

<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2021-36-4-78-85>
УДК 575.174.015.3:618.19-006.6-036.4-039-033.2-097

Связь особенностей экспрессии интегринов $\beta 1$ и $\beta 3$ с лимфогенным метастазированием при инвазивной карциноме неспецифического типа молочной железы с учетом морфологической гетерогенности опухоли

Н.В. Крахмаль^{1, 2}, Н.С. Телегина², М.В. Завьялова^{1, 2}, С.В. Вторушин^{1, 2},
В.А. Крохмаль², В.М. Перельмутер¹

¹ Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, 634009, Российская Федерация, Томск, пер. Кооперативный, 5

² Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, 634050, Российская Федерация, Томск, Московский тракт, 2

Аннотация

Цель: изучить экспрессию интегринов $\beta 1$ и $\beta 3$ при инвазивной карциноме неспецифического типа молочной железы и сопоставить полученные результаты с особенностями морфологической гетерогенности опухоли и показателями лимфогенной диссеминации.

Материал и методы. Группу исследования составили 107 пациенток с раком молочной железы (РМЖ), гистотип опухоли в 100% случаев соответствовал по морфологии инвазивной карциноме неспецифического типа (инвазивная протоковая карцинома). Предоперационное лечение больные не получали. В каждом случае выполняли морфологическое исследование образцов первичной опухоли и лимфатических узлов аксиллярной клетчатки, полученных в результате проведения оперативного этапа лечения (радикальная мастэктомия или секторальная резекция молочной железы с аксиллярной лимфаденэктомией). Иммуногистохимически оценивали показатели экспрессии маркеров интегринов $\beta 1$ и $\beta 3$ в ткани первичной опухоли.

Результаты. Исследование продемонстрировало, что увеличение степени злокачественности карциномы молочной железы ассоциировано с уменьшением частоты случаев с наличием позитивной экспрессии интегрин $\beta 1$ и с увеличением частоты случаев с позитивной экспрессией интегрин $\beta 3$. Метастазы в лимфатических узлах значимо реже определяли при наличии позитивной экспрессии интегрин $\beta 1$ в альвеолярных и солидных структурах по сравнению со случаями негативной экспрессии маркера в аналогичных структурах (48%; $\chi^2 = 3,5$; $p = 0,05$ и 48%; $\chi^2 = 4,8$; $p = 0,02$ соответственно). Лимфогенные метастазы регистрировали статистически значимо чаще при наличии позитивной экспрессии интегрин $\beta 3$ в дискретных группах клеток по сравнению со случаями, в которых экспрессия изучаемого маркера в описанных структурах была негативной (47 и 23% соответственно; $\chi^2 = 5,1$; $p = 0,02$).

Заключение. Результаты работы показали наличие взаимосвязей между морфологической гетерогенностью опухоли и показателями экспрессии интегринов $\beta 1$ и $\beta 3$ в паренхиматозных структурах новообразования, выявили зависимость описанных параметров с частотой лимфогенной диссеминации у пациенток с РМЖ. Полученные в результате проведенного исследования данные расширяют и дополняют известные ранее сведения, указывают на возможность оценки маркеров в качестве потенциальных факторов прогноза течения онкологического заболевания.

Ключевые слова: рак молочной железы, интегрины $\beta 1$ и $\beta 3$, морфологическая гетерогенность.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Прозрачность финансовой деятельности: никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации НШ-2701.2020.7 «Разработка новых подходов к прогнозированию течения карцином молочной железы и легких с учетом морфологической и молекулярно-генетической гетерогенности опухоли».

✉ Крахмаль Надежда Валерьевна, e-mail: krakhmal@mail.ru.

Соответствие принципам этики:	информированное согласие получено от каждого пациента. Исследование одобрено этическим комитетом Сибирского государственного медицинского университета Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 3595 от 24.02.2014 г.).
Для цитирования:	Крахмаль Н.В., Телегина Н.С., Завьялова М.В., Вторушин С.В., Крохмаль В.А., Перельмутер В.М. Связь особенностей экспрессии интегринов $\beta 1$ и $\beta 3$ с лимфогенным метастазированием при инвазивной карциноме неспецифического типа молочной железы с учетом морфологической гетерогенности опухоли. <i>Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины</i> . 2021;36(4):78–85. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2021-36-4-78-85 .

Correlation between the features of $\beta 1$ and $\beta 3$ integrin expression and lymphangitic metastatic spread in nonspecific invasive breast carcinoma based on tumor morphological heterogeneity

Nadezhda V. Krakhmal^{1, 2}, Nadezhda S. Telegina², Marina V. Zavyalova^{1, 2},
Sergey V. Vtorushin^{1, 2}, Vladislav A. Krokhmal², Vladimir M. Perelmutter¹

¹ Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences,
5, Kooperativny str., Tomsk, 634009, Russian Federation

² Siberian State Medical University,
2, Moskovsky tract, Tomsk, 634050, Russian Federation

Abstract

Objective. To study $\beta 1$ and $\beta 3$ integrin expression in nonspecific invasive breast carcinoma and to find the associations with parameters of tumor morphological heterogeneity and lymphatic dissemination.

Material and Methods. Study group comprised 107 patients with breast cancer. Histological type of tumor corresponded to invasive carcinoma of a nonspecific type (invasive ductal carcinoma) in 100% of cases. Patients did not receive any preoperative treatment. In each case, we performed morphological examination of samples of primary tumor and axillary lymph nodes obtained at the surgical stage of treatment (radical mastectomy or sectoral resection of mammary gland with axillary lymphadenectomy). The parameters of $\beta 1$ and $\beta 3$ integrin expression in primary tumor tissue were assessed by immunohistochemistry.

Results. The study demonstrated that an increase in the degree of malignancy of breast carcinoma was associated with a decrease in the incidence of positive expression of $\beta 1$ integrin as well as with an increase in the incidence of positive expression of $\beta 3$ integrin. Metastases in lymph nodes were significantly less frequently detected in the presence of positive expression of $\beta 1$ integrin in the alveolar and solid structures compared with the cases of absent expression of the marker in similar structures (48%; $\chi^2 = 3.5$; $p = 0.05$ and 48%; $\chi^2 = 4.8$; $p = 0.02$, respectively). Lymphogenic metastasis were detected significantly more often in cases with positive expression of $\beta 3$ integrin in discrete groups of cells compared with the cases where the expression of study marker in the described structures was absent (47 and 23%, respectively; $\chi^2 = 5.1$; $p = 0.02$).

Conclusion. The results of work showed the presence of relationships between the morphological heterogeneity of the tumor and the parameters of $\beta 1$ and $\beta 3$ integrin expression in the parenchymal structures of the neoplasm. The study showed the association of described parameters with the frequency of lymphatic dissemination in patients with breast cancer. Obtained data expand and support previously known evidence and suggest the possibility of assessing the markers as potential prognostic factors predicting the course of cancer.

Keywords:	breast cancer, $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins, morphological tumor heterogeneity.
Conflict of interest:	the authors do not declare a conflict of interest.
Financial disclosure:	no author has a financial or property interest in any material or method mentioned. The study was supported by Grant of the President of the Russian Federation No. ПШ-2701.2020.7 "Development of new approaches to predicting the course of breast carcinomas based on morphological and molecular-genetic tumor heterogeneity".

Adherence to ethical standards:**For citation:**

informed consent was obtained from all patients. The study was approved by the Ethics Committee of Siberian State Medical University (protocol No. 3595 from 24.02.2014).

Krakhmal N.V., Telegina N.S., Zavyalova M.V., Vtorushin S.V., Krokhamal V.A., Perelmutter V.M. Correlation between the features of $\beta 1$ and $\beta 3$ integrin expression and lymphangitic metastatic spread in nonspecific invasive breast carcinoma based on tumor morphological heterogeneity. *The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2021;36(4):78–85. <https://doi.org/10.29001/2073-8552-2021-36-4-78-85>.

Актуальность

Интегрины представляют собой одно из наиболее изученных семейств поверхностных рецепторов, способных формировать связи с молекулами внеклеточного матрикса и обладающих свойством трансформировать сигналы микроокружения во внутриклеточные сигналы, запуская тем самым множество каскадных механизмов клеточного ответа. По природе интегрины являются нековалентно связанными гетеродимерными трансмембранными молекулами (гликопротеины), в состав которых входят α - и β -субъединицы, выполняющие роль клеточного рецептора и не обладающие собственной ферментативной активностью. Интегрины осуществляют запуск биохимических и механических сигналов, контролирующих клеточный фенотип, что, в свою очередь, может определять дальнейшую судьбу клетки. На данный момент у человека было охарактеризовано 18 α - и 8 β -субъединиц, образующих около 24 комбинаций $\alpha\beta$ -рецепторов с различной субстратной специфичностью [1, 2].

Интегрины, связывающие Arg-Gly-Asp последовательность (RGD-пептид), принадлежат к наиболее изученному подсемейству, которое включает $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 6$, $\alpha 5\beta 1$ и $\alpha 11\beta 3$ интегрины. Представители данного подсемейства распознают RGD-последовательность в некоторых компонентах внеклеточного матрикса, среди них фибронектин, витронектин, остеопонтин и фибриноген. Интегрины, участвующие в связывании клеток с коллагеном или ламинином, объединяют в другое подсемейство, которое включает $\beta 1$ ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$, $\alpha 11\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$) или $\beta 4$ ($\alpha 6\beta 4$) [1]. В этих взаимосвязях интегрины осуществляют двустороннюю коммуникацию между клетками и структурами внеклеточного матрикса [3].

Особое значение для данного исследования представляют интегрины семейства $\beta 1$ и $\beta 3$, поскольку именно этим молекулам отведена значимая роль в онкогенезе рака молочной железы (РМЖ). Функции интегринов $\beta 1$ широко связаны с регуляцией многих клеточных процессов, таких как пролиферация, клеточная адгезия, дифференцировка, миграция и онкогенная трансформация клеток молочной железы. Так, к примеру, делеция гена субъединицы интегрин $\beta 1$ в базальных или люминальных клетках ставит под угрозу регенераторный потенциал эпителия железы, что обуславливает роль интегринов $\beta 1$ в поддержании пула стволовых клеток [2].

Цепь интегрин $\beta 1$ может связывать различные α -субъединицы, которые определяют специфичность лиганда внеклеточного матрикса к гетеродимеру интегрин. Мало что известно о вкладе отдельных димеров интегрин в развитие тканевых и клеточных структур молочной железы, при этом отмечен тесный синергизм сигнальных путей интегринов и EGFR (Epidermal growth factor receptor) [1, 2, 4]. При инвазивной карциноме молочной железы повышенная экспрессия интегрин $\beta 1$ в опухоли коррелирует с плохой выживаемостью, что де-

монстрирует его вклад в формирование более злокачественного потенциала в клетках новообразования [3]. Показано, что ремоделирование микроокружения с повышением жесткости фибриллярных коллагенов под действием лизилоксидазы, а также повышение содержания $\beta 1$ интегрин при РМЖ коррелируют с возникновением процессов злокачественной трансформации нормальной ткани в инвазивную карциному, определяя худший общий прогноз [5].

Интегрин $\beta 3$ в составе $\alpha v\beta 3$ -гетеродимера также связывается со многими белками внеклеточного матрикса, усиливает пролиферацию и миграцию за счет фосфорилирования нижестоящих сигналов киназного пути фокальной адгезии (FAK). Экспериментальные исследования демонстрируют способность интегринов осуществлять контроль над метастатической способностью клеток РМЖ в ткань головного мозга [6]. Т. Вуй и соавт. провели исследование, в котором изучение влияния комбинированной делеции $\beta 1$ -/ $\beta 3$ -интегринов на прогрессирование, пролиферативный и апоптотический статус опухоли молочной железы, управляемых и регулируемых ErbB2 рецептором тирозинкиназы, показало уменьшение количества пролиферирующих клеток с возникновением нарушений в прогрессии заболевания и маргинальное увеличение количества апоптотических клеток. Кроме того, в работе было подтверждено снижение клеточной адгезии к фибронектину и распространения клеток опухоли за счет уменьшения образования устойчивых фокальных адгезионных комплексов. Исследование демонстрирует потребность в интегрин $\beta 1$ в процессах метастазирования. Оценка метастатической пенетрантности и количества метастазов в легких в условиях комбинированной делеции $\beta 1$ -/ $\beta 3$ -интегринов показала как уменьшение количества метастазов в легочной ткани, так и снижение пенетрантности. При этом селективная делеция интегринов $\beta 1$ оказывает большее влияние на процессы опухолевой диссеминации, чем селективная делеция интегринов $\beta 3$ [7].

Известно, что для РМЖ характерным является наличие выраженной внутриопухолевой гетерогенности, при этом между опухолевыми клетками и компонентами микроокружения карциномы существуют сложные взаимодействия. Стромальные клетки, внеклеточный матрикс и межклеточная жидкость в значительной мере определяют процессы опухолевой прогрессии и метастазирования [3, 8]. В свою очередь, особенности микроокружения опухоли могут влиять на формирование клинически значимых вариаций фенотипов РМЖ и, возможно, способны предсказать исход [9]. Экспрессия и активность интегринов, их адгезионные свойства являются важными в процессах онкогенеза, определяя вероятность метастазирования, а также формирования лекарственной устойчивости опухоли [10]. В связи с этим определенный интерес представляло исследование и оценка экспрессионных характеристик описанных маркеров в опухоли

при РМЖ, сопоставление полученных результатов с особенностями гетерогенности строения карцином данной локализации и показателями лимфогенной опухолевой диссеминации.

Материал и методы

Группу исследования составили 107 пациенток, которые проходили лечение в отделении общей онкологии НИИ онкологии Томского НИМЦ. У всех пациенток был диагностирован РМЖ, гистотип опухоли в 100% случаев соответствовал по морфологии инвазивной карциноме неспецифического типа (инвазивная протоковая карцинома) молочной железы. Возраст пациенток варьировал от 29 до 85 лет (средний возраст – $57,2 \pm 11,2$ года), 74,8% ($n = 80$) составили женщины старше 50 лет, меньшими по количеству оказались группы в возрасте от 35 до 50 лет – 23,4% ($n = 25$) и до 35 лет – 1,8% ($n = 2$). У 31 пациентки (29%) менструальная функция была сохранена (возраст $45,7 \pm 8,1$ года), у 76 (71%) определялось состояние менопаузы (возраст $61,9 \pm 8,6$ года). Предоперационное лечение больные не получали. В 49% случаев ($n = 52$) объем оперативного пособия соответствовал радикальной мастэктомии, в 51% ($n = 55$) – секторальной резекции молочной железы с аксиллярной лимфаденэктомией. Стадию заболевания оценивали в соответствии с международной классификацией опухолей молочной железы по системе TNM (WHO Classification of Tumors Editorial Board. Breast Tumours; Lyon, 2019).

Чаще выявлялись I и IIA стадии ($n = 49$ и $n = 33$ соответственно), реже диагностировали IIB ($n = 14$), IIIA ($n = 9$), IIIB ($n = 1$) и IIIC ($n = 1$) стадии процесса. Новообразования наиболее часто располагались в наружных квадрантах молочных желез (48,6%; $n = 52$), реже – во внутренних квадрантах (25,23%; $n = 27$) и на границе наружных и внутренних квадрантов (24,3%; $n = 26$). Центральная локализация процесса наблюдалась лишь в 1,87% случаев

($n = 2$). В исследуемой группе преобладали опухоли, размер которых соответствовал 2–5 см и менее 2 см (52,34%; $n = 56$ и 46,73%; $n = 50$ соответственно), в 0,93% случаев ($n = 1$) размер первичного новообразования составил более 5 см.

Выполняли морфологическое исследование операционного материала. Макроскопически оценивали ткань первичной опухоли молочной железы и ткань органа вне новообразования с целью исключить случаи с мультицентрическим ростом. Аксиллярную клетчатку детально исследовали на предмет выявления всех имеющихся в пределах операционного материала лимфатических узлов. Материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина в течение 24 ч с последующей вырезкой образцов. Проводку, заливку материала в парафин и изготовление гистологических срезов осуществляли по стандартной методике с окраской препаратов гематоксилином и эозином. В полученных срезах морфологическое исследование ткани первичной опухоли проводили согласно следующему алгоритму: определяли гистологический тип РМЖ и оценивали степень злокачественности новообразования.

Гистотип устанавливали в соответствии с классификацией опухолей молочной железы (WHO Classification of Tumors Editorial Board. Breast Tumours; Lyon, 2019). В исследование включали только случаи с классической морфологией инвазивной карциномы неспецифического типа. Степень злокачественности определяли по модифицированной схеме P. Scarff, H. Bloom и W. Richardson. В паренхиматозном компоненте опухоли оценивали наличие различных типов структур: альвеолярных, трабекулярных, тубулярных и солидных, а также дискретные группы опухолевых клеток (рис. 1). К альвеолярным структурам относили комплексы опухолевых клеток (15–20 клеток) округлой или слегка неправильной округлой формы.

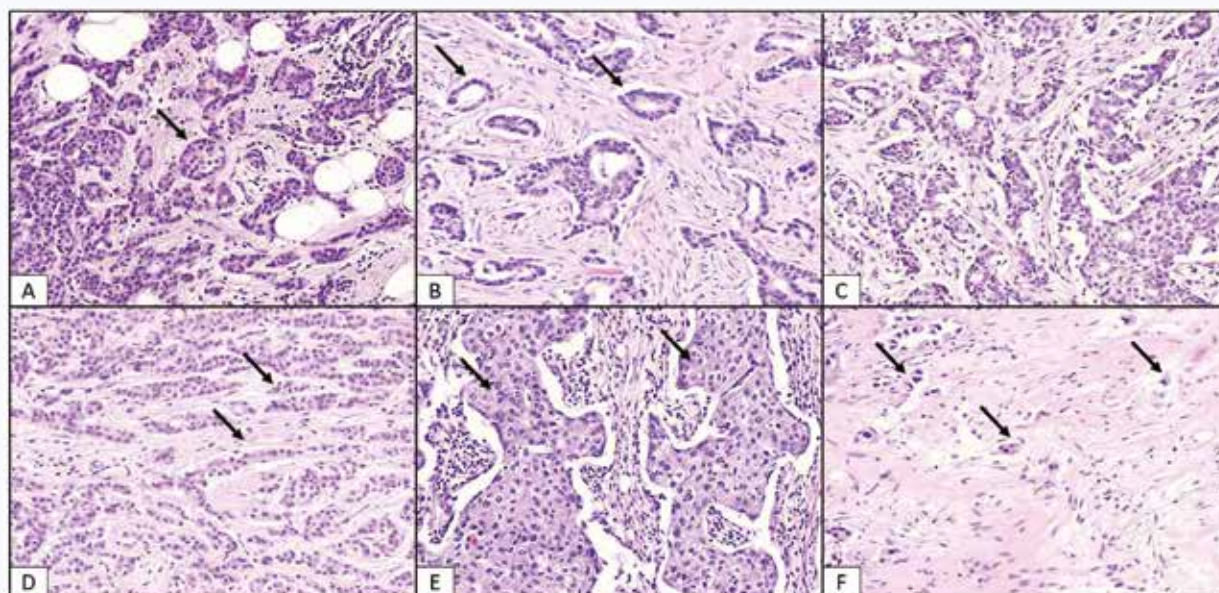


Рис. 1. Опухолевые структуры паренхиматозного компонента инвазивной карциномы неспецифического типа молочной железы. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 400$. Стрелками указаны: А – альвеолярные структуры, В – тубулярные структуры, С – паренхиматозный компонент опухоли с разными структурами, D – трабекулярные структуры, E – солидные структуры, F – группы опухолевых клеток в строме опухоли
Fig. 1. Tumor structures in parenchymal component of nonspecific invasive breast carcinoma. Hematoxylin and eosin stain, $\times 400$. Arrows indicate: A – alveolar structures, B – tubular structures, C – parenchymal component of tumor with different structures, D – trabecular structures, E – solid structures, F – groups of tumor cells in the tumor stroma

Трабекулярные структуры представляли собой один ряд мелких относительно мономорфных клеток либо 2–3 практически параллельно расположенных ряда клеток средних размеров с умеренно выраженной цитоплазмой, с округлыми нормохромными или гиперхромными ядрами.

Тубулярными считали однорядные по типу «замыкающих» опухолевые структуры с наличием просвета в центре, образованные достаточно мономорфными клетками с нормохромными округлыми ядрами. К солидным относили структуры, представляющие собой различные по размеру и форме поля, состоящие из мелких клеток с умеренно выраженной цитоплазмой и мономорфными ядрами или из крупных клеток с обильной цитоплазмой и полиморфными ядрами, плотно прилежащих друг к другу. Дискретно располагающиеся в строме новообразования скопления от 1 до 4 клеток, различные по своему строению, считали группами клеток.

В большинстве случаев паренхиматозный компонент первичной опухоли молочной железы имел смешанное строение, в котором отмечалось наличие вариаций в сочетании разных типов перечисленных выше структур (см. рис. 1). Кроме того, в каждом случае при оценке паренхиматозного компонента подсчитывали количество

разных типов структур (от 1 до 5). При исследовании лимфатических узлов подсчитывали общее количество лимфоузлов, оценивали наличие в них метастатического поражения и количество лимфоузлов с метастазами.

Иммуногистохимическое исследование проводили с применением антител фирмы Abcam к интегину $\beta 3$ ab75872 (Clone EPR2417Y; кроличьи моноклональные; 1 : 250) и к интегину $\beta 1$ ab3167 (Clone 4B7R; мышинные моноклональные; 1 : 20) (рис. 2). Экспрессию исследуемых маркеров в структурах паренхиматозного компонента первичной опухоли инвазивной карциномы неспецифического типа молочной железы оценивали по следующим параметрам: наличие (позитивная экспрессия) или отсутствие (негативная экспрессия) экспрессии; процент опухолевых клеток с позитивной экспрессией маркера (в 10 полях зрения на 1000 клеток при увеличении $\times 400$).

Исследование выполнялось с применением светового микроскопа Carl Zeiss Axio Lab.A1 (Германия). Статистическая обработка полученных данных выполнялась с использованием пакета программ STATISTICA 10.0. Применялись дисперсионный анализ и критерий χ^2 . Обсуждались результаты со статистической значимостью различий при $p < 0,05$ и с тенденцией к различиям при $p < 0,1$.

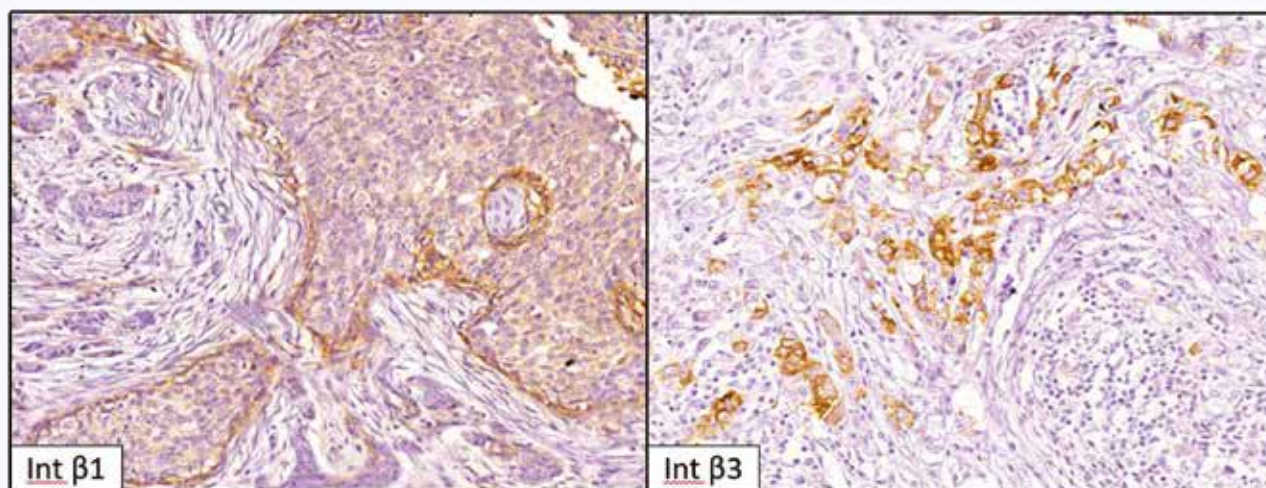


Рис. 2. Наличие позитивной экспрессии интегрина $\beta 1$ и интегрина $\beta 3$ в структурах паренхиматозного компонента инвазивной карциномы неспецифического типа молочной железы. Увеличение $\times 400$

Fig. 2. Presence of positive $\beta 1$ and $\beta 3$ integrin expression in the structures of parenchymal component of nonspecific invasive breast carcinoma, $\times 400$

Результаты и обсуждение

Морфологическое исследование образцов опухолевой ткани молочной железы показало следующие результаты. Оценка паренхиматозного компонента новообразования молочной железы выявила, что наименьшими по частоте встречаемости в опухоли являлись тубулярные структуры (49%), при этом альвеолярные (73%; $p = 0,0002$), трабекулярные (85%; $p = 0,0000$), солидные (65%; $p = 0,009$) структуры, в том числе группы клеток (75%; $p = 0,0001$), определялись значимо чаще и приблизительно с одинаковой частотой. Подсчет количества разных типов структур в паренхиматозном компоненте показал, что почти каждый образец характеризовался различным сочетанием опухолевых структур.

Наиболее часто выявлялись разнообразные по строению опухоли, паренхиматозный компонент которых включал до 4 типов структур. Представленные исключительно одним типом опухолевых структур мономорфные новообразования молочной железы диагностировали статистически значимо реже (1,87%; $n = 2$) по сравнению с карциномами, в которых присутствовали 2 (18,69%; $n = 20$; $p = 0,0000$), 3 (26,17%; $n = 28$; $p = 0,0000$), 4 (37,38%; $n = 40$; $p = 0,0000$) или 5 типов структур (15,89%; $n = 17$; $p = 0,0002$).

Следующим этапом с применением метода иммуногистохимии в опухолевой ткани проводили оценку экспрессии изучаемых маркеров с учетом морфологического строения карциномы молочной железы. Изучение особенностей экспрессии показало, что наличие пози-

тивной экспрессии интегрин $\beta 1$ чаще наблюдалось в солидных структурах (35%; $n = 27$) по сравнению с тубулярными (15%; $n = 6$; $p = 0,01$), трабекулярными (16%; $n = 9$; $p = 0,008$) структурами и группами опухолевых клеток (14%; $n = 4$; $p = 0,01$). При этом наиболее высокий процент позитивной экспрессии интегрин $\beta 1$ отмечался в тубулярных структурах и в группах опухолевых клеток (таблица). Позитивная экспрессия маркера интегрин $\beta 3$ статистически значимо чаще определялась в солидных структурах (72%; $n = 68$), а также в дискретных группах опухолевых клеток (65%; $n = 64$). При сопоставлении показателей частоты позитивной экспрессии маркера между структурами было отмечено наличие статистически значимых

различий между солидными структурами и альвеолярными (19%; $n = 11$; $p = 0,0000$), тубулярными (25%; $n = 9$; $p = 0,0000$) и трабекулярными структурами (22%; $n = 12$; $p = 0,0000$). Аналогичного рода закономерность прослеживалась и в отношении групп опухолевых клеток, в которых значимо чаще регистрировалась позитивная экспрессия интегрин $\beta 3$ нежели в альвеолярных, тубулярных и трабекулярных структурах ($p = 0,0000$). Наиболее высокий процент позитивной экспрессии интегрин $\beta 3$ отмечался в трабекулярных и солидных структурах, при этом тубулярные структуры и группы опухолевых клеток характеризовались наименьшим процентом экспрессии маркера (см. табл.).

Таблица. Позитивная экспрессия интегрин $\beta 1$ и $\beta 3$ в разных структурах паренхиматозного компонента инвазивной карциномы неспецифического типа молочной железы, %

Table. Positive $\beta 1$ and $\beta 3$ integrin expression in different structures of parenchymal component of nonspecific invasive breast carcinoma, %

Локализация экспрессии Expression localization		Экспрессия интегрин $\beta 1$, $M \pm SD$ Percentage of $\beta 1$ integrin expression, $M \pm SD$	Экспрессия интегрин $\beta 3$, $M \pm SD$ Percentage of $\beta 3$ integrin expression, $M \pm SD$
Альвеолярные структуры Alveolar structures	1	38,8 $\pm$ 13,9 ($n = 15$)	13,6 $\pm$ 6,2 ($n = 11$)
Тубулярные структуры Tubular structures	2	61,2 $\pm$ 10,1 ($n = 6$) $p_1 = 0,0010$ $p_3 = 0,0001$ $p_4 = 0,0300$	7,5 $\pm$ 0,3 ($n = 9$) $p_1 = 0,0040$ $p_3 = 0,0020$ $p_4 = 0,0000$
Трабекулярные структуры Trabecular structures	3	33,3 $\pm$ 10,7 ($n = 9$)	25,9 $\pm$ 16,3 ($n = 12$)
Солидные структуры Solid structures	4	44,2 $\pm$ 19,9 ($n = 27$)	21,1 $\pm$ 7,0 ($n = 68$)
Группы клеток Groups of tumor cells	5	70,5 $\pm$ 13,8 ($n = 4$) $p_1 = 0,0004$ $p_3 = 0,0001$ $p_4 = 0,0080$	8,4 $\pm$ 1,9 ($n = 64$) $p_1 = 0,0000$ $p_3 = 0,0000$ $p_4 = 0,0000$

Сопоставление особенностей экспрессии маркеров интегрин $\beta 1$ и интегрин $\beta 3$ в структурах паренхиматозного компонента со степенью злокачественности опухоли позволило выявить следующую зависимость. Позитивная экспрессия интегрин $\beta 1$ статистически значимо реже обнаруживалась при второй степени злокачественности, чем при первой (19%; $n = 15$ и 45,5%; $n = 5$; $p = 0,03$ соответственно). В отношении экспрессии интегрин $\beta 3$ исследование показало диаметрально противоположные результаты. Позитивная экспрессия интегрин $\beta 3$ значимо чаще определялась в опухолях, по морфологии соответствующих второй степени злокачественности, и значимо реже – при первой (77%; $n = 61$ и 45,5%; $n = 5$; $p = 0,01$ соответственно). В случаях опухолей с третьей степенью злокачественности отчетливых закономерностей обнаружено не было.

Морфологическое исследование и оценка паренхиматозного компонента инвазивной карциномы неспецифического типа молочной железы и последующее сопоставление полученных результатов с показателями лимфогенного метастазирования позволило выявить ряд взаимосвязей. Количество лимфатических узлов с наличием метастатического поражения не было ассоциировано с обнаружением в паренхиме конкретных опухолевых структур. Кроме того, количество разных типов структур в паренхиматозном компоненте новообразования не было

связано ни с частотой, ни с выраженностью лимфогенного метастазирования.

Представляющие определенный интерес результаты были получены при сопоставлении особенностей экспрессии интегринов семейств $\beta 1$ и $\beta 3$ в структурах опухоли с показателями лимфогенной диссеминации. Очаги метастатического поражения в лимфатических узлах значимо реже определялись при наличии позитивной экспрессии интегрин $\beta 1$ в альвеолярных (20%) и солидных (22%) структурах по сравнению со случаями с негативной экспрессией маркера в аналогичных структурах (48%; $\chi^2 = 3,5$; $p = 0,05$ и 48%; $\chi^2 = 4,8$; $p = 0,02$ соответственно). Лимфогенные метастазы наблюдались статистически значимо чаще при наличии позитивной экспрессии интегрин $\beta 3$ в дискретных группах клеток по сравнению со случаями, в которых экспрессия изучаемого маркера в описанных структурах была негативной (47 и 23% соответственно; $\chi^2 = 5,1$; $p = 0,02$). Исследование продемонстрировало, что при наличии лимфогенных метастазов значимо чаще нежели при их отсутствии определялся более высокий процент экспрессии интегрин $\beta 3$ в альвеолярных (22,5 $\pm$ 4,1; $n = 6$ и 3,0 $\pm$ 0,3; $n = 5$; $p = 0,0000$ соответственно), трабекулярных (43,8 $\pm$ 15,4; $n = 6$ и 8,0 $\pm$ 4,0; $n = 6$; $p = 0,0000$ соответственно), солидных структурах (31,4 $\pm$ 4,0; $n = 27$ и 14,2 $\pm$ 8,6; $n = 41$; $p = 0,0000$ соответственно) и дискретных группах опухолевых клеток

($12,6 \pm 6,6$; $n = 30$ и $4,8 \pm 2,1$; $n = 34$; $p = 0,0000$ соответственно). В тубулярных структурах процент экспрессии интегрин $\beta 3$ при наличии в лимфатических узлах метастазов был минимальным ($3,2 \pm 0,8$; $n = 4$).

Исследование зависимости экспрессионных характеристик ткани опухолей и клинко-морфологических параметров позволило определить ряд особенностей. Было установлено, что увеличение степени злокачественности карциномы молочной железы ассоциировано с уменьшением частоты случаев с наличием позитивной экспрессии интегрин $\beta 1$ и с увеличением частоты случаев с позитивной экспрессией интегрин $\beta 3$. Описанный вектор изменения экспрессионного профиля исследуемых маркеров сопряжен с увеличением частоты случаев метастатического поражения лимфоузлов. На основании полученных данных можно сделать предположение о том, что степень злокачественности выше при наличии в клетках опухоли инвазивных признаков, определяющих процессы лимфогенной диссеминации. При уточнении характера изменения экспрессии изучаемых параметров в различных структурах паренхиматозного компонента опухоли обнаружено, что экспрессия маркеров в дискретных опухолевых клетках также сопряжена со степенью злокачественности. Наибольший интерес в этом плане представляет усиление экспрессии интегринов $\beta 1$ и $\beta 3$. В литературе имеются сведения о том, что повышенная экспрессия в ткани опухоли интегрин $\beta 3$ в случаях РМЖ, ассоциированная с высокой миграционной способностью злокачественно трансформированных клеток, определяет высокий злокачественный потенциал карциномы [11].

Данные, полученные в результате нашего исследования, также указывают на такую взаимосвязь. Наряду с этим, представленная в литературных источниках информация относительно экспрессии интегрин $\beta 1$ подтверждает его значение и участие в процессах пролиферации клеток, миграции и инвазии, что, в свою очередь,

определяет прогрессирование болезни. Авторы отмечают, что высокая экспрессия маркера интегрин $\beta 1$ при протоковой карциноме *in situ* молочной железы может быть ассоциирована с агрессивным течением, а повышенный уровень данного показателя при инвазивных формах сочетается с низкой выживаемостью пациентов, короткими безрецидивным и безметастатическим периодами [1, 12, 13].

Заключение

Таким образом, полученные в результате нашего исследования данные относительно существования взаимосвязи между экспрессией интегринов семейства $\beta 1$ и $\beta 3$ при инвазивной карциноме молочной железы неспецифического типа в разных структурах опухоли с показателями лимфогенной диссеминации расширяют и дополняют известные ранее сведения. Так, N.E. Ramirez и соавт. в эксперименте на моделях РМЖ у мышей продемонстрировали, что интегрины семейства $\beta 1$ скорее подавляют образование метастазов, подтверждая этот факт регистрацией высокой экспрессии маркера в клетках нормального эпителия молочной железы и его утратой при развитии карциномы. Эта закономерность позволила предположить, что интегрины семейства $\beta 1$ могут являться функциональными ингибиторами возникновения метастатических очагов [14]. S. Havaki в своем исследовании связывает повышение миграционной способности клеток опухоли и усиление их инвазивных свойств с повышенной экспрессией интегрин $\beta 3$ в опухолевых клетках при РМЖ, что впоследствии также может определять развитие метастазов [11]. Результаты работы демонстрируют потенциальную возможность получения дополнительных новых факторов прогностического значения в случаях инвазивной карциномы молочной железы, основанную на изучении молекулярно-биологического профиля опухоли с оценкой экспрессии интегриновых рецепторов семейства $\beta 1$ и $\beta 3$.

Литература / References

- Blandin A.F., Renner G., Lehmann M., Lelong-Rebel I., Martin S., Donatenwill M. $\beta 1$ Integrins as therapeutic targets to disrupt hallmarks of cancer. *Front. Pharmacol.* 2015;6:279. DOI: 10.3389/fphar.2015.00279.
- Romagnoli M., Bresson L., Di-Cicco A., Pérez-Lanzón M., Legoix P., Baulande S. et al. Laminin-binding integrins are essential for the maintenance of functional mammary secretory epithelium in lactation. *Development*. 2020;147(4):dev181552. DOI: 10.1242/dev.181552.
- Smeland H.Y., Askeland C., Wik E., Knutsvik G., Molven A., Edelmann R.J. et al. Integrin $\alpha 11\beta 1$ is expressed in breast cancer stroma and associates with aggressive tumor phenotypes. *J. Pathol. Clin. Res.* 2020;6(1):69–82. DOI: 10.1002/cjp2.148.
- Shen M., Jiang Y.Z., Wei Y., Ell B., Sheng X., Esposito M. et al. Tinag1 suppresses triple-negative breast cancer progression and metastasis by simultaneously inhibiting Integrin/FAK and EGFR signaling. *Cancer Cell*. 2019;35(1):64–80.e7. DOI: 10.1016/j.ccell.2018.11.016.
- Acerbi I., Cassereau L., Dean I., Shi Q., Au A., Park C. et al. Human breast cancer invasion and aggression correlates with ECM stiffening and immune cell infiltration. *Integr. Biol. (Camb.)*. 2015;7(10):1120–1134. DOI: 10.1039/c5ib00040h.
- Naik A., Al-Yahyaee A., Abdullah N., El-Sam J., Al-Zeheimi N., Yaish M. et al. Neuropilin-1 promotes the oncogenic Tenascin-C/integrin $\beta 3$ pathway and modulates chemoresistance in breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2018;18(1):533. DOI: 10.1186/s12885-018-4446-y.
- Bui T., Rennhack J., Mok S., Ling C., Perez M., Roccamo J. et al. Functional redundancy between $\beta 1$ and $\beta 3$ Integrin in activating the IR/Akt/mTORC1 signaling axis to promote ErbB2-driven breast cancer. *Cell Rep.* 2019;29(3):589–602.e6. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.09.004.
- Maman S., Witz I.P. A history of exploring cancer in context. *Nat. Rev. Cancer*. 2018;18(6):359–376. DOI: 10.1038/s41568-018-0006-7.
- Nienhuis H.H., Gaykema S.B., Timmer-Bosscha H., Jalving M., Brouwers A.H., de Hooge. et al. Targeting breast cancer through its microenvironment: current status of preclinical and clinical research in finding relevant targets. *Pharmacol. Ther.* 2015;147:63–79. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.004.
- Seguin L., Desgrosellier J.S., Weis S.M., Cheresh D.A. Integrins and cancer: Regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. *Trends Cell Biol.* 2015;25(4):234–240. DOI: 10.1016/j.tcb.2014.12.006.
- Havaki S., Kouloukoussa M., Amawi K., Drosos Y., Arvanitis L.D., Goutas N. et al. Altered expression pattern of integrin $\alpha v\beta 3$ correlates with actin cytoskeleton in primary cultures of human breast cancer. *Cancer Cell Int.* 2007;7:16. DOI: 10.1186/1475-2867-7-16.
- Missan D.S., DiPersio M. Integrin control of tumor invasion. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 2012;22(4):309–324. DOI: 10.1615/critrevukargeneexpr.v22.i4.50.
- Nisticò P., Di Modugno F., Spada S., Bissell M.J. $\beta 1$ and $\beta 4$ integrins: From breast development to clinical practice. *Breast Cancer Res.* 2014;16(5):459. DOI: 10.1186/s13058-014-0459-x.
- Ramirez N.E., Zhang Z., Madamanchi A., Boyd K.L., O'Rear L.D., Nashabi A. et al. The $\alpha 2\beta 1$ integrin is a metastasis suppressor in mouse models and human cancer. *J. Clin. Invest.* 2011;121(1):226–237. DOI: 10.1172/JCI42328.

Информация о вкладе авторов

Крахмаль Н.В., Крохмаль В.А. осуществили сбор клинических данных пациентов на основе анализа медицинских карт, направлений на патогистологическое исследование и протоколов, произвели отбор гистологических блоков операционного материала.

Завьялова М.В., Перельмутер В.М. сформулировали идею, предложили концепцию и разработали протокол исследования, сформировали выборку пациентов с оценкой «критериев включения/исключения», осуществляли контроль над организацией и ходом работы.

Телегина Н.С. провела иммуногистохимическое исследование образцов ткани опухоли молочной железы, вместе с Крахмаль Н.В. и Крохмаль В.А. участвовали в написании первой версии рукописи.

Крохмаль В.А. провел обзор литературы по теме исследования.

Завьялова М.В., Вторушин С.В., Крахмаль Н.В. провели морфологическую оценку гистологических препаратов, оценили экспрессию маркеров в образцах опухолевой ткани.

Перельмутер В.М., Завьялова М.В., Вторушин С.В., Крахмаль Н.В. анализировали и интерпретировали полученные данные, внесли существенный вклад в доработку первой исходной версии рукописи.

Все авторы дали окончательное согласие на подачу рукописи и согласились нести ответственность за все аспекты работы, ручаясь за их точность и безупречность.

Сведения об авторах

Крахмаль Надежда Валерьевна, канд. мед. наук, доцент кафедры патологической анатомии, Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации; старший научный сотрудник, отделение общей и молекулярной патологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0002-1909-1681.

E-mail: krakhmal@mail.ru.

Телегина Надежда Семеновна, канд. мед. наук, доцент кафедры патологической анатомии, Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0003-2471-8626.

E-mail: nadezhda-telegina81@mail.ru.

Завьялова Марина Викторовна, д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии, Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации; ведущий научный сотрудник, отделение общей и молекулярной патологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0001-9429-9813.

E-mail: zavyalovamv@mail.ru.

Вторушин Сергей Владимирович, д-р мед. наук, профессор, профессор кафедры патологической анатомии, Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации; руководитель отделения общей и молекулярной патологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0002-1195-4008.

E-mail: vtorushin@rambler.ru.

Крохмаль Владислав Алексеевич, студент 4-го курса, лечебный факультет, Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации.

E-mail: krokhmal234@gmail.com.

Перельмутер Владимир Михайлович, д-р мед. наук, профессор, главный научный сотрудник, отделение общей и молекулярной патологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. ORCID 0000-0002-7633-9620.

E-mail: pvm@ngs.ru.

 **Крахмаль Надежда Валерьевна**, e-mail: krakhmal@mail.ru.

Information on author contributions

Krakhmal N.V. and Krokhamal V.A. collected clinical data from patients based on medical record analysis, histopathological examination referrals, and protocols and selected the histological blocks of surgical material.

Zavyalova M.V. and Perelmuter V.M. formulated the idea, proposed study concept, developed research protocol, formed patient sample based on assessment of inclusion and exclusion criteria, and supervised the organization and progress of work.

Telegina N.S. performed the immunohistochemistry study of breast tumor samples and, together with Krakhmal N.V. and Krokhamal V.A., participated in writing the first version of the manuscript.

Krokhamal V.A. performed literature review on research topic.

Zavyalova M.V., Vtorushin S.V., and Krakhmal N.V. performed morphological assessment of histological slides and assessed the expression of markers in tumor tissue.

Perelmuter V.M., Zavyalova M.V., Vtorushin S.V., and Krakhmal N.V. analyzed and interpreted obtained data and made a significant contribution to the finalization of initial version of the manuscript.

All authors have given their final consent to the submission of manuscript and agreed to be responsible for all aspects of work vouching for their accuracy and flawlessness.

Information about the authors

Nadezhda V. Krakhmal, Cand. Sci. (Med.), Assistant Professor, Department of Pathology, Siberian State Medical University; Senior Research Scientist, Department of General and Molecular Pathology, Oncology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0002-1909-1681.

E-mail: krakhmal@mail.ru.

Nadezhda S. Telegina, Cand. Sci. (Med.), Assistant Professor, Department of Pathology, Siberian State Medical University. ORCID 0000-0003-2471-8626.

E-mail: nadezhda-telegina81@mail.ru.

Marina V. Zavyalova, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Pathology, Siberian State Medical University; Leading Research Scientist, Department of General and Molecular Pathology, Oncology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0001-9429-9813.

E-mail: zavyalovamv@mail.ru.

Sergey V. Vtorushin, Dr. Sci. (Med.), Professor, Pathology Department, Siberian State Medical University; Head of the Department of General and Molecular Pathology, Oncology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0002-1195-4008.

E-mail: vtorushin@rambler.ru.

Vladislav A. Krokhamal, 4th Year Student, Faculty of Medicine, Siberian State Medical University.

E-mail: krokhmal234@gmail.com.

Vladimir M. Perelmuter, Dr. Sci. (Med.), Professor, Chief Research Scientist, Department of General and Molecular Pathology, Oncology Research Institute, Tomsk National Research medical Center, Russian Academy of Sciences. ORCID 0000-0002-7633-9620.

E-mail: pvm@ngs.ru.

 **Nadezhda V. Krakhmal**, e-mail: krakhmal@mail.ru.

Received May 14, 2021

Поступила 14.05.2021