роль и в поддержании межклеточной адгезии через взаимодействия с фибронектином и ламинином (Salmenpera et al., 2008; Belvindrah et al., 2007). К семейству IgSF CAM относятся такие молекулы, как L1CAM, NCAM и другие; их экспрессия ассоциирована с усилением межклеточной адгезии и инвазивного потенциала в коллективно мигрирующих опухолевых клетках (Bergmann et al., 2010).
2) Реорганизация актинового цитоскелета и полярность. Для движения всей коллективной структуры необходима генерация силы, которая обеспечивается за счет работы актиновой сети. При коллективной миграции актиновая сеть приобретает «надклеточный» характер, в ее работе задействованы все клетки структуры. Молекулярные механизмы этого явления не до конца известны,

однако ясно, что важную роль играют межклеточные контакты, а так же Rho ГТФазы, обеспечивающие формирование разнообразных мембранных протрузий (Friedl & Gilmour, 2009).

Различные механизмы обеспечивают изменения в полярности коллективно мигрирующих клеток. Факторы роста и хемокины, которые вырабатываются стромальными клетками, могут обеспечивать индукцию клеточной поляризации и, соответственно, разделение клеток на лидеры и последователи (Aman & Piotrowski, 2008).

3) Ремоделирование внеклеточного матрикса (ВКМ). Перестройка ВКМ важна для генерирования специализированных «треков», путей в матриксе, по которым двигаются группы опухолевых клеток. Механизм разрушения ВКМ осуществляется с помощью матриксных металлопротеиназ, которые экспрессируются преимущественно на лидирующем фронте инвазирующей структуры (Westermarck & Kähäri, 1999). Помимо обычного разрушения ВКМ, мигрирующие клетки способны перестраивать его, образуя более удобные и подходящие для движения пути (Friedl & Gilmour, 2009).

Отдельным типом коллективной миграции является движение опухолевых кластеров, так называемый «tumor budding». Опухолевые кластеры находятся на инвазивном фронте и связаны с опухолевым массивом, но могут отрываться от него и инвазировать в прилежащие ткани. Это явление наблюдается при РМЖ и раке легкого, но преимущественно при колоректальной карциноме, и ассоциировано с плохим прогнозом (Grigore et al., 2016). Миграция опухолевых кластеров заметно отличается от классической коллективной миграции. Так, известно, что у маленьких групп инвазирующих клеток нет ярко выраженного «лидера»; любые клетки кластера могут принимать на себя эту функцию в зависимости от изменяющихся условий среды (Friedl & Alexander, 2011). Помимо этого, важно отметить, что опухолевые кластеры демонстрируют частичный, или гибридный, ЭМП (Grigore et al., 2016).

Таким образом, коллективная миграция является одним из способов инвазии злокачественных клеток. Другим вариантом инвазии опухолевых клеток является индивидуальная миграция, или движение одиночных клеток.

Индивидуальная миграция – это направленное движение одиночных опухолевых клеток (Friedl & Wolf, 2003). Существуют два основных механизма движения одиночных опухолевых клеток – мезенхимальный и амебоидный.

Мезенхимальное движение хорошо изучено в системе *in vitro*, характеризуется ступенчатостью процесса и работой большого числа разнообразных молекул. В норме этот механизм характерен для кератиноцитов в условиях репаративной регенерации, эндотелиоцитов и фибробластов. Для мезенхимально движущихся клеток характерна специфическая вытянутая форма, высокая зависимость от интегринов, протеаз и белков Rac1 и Cdc42, а также низкая скорость передвижения (Friedl & Wolf, 2003). При мезенхимальном движении принято выделять пять основных этапов:

1. Формирование на переднем крае клетки псевдоподии за счет полимеризации актина.
2. Возникновение фокального контакта между клеткой и внеклеточным матриксом с помощью интегринов.
3. Активация протеолитических ферментов, таких как матриксные металлопротеиназы и катепсины, вовлеченных в ремоделирование окружающего матрикса.
4. Сокращение тела клетки за счет актомиозиновой системы.
5. Отделение заднего края клетки и «подтягивание» его по направлению движения.

Амебоидное движение опухолевых клеток сходно с передвижением одноклеточного организма *Dictyostelium discoideum*. В норме у человека таким образом передвигаются циркулирующие стволовые клетки и лейкоциты. Движение клеток осуществляется с помощью блеббов – выпячиваний цитоплазматической мембраны, обусловленных актомиозиновыми сокращениями. С использованием блеббов клетка «исследует» окружающий ее матрикс для поиска наиболее оптимального маршрута. Опухолевые клетки, движущиеся амебоидно, более эффективно проникают в кровеносные сосуды и более приспособлены к выживанию в суровых условиях среды (Sanz-Moreno et al., 2011). Амебоидная клетка характеризуется округлой морфологией, способностью значительно изменять свою форму, отсутствием зависимости от адгезии и протеолитических ферментов (Paňková et al., 2010).

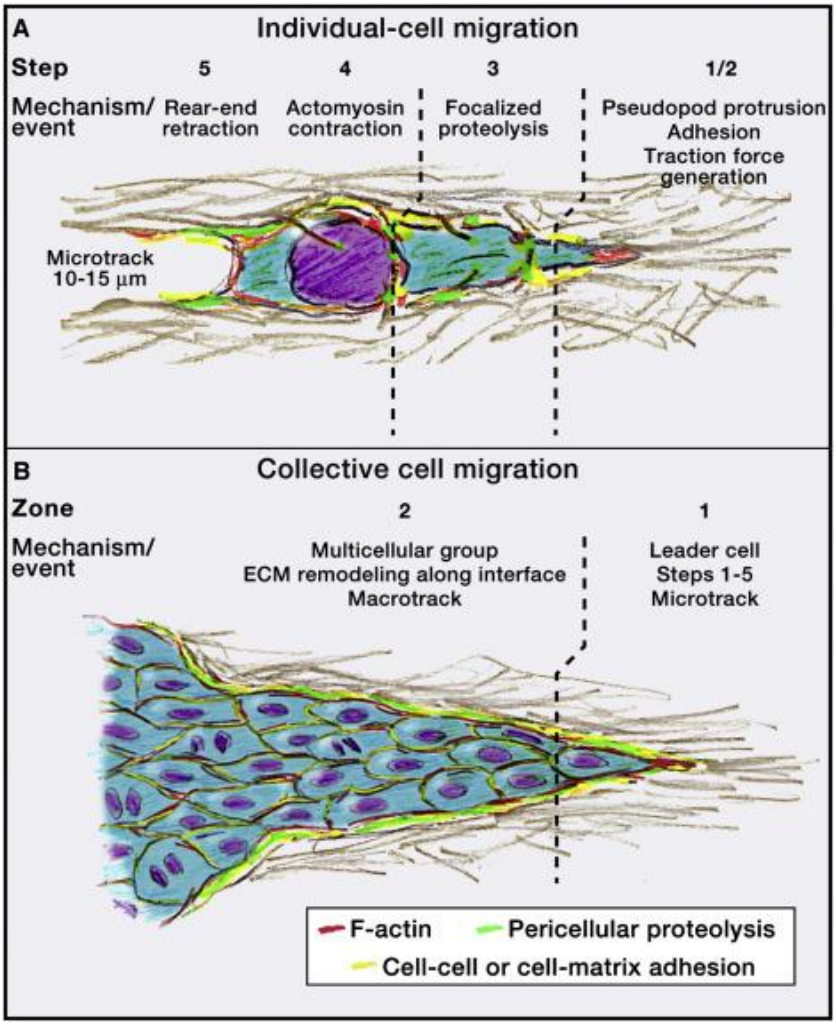


Рисунок 2 – Коллективная и индивидуальная миграция (Friedl P., 2011).

1.2.3 Молекулярные механизмы клеточной миграции

Молекулярные механизмы схожи для всех способов и типов клеточной миграции. Ключевыми молекулами, регулирующими движение клеток, являются Rho ГТФазы (Ridley, 2001). Rho ГТФазы в клетке могут переходить из неактивной ГДФ-формы в активную ГТФ-форму и обратно. Эти переходы регулируются соответственно белками семейства GEF (ARHGEFs) и GAP (ARHGAPs). Известно более 150 GEF и GAP-регуляторов Rho ГТФаз, что говорит о сложной структуре сигнальных путей, задействованных в движении клетки, и о сложности регуляции этого процесса. Помимо GEF и GAP-регуляторов существует и третий класс – GDI-регуляторы Rho ГТФаз, которые, связываясь с их неактивной ГДФ-формой, предотвращают их присоединение к

внутренней стороне клеточной мембраны (Рисунок 3). Такая сложная динамическая регуляция Rho ГТФаз важна для эффективной клеточной миграции (Ridley, 2015).

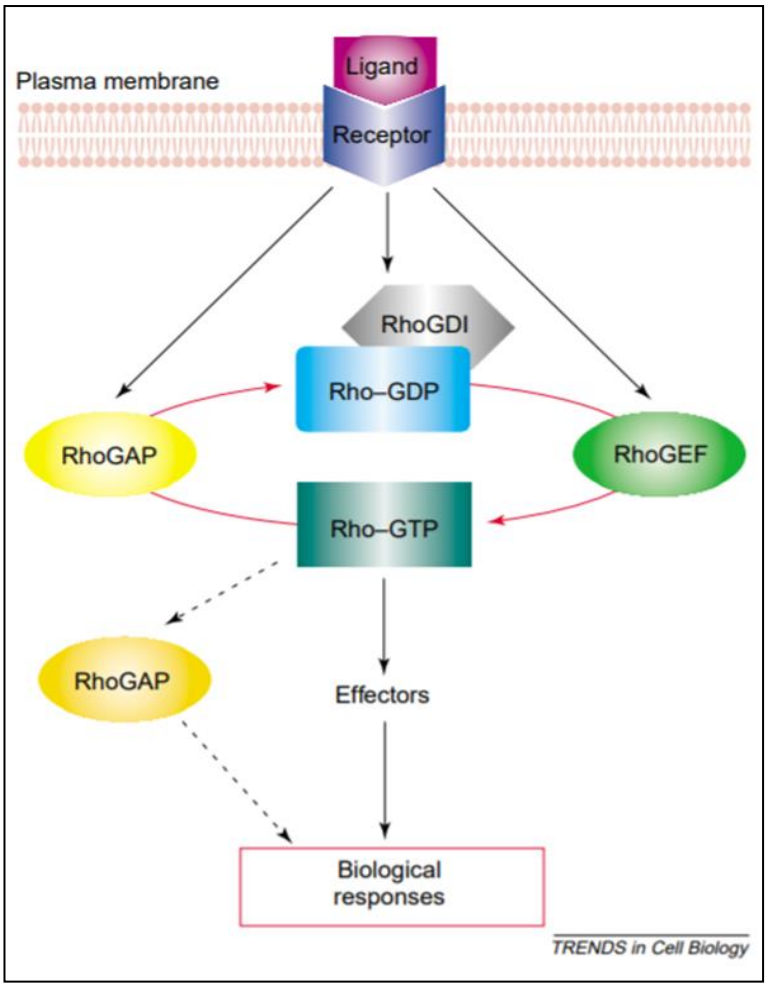


Рисунок 3 – Модель функционирования регуляторов Rho ГТФаз (Moon and Zheng, 2003).

Из более чем двадцати известных на данный момент Rho ГТФаз наибольший интерес представляют белки подсемейств Rac, Rho и Cdc42. Было показано, что Rac ГТФазы промотируют образование ламеллиподий, Cdc42 участвуют в формировании филоподий и клеточной полярности, а Rho ответственны за формирование стресс-фибрилл и актомиозиновую сократимость (Sadok & Marshall, 2014).

Rac ГТФазы формирует ламеллиподии на переднем крае клетки через связывание с компонентами комплекса SCAR/Wave, что ведет к активации комплекса Arp2/3 и сборке актина (Chen et al., 2010). Cdc42 ГТФазы тоже способны активировать комплекс Arp2/3 через N-WASP (Lim et al., 2008). В 3D моделях *in vitro* показано, что клетка может переключаться между Rac и Cdc42 сигнальными путями: при потере SCAR/Wave-

комплекса наблюдается увеличение экспрессии FAK, что приводит к сборке и активации N-WASP на инвазивном фронте и, соответственно, к Arp2/3-опосредованной инвазии (Tang et al., 2013). Помимо этого, Rac способен управлять миграцией за счет регуляции активности комплекса Arp2/3 через белок Арпин (Dang et al., 2013).

Rho ГТФазы вовлечены как в полимеризацию актина через формины (семейство mDia), так и в генерирование актомиозиновой сократимости через ROCK-киназу (Narumiya et al., 2009). Классический сигнальный путь Rho/ROCK ответственен за актомиозиновую сократимость через инактивацию легкой цепи миозина MYPT, что приводит к активации миозина-2 (Raftopoulou & Hall, 2004). Показано, что MYPT может быть инактивирована и через сигнальный путь Cdc42/MRCK. Таким образом, Rho и Cdc42 ГТФазы кооперируются для генерирования актомиозиновой сократимости, необходимой для подтягивания заднего края клетки, движущейся мезенхимально (Wilkinson et al., 2005). Амебоидное движение блеббами целиком и полностью зависит от Rho-сигналинга (Paňková et al., 2010).

1.2.4 Пластичность опухолевых клеток

Изменение факторов внешней среды или же свойств самой клетки могут приводить к смене типа движения. Это явление получило название пластичности. Пластичность способствует процессам инвазии и метастазирования, так как опухолевые клетки благодаря ей способны переходить от одного типа миграции к другому (Friedl & Alexander, 2011). Известно несколько типов пластичности.

Уже описанные выше ЭМП и КАП являются вариантами коллективно-индивидуального перехода, при котором наиболее серьезным изменениям подвергаются межклеточные контакты. Обратный процесс, индивидуально-коллективный переход, становится возможным при условии, что межклеточные контакты восстанавливаются, и индивидуально мигрирующие клетки собираются вместе, образуя коллективные структуры различной морфологии (Friedl & Wolf, 2010).

Переходы между мезенхимальным и амебоидным типами движения охарактеризованы в основном именно на мигрирующих опухолевых клетках. Центральными сигнальными молекулами, контролирующими переключение между этими

типами движения, являются уже описанные Rho ГТФазы (Sanz-Moreno et al., 2008). Так, ослабление Rac-сигналинга и усиление Rho/ROCK-сигналинга ведет к мезенхимально-амебоидному переходу (МАП). К МАП также ведут изменения в экспрессии молекул фокальной адгезии, в частности ослабление экспрессии интегрина β1 (Zaman et al., 2006). Обратный процесс – амебоидно-мезенхимальный переход (АМП) – в литературе описан значительно хуже, однако все же известно, что усиление экспрессии интегринов ведет к мезенхимальному типу миграции (McNally & Anderson, 2002).

Таким образом, изменение межклеточных связей и адгезии к ВКМ, сигнальных путей, регулирующих работу актинового цитоскелета, и модулирование функций различных протеаз определяет переключение опухолевых клеток между разными способами миграции, то есть их пластичность (Friedl & Wolf, 2010).

1.2.5 Инвазия и микроокружение опухоли

Инвазия и метастазирование являются мультифакторными процессами. Помимо самих опухолевых клеток, в метастатический каскад, в частности в инвазию, вносят свой значительный вклад и клетки микроокружения опухоли (Quail & Joyce, 2013).

К клеткам опухолевого микроокружения, играющим значимую роль в метастазировании, относятся фибробласты, макрофаги, миелоидные клетки, тромбоциты и другие.

Было показано, что опухоль-ассоциированные фибробласты отличаются от нормальных фибробластов, и способствуют опухолевой прогрессии и метастазированию при РМЖ (Dumont et al., 2013). Опухоль-ассоциированные фибробласты экспрессируют факторы роста, воспалительные цитокины и хемокины, которые способствуют росту опухоли, а так же ангиогенезу (Marsh et al., 2013). Опухоль-ассоциированные фибробласты могут играть роль клеток-лидеров в коллективной инвазии за счет своей способности к ремоделированию ВКМ (Gaggioli et al., 2007).

Опухоль-ассоциированные макрофаги составляют значительную часть опухолевой массы. Макрофаги в опухоли ассоциированы с хроническим воспалительным процессом, первыми этапами метастатического каскада, а так же с подготовкой ниш в отдаленных

органах для развития вторичных опухолей (Condeelis & Pollard, 2006). Опухолевые клетки способны использовать возможности макрофагов для перестройки ВКМ в свою пользу, что проявляется в разрушении базальной мембраны и инвазии (Condeelis and Segall, 2003). Эффективность интравазации напрямую связана с наличием и количеством макрофагов в опухоли. На различных моделях было показано, что «выключение» работы макрофагов в опухоли способствует серьезному ослаблению процессов метастазирования (Lin et al., 2002).

Миелоидные клетки участвуют в переключениях опухолевых клеток между эпителиальным и мезенхимальным фенотипами за счет воздействия на сигнальные пути TGF-β и Wnt (Gay et al., 2011). Помимо этого, они играют важную роль в метастатическом каскаде и в инвазии злокачественных клеток (Schmid & Varner, 2010).

Таким образом, клетки микроокружения вносят существенный вклад в процессы инвазии и метастазирования.

1.3 Генетические аспекты инвазии и метастазирования

Для успешной инвазии в прилежащие ткани и метастазирования в отдаленные органы опухолевые клетки должны приобретать определенные, которые являются предпосылками для формирования метастазов. Помимо описанной выше способности к отделению от общего опухолевого массива и миграции, будущие метастазы должны быть способны к неограниченной пролиферации, избеганию контроля со стороны внутренних и внешних факторов, а так же к ангиогенезу. В процессе метастатического каскада опухолевые клетки встречают множество препятствий на своем пути, преодолевание каждого из которых зависит в основном именно от характеристик самой опухолевой клетки (Valastyan & Weinberg, 2011). Приобретение этих характеристик в ходе опухолевой эволюции обуславливается генетическими и эпигенетическими факторами. Изучение генетики метастазирования может дать ответ на вопрос, как именно происходит регуляция метастатического каскада, и как можно влиять на него, уничтожая на корню возможность опухоли к диссеминации (Nguyen & Massague, 2007).

На основании уровня вовлеченности в процессы инвазии и метастазирования были выделены три основных класса метастатических генов: гены инициирования, гены

прогрессии и гены вирулентности. Гены инициирования метастазирования – гены, которые способствуют появлению у опухолевых клеток определенных преимуществ, позволяющих инвазировать в окружающие ткани и интравазировать в кровеносные сосуды. Гены прогрессии метастазирования – гены, которые обеспечивают работу определенных систем метастазирующих клеток, необходимых как для ее интравазации и экстравазации, так и для ее выживания в процессе диссеминации. Гены вирулентности – гены, работа которых во вторичном очаге, но не в первичной опухоли, способствует приобретению злокачественной клеткой определенных преимуществ, необходимых для колонизации. Важно отметить, что все три класса генов участвуют в промоции метастазирования, но при этом работа этих генов непосредственно в метастазирующих клетках не является обязательной. Эти гены могут работать как в клетках первичной опухоли, неспособных к инвазии и метастазированию, так и в клетках микроокружения опухоли или вторичного очага развития заболевания (Nguyen & Massague, 2007).

Несмотря на то, что гены прогрессии и вирулентности метастазирования, несомненно, представляют огромный интерес в плане изучения механизмов регуляции метастатического каскада, именно гены инициирования метастазирования определяют дальнейшую судьбу злокачественной клетки. Начнет ли злокачественно измененная клетка свой “долгий и тернистый” путь к “заражению” других органов и разрушению организма, или же останется одним из миллиона “безымянных кирпичиков”, составляющих первичную опухоль, это определяют гены-инициаторы.

Молекулярные процессы и, соответственно, гены, с которых начинается процесс метастазирования, широко освещены в литературе. К таким процессам относится уже упомянутые выше ЭМП и КАП, ангиогенез и определенные взаимодействия между опухолевыми клетками и микроокружением, обеспечивающие инвазию и интравазацию (Chiang & Massague, 2008).

Инициацию инвазии и, соответственно, метастазирования, обеспечивают как генетические, так и эпигенетические факторы. Число подтвержденных примеров воздействия генетических и эпигенетических нарушений на процессы метастазирования на данный момент прискорбно мало. Примерами мутаций, наделяющих опухолевые клетки способностью к метастазированию, могут являться мутации гена *CDH1*, кодирующего Е-кадгерин, роль которого в процессе ЭМП давно известна (Moslim et al., 2018; Gheldof & Berx, 2013); потеря гетерозиготности в локусе гена *NM23*, являющегося супрессором метастазирования (Boissan & Lacombe, 2012); амплификация *NEDD9*,

продукт которого усиливает формирование фокальной адгезии и инвазии (Kim et al., 2006). Эпигенетические факторы, запускающие процесс инвазии, описаны гораздо лучше генетических. Так, процесс ЭМП полностью регулируется различными транскрипционными факторами, и почти не зависит от мутаций в тех или иных генах, ответственных за движение опухолевых клеток (Saitoh, 2018).

Принято считать, что генетические нарушения, если и принимают участие в инициировании метастатического каскада, они не являются ключевыми для этого процесса (Vogelstein et al., 2013). Тем не менее, вопрос о генетических нарушениях, запускающих инвазию, остается открытым. Ранее предпринимались попытки охарактеризовать опухолевую прогрессию, анализируя исключительно генетические нарушения, которые опухоль приобретала в процессе эволюции, однако число точных и подтвержденных *in vitro* и *in vivo* данных по этой теме очень мало (Krøigård et al., 2018).

2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материал исследования

В исследовании были использованы образцы опухолевой и нормальной ткани молочной железы, полученные в ходе хирургического вмешательства от пациентов с РМЖ (n=10). Клинико-патологическая характеристика пациентов представлена в таблице 1.

Вариант инвазивного компонента (коллективный или индивидуальный) определяли с помощью морфологического анализа (Рисунок 4). Индивидуальную инвазию определяли по преобладанию в морфологическом срезе дискретных групп опухолевых клеток, представленных скоплениями из 5 или менее клеток; индивидуальный вариант инвазивного компонента также характеризовался полным отсутствием или присутствием небольшой доли многоклеточных структур. Коллективную инвазию определяли по преобладанию многоклеточных групп опухолевых клеток; коллективный вариант инвазивного компонента характеризовался малым количеством дискретных групп.

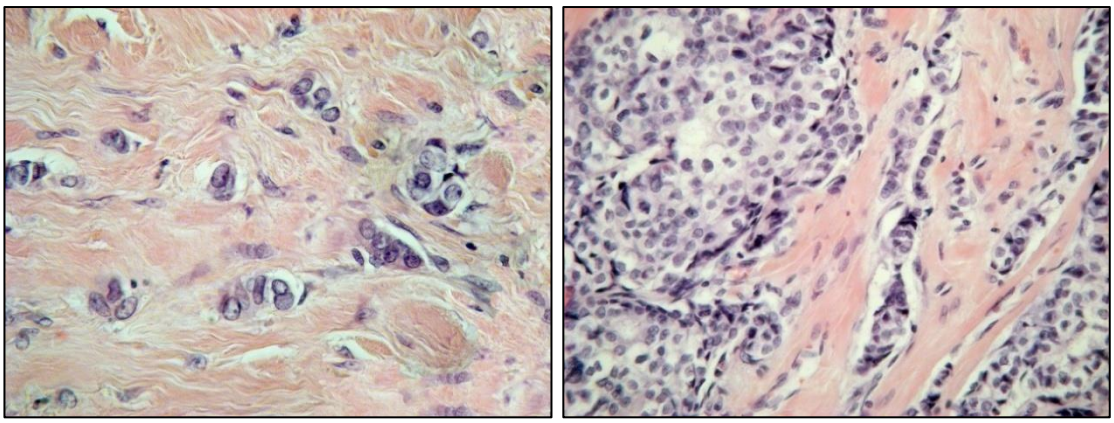


Рисунок 4 – Индивидуальный (слева) и коллективный (справа) варианты инвазивного компонента.

Примечание: окраска гематоксилином и эозином, увеличение 200х.

Таблица 1 – Клинико-патологическая характеристика пациентов с РМЖ.

Тип инвазии	Код пациента	Молекулярный подтип	Возраст	TNM
Индивидуальная инвазия	MzT	ИПР, Люм А	41	T3N1M0
	KT	ИПР, Люм В HER2+	63	T2N0M0
	MT	ИПР, Люм В HER2-	67	T2N1M0
	OT	ИПР, Люм А	61	T2N2M0
Коллективная инвазия	ST	ИПР, Люм В HER2+	55	T1N0M0
	ShT	ИПР, Люм А	Нет данных	T1N0M0
	XT	ИПР, Люм В HER2+	53	T0N0M0
	TT	ИПР, Люм В HER2-	59	T1N1M0
	YT	ИПР, Люм В	38	T1N1M0
	SvT	ИПР, Люм В HER2-	44	T2N0M0

Материал исследования был любезно предоставлен сотрудниками отделения общей и молекулярной патологии НИИ онкологии СО РАМН.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Выделение ДНК

Выделение ДНК из образцов опухолевой и нормальной ткани молочной железы проводилось с использованием коммерческого набора DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, США).

Образцы лизировались с использованием протеиназы К. К лизату добавляли буфер для связывания ДНК с фильтром колонок. Лизат переносили на колонку DNeasy Mini Spin. В процессе центрифугирования ДНК избирательно связывается с мембраной колонки, в то время как остальные компоненты лизата проходят через неё. Образцы ДНК, фиксированные на фильтре колонок, дважды очищали и затем элюировали в воде. В целом, протокол выделения ДНК выглядел следующим образом:

1. Добавить к образцам ткани 180 мкл буфера ATL и 20 мкл протеиназы К. Перемешать на вортексе, затем инкубировать при 56° С до полного лизиса образцов (~2 часа). В процессе инкубации образец перемешивать каждые 15 минут.
2. Добавить 200 мкл буфера AL, перемешать на вортексе. Затем добавить 200 мкл 96% этанола, снова перемешать на вортексе.
3. Перенести смесь на ДНК колонку, поместить колонку в собирательную пробирку (2 мл). Центрифугировать при 8000 об./мин. в течение 1 минуты. Избавиться от осадка.
4. Поместить колонку в новую собирательную пробирку (2 мл), добавить 500 мкл буфера AW1, затем центрифугировать при 8000 об./мин. в течение 1 минуты. Избавиться от осадка.
5. Перенести колонку в новую собирательную пробирку (2 мл), добавить 500 мкл буфера AW2, центрифугировать при 14000 об./мин. в течение 3 минут, чтобы высушить фильтр на колонке. Избавиться от осадка.
6. Поместить колонку в чистую пробирку (1,5 мл), добавить 200 мкл буфера AE/воды на мембрану. Инкубировать 1 минуту при комнатной температуре, затем центрифугировать при 8000 об./мин. в течение 1 минуты, чтобы элюировать ДНК.
7. Повторить элюирование (шаг 7).

2.2.2 Анализ качества и количества образцов ДНК

Оценка качества и количества образцов ДНК проводилась с использованием трех методов:

1. Оценка концентрации ДНК с помощью метода флуорометрии с использованием прибора Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США). Концентрация ДНК-библиотек, оцененная с помощью набора dsDNA Broad Range (Thermo Fisher Scientific, США), варьировала от 11,5 до 204 нг/мкл.
2. Оценка чистоты выделенной ДНК методом спектрофотометрии с использованием прибора NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США).

Соотношение 260/280 для проанализированных образцов варьировало от 1,81 до 2,03.

3. Оценка качества ДНК методом гель-электрофореза на приборе 2200 Tape Station (Agilent, США). Данные оценки ДНК представлены на рисунке 5.

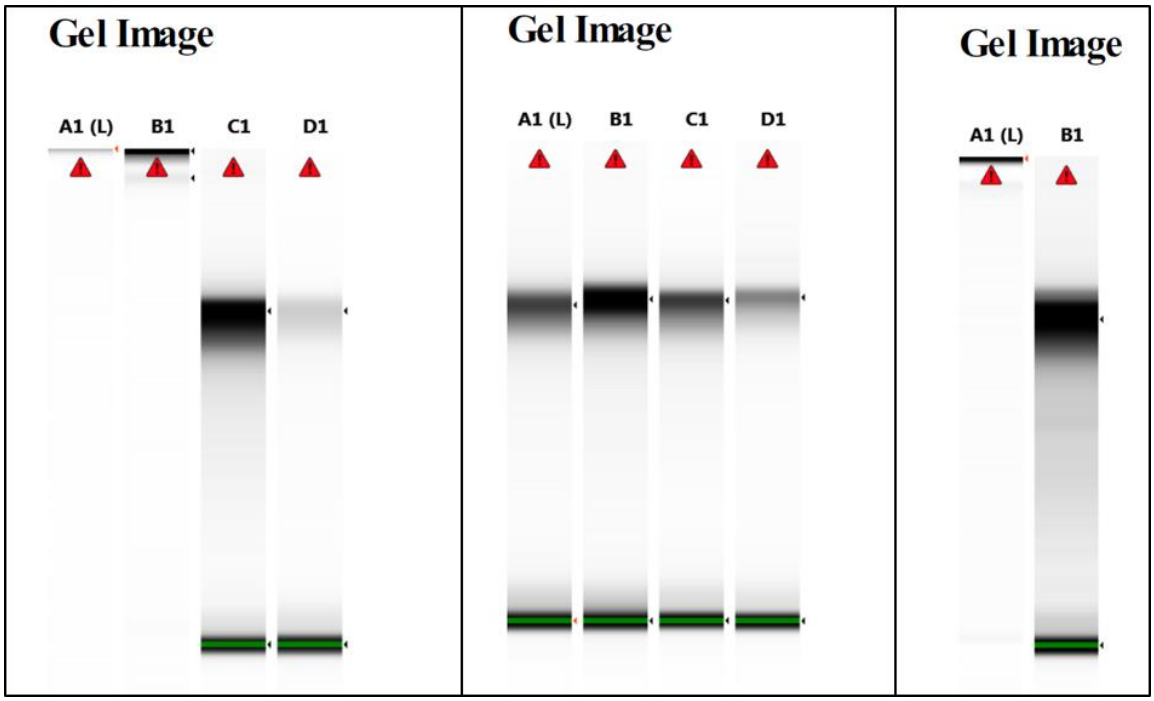


Рисунок 5 – Электрофореграмма анализа качества образцов ДНК.

2.2.3 Подготовка ДНК-библиотек для полноэкзомного секвенирования

ДНК-библиотеки для полноэкзомного секвенирования подготовливали с помощью набора SureSelect XT HS согласно прилагаемому протоколу (Agilent, США). Образцы ДНК отвечали требуемым условиям: количество – от 10 до 200 нг, соотношение 260/280 – 1,8 до 2,0.

Протокол подготовки библиотек состоял из двух частей: подготовка геномных библиотек ДНК и экзомное обогащение. Обогащение образцов необходимо для отбора нужных нуклеотидных последовательностей из генома, в данном случае производился отбор всех экзонов. В целом, подготовка геномных ДНК библиотек длилась 3,5 часа и включала в себя следующие этапы:

1. Ультразвуковая фрагментация ДНК с использованием аппарата Covaris E220 (Covaris, США). Размер целевых фрагментов – 150-200 п.н.
2. Репарация концевых участков фрагментов ДНК

   Добавить 20 мкл End Repair/dA-Tailing master mix к каждому образцу, перемешать пипетированием и поместить в термоциклер SureCycler 8800 (программа представлена в таблице 2).

   Таблица 2 – Программа термоциклера для этапа репарации концевых участков фрагментов ДНК.

Шаг	Температура	Время
Шаг 1	20°C	15 минут
Шаг 2	72°C	15 минут
Шаг 3	4°C	Сохранять до следующего этапа

3. Лигирование штрих-кодированных адаптеров, необходимых для присоединения ДНК-библиотек к проточной ячейке секвенатора

   Приготовить Ligation master mix. После термоциклирования перенести образцы ДНК-библиотек на лед, добавить 25 мкл Ligation master mix к каждому образцу, перемешать пипетированием, добавить 5 мкл Adaptor Oligo Mix к каждому образцу, перемешать пипетированием, затем поместить в термоциклер (программа представлена в таблице 3).

   Таблица 3 – Программа термоциклера для этапа лигирования.

Шаг	Температура	Время
Шаг 1	20°C	30 минут
Шаг 2	4°C	Сохранять до следующего этапа

4. Очистка образцов ДНК магнитными частицами AMPure XP

   Добавить 80 мкл раствора магнитных частиц к каждому образцу, перемешать, инкубировать 5 минут при комнатной температуре. Поместить образцы на

магнитный штатив, дождаться осветления раствора (5-10 минут). Избавиться от надосадочной жидкости, добавить к магнитным частицам 200 мкл свежеприготовленного 70% этанола. Подождать 1 минуту, избавиться от этанола. Повторить этап с промывкой магнитных частиц в этаноле еще 1 раз. Высушить образцы (1-2 минуты), затем развести их в свободной от нуклеаз воде, инкубировать 2 минуты при комнатной температуре, перенести образцы на магнитный штатив, инкубировать 5 минут. Отобрать очищенный супернатант и поместить его в чистую пробирку.

5. Амплификация библиотек с лигированными адаптерами и присоединение индексов к каждому образцу

   Определить подходящий индекс для каждого образца. Подготовить Pre-Capture PCR Reaction Mix, добавить 13.5 мкл в каждый образец. Добавить 2 мкл соответствующего раствора с индексом к каждому образцу. Перемешать и поместить в термоциклер (программа представлена в таблице 4).

   Таблица 4 – Программа термоциклера для амплификации библиотек с лигированными адаптерами.

Шаг	Число циклов	Температура	Время
Шаг 1	1	98°C	2 минуты
Шаг 2	8	98°C	30 секунд
		60°C	30 секунд
		72°C	1 минута
Шаг 3	1	72°C	5 минут
Шаг 4	1	4°C	Сохранять до следующего этапа

6. Очистка образцов магнитными частицами AMPure XP

Экзомное обогащение длилось 4,5 часа и включало в себя следующие этапы:

1. Гибридизация образцов геномных ДНК библиотек с зондами, меченными биотином

Использовать 500-1000 нг ДНК-библиотек, приготовленных ранее. К каждому образцу добавить 5 мкл SureSelect XT HS и XT Low Input Blocker Mix. Перемешать и поместить в термоциклер (программа представлена в таблице 5).

Таблица 5 – Программа термоциклера для этапа гибридизации геномных ДНК-библиотек.

Шаг	Число циклов	Температура	Время
Шаг 1	1	95°C	5 минут
Шаг 2	1	65°C	10 минут
Шаг 3	1	65°C	1 минута (ПАУЗА)
Шаг 4	60	65°C	1 минута
		37°C	3 секунды
Шаг 5	1	65°C	Сохранять до следующего этапа

Подготовить раствор SureSelect RNase Block и Capture Library Hybridization Mix. Смешать растворы при комнатной температуре. Добавить 13 мкл полученного раствора к каждому образцу, сохраняя их в термоциклере, перемешать. Плотно закрыть образцы, перемешать на вортексе, вернуть в термоциклер и запустить программу, представленную в таблице 5 после третьего шага.

2. Захват фрагментов экзомной ДНК с использованием стрептавидиновых частиц Dynabeads MyOne Streptavidin T1

Подготовить стрептавидиновые частицы. После окончания работы термоциклера смешать образцы со стрептавидиновыми частицами, инкубировать 30 минут. Поместить образцы на магнитный штатив, дождаться осветления раствора, избавиться от супернатанта. Растворить образцы, связавшиеся с частицами, в буфере SureSelect Wash Buffer 1. Затем провести отмывку с помощью SureSelect Wash Buffer 2. Убрать остатки буфера с образцов, добавить 25 мкл свободной от нуклеаз воды, перемешать и хранить на льду.

3. Амплификация ДНК библиотек

Смешать 25 мкл post-capture PCR reaction mix с образцами. Перемешать пипетированием, поместить в термоциклер (программа представлена в таблице 6).

Таблица 6 – Программа термоциклера для этапа амплификации ДНК-библиотек.

Шаг	Число циклов	Температура	Время
Шаг 1	1	98°C	2 минуты
Шаг 2	9	98°C	30 секунд
		60°C	30 секунд
		72°C	1 минута
Шаг 3	1	72°C	5 минут
Шаг 4	1	4°C	Сохранять до следующего этапа

После завершения работы термоциклера извлечь образцы, поместить их на магнитный штатив. Подождать осветления раствора (2 минуты), перенести супернатант в чистые пробирки.

4. Очистка образцов магнитными частицами AMPure XP
5. Оценка качества и количества экзомных ДНК библиотек

Полученные ДНК-библиотеки оценивали с помощью набора HS D1000 Screen Tape на станции автоматического гель-электрофореза 2200 Tape Station (Agilent, США). Размер ДНК библиотек варьировал от 200 до 400 п.н. (средний пик 324 п.н.). Концентрация ДНК-библиотек, оцененная с помощью набора dsDNA HS на флюориметре Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США), варьировала от 2,5 до 6,44 нг/мкл.

6. Хранение при -20°C.

2.2.4 Секвенирование ДНК-библиотек

Полноэкзомные ДНК библиотеки пулировали, подвергали денатурации и разводили до необходимой концентрации для загрузки в секвенатор. Пулированные

образцы секвенировали на платформе NextSeq 500 (Illumina, США) в режиме двуконцевого чтения по 150 п.н. Количество кластеров составило 180-220 К/мм^2, показатель Q30 > 80%.

2.2.5 Биоинформатическая и статистическая обработка данных полноэкзомного секвенирования

Был проведен биоинформатический анализ полученных сырых данных с помощью пайплайна GATK (Van der Auwera et al., 2013). Аннотирование генетических вариантов, обнаруженных в образцах опухолевой ткани относительно нормальной ткани молочной железы, производилось с помощью инструмента ANNOVAR (Wang et al., 2010).

Количество общих и специфических генов, содержащих нарушения, для каждого типа опухолей подсчитывалось с помощью инструмента InteractiVenn (Heberle et al., 2015). Анализ сигнальных путей, затронутых генетическими нарушениями, проводился с использованием инструмента GSEA MSigDB (Liberzon et al., 2015). В результате отбирались гены, нарушения в которых встречались только в опухолях с индивидуальной инвазией, и проводился анализ литературных данных на предмет ассоциации этих генов с клеточной подвижностью и метастазированием.

Оценка значимости различий между числом нарушений в опухолях с индивидуальной и коллективной инвазией проводилась с использованием теста Манна-Уитни в программе STATISTICA 10.

Раздел «Результаты и их обсуждение» (стр. 30-41) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъят из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстов выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

Раздел «Результаты и их обсуждение» (стр. 30-41) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъят из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстов выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

Раздел «Результаты и их обсуждение» (стр. 30-41) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъят из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстов выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

Раздел «Результаты и их обсуждение» (стр. 30-41) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъят из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстов выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

Раздел «Результаты и их обсуждение» (стр. 30-41) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъят из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстов выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

Раздел «Результаты и их обсуждение» (стр. 30-41) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъят из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстов выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

Раздел «Результаты и их обсуждение» (стр. 30-41) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъят из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстов выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

Раздел «Результаты и их обсуждение» (стр. 30-41) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъят из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстов выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

Раздел «Результаты и их обсуждение» (стр. 30-41) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъят из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстов выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

Раздел «Результаты и их обсуждение» (стр. 30-41) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъят из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстов выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

Раздел «Результаты и их обсуждение» (стр. 30-41) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъят из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстов выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

Раздел «Результаты и их обсуждение» (стр. 30-41) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъят из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстов выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

ВЫВОДЫ

1. Опухоли молочной железы с индивидуальным и коллективным вариантами инвазивного роста значимо не отличаются ($p = 0,67$) числом генетических нарушений; не было найдено генов-драйверов канцерогенеза, характерных для индивидуальной или коллективной инвазии.
2. Опухоли молочной железы с коллективным и индивидуальным вариантами инвазивного роста демонстрируют нарушения в генах, вовлеченных в сигнальные пути клеточной миграции, а именно в путь фокальной адгезии и в путь регуляции актинового цитоскелета; спектр таких генов различался между исследуемыми типами опухолей.
3. Опухоли молочной железы с индивидуальным вариантом инвазивного роста характеризуются уникальными нарушениями в генах, вовлеченных в регуляцию процессинга малых ядерных РНК *(INTS6),* в регуляцию активности Rho ГТФаз *(ARHGAP39, ARHGAP35, ARHGAP45, ARHGAP5)* и в генах, кодирующих адаптерные белки SHC *(SHC1, SHC2, SHC4).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ahmed S. B. M., Prigent S. A. Insights into the shc family of adaptor proteins // Journal of molecular signaling. – 2017. – Т. 12. – №. 1. – С. 12-26.
2. Aman A., Piotrowski T. Wnt/β-catenin and Fgf signaling control collective cell migration by restricting chemokine receptor expression // Developmental cell. – 2008. – Т. 15. – №. 5. – С. 749-761.
3. Bankfalvi A., Piffko J. Prognostic and predictive factors in oral cancer: the role of the invasive tumour front // Journal of Oral Pathology & Medicine: Review article. – 2000. – Т. 29. – №. 7. – С. 291-298.
4. Barczyk M., Carracedo S., Gullberg D. Integrins // Cell and tissue research. – 2010. – Т. 339. – №. 1. – С. 269-280.
5. Belvindrah R. et al. β1 integrins control the formation of cell chains in the adult rostral migratory stream // Journal of Neuroscience. – 2007. – Т. 27. – №. 10. – С. 2704-2717.
6. Bergmann A., Steller H. Apoptosis, stem cells, and tissue regeneration // Sci. Signal. – 2010. – Т. 3. – №. 145. – С. 1-16.
7. Binamé F. et al. Cancer-associated mutations in the protrusion-targeting region of p190RhoGAP impact tumor cell migration // J Cell Biol. – 2016. – Т. 214. – №. 7. – С. 859-873.
8. Böhm M. et al. Genetic variants of DICE1/INTS6 in German prostate cancer families with linkage to 13q14 // Urologia internationalis. – 2015. – Т. 95. – №. 4. – С. 386-389.
9. Boissan M., Lacombe M. L. NM23, an example of a metastasis suppressor gene // Bulletin du cancer. – 2012. – Т. 99. – №. 4. – С. 431-440.
10. Che K. et al. Prognostic significance of tumor budding and single cell invasion in gastric adenocarcinoma // OncoTargets and therapy. – 2017. – Т. 10. – С. 1039-1047.
11. Chen Z. et al. Structure and control of the actin regulatory WAVE complex // Nature. – 2010. – Т. 468. – №. 7323. – С. 533.
12. Chiang A. C., Massagué J. Molecular basis of metastasis // New England Journal of Medicine. – 2008. – Т. 359. – №. 26. – С. 2814-2823.
13. Condeelis J., Pollard J. W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis // Cell. – 2006. – Т. 124. – №. 2. – С. 263-266.
14. Dang I. et al. Inhibitory signalling to the Arp2/3 complex steers cell migration // Nature. – 2013. – Т. 503. – №. 7475. – С. 281.
15. de Kreuk B. J. et al. The human minor histocompatibility antigen1 is a RhoGAP // PloS one. – 2013. – Т. 8. – №. 9. – С. e73962.

16. Dumont N. et al. Breast fibroblasts modulate early dissemination, tumorigenesis, and metastasis through alteration of extracellular matrix characteristics // Neoplasia. – 2013. – Т. 15. – №. 3. – С. 249-257.
17. Fagiani E. et al. RaLP, a new member of the Src homology and collagen family, regulates cell migration and tumor growth of metastatic melanomas // Cancer research. – 2007. – Т. 67. – №. 7. – С. 3064-3073.
18. Fodde R. The APC gene in colorectal cancer // European journal of cancer. – 2002. – Т. 38. – №. 7. – С. 867-871.
19. Friedl P. Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration // Current opinion in cell biology. – 2004. – Т. 16. – №. 1. – С. 14-23.
20. Friedl P., Alexander S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity // Cell. – 2011. – Т. 147. – №. 5. – С. 992-1009.
21. Friedl P., Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer // Nature reviews Molecular cell biology. – 2009. – Т. 10. – №. 7. – С. 445-457.
22. Friedl P., Wolf K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model // The Journal of cell biology. – 2010. – Т. 188. – №. 1. – С. 11-19.
23. Friedl P., Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms // Nature reviews cancer. – 2003. – Т. 3. – №. 5. – С. 362-374.
24. Fujii N. et al. Expression of minor histocompatibility antigen, HA-1, in solid tumor cells // Transplantation. – 2002. – Т. 73. – №. 7. – С. 1137-1141.
25. Gaggioli C. et al. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells // Nature cell biology. – 2007. – Т. 9. – №. 12. – С. 1392.
26. Gay L. J., Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis // Nature Reviews Cancer. – 2011. – Т. 11. – №. 2. – С. 123.
27. Gen Y. et al. A novel amplification target, ARHGAP5, promotes cell spreading and migration by negatively regulating RhoA in Huh-7 hepatocellular carcinoma cells // Cancer letters. – 2009. – Т. 275. – №. 1. – С. 27-34.
28. Gheldof A., Berx G. Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition // Progress in molecular biology and translational science. – Academic Press, 2013. – Т. 116. – С. 317-336.
29. Gonzalez-Perez A. et al. IntOGen-mutations identifies cancer drivers across tumor types // Nature methods. – 2013. – Т. 10. – №. 11. – С. 1081.

30. Gouon-Evans V., Lin E. Y., Pollard J. W. Requirement of macrophages and eosinophils and their cytokines/chemokines for mammary gland development // Breast Cancer Research. – 2002. – Т. 4. – №. 4. – С. 155.
31. Grigore A. et al. Tumor budding: the name is EMT. Partial EMT // Journal of clinical medicine. – 2016. – Т. 5. – №. 5. – С. 51-74.
32. Hanahan D., Weinberg R. A. Hallmarks of cancer: the next generation // Cell. – 2011. – Т. 144. – №. 5. – С. 646-674.
33. Hanahan D., Weinberg R. A. The hallmarks of cancer // cell. – 2000. – Т. 100. – №. 1. – С. 57-70.
34. Heberle H. et al. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams // BMC bioinformatics. – 2015. – Т. 16. – №. 1. – С. 169.
35. Hegerfeldt Y. et al. Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, β1-integrin function, and migration strategies // Cancer research. – 2002. – Т. 62. – №. 7. – С. 2125-2130.
36. Herbrand U., Ahmadian M. R. p190-RhoGAP as an integral component of the Tiam1/Rac1-induced downregulation of Rho // Biological chemistry. – 2006. – Т. 387. – №. 3. – С. 311-317.
37. Hudson J. et al. p66ShcA promotes breast cancer plasticity by inducing an epithelial-to-mesenchymal transition // Molecular and cellular biology. – 2014. – Т. 34. – №. 19. – С. 3689-3701.
38. Jackson J. G. et al. Elevated levels of p66 Shc are found in breast cancer cell lines and primary tumors with high metastatic potential // Clinical Cancer Research. – 2000. – Т. 6. – №. 3. – С. 1135-1139.
39. Jiang W. G. et al. Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives // Seminars in cancer biology. – 2015. – Т. 35. – С. 244-275.
40. Jolly M. K. et al. Implications of the hybrid epithelial/mesenchymal phenotype in metastasis // Frontiers in oncology. – 2015. – Т. 5. – С. 155.
41. Kalluri R., Weinberg R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition // The Journal of clinical investigation. – 2009. – Т. 119. – №. 6. – С. 1420-1428.
42. Kaur S. et al. Silencing of directional migration in roundabout4 knockdown endothelial cells // BMC cell biology. – 2008. – Т. 9. – №. 1. – С. 61.
43. Kawauchi T. Cell adhesion and its endocytic regulation in cell migration during neural development and cancer metastasis // International journal of molecular sciences. – 2012. – Т. 13. – №. 4. – С. 4564-4590.

44. Kim M. et al. Comparative oncogenomics identifies NEDD9 as a melanoma metastasis gene // Cell. – 2006. – Т. 125. – №. 7. – С. 1269-1281.
45. Krakhmal N. V. et al. Cancer invasion: patterns and mechanisms // Acta Naturae (англоязычная версия). – 2015. – Т. 7. – №. 2 (25).
46. Krøigård A. B. et al. Identification of metastasis driver genes by massive parallel sequencing of successive steps of breast cancer progression // PloS one. – 2018. – Т. 13. – №. 1. – С. e0189887.
47. Lambert A. W., Pattabiraman D. R., Weinberg R. A. Emerging biological principles of metastasis // Cell. – 2017. – Т. 168. – №. 4. – С. 670-691.
48. Lee E. Y. H. P., Muller W. J. Oncogenes and tumor suppressor genes // Cold Spring Harbor perspectives in biology. – 2010. – Т. 2. – №. 10. – С. a003236.
49. Liberzon A. et al. The molecular signatures database hallmark gene set collection // Cell systems. – 2015. – Т. 1. – №. 6. – С. 417-425.
50. Lim K. B. et al. The Cdc42 effector IRSp53 generates filopodia by coupling membrane protrusion with actin dynamics // Journal of Biological Chemistry. – 2008. – Т. 283. – №. 29. – С. 20454-20472.
51. Lui K. Y. et al. Integrator complex subunit 6 (INTS6) inhibits hepatocellular carcinoma growth by Wnt pathway and serve as a prognostic marker // BMC cancer. – 2017. – Т. 17. – №. 1. – С. 644.
52. Marsh T., Pietras K., McAllister S. S. Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease. – 2013. – Т. 1832. – №. 7. – С. 1070-1078.
53. Martinez-Rico C. et al. Integrins stimulate E-cadherin-mediated intercellular adhesion by regulating Src-kinase activation and actomyosin contractility // J Cell Sci. – 2010. – Т. 123. – №. 5. – С. 712-722.
54. Masoud V., Pagès G. Targeted therapies in breast cancer: New challenges to fight against resistance // World journal of clinical oncology. – 2017. – Т. 8. – №. 2. – С. 120.
55. McNally A. K., Anderson J. M. β1 and β2 integrins mediate adhesion during macrophage fusion and multinucleated foreign body giant cell formation // The American journal of pathology. – 2002. – Т. 160. – №. 2. – С. 621-630.
56. Moon S. Y., Zheng Y. Rho GTPase-activating proteins in cell regulation // Trends in cell biology. – 2003. – Т. 13. – №. 1. – С. 13-22.
57. Moslim M. A. et al. Early genetic counseling and detection of CDH1 mutation in asymptomatic carriers improves survival in hereditary diffuse gastric cancer // Surgery. – 2018. – Т. 164. – №. 4. – С. 754-759.

58. Narumiya S., Tanji M., Ishizaki T. Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion // Cancer and Metastasis Reviews. – 2009. – Т. 28. – №. 1-2. – С. 65-76.
59. Nguyen D. X., Massagué J. Genetic determinants of cancer metastasis // Nature Reviews Genetics. – 2007. – Т. 8. – №. 5. – С. 341.
60. Notsuda H. et al. p190A RhoGAP is involved in EGFR pathways and promotes proliferation, invasion and migration in lung adenocarcinoma cells // International journal of oncology. – 2013. – Т. 43. – №. 5. – С. 1569-1577.
61. Nowak F. V. Porf-2= Arhgap39= Vilse: A Pivotal Role in Neurodevelopment, Learning and Memory // eNeuro. – 2018. – Т. 5. – №. 5.
62. Pandya P., Orgaz J. L., Sanz-Moreno V. Modes of invasion during tumour dissemination // Molecular oncology. – 2017. – Т. 11. – №. 1. – С. 5-27.
63. Paňková K. et al. The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells // Cellular and molecular life sciences. – 2010. – Т. 67. – №. 1. – С. 63-71.
64. Peng H. et al. Pseudogene INTS6P1 regulates its cognate gene INTS6 through competitive binding of miR-17-5p in hepatocellular carcinoma // Oncotarget. – 2015. – Т. 6. – №. 8. – С. 5666.
65. Pon J. R., Marra M. A. Driver and passenger mutations in cancer // Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. – 2015. – Т. 10. – С. 25-50.
66. Quail D. F., Joyce J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis // Nature medicine. – 2013. – Т. 19. – №. 11. – С. 1423.
67. Raftopoulou M., Hall A. Cell migration: Rho GTPases lead the way // Developmental biology. – 2004. – Т. 265. – №. 1. – С. 23-32.
68. Ridley A. J. Rho GTPase signalling in cell migration // Current opinion in cell biology. – 2015. – Т. 36. – С. 103-112.
69. Ridley A. J. Rho GTPases and cell migration // Journal of cell science. – 2001. – Т. 114. – №. 15. – С. 2713-2722.
70. Rivera C., Venegas B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma // Oncology letters. – 2014. – Т. 8. – №. 1. – С. 7-11.
71. Rubin E. M. et al. Wnt inhibitory factor 1 decreases tumorigenesis and metastasis in osteosarcoma // Molecular cancer therapeutics. – 2010. – Т. 9. – №. 3. – С. 731-741.
72. Ryland G. L. et al. Loss of heterozygosity: what is it good for? // BMC medical genomics. – 2015. – Т. 8. – №. 1. – С. 45.

73. Sadok A., Marshall C. J. Rho GTPases: masters of cell migration // Small GTPases. – 2014. – Т. 5. – №. 4. – С. e983878.
74. Sahai E. Mechanisms of cancer cell invasion // Current opinion in genetics & development. – 2005. – Т. 15. – №. 1. – С. 87-96.
75. Saitoh M. Involvement of partial EMT in cancer progression // The Journal of Biochemistry. – 2018. – Т. 164. – №. 4. – С. 257-264.
76. Salmenperä P. et al. Formation and activation of fibroblast spheroids depend on fibronectin–integrin interaction // Experimental cell research. – 2008. – Т. 314. – №. 19. – С. 3444-3452.
77. Sanz-Moreno V. et al. ROCK and JAK1 signaling cooperate to control actomyosin contractility in tumor cells and stroma // Cancer cell. – 2011. – Т. 20. – №. 2. – С. 229-245.
78. Schmid M. C., Varner J. A. Myeloid cells in the tumor microenvironment: modulation of tumor angiogenesis and tumor inflammation // Journal of oncology. – 2010. – Т. 2010.
79. Shen C. H. et al. Breast tumor kinase phosphorylates p190RhoGAP to regulate rho and ras and promote breast carcinoma growth, migration, and invasion // Cancer Research. – 2008. – Т. 68. – №. 19. – С. 7779-7787.
80. Su L., Agati J. M., Parsons S. J. p190RhoGAP is cell cycle regulated and affects cytokinesis // J Cell Biol. – 2003. – Т. 163. – №. 3. – С. 571-582.
81. Takami K. et al. Multistep carcinogenesis in colorectal cancers // The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health. – 1995. – Т. 26. – С. 190-196.
82. Tang H. et al. Loss of Scar/WAVE complex promotes N-WASP-and FAK-dependent invasion // Current Biology. – 2013. – Т. 23. – №. 2. – С. 107-117.
83. Teodorczyk M. et al. CD95 promotes metastatic spread via Sck in pancreatic ductal adenocarcinoma // Cell death and differentiation. – 2015. – Т. 22. – №. 7. – С. 1192.
84. Thiery J. P. et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease // cell. – 2009. – Т. 139. – №. 5. – С. 871-890.
85. Valastyan S., Weinberg R. A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms // Cell. – 2011. – Т. 147. – №. 2. – С. 275-292.
86. Van der Auwera G. A. et al. From FastQ data to high-confidence variant calls: the genome analysis toolkit best practices pipeline // Current protocols in bioinformatics. – 2013. – Т. 43. – №. 1. – С. 11.10. 1-11.10. 33.
87. van Zijl F., Krupitza G., Mikulits W. Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration // Mutation Research/Reviews in Mutation Research. – 2011. – Т. 728. – №. 1-2. – С. 23-34.

88. Vogelstein B. et al. Cancer genome landscapes // science. – 2013. – Т. 339. – №. 6127. – С. 1546-1558.
89. Vogelstein B., Kinzler K. W. Cancer genes and the pathways they control // Nature medicine. – 2004. – Т. 10. – №. 8. – С. 789.
90. Wang J. et al. Downregulation of miR-486-5p contributes to tumor progression and metastasis by targeting protumorigenic ARHGAP5 in lung cancer // Oncogene. – 2014. – Т. 33. – №. 9. – С. 1181.
91. Wang J. R. et al. Expression of MMP-13 is associated with invasion and metastasis of papillary thyroid carcinoma // Eur Rev Med Pharmacol Sci. – 2013. – Т. 17. – №. 4. – С. 427-35.
92. Wang K., Li M., Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data // Nucleic acids research. – 2010. – Т. 38. – №. 16. – С. e164.
93. Westermarck J., KÄHÄRI V. M. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion // The FASEB journal. – 1999. – Т. 13. – №. 8. – С. 781-792.
94. Wieland I. et al. Isolation of DICE1: a gene frequently affected by LOH and downregulated in lung carcinomas // Oncogene. – 1999. – Т. 18. – №. 32. – С. 4530.
95. Wilkinson S., Paterson H. F., Marshall C. J. Cdc42–MRCK and Rho–ROCK signalling cooperate in myosin phosphorylation and cell invasion // Nature cell biology. – 2005. – Т. 7. – №. 3. – С. 255.
96. Xu P. et al. Multiple pro-tumorigenic functions of the human minor Histocompatibility Antigen-1 (HA-1) in melanoma progression // Journal of dermatological science. – 2017. – Т. 88. – №. 2. – С. 216-224.
97. Yao Y., Dai W. Genomic instability and cancer // Journal of carcinogenesis & mutagenesis. – 2014. – Т. 5.
98. Zaman M. H. et al. Migration of tumor cells in 3D matrices is governed by matrix stiffness along with cell-matrix adhesion and proteolysis // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2006. – Т. 103. – №. 29. – С. 10889-10894.
99. Zhang P., Sun Y., Ma L. ZEB1: at the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance // Cell cycle. – 2015. – Т. 14. – №. 4. – С. 481-487.

АНТИПЛАГИАТ
ТВОРИТЕ СОБСТВЕННЫМ УМОМ

Отчет о проверке на заимствования №1

Автор: drcoxisefoxi@gmail.com / ID: 6867538
Проверяющий: (drcoxisefoxi@gmail.com / ID: 6867538)

Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат»- http://users.antiplagiat.ru

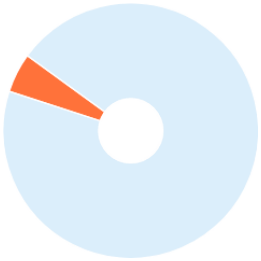
ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 4
Начало загрузки: 12.06.2019 21:19:23
Длительность загрузки: 00:00:01
Имя исходного файла: ВКР Новиков 2019_испр (1)
Размер текста: 1528 кБ
Символов в тексте: 81840
Слов в тексте: 9828
Число предложений: 979

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Последний готовый отчет (ред.)
Начало проверки: 12.06.2019 21:19:25
Длительность проверки: 00:00:07
Комментарии: не указано
Модули поиска: Модуль поиска Интернет

ЗАИМСТВОВАНИЯ	ЦИТИРОВАНИЯ	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ
5,38%	0%	94,62%



Заимствования — доля всех найденных текстовых пересечений, за исключением тех, которые система отнесла к цитированиям, по отношению к общему объему документа.
Цитирования — доля текстовых пересечений, которые не являются авторскими, но система посчитала их использование корректным, по отношению к общему объему документа. Сюда относятся оформленные по ГОСТу цитаты; общеупотребительные выражения; фрагменты текста, найденные в источниках из коллекций нормативно-правовой документации.
Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.
Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.
Оригинальность — доля фрагментов текста проверяемого документа, не обнаруженных ни в одном источнике, по которым шла проверка, по отношению к общему объему документа.
Заимствования, цитирования и оригинальность являются отдельными показателями и в сумме дают 100%, что соответствует всему тексту проверяемого документа.
Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые пересечения проверяемого документа с проиндексированными в системе текстовыми источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности заимствований или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в отчете	Источник	Ссылка	Актуален на	Модуль поиска
[01]	1,58%	http://centaur.reading.ac.uk/68648/1/17021082_Keeton_thesis.pdf (2/2)	http://centaur.reading.ac.uk	04 Мар 2018	Модуль поиска Интернет
[02]	0,65%	http://centaur.reading.ac.uk/45043/3/20023167_Ponuwei_thesis_text.pdf	http://centaur.reading.ac.uk	04 Мар 2018	Модуль поиска Интернет
[03]	0,48%	Диссертация	http://oncology.tomsk.ru	28 Окт 2017	Модуль поиска Интернет

Еще источников: 14
Еще заимствований: 2,66%

Директору Биологического института,

д-ру биол. наук Д.С. Воробьёву

от с.н.с. НИИ онкологии Томского НИМЦ,

канд. биол. наук Е.В. Денисова

Служебная записка

Выпускная квалификационная работа "Генетические нарушения, вовлеченные в инвазию рака молочной железы " студента 4 курса Биологического института кафедры цитологии и генетики Новикова Н.М., выполненная на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский научно-исследовательский институт онкологии» содержит в себе сведения, представляющие интеллектуальную собственность НИИ онкологии Томского НИМЦ, а также сведения, имеющие потенциальную коммерческую ценность, в связи с чем текст ВКР не может быть опубликован в репозитории. Прошу разрешить размещение текста ВКР в репозитории с изъятием раздела "Результаты и обсуждение".

13.06.2019г

Денисов Е.В.)