

©Коллектив авторов

## БЕЛКОВЫЕ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЁРЫ ЗАБОЛЕВАНИЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

*А.И. Аутенилюс<sup>1,2\*</sup>, А.В. Бернадо<sup>1</sup>, К.И. Давлетова<sup>1</sup>, С.А. Архипов<sup>1,2</sup>, И.П. Жураковский<sup>1,2</sup>,  
Е.С. Михайлова<sup>1,2</sup>, А.В. Проскура<sup>2</sup>, А.П. Богачук<sup>3</sup>, В.М. Липкин<sup>3</sup>, В.В. Ляхович<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Новосибирский государственный медицинский университет,  
630091, Новосибирск, Красный пр-кт, 52; \*эл. почта: lrciir@211.ru

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики –  
подразделение Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины,  
630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2/12

<sup>3</sup>Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова,  
117997, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, 16/10

Проведено сравнение показателей злокачественных и незлокачественных заболеваний молочной железы по 8 белкам: гистидинбогатый гликопротеин (HRG), муцин 1 (MUC1), ингибитор активатора плазминогена 1 (PAI-1), белок теплового шока 90αA1 (HSP90αA1), E-кадгерин (CDH1), рецептор эстрогена α (ERα), рецептор прогестерона (PGR) и интерлейкин 12 (IL-12). Их концентрации определяли в супернатантах иммуннокомпетентных клеток крови и биоптатов молочной железы при спонтанной, а также индуцированной поликлональным активатором продукции и после воздействия на биоптаты фактора дифференцировки HLDF. Помимо этого рассчитывали индексы влияния поликлонального активатора и HLDF на продукцию этих белков и исследовали корреляционные связи перечисленных выше показателей с экспрессией маркёров эпителиально-мезенхимального перехода: коллагена II типа (CII), β-1-интегрина (CD29) и кадгерина-E (CDH1). Обнаружены статистически значимые различия в концентрации HRG в супернатанте иммуннокомпетентных клеток крови, IL-12 при спонтанной продукции биоптатами, PGR при индуцированной поликлональным активатором продукции биоптатами, CDH1 и IL-12 при воздействии HLDF на биоптаты. По индексам влияния поликлонального активатора и HLDF статистически значимые различия выявлены на продукцию CDH1. При сравнении маркёров эпителиально-мезенхимального перехода между биоптатами инвазивной карциномы неспецифического типа и незлокачественными заболеваниями молочной железы обнаружены статистически значимые различия в показателях экспрессии CD29, в то время как по экспрессии CDH1 и CII различий получено не было. Это свидетельствует о наличии клеточной атипии в образцах незлокачественных заболеваний молочной железы и подтверждается обнаруженными корреляционными связями между продукцией некоторых белков и экспрессией маркёров эпителиально-мезенхимального перехода.

**Ключевые слова:** заболевания молочной железы; белковые маркёры; иммуногистохимия

**DOI:** 10.18097/PBMC20206602167

## ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы (РМЖ) является одной из наиболее часто встречающихся злокачественных опухолей и основной причиной смерти от злокачественных заболеваний среди женщин во всём мире [1]. Последние достижения в области геномных технологий помогли исследователям расширить своё понимание генетических основ рака и предоставили им важный инструмент для открытия новых биомаркёров. Тем не менее, в настоящее время известно, что геномный подход имеет свои ограничения: анализ на уровне генов или транскриптов может не отражать непосредственно клеточные функции из-за ключевых биологических механизмов, таких как альтернативный сплайсинг и посттрансляционная модификация белков [2]. Биомаркёры, обнаруженные в результате протеомного анализа, можно интегрировать в персонализированный подход к наблюдению за пациентами [3]. Поскольку опухолевые клетки секретируют и выделяют характерные белки с большей скоростью, чем здоровые клетки, многие из этих белков

попадают в кровь и выполняют множество функций. Белки, секретируемые или выделяемые атипичными клетками, могут быть фенотипическими биомаркёрами заболеваний и, что ещё более важно, могут обнаруживаться в крови и других жидкостях организма неинвазивным способом [4].

Одним из потенциальных маркёров опухолевой прогрессии является гистидинбогатый гликопротеин (HRG), представляющий собой белок с широким спектром функций: он участвует в регулировании многих процессов, таких как ангиогенез, коагуляция, фибринолиз, клеточный хемотаксис, иммунный ответ, апоптоз, клеточная адгезия, миграция, рост и пролиферация клеток [5]. Его мРНК была обнаружена более чем в 70% случаев в тканях опухоли молочной железы и отсутствовала в здоровой ткани при использовании метода ОТ-PCR (ПЦР с обратной транскрипцией) с дальнейшей детекцией электрофорезом [6]. В нашей лаборатории при использовании метода RT-qPCR (количественная ПЦР в режиме реального времени) мРНК HRG была выявлена в 70% случаев при РМЖ и в 66,7% при доброкачественных заболеваниях молочной железы [7].

Муцин 1 (MUC1) представляет собой трансмембранный гликопротеин и является одним из наиболее тщательно исследованных антигенов, ассоциированных с опухолями. MUC1 может усиливать инвазивные и метастатические свойства аденокарцином путём снижения клеточной адгезии и клеточно-внеклеточного матрикса [8].

Ингибитор активатора плазминогена 1 (PAI-1) является прокоагулянтом, провоспалительным и профибротическим белком. Экспрессия PAI-1 была идентифицирована как негативно связанная с прогнозом у пациентов с РМЖ [9].

Белок теплового шока 90 (HSP90) существует в виде множественных изоформ, которые включают HSP90 $\alpha$ A1 (индуцибельная форма) и HSP90AB1 (конститутивная форма) в цитоплазме, HSP90 $\alpha$ B1 в эндоплазматической сети и TRAP1 в митохондриях [10]. Повышенная экспрессия HSP90 $\alpha$ A1, по-видимому, является признаком РМЖ и может быть неотъемлемой частью механизма развития новообразования [11]. Существует значительный дефицит данных в отношении концентрации HSP90 $\alpha$ A1 в биологических жидкостях и его прогностической роли при злокачественных, предраковых и доброкачественных поражениях молочной железы.

Е-кадгерин (CDH1) является эпителиальным маркёром и играет важную роль в адгезии клеток. Экспрессия CDH1 строго регулируется на генетическом, эпигенетическом, транскрипционном и посттрансляционном уровнях во время онкогенеза [12]. Частичная или полная потеря экспрессии и/или функции(й) CDH1, означающая эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), была отмечена в многочисленных опухолях эпителиального происхождения, в том числе в опухолях молочной железы, что приводит к дестабилизации межклеточных взаимодействий и aberrантной активации клеточных сигнальных путей [13].

Даже с развитием геномных тестов полуколичественная оценка эстрогенового (ER) и прогестеронового рецепторов (PGR) остаётся наиболее значимым прогностическим биомаркёром. ER экспрессируется в двух изоформах – ER $\alpha$  и ER $\beta$ . В работе был исследован ER $\alpha$ , так как он является преобладающим рецептором, экспрессируемым в опухолях молочной железы [14].

Интерлейкин 12 (IL-12) – это цитокин, который играет важную роль как во врождённом, так и в адаптивном звеньях иммунитета. Известно, что IL-12 является активатором противоопухолевого иммунитета, а также антиангиогенным фактором, который усиливает противоопухолевую активность в доклинических моделях [15, 16].

Целью работы было определение концентрации 8 протеинов в супернатантах иммунокомпетентных клеток крови и биоптатах при влиянии на них поликлонального активатора и фактора дифференцировки HLDF, а также экспрессии иммуногистохимических маркёров ЭМП

в биоптатах ткани пациентов с инвазивной карциномой неспецифического типа и незлокачественными заболеваниями молочной железы.

## МЕТОДИКА

Исследован биопсийный материал молочной железы 35 женщин. Из них 23 – с установленным диагнозом инвазивная карцинома неспецифического типа (ИКНТ), все пациенты имели степень злокачественности G2; 12 – с незлокачественными заболеваниями молочной железы (НЗМЖ): пациенты с фиброаденомой, фиброаденоматозом и фиброзно-кистозной болезнью. Средний возраст больных ИКНТ 54,8 $\pm$ 2,7 лет (от 23 лет до 71 года). Средний возраст больных с НЗМЖ составил 40,5 $\pm$ 3,6 лет (от 18 до 63 лет).

Для индуцирования продукции белков биоптатами ткани молочной железы использовали комплекс поликлональных активаторов (ПА), который включает фитомагглютинин 4 мкг/мл, конканавалин А 4 мкг/мл и липополисахарид 2 мкг/мл (“Вектор-Бест”, Россия) [17]. Биоптаты, полученные методом трепанобиопсии, делили на три части по 8 мм<sup>3</sup>. Одну часть инкубировали в 1 мл питательной среды DMEM-F12 для определения спонтанной продукции (СП), а другую – в таком же объёме среды при 37°C в течение 72 ч с комплексом ПА для определения индуцированной продукции (ИП), третью часть инкубировали при тех же условиях с HLDF (Human Leukemia Differentiation Factor) [18] в концентрации 20 мкг/мл, после чего клетки осаждали центрифугированием при 900 g 15 мин и получали супернатант. Супернатант клеток крови получали следующим образом: цельную кровь в количестве 1 мл помещали в стерильный флакон с 4 мл питательной среды DMEM-F12 и культивировали при 37°C в течение 24 ч, затем осаждали центрифугированием в вышеуказанном режиме. Концентрации белков в супернатантах определяли иммуноферментным анализом (ИФА) с использованием наборов производства “Cloud-Clone Corp.” (США) согласно стандартной инструкции. Индекс влияния поликлональных активаторов (ИБПА) на продукцию белков биоптатами опухолей высчитывали по формуле: ИБПА = А/Б, где А – концентрация белка в супернатанте после инкубации биоптата с ПА, а Б – концентрация белка в супернатанте биоптата без стимуляции ПА. Индекс влияния HLDF (ИБHLDF) на продукцию белков биоптатами опухолей высчитывали по формуле: ИБHLDF = А/Б, где А – концентрация протеина в супернатанте после инкубации биоптата с HLDF, а Б – концентрация протеина в супернатанте биоптата без стимуляции HLDF.

Кроме того, в срезах биоптатов молочной железы определяли экспрессию маркёров ЭМП: коллагена II типа (СII),  $\beta$ -1-интегрина (CD29) и кадгерина-Е (CDH1). СII обычно выявляется только в клетках мезенхимальной природы. В тех случаях, когда клетки эпителия претерпевают трансформацию и совершают ЭМП, они утрачивают

способность секретировать белки, характерные для эпителиальных клеток, и становятся способными секретировать компоненты внеклеточного матрикса, в том числе коллагены, что свидетельствует о приобретении ими мезенхимального фенотипа. Это расценивается как один из признаков клеточной атипии [19], так как клеточные элементы, приобретшие мезенхимальный и утратившие эпителиальный фенотип, не могут рассматриваться как типичные эпителиальные клетки. Таким образом, экспрессия СП в клетках молочной железы является показателем ЭМП и, следовательно, маркером клеточного атипизма. Экспрессия СП определялась только в клетках эпителиального слоя.

Помимо экспрессии СП, определяли экспрессию CD29 – гликопротеина, участвующего в адгезии клеток к внеклеточному матриксу. Данный гликопротеин может экспрессироваться при ЭМП, в том числе, в клетках злокачественных опухолей молочной железы [20].

Ещё одним из определяемых иммуногистохимически показателей была экспрессия кадгерина-Е (CDH1). В норме CDH1 присутствует в эпителиальных клетках, но при наличии ЭМП эпителиальные клетки в той или иной степени утрачивают способность к его синтезу, что отражает утрату ими эпителиального и приобретения мезенхимального фенотипа [21].

Иммуногистохимическое исследование экспрессии СП, CD29 и CDH1 проводили на парафиновых срезах биоптатов опухолей с использованием набора “Vectastain Universal Elite ABC Kit” (“Vector Laboratories”, США). Анализ экспрессии изучаемых маркеров проводился с помощью морфометрического комплекса на базе микроскопа “Микромед-6”, цифровой камеры “DSM 510” и программного обеспечения ImageJ 1.42g (“NIH”, США). Для каждого пациента оценивали по 10 изображений (площадь каждого составляла 95578 мкм<sup>2</sup>), подсчитывали относительное количество клеток, либо экспрессирующих (Э), либо не экспрессирующих каждый маркер (Н). Для удобства оценки использовали отношения экспрессирующих клеток к не экспрессирующим для СП и CD29 и не экспрессирующих к экспрессирующим для CDH1.

Статистическую обработку данных выполняли с помощью программного пакета Statistica V6.0. При определении характера распределения данных использовали уравнение Колмогорова-Смирнова с определением поправки Лиллифорса. Поскольку распределение отличалось от нормального, проводили анализ с использованием непараметрического критерия Уилкоксона-Манна-Уитни. Показатели выражали в виде медианы – Me, и нижнего и верхнего квартилей (Q1; Q3). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный анализ путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (R).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Уже после первых измерений концентраций HSP90αA1 и MUC1 в супернатантах клеток крови стало ясно, что концентрации этих белков находятся ниже уровня чувствительности используемых для проведения ИФА наборов, поэтому определение концентраций HSP90αA1 и MUC1 проводили только в супернатанте биоптатов ткани молочной железы при разных вариантах исследования.

При сравнении концентраций исследуемых протеинов в супернатанте клеток крови наблюдалась статистически значимо более высокая концентрация только HRG ( $p=0,004$ ) в образцах, полученных от больных ИКНТ по сравнению с НЗМЖ (табл. 1). Эти данные вполне согласуются с полученными нами ранее результатами исследования экспрессии мРНК HRG [7].

При сравнении концентраций исследуемых протеинов в супернатантах биоптатов при их СП наблюдалась статистически значимо более высокая концентрация только IL-12 ( $p=0,04$ ) в образцах, полученных от больных ИКНТ по сравнению с НЗМЖ (табл. 1). Хотя IL-12 является провоспалительным цитокином, тем не менее, есть данные о том, что у больных РМЖ с повышенными концентрациями IL-12 в крови выживаемость выше, чем у пациентов с низкими концентрациями [16].

При сравнении концентраций исследуемых протеинов при ИП биоптатами статистически значимо наблюдалась более высокая концентрация PGR ( $p=0,01$ ) в образцах НЗМЖ по сравнению с ИКНТ (табл. 1). PGR активирует транскрипционный процесс, участвующий как в нормальной пролиферации клеток, так и в развитии РМЖ. В то же время PGR-экспрессия является важным маркером люминального РМЖ, который связан с хорошим прогнозом и лучше отвечает на эндокринную терапию [22].

При сравнении концентраций исследуемых протеинов в супернатантах биоптатов при воздействии на них HLDF наблюдали статистически значимо более низкую концентрацию CDH1 ( $p=0,003$ ) и, наоборот, статистически значимо более высокую концентрацию IL-12 ( $p=0,04$ ) в образцах ИКНТ по сравнению с НЗМЖ (табл. 1). Сниженная экспрессия CDH1 является отличительной чертой ЭМП – процесса, который вызывает изменения в экспрессии генов и в поведении клеток, связанных с прогрессированием и агрессивностью опухоли [23].

При сравнении ИВПА и ИВHDLF на продукцию исследуемых белков статистически выше были показатели ИВПА ( $p=0,03$ ) и ИВHDLF ( $p=0,0002$ ) на продукцию CDH1 биоптатами, полученными от пациентов с НЗМЖ, по сравнению с ИКНТ, за счёт более высокой ИП и более высокой продукции при воздействии HLDF (табл. 2). Следовательно, ПА и HLDF стимулировали продукцию CDH1 в биоптатах, полученных от пациентов с НЗМЖ, что свидетельствует о сдерживании этими факторами ЭМП.

# МАРКЁРЫ ЗАБОЛЕВАНИЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Таблица 1. Концентрация исследуемых белков в супернатанте клеток крови (КК), при спонтанной продукции биоптатами (СП), при индуцированной продукции (ИП) и под воздействием HLDF (HLDF)

	КК		СП		ИП		HLDF	
	НЗМЖ	ИКНТ	НЗМЖ	ИКНТ	НЗМЖ	ИКНТ	НЗМЖ	ИКНТ
	Me (Q1; Q3)	Me (Q1; Q3)	Me (Q1; Q3)	Me (Q1; Q3)	Me (Q1; Q3)	Me (Q1; Q3)	Me (Q1; Q3)	Me (Q1; Q3)
PGR нг/мл	39,5 (31,0; 54,8)	46,0 (29,0; 66,0)	15,2 (9,4; 19,0)	12,5 (7,6; 16,0)	22,2 (18,6; 25,9)	14,4 (8,5; 21,4)	19,2 (10,4; 38,4)	15,5 (12,1; 22,0)
					$p_{1,2}=0,01$			
ERα нг/мл	12,7 (9,5; 20,3)	9,5 (4,0; 15,5)	1,5 (0,2; 3,5)	3,0 (0,8; 5,0)	0,5 (0,2; 1,2)	0,9 (0,2; 1,8)	0,4 (0,2; 1,1)	0,5 (0,2; 2,5)
HRGP нг/мл	2499,7 (2276,1; 2872,2)	3681,0 (2819,3; 3868,0)	2333,8 (1728,1; 2815,0)	3239,0 (2634,0; 3529,0)	1300,6 (768,8; 2300,5)	1823,0 (1056,3; 2453,5)	862,7 (597,2; 1547,9)	1479,0 (604,6; 2437,0)
					$p_{1,2}=0,004$			
CDH1 пг/мл	9137,0 (8452,5; 9707,0)	7780,0 (6964,0; 14061,0)	9237,0 (7276,0; 9914,0)	9731,0 (7162,0; 14181,0)	9957,5 (8551,0; 11243,0)	6218,0 (2535,0; 10887,0)	10306,5 (8598,5; 12613,0)	5393,0 (3124,0; 8404,0)
							$p_{1,2}=0,003$	
PAI1 пг/мл	6595,3 (3856,9; 7893,6)	7169,0 (4999,5; 9873,0)	581,7 (235,5; 3152,1)	881,0 (514,0; 2535,6)	1032,5 (284,7; 3192,3)	797,0 (409,0; 1869,0)	496,1 (105,6; 1474,3)	550,0 (334,0; 1663,0)
HSP90αA1 нг/мл			50,3 (44,2; 67,3)	70,0 (33,7; 179,3)	46,1 (33,3; 54,8)	34,2 (19,6; 58,3)	35,6 (14,8; 41,9)	36,5 (14,2; 72,6)
MUC1 нг/мл			0,9 (0,3; 1,7)	1,6 (0,3; 29,5)	0,3 (0,3; 0,3)	0,5 (0,3; 2,7)	0,3 (0,3; 0,4)	0,3 (0,3; 0,7)
IL12 пг/мл	153,5 (134,0; 193,0)	284,0 (157,0; 488,0)	9,2 (6,4; 19,4)	25,6 (10,2; 41,0)	6,7 (4,6; 11,8)	14,4 (9,0; 21,2)	4,5 (2,6; 12,4)	13,8 (9,0; 29,2)
			$p_{1,2}=0,04$				$p_{1,2}=0,04$	

Примечание. Здесь и в таблицах 2 и 3:  $p_{1,2}$  – при сравнении НЗМЖ и ИКНТ. КК – супернатант клеток крови, СП – спонтанная продукция биоптатами, ИП – индуцированная продукция, HLDF – продукция под воздействием HLDF.

Таблица 2. Концентрация CDH1 при спонтанной продукции биоптатами (СП), при индуцированной продукции (ИП) и под воздействием HLDF (HLDF), а также показатели ИВПА и ИВHLDF на продукцию CDH1 биоптатами

Диагноз	СП Me (Q1; Q3)	ИП Me (Q1; Q3)	HLDF Me (Q1; Q3)	ИВПА Me (Q1; Q3)	ИВHLDF Me (Q1; Q3)
НЗМЖ	9237,0 (7276,0; 9914,0)	9957,5 (8551,0; 11243,0)	10306,5 (8598,5; 12613,0)	1,2 (0,8; 1,4)	1,1 (0,8; 1,5)
ИКНТ	9731,0 (7162,0; 14181,0)	6218,0 (2535,0; 10887,0)	5393,0 (3124,0; 8404,0)	0,4 (0,3; 1,3)	0,5 (0,3; 0,7)
$p$	$p_{1,2}=0,5$	$p_{1,2}=0,1$	$p_{1,2}=0,003$	$p_{1,2}=0,03$	$p_{1,2}=0,0002$

Сравнение маркёров ЭМП показало, что статистически значимо были выше показатели экспрессии CD29 в биоптатах при ИКНТ, чем при НЗМЖ ( $p=0,017$ ). Не было обнаружено статистически значимых различий по показателям экспрессии CDH1 ( $p=0,1$ ) и СП ( $p=0,2$ ), что свидетельствовало о наличии ЭМП, а, следовательно, и клеточной атипии, при НЗМЖ.

При оценке корреляционных связей между показателями экспрессии маркёров ЭМП и концентрацией белков в супернатанте клеток крови были обнаружены слабые корреляционные связи: обратная между концентрацией ER $\alpha$  и CD29, прямая между концентрацией HRG и СП и также прямая между концентрацией CDH1 и показателем экспрессии CDH1. Кроме того, обнаружена умеренная прямая корреляционная связь между концентрацией PAI-1 в супернатанте клеток крови и показателями экспрессии СП (табл. 3).

Таблица 3. Коэффициенты ранговой корреляции Спирмена (R) между показателями концентрации протеинов и показателями экспрессии маркёров ЭМП, для которых была обнаружена статистическая значимость (p)

Сравниваемые показатели	R	p
<b>PGR</b>		
ИП и CD29	-0,372	0,03
ИБПА и СП	-0,415	0,02
ИБHLDf и СП	-0,355	0,04
<b>ER</b>		
КК и CD29	-0,399	0,02
<b>HRG</b>		
КК и СП	0,354	0,04
<b>CDH1</b>		
КК и CDH1	0,397	0,02
HLDF и СП	-0,551	0,0009
<b>PAI1</b>		
КК и СП	0,465	0,006
<b>HSP90<math>\alpha</math>A1</b>		
ИП и CD29	-0,338	0,05

При оценке корреляционных связей между экспрессией маркёров ЭМП и концентрацией протеинов при спонтанной продукции биоптатами статистически значимых корреляционных связей обнаружено не было.

При оценке корреляционных связей между экспрессией маркёров ЭМП и концентрацией белков в супернатанте при ИП биоптатами обнаружены слабые обратные связи между показателями экспрессии CD29 и концентрациями PGR и HSP90 $\alpha$ A1 (табл. 3).

При оценке корреляционных связей между экспрессией маркёров ЭМП и концентрацией белков в супернатанте при воздействии на биоптаты HLDF обнаружена умеренная обратная связь между концентрацией CDH1 и показателями экспрессии СП (табл. 3).

При оценке корреляционных связей между экспрессией маркёров ЭМП и ИБПА на продукцию белка биоптатами была обнаружена умеренная обратная корреляционная связь между показателями экспрессии СП и ИБПА на продукцию PGR (табл. 3).

При оценке корреляционных связей между экспрессией маркёров ЭМП и ИБHLDf на продукцию белка биоптатами была обнаружена слабая обратная связь между показателями экспрессии СП и ИБHLDf на продукцию PGR (табл. 3).

Наибольший интерес представляет умеренная прямая корреляционная связь, обнаруженная между концентрацией PAI-1 в супернатанте клеток крови и показателями экспрессии СП; она может объясняться перестройкой микроокружения, которая сопровождается прогрессированием рака. Известно, что повышенная концентрация PAI-1 связана с активацией сигнальных путей, которые модифицируют микроокружение опухоли, предотвращают апоптоз и стимулируют ангиогенез посредством прямого ингибирования протеаз [24]. При этом происходит отложение коллагена, что сопровождается ремоделированием и уплотнением коллагеновых волокон, а это, в свою очередь, также повышает устойчивость раковых клеток к протеолитической деградации и имеет большое значение для прогрессии рака [25]. Также умеренная связь, только обратная, была обнаружена между ИБПА на продукцию PGR и показателями экспрессии СП, что может быть связано с избирательностью воздействия ПА на биоптаты НЗМЖ и уменьшением его влияния на биоптаты, в которых клетки находятся в состоянии ЭМП, следовательно, с наличием клеточной атипии, и на биоптаты ИКНТ. Кроме того, умеренная обратная связь, обнаруженная между концентрацией CDH1 в супернатанте биоптатов при воздействии на них HLDF и показателями экспрессии СП, также может свидетельствовать об избирательности действия фактора дифференцировки HLDF на образцы, в которых клеточная атипия менее выражена.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В результате проведённого исследования были выявлены различия в концентрациях протеинов при злокачественных и незлокачественных заболеваниях молочной железы, а именно – статистически значимо более высокие концентрации HRG в супернатанте клеток крови, IL-12 в супернатанте биоптатов при СП и при воздействии на них HLDF при ИКНТ по сравнению с НЗМЖ, свидетельствуют о возможности использования их в качестве биомаркёров злокачественных заболеваний. Обнаруженные различия в концентрации HRG в супернатанте клеток крови и отсутствие статистически значимых различий в супернатантах биоптатов при его СП могут свидетельствовать как об усиленной секреции HRG печенью (органом, где HRG экспрессируется в норме) при ИКНТ, так и о наличии среди пациентов с НЗМЖ заболеваний, которые можно отнести к предраковым состояниям, при которых отмечается экспрессия HRG [7].

При этом статистически значимо более высокие концентрации PGR в супернатантах биоптатов при ИП поликлональными активаторами и CDH1 при воздействии на них HLDF отмечены при НЗМЖ, что свидетельствует об избирательном

воздействии ПА и HLDF. Это подтверждается статистически значимыми различиями ИВПА и ИВНЛДФ на продукцию CDH1 биоптатами.

Сравнение маркёров ЭМП показало, что показатели экспрессии CD29 в биоптатах были статистически значимо выше при ИКНТ, чем при НЗМЖ, в то время как по экспрессии CDH1 и CIP различий получено не было. Это свидетельствует о наличии ЭМП, следовательно, и клеточной атипии при НЗМЖ, что подтверждается обнаруженными корреляционными связями между продукцией протеинов и экспрессией маркёров ЭМП. Наибольшее внимание заслуживает наличие умеренных корреляционных связей с показателями экспрессии CIP: прямая с концентрацией PAI-1 в супернатанте клеток и обратные с концентрацией CDH1 в супернатанте биоптатов при воздействии на них HLDF и с ИВПА на продукцию PGR биоптатами. В совокупности эти данные позволяют обнаруживать среди незлокачественных заболеваний те, в которых сильнее выражен ЭМП и клеточная атипия, а, следовательно, выявлять пациентов с риском развития злокачественного заболевания молочной железы.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Финансирование исследования за счёт государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации № АААА-А18-118030790008-7.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования были проведены в соответствии с Хельсинской декларацией. Каждому пациенту была предоставлена информация о проведении исследований, его цели и методах исследования. От каждого пациента получено информированное согласие на проведение исследования и получение образцов крови и биопсий опухолей, подписанное самим пациентом и заверенное врачом. Этический комитет Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины (г. Новосибирск) дал разрешение на проведение этого исследования.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Torre L.A., Bray F., Siegel R.L., Ferlay J., Lortet-Tieulent J., Jemal A. (2015) CA: A Cancer Journal For Clinicians, **65**(2), 87-108.
2. Zeidan B.A., Townsend P.A., Garbis S.D., Copson E., Cutress R.I. (2015) Surgeon, **13**(5), 271-278.
3. Shukla H.D., Mahmood J., Vujaskovic Z. (2015) Cancer Lett., **369**(1), 28-36.
4. Kulasingam V., Diamandis E.P. (2008) Nat. Clin. Pract. Oncol., **5**(10), 588-599. DOI: 10.1038/ncponc1187.
5. Rolny C., Mazzone M., Tugues S., Laoui D., Johansson I., Coulon C., Squadrito M.L., Segura I., Li X., Knevels E., Costa S., Vinckier S., Dresselaer T., Åkerud P., de Mol M., Salomäki H., Phillipson M., Wyns S., Larsson E., Buyschaert I., Botling J., Himmelreich U., van Ginderachter J.A., de Palma M., Dewerchin M., Claesson-Welsh L., Carmeliet P. (2011) Cancer Cell, **19**(1), 31-44.
6. Elissa S., Matboli M., Shehata H.H. (2015) Transl. Res., **165**(3), 417-427.
7. Autenshlyus A.I., Golovanova A.V., Studenikina A.A., Zhurakovskiy I.P., Arhipov S.A., Proskura A.V., Vavilin V.A., Lyakhovich V.V., Brusentsov I.I., Sidorov S.V. (2019) Dokl. Biochem. Biophys., **484**(1), 59-62.
8. Huang X., Sun Q., Chen C., Zhang Y., Kang X., Zhang J.Y., Ma D.W., Xia L., Xu L., Xu X.Y., Ren B.H. (2017) Oncotarget, **8**, 90315-90326.
9. Witzel I., Milde-Langosch K., Schmidt M., Karn T., Becker S., Wirtz R., Rody A., Laakmann E., Schütze D., Jänicke F., Müller V. (2014) Onco Targets Ther., **7**, 2205-2213.
10. Chen B., Piel W.H., Gui L., Bruford E., Monteiro A. (2005) Genomics, **86**, 627-637.
11. Zagouri F., Sergeantanis T.N., Nonni A., Papadimitriou C.A., Michalopoulos N.V., Domeyer P., Theodoropoulos G., Lazaris A., Patsouris E., Zografos E., Pazaiti A., Zografos G.C. (2010) BMC Cancer, **10**, 353.
12. Zeng P., Sun S., Li R., Xiao Z.X., Chen H. (2019) Int. J. Mol. Sci., **20**(9), pii: E2223. DOI: 10.3390/ijms20092223.
13. Wong S.H.M., Fang C.M., Chuah L.H., Leong C.O., Ngai S.C. (2018) Crit. Rev. Oncol. Hematol., **121**, 11-22.
14. Pettersson K., Gustafsson J.A. (2001) Annu. Rev. Physiol., **63**, 165-192.
15. Jafarzadeh A., Minaee K., Farsinejad A.R., Nemati M., Khosravimashizi A., Daneshvar H., Mohammadi M.M., Sheikhi A., Ghaderi A. (2015) Iran J. Basic. Med. Sci., **18**(12), 1189-1198.
16. Youssef S.S., Mohammad M.M., Ezz-El-Arab L.R. (2015) J. Med. Sci., **3**(4), 640-644.
17. Freeman A.E., Hoffman R.M. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**(8), 2694-2698.
18. Zhou S., Sun X., Yu L., Zhou R., Li A., Li M., Yang W.J. (2018) J. Cancer, **9**(3), 604-613.
19. Kostanyan I.A., Astapova M.V., Starovoytova E.V., Dranitsina S.M., Lipkin V.M. (1994) FEBS Lett., **356**(2-3), 327-329.
20. dos Santos P.B., Zanetti J.S., Ribeiro-Silva A., Beltrão E.I. (2012) Diagn. Pathol., **7**, 104.
21. le Bras G.F., Taubenslag K.J., Andl C.D. (2012) Cell Adhesion Migration, **6**(4), 365-373.
22. Lou P., Li C., Shi L., Xia T.S., Zhou W., Wu J., Zhou X., Li X., Wang Y., Wei J.F., Ding Q. (2017) Oncotarget, **8**(10), 16387-16400.
23. Prieto-García E., Díaz-García C.V., García-Ruiz I., Agulló-Ortuño M.T. (2017) Med. Oncol., **34**, 122.
24. Lal I., Dittus K., Holmes C.E. (2013) Breast Cancer Res., **15**(4), 207.
25. Franchi M., Masola V., Bellin G., Onisto M., Karamanos K.A., Piperigkou Z. (2019) J. Clin. Med., **8**(2), 213.

Поступила в редакцию: 05. 11. 2019.  
После доработки: 27. 01. 2020.  
Принята к печати: 21. 04. 2020.

## PROTEINS AND IMMUNOHISTOCHEMICAL MARKERS OF BREAST DISEASES

*A.I. Autenschlyus<sup>1,2\*</sup>, A.V. Bernado<sup>1</sup>, K.I. Davletova<sup>1</sup>, S.A. Arkhipov<sup>1,2</sup>, I.P. Zhurakovsky<sup>1,2</sup>,  
E.S. Mikhailova<sup>1,2</sup>, A.V. Proskura<sup>2</sup>, A.P. Bogachuk<sup>3</sup>, V.M. Lipkin<sup>3</sup>, V.V. Lyakhovich<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Novosibirsk State Medical University,

52 Krasny ave., Novosibirsk, 630091 Russia; \*e-mail: lpciip@211.ru

<sup>2</sup>Institute of Molecular Biology and Biophysics, 2/12 Timakova str., Novosibirsk, 630117 Russia

<sup>3</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, 16/10 Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117997 Russia

In this work, we have compared malignant and non-malignant diseases of the mammary gland using 8 proteins: HRG, MUC1, PAI-1, HSP90 $\alpha$ A1, CDH1, ER $\alpha$ , PGR and IL-12. Their concentrations in the supernatants of blood cells and breast biopsies were compared in terms of spontaneous production, induced by a polyclonal activator and after exposure to biopsy samples of the HLDF differentiation factor, as well as the indices of the effect of the polyclonal activator and HLDF on the protein production. In addition, the correlation relationships of the above indicators with the expression of markers of the epithelial-mesenchymal transition: collagen type II (CII),  $\beta$ -1 integrin (CD29) and cadherin-E (CDH1) were studied. The study revealed statistically significant differences in the concentration of HRG in the supernatant of blood cells, IL-12 during spontaneous production by biopsy specimens, PGR production of biopsy specimens induced by the polyclonal activator, CDH1 and IL-12 production biopsy specimens exposed to HLDF. According to the influence index of the polyclonal activator and HLDF, statistically significant differences were found for CDH1 production. Comparison of non-specific invasive carcinoma biopsy specimens and non-malignant breast diseases by means of the markers of the epithelial-mesenchymal transition revealed statistically significant differences in CD29 expression and the lack of differences in the expression of CDH1 and CII. This indicates the presence of cell atypia in samples of non-malignant breast diseases; it is confirmed by the recognized correlation between the production of certain proteins and the expression of the epithelial-mesenchymal transition markers.

**Key words:** breast diseases; proteins markers; immunohistochemistry

**Funding.** Research funding at the expense of the state task of the Ministry of Health of the Russian Federation No. AAAA-A18-118030790008-7.

Received: 05.11.2019, revised: 27.01.2020, accepted: 21.04.2020.