

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ И НЕЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Аутеншлюс А.И.<sup>1,2</sup>, Жураковский И.П.<sup>1,2</sup>, Архипов С.А.<sup>1,2</sup>, Архипова В.В.<sup>1</sup>,  
Ляхович В.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, e-mail: lrciip@211.ru;

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики ФИЦ ФТМ, Новосибирск

Исследования проведены на биоптатах молочной железы 43 пациенток, средний возраст – 50 (41–64) года, 28 из которых имели инвазивную карциному неспецифического типа, а 15 – незлокачественные пролиферативные заболевания молочной железы (фиброаденоматоз – 7 пациенток и фиброаденому – 8). Проведено иммуногистохимическое исследование экспрессии циклина D1, Ki67 и фибронектина. Установлено, что имеются статистически достоверные различия в экспрессии Ki-67, циклина D1 и фибронектина между пациентками со злокачественными новообразованиями и незлокачественными пролиферативными заболеваниями. Наиболее выраженными являются различия между экспрессией фибронектина по сравнению с экспрессией остальных изученных маркеров. Абсолютное количество клеток с экспрессией циклина D1 значительно превосходит аналогичный показатель экспрессии маркера пролиферации Ki67, что может трактоваться как большая чувствительность циклина D1 для выявления клеток, находящихся в переходный период между пресинтетической (G1) и синтетической (S) фазами митоза. Характерной для пациенток, не имеющих на момент обследования метастазов в лимфатические узлы, но с выявленной инвазией опухолевых клеток в лимфатические сосуды, является суперэкспрессия фибронектина, выявляемая более чем в 99,0% опухолевых клеток. У 33% пациенток с незлокачественными пролиферативными заболеваниями молочной железы, в том числе с фиброаденомой, диагностировано положительное иммуногистохимическое окрашивание на фибронектин, в том числе у 3 пациенток отмечалось процентное содержание клеток, экспрессирующих данный маркер, более 75%. Не исключено, что активация эпителиально-мезенхимальной трансформации, которую отражает увеличение относительного содержания клеток, экспрессирующих фибронектин, может служить неблагоприятным фоном для малигнизации незлокачественных пролиферативных заболеваний молочной железы.

Ключевые слова: рак молочной железы, фиброаденома, фиброаденоматоз, циклин D1, фибронектин, эпителиально-мезенхимальный переход.

## COMPARATIVE EVALUATION OF THE EXPRESSION OF THE MARKERS OF PROLIFERATION AND EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION IN MALIGNANT AND NON-MALIGNANT BREAST DISEASES

Autenshlyus A.I.<sup>1,2</sup>, Zhurakovsky I.P.<sup>1,2</sup>, Arkhipov S.A.<sup>1,2</sup>, Arkhipova V.V.<sup>1</sup>, Lyahovich V.V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>FGBOU VO «Novosibirsk State Medical University» Ministry of Health of Russia, Novosibirsk, e-mail: lrciip@211.ru;

<sup>2</sup>Institute of Molecular Biology and Biophysics Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk

The studies were conducted on breast biopsies of 43 patients, the average age was 50 (41–64) years, 28 of whom had invasive carcinoma of a non-specific type, and 15 had non-malignant proliferative breast diseases (fibroadenomatosis – 7 patients and fibroadenoma – 8). An immunohistochemical study of the expression of cyclin D1, Ki67 and fibronectin was performed. It was found that there are statistically significant differences in the expression of Ki-67, cyclin D1 and fibronectin between patients with malignant neoplasms and non-malignant proliferative diseases. The most pronounced differences are between the expression of fibronectin compared with the expression of the other studied markers. The absolute number of cells with cyclin D1 expression significantly exceeds the same indicator of the expression of the proliferation marker Ki67, which can be interpreted as a greater sensitivity of cyclin D1 to detect cells in the transition period between the presynthetic (G1) and synthetic (S) phases of mitosis. Characteristic of patients who do not have metastases to the lymph nodes at the time of examination, but with detected invasion of tumor cells into the lymphatic vessels, is the superexpression of fibronectin, detected in more than 99.0% of tumor cells. 33% of patients with non-malignant proliferative breast diseases, including fibroadenoma, were diagnosed with positive immunohistochemical staining for fibronectin, including 3 patients with a percentage of cells expressing this marker of more than 75%.

**It is possible that activation of epithelial-mesenchymal transformation, which reflects an increase in the relative content of cells expressing fibronectin, may serve as an unfavorable background for malignancy of non-malignant proliferative breast diseases.**

Keywords: breast cancer, fibroadenoma, fibroadenomatosis, cyclin D1, fibronectin, epithelial-mesenchymal transition.

На начальном этапе опухолевого роста существенную роль играет процесс эпителиально-мезенхимального перехода, который сопровождается потерей межклеточных контактов, перестройкой цитоскелета, активацией синтеза ферментов, способных приводить к деградации внеклеточного матрикса, что позволяет эпителиальным клеткам, приобретшим мезенхимальный фенотип, активно перемещаться и проходить через базальную мембрану [1], обуславливая инвазивную способность опухолевых клеток. Кроме того, клетки, подвергшиеся эпителиально-мезенхимальной трансформации и изменившие свой фенотип, становятся способными к продукции компонентов внеклеточного матрикса.

Так, одним из таких веществ, относящихся к группе мезенхимальных маркеров, способствующих подвижности и инвазии, наряду с Н-катгерином, виментином, матриксными металлопротеиназами,  $\beta 1$  и  $\beta 3$  интегринами является фибронектин [2], экспрессия которого свидетельствует о развитии TGF $\beta$ -индуцированного эпителиально-мезенхимального перехода [3]. Известно, что повышение экспрессии фибронектина при раке молочной железы связано с плохим клиническим исходом и способствует метастазированию [4].

В настоящее время установлено, что клеточный цикл, в результате которого происходит образование двух идентичных дочерних клеток, управляется циклинами в их связке с циклин-зависимыми киназами (ЦЗК). При этом образуются гетеродимерные комплексы циклинов D-типа (D1, D2 и D3) с ЦЗК4 или ЦЗК6 [5] для контроля фазового перехода G1 в S, тем самым иницируя репликацию ДНК. Экспрессия, активация, внутриклеточное распределение, стабилизация и деградация циклинов D-типа строго контролируются в нормальных клетках в ответ на включение/выключение митогенных сигналов. Сверхэкспрессия, накопление и нетипичная локализация циклинов D-типа приводят к опухолям человека и могут повышать устойчивость к химиотерапии [6]. Было отмечено, что нарушение регуляции циклина D1 при солидном раке наблюдается чаще, чем циклинов D2 и D3 [7]. Также было показано, что ген CCND1, кодирующий циклин D1, является вторым наиболее часто амплифицируемым локусом при солидном раке [8]. Имеются литературные данные о нарушении регуляции циклина D1 при раке молочной железы [9]. Однако связь между маркерами эпителиально-мезенхимальной трансформации и маркерами пролиферации, а также ее роль в развитии рака молочной железы до сих пор не изучены. Кроме того, в литературе имеются лишь единичные сведения об изучении маркеров

пролиферации и эпителиально-мезенхимального перехода при незлокачественных пролиферативных заболеваниях молочной железы [10, 11], что, вероятно, связано со значительно меньшим числом оперативных вмешательств по поводу данной группы заболеваний. Фиброаденома, как правило, рассматривается лишь в качестве объекта с отсутствием экспрессии маркеров эпителиально-мезенхимальной трансформации при злокачественных опухолевых процессах [12], а не в качестве объекта для самостоятельного изучения. При этом сообщается об отсутствии при фиброаденомах клеток с признаками активации эпителиально-мезенхимального перехода [13].

**Цель исследования:** изучение экспрессии маркеров пролиферации циклина D1 и часто используемого в исследованиях маркера Ki-67, а также маркера эпителиально-мезенхимального перехода (фибронектина) в клетках инвазивной карциномы неспецифического типа и незлокачественных пролиферативных заболеваниях молочной железы.

#### **Материал и методы исследования**

Материалом служили биоптаты молочной железы 43 пациенток в возрасте 50 (41; 64) лет, 28 из которых имели инвазивную карциному неспецифического типа (ИКНТ) (у 13 пациенток отмечались метастазы с поражением 1–5 регионарных лимфатических узлов, у 15 пациенток метастазы выявлены не были), а у 15 – незлокачественные пролиферативные заболевания молочной железы ((НПЗ) (фиброаденоматоз – у 7 пациенток и фиброаденома – у 8). Неоадьювантная терапия ни одной из пациенток на момент исследования не проводилась.

Все исследования были проведены в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации. От каждой пациентки получено информированное согласие на проведение исследования и получение образцов опухолей, подписанное самой пациенткой и заверенное врачом. Исследование одобрено комитетом по этике Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики подразделения Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины (протокол № 2016-3).

Иммуногистохимическое исследование экспрессии циклина D1, Ki67 и фибронектина проводили на парафиновых срезах опухолей с использованием следующих наборов антител и систем визуализации. Первичные антитела: кроличьи поликлональные антитела анти-Cyclin D1 (CCND1, PAA585Hu01, Cloud-clone corp.), мышинные моноклональные антитела анти-Fibronectin (IST-9, sc-59826, Santa Cruz Biotechnology), мышинные моноклональные антитела анти-Ki67 (Ki-67-MM1, Leica Biosystems). Для выявления на срезах первичных антител Cyclin D1 использовали систему визуализации Novocastra Peroxidase Detection System REF7120-K Leica Biosystems; для выявления первичных антител к фибронектину и

Ki-67 использовали систему Novolink Polymer Detection System REF7120-K (Leica Biosystems).

Анализ экспрессии изучаемого маркера проводился с помощью морфометрического комплекса на базе микроскопа Микромед-6, цифровой камеры DSM 510 и программного обеспечения ImageJ 1.42g (Национальный институт здоровья, США). Для каждой пациентки оценивалось по 10 изображений (площадь каждого составляла 95578 мкм<sup>2</sup>). Подсчитывали абсолютное количество эпителиальных клеток, экспрессирующих и не экспрессирующих соответствующий маркер, далее высчитывалось процентное содержание экспрессирующих клеточных элементов. Дополнительно экспрессию Ki67, циклина D1 и фибронектина определяли полуколичественным методом в соответствии со следующим стандартом оценки процента окрашивания клеток: 0–10% – 0 баллов; 11–25% – 1 балл; 26–50% – 2 балла; 51–75% – 3 балла, >75% – 4 балла. Те клетки, у которых оценка была меньше или равна 2 баллам, считались отрицательными, а те, у которых оценка была равна 3 или более, считались положительными [12].

Для статистической обработки результатов использовали программный пакет SPSS v 17.0 for Windows. Для сравнения двух независимых групп применяли критерий Манна–Уитни. Частота встречаемости эффекта при сопоставлении двух выборок осуществлялась с помощью критерия углового преобразования Фишера. Полученные в ходе исследования данные представлены как медиана (Me) и интерквартильный размах (Q1; Q3). Качество модели проверялось при помощи ROC-анализа.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Протеомный анализ», поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691).

### Результаты исследования и их обсуждение

Результаты морфометрического анализа экспрессии маркеров пролиферации и эпителиально-мезенхимального перехода отражены в таблице 1.

Таблица 1

Экспрессия маркеров пролиферации и эпителиально-мезенхимального перехода у пациенток со злокачественными и незлокачественными заболеваниями

Показатель	1. НПЗ n=15	2. ИКНТ n=28
Процент клеток с экспрессией Ki67	12,9 (2,6; 22,3)* p <sub>1-2</sub> =0,003	32,5 (13,2; 64,0)
Процент клеток с экспрессией циклина D1	23,4 (10,0; 65,5)* p <sub>1-2</sub> =0,0002	88,6 (67,0; 97,2)
Процент клеток с экспрессией фибронектина	15,9 (5,0; 71,7)*	96,5 (87,5; 98,1)

	$p_{1-2} = 0,00001$	
Количество опухолевых клеток с экспрессией Ki67 (в баллах)	1,0 (0,0; 1,0)* $p_{1-2} = 0,004$	2,0 (1,0; 3,0)
Количество опухолевых клеток с экспрессией циклина D1 (в баллах)	2,0 (1,0; 3,0)* $p_{1-2} = 0,0001$	4,0 (3,0; 4,0)
Количество опухолевых клеток с экспрессией фибронектина (в баллах)	1,0 (0,0; 3,0)* $p_{1-2} < 0,00001$	4,0 (4,0; 4,0)

Примечание: \* – достоверные различия между группами НПЗ и ИКНТ;  $p_{1-2}$  – значение достоверности между группами НПЗ и ИКНТ

Обращает на себя внимание тот факт, что процентное соотношение клеток с экспрессией циклина D1 значительно превосходит аналогичный показатель, отражающий экспрессию широко используемого в клинической практике маркера пролиферативной активности – Ki67, что может объясняться большей чувствительностью данного метода для выявления клеток, находящихся в переходный период между пресинтетической (G1) и синтетической (S) фазами митоза.

При анализе группы пациенток с ИКНТ было отмечено, что пролиферативный потенциал опухолевых клеток у пациенток, имеющих метастазы в регионарных лимфатических узлах, и у пациенток без диагностированных метастазов колеблется в достаточно широких пределах (табл. 2), причем присутствуют как достаточно низкие значения, так и суперэкспрессия маркеров. Нужно отметить, что в данном исследовании мы не получили достоверных различий между показателями экспрессии маркеров пролиферации и эпителиально-мезенхимальной трансформации между подгруппами пациенток с ИКНТ, имеющих метастазы в регионарные лимфатические узлы, и при их отсутствии.

Таблица 2

Экспрессия маркеров пролиферации и эпителиально-мезенхимального перехода у пациенток с инвазивной карциномой неспецифического типа

Показатель	1. С метастазами n=13	2. Без метастазов n=15
Процент клеток с экспрессией Ki67	35,0 (20,0; 75,0) $p_{1-2} = 0,128$	25,0 (5,1; 55,0)
Процент клеток с экспрессией циклина D1	87,1 (72,1; 97,4) $p_{1-2} = 0,629$	90,1 (44,1; 96,7)
Процент клеток с экспрессией фибронектина	96,6 (80,9; 98,0) $p_{1-2} = 0,662$	96,4 (95,0; 98,3)

Абсолютное количество клеток с экспрессией циклина D1 на тестируемой площади	2148,0 (1231,5; 3051,0) $p_{1-2}=0,629$	2079,0 (867,0; 2959,0)
Абсолютное количество клеток с экспрессией фибронектина на тестируемой площади	2245,0 (1859,5; 3384,0) $p_{1-2}=0,322$	2929,0 (2256,0; 3558,0)

Примечание: \* – достоверные различия между подгруппами с наличием метастазов и без метастазов;  $p_{1-2}$  – значение достоверности между группами с наличием метастазов и без метастазов

Одной из причин этого может быть неодинаковая активность исследуемых маркеров при разных молекулярно-генетических подтипах рака молочной железы. Так, например, такая зависимость была установлена в ряде исследований для циклина D1 [14]. При этом авторы показали связь между усилением экспрессии этого маркера и количеством рецепторов к эстрогену.

Другой возможной причиной отсутствия различий между подгруппами пациенток с ИКНТ, имеющих метастазы в регионарные лимфатические узлы и без диагностированных метастазов, может быть достоверное различие в возрасте пациенток этих двух подгрупп ( $p=0,042$ ). Так, возраст больных в подгруппе с наличием метастазов составил 45,0 (41,0; 58,5) лет, в подгруппе пациенток без метастазов – 60,0 (54,0; 68,0) лет. При сравнении показателей экспрессии изучаемых маркеров в одинаковых возрастных подгруппах (пациентки старше 50 лет), то есть по окончании детородного возраста и при снижении уровня эстрогенов, абсолютное количество клеток, экспрессирующих маркеры циклина и фибронектина, в более агрессивных опухолях (с наличием метастазов) достоверно отличается от соответствующих показателей опухолей без метастазов (табл. 3).

Таблица 3

Экспрессия маркеров пролиферации и эпителиально-мезенхимального перехода у пациенток с инвазивной карциномой неспецифического типа в возрасте более 50 лет

Показатель	1. С метастазами n=5	2. Без метастазов n=12
Процент клеток с экспрессией Ki67	25,4 (17,5; 80,0) $p_{1-2}=0,246$	22,4 (5,5; 50,1)
Процент клеток с экспрессией циклина D1	97,1 (78,9; 98,0) $p_{1-2}=0,114$	83,1 (37,8; 92,0)
Процент клеток с экспрессией фибронектина	95,6 (53,7; 98,7) $p_{1-2}=0,673$	96,6 (91,6; 98,0)

Абсолютное количество клеток с экспрессией циклина D1 на тестируемой площади	2815,0 (2459,5; 3051,0)* $p_{1-2}=0,045$	1548,0 (793,5; 2581,0)
Абсолютное количество клеток с экспрессией фибронектина на тестируемой площади	2076,0 (1298,0; 2520,5)* $p_{1-2} 0,045$	3004,0 (2296,8; 3560,3)

Примечание: \* – достоверные различия между подгруппами с наличием метастазов и без метастазов;  $p_{1-2}$  – значение достоверности между группами с наличием метастазов и без метастазов

Так, абсолютное количество клеток с экспрессией циклина D1, играющего важную роль в контроле перехода G1/2-S в клеточном цикле и способствующего программе транскрипции и инициации синтеза ДНК, достоверно больше в подгруппе пациенток с наличием метастазов, то есть в более агрессивных на момент обследования опухолях. В то же время абсолютное количество клеток с экспрессией фибронектина достоверно больше у пациенток без метастазов. Учитывая, что активация эпителиально-мезенхимальной трансформации усиленно происходит на начальных этапах опухолевого роста [15], можно заключить, что большая активность данного процесса может быть вызвана именно периодом, предшествующим метастазированию, в ходе которого происходят потеря межклеточных контактов, перестройка цитоскелета, активация синтеза ферментов, способных приводить к деградации внеклеточного матрикса, что сопровождается синтезом продуктов, характерных для мезенхимальных клеток, но самого заселения опухолевых клеток в регионарные лимфатические узлы еще не произошло. Следовательно, это может свидетельствовать об имевшейся потенциальной угрозе метастазирования у пациенток, у которых на момент обследования не было выявлено метастазов в регионарных лимфатических узлах. Это подтверждается и тем наблюдением, что у всех пациенток, не имеющих на момент обследования метастазов в лимфатические узлы, но у которых была выявлена инвазия опухолевых клеток в лимфатические сосуды, а соответственно существовала исключительно высокая угроза развития метастазирования в дальнейшем, отмечалась суперэкспрессия фибронектина в пределах 99,1–99,6%. При этом у всех больных с ИКНТ, не имеющих ни метастазов, ни инвазии в лимфатические сосуды, процентное содержание клеток с экспрессией фибронектина никогда не достигало 99% (достоверность различия  $p=0,0095$ ). В связи с этим являются целесообразными рекомендации исследования фибронектина в клинической практике для выявления группы пациенток с высокой вероятностью риска метастазирования в регионарные лимфатические узлы.

Результаты морфометрического анализа экспрессии маркеров пролиферации и эпителиально-мезенхимального перехода показали, что процентное соотношение клеток,

экспрессирующих как маркеры Ki67 и циклина D1, так и маркер фибронектина, в группе пациенток с ИКНТ существенно выше, чем в группе пациенток с НПЗ. Это служило отражением не только повышенной пролиферативной активности клеток в группе пациенток со злокачественными новообразованиями, но и резкого усиления экспрессии фибронектина – маркера эпителиально-мезенхимальной трансформации. Экспрессия фибронектина в эпителиальных клетках свидетельствует о формировании атипии данных клеток.

Вместе с тем обращает на себя внимание тот факт, что в ряде случаев у пациенток с НПЗ не только отмечались единичные клетки с имевшей место экспрессией маркера эпителиально-мезенхимального перехода, но и выявлялось достаточно большое их количество (табл. 4). При этом у 5 пациенток (33,3% случаев НПЗ) содержание клеток, экспрессирующих фибронектин, превышало 50%, что позволило отнести этих пациенток в группу с положительным результатом иммуногистохимического окрашивания, причем у 3 из них (20,0% случаев НПЗ) содержание клеток, экспрессирующих фибронектин, было более 75%.

Таблица 4

Абсолютное количество клеток с экспрессией маркеров пролиферации и эпителиально-мезенхимального перехода и величины экспрессии иммуногистохимических окрашиваний

Показатель	1. НПЗ	2. ИКНТ
Абсолютное количество клеток с экспрессией циклина D1	467,0 (150,0; 1080,0)* $p_{1-2}=0,0001$	2113,5 (1192,3; 2957,3)
Абсолютное количество клеток с экспрессией фибронектина	444,0 (80,0; 1569,0)* $p_{1-2}=0,0001$	2833,0 (2085,5; 3471,0)
Величина экспрессии иммуногистохимического выявления циклина D1 (на основании балльной оценки)	1,0 (1,0; 2,0)* $p_{1-2}=0,001$	2,0 (2,0; 2,0)
Величина экспрессии иммуногистохимического выявления фибронектина (на основании балльной оценки)	1,0 (1,0; 2,0)* $p_{1-2}=0,0002$	2,0 (2,0; 2,0)

Примечание: \* – достоверные различия между группами НПЗ и ИКНТ;  $p_{1-2}$  – значение достоверности между группами НПЗ и ИКНТ

При анализе морфометрических показателей 5 пациенток с НПЗ, отнесенных в группу с положительным результатом для иммуногистохимического маркера в эпителиальных клетках биоптата молочной железы, обращает на себя внимание, что эту группу составляли пациентки исключительно с фибroadеномой, в то время как в группу с отрицательным результатом для иммуногистохимического маркера входили пациентки как с фибroadеномой, так и с фибroadеноматозом (различия между группами  $p=0,0186$ ). Характерным являлся и тот факт, что все исследованные случаи фибroadеномы смешанного типа относились к подгруппе с положительным результатом иммуногистохимического окрашивания. Не исключено, что активация эпителиально-мезенхимальной трансформации, которую отражает увеличение процентного соотношения клеток, экспрессирующих фибронектин, может служить неблагоприятным фоном для малигнизации НПЗ. Одним из косвенных доказательств существования такой возможности могут служить результаты ROC-анализа, представленные в таблице 5, которые демонстрируют отличное качество модели для подтверждения злокачественности процесса на основании оценки процентного содержания клеток с экспрессией фибронектина. При этом, если установить порог для процентного содержания фибронектина более 50% как соответствующий злокачественному новообразованию, то чувствительность данного метода будет равна 0,892, специфичность – 0,800, а точность, или доля «правильных срабатываний теста» среди всех обследованных, что является совокупным показателем информативности теста, – 0,860.

Таблица 5

Результаты ROC-анализа оценки процентного содержания клеток, экспрессирующих маркеры пролиферации и эпителиально-мезенхимального перехода

Тестовая переменная	Площадь ROC-кривой	Значимость	Оценка качества модели
Процент клеток с экспрессией Ki67	0,779	$p=0,003$	хорошее
Процент клеток с экспрессией циклина D1	0,850	$p=0,0002$	высокое
Процент клеток с экспрессией фибронектина	0,905	$p=0,00001$	отличное

### Заключение

Таким образом, проведенное исследование позволило установить, что имеются достоверные различия в экспрессии Ki-67, циклина D1 и фибронектина между пациентками со злокачественными новообразованиями и незлокачественными пролиферативными

заболеваниями. Наиболее выраженными при этом являются различия экспрессии фибронектина.

Процентное соотношение клеток с экспрессией циклина D1 значительно превосходит аналогичный показатель, отражающий экспрессию широко используемого в клинической практике маркера пролиферативной активности – Ki67, что может трактоваться как большая чувствительность данного метода для выявления клеток, находящихся в переходный период между пресинтетической (G1) и синтетической (S) фазами митоза.

Наличие большого количества клеток с экспрессией фибронектина у пациенток с ИКНТ при отсутствии метастазов свидетельствует об активации эпителиально-мезенхимального перехода, который интенсифицируется на начальных этапах опухолевого роста, когда усиливается инвазивная способность опухолевых клеток, но самого заселения их в регионарные лимфатические узлы еще не выявлено. Характерным для пациенток, не имеющих на момент обследования метастазов в лимфатические узлы, но с выявленной инвазией опухолевыми клетками лимфатических сосудов, является суперэкспрессия фибронектина более 99,0%. В связи с этим можно рекомендовать исследование фибронектина в клинической практике для выявления группы пациенток с высокой вероятностью риска метастазирования в регионарные лимфатические узлы.

У 33% пациенток с незлокачественными пролиферативными заболеваниями молочной железы, в том числе с фиброаденомой, диагностировано положительное иммуногистохимическое окрашивание на фибронектин, в том числе у 3 пациенток отмечалось процентное содержание клеток, экспрессирующих данный маркер более 75%. Все исследованные случаи фиброаденомы смешанного типа относились к подгруппе с положительным результатом иммуногистохимического окрашивания. Не исключено, что активация эпителиально-мезенхимальной трансформации, которую отражает увеличение процентного соотношения клеток, экспрессирующих фибронектин, может служить неблагоприятным фоном для малигнизации незлокачественных пролиферативных заболеваний молочной железы.

### **Список литературы**

1. Friedl P., Mayor R. Tuning Collective Cell Migration by Cell-Cell Junction Regulation. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2017. vol. 9. no.4. P. a029199. DOI: 10.1101/cshperspect.a029199.
2. Lu W., Kang Y. Epithelial-mesenchymal plasticity in cancer progression and metastasis. Dev Cell. 2019. vol. 49. no. 3. P. 361-374. DOI: 10.1016/j.devcel.2019.04.010.

3. Hao Y., Baker D., Ten Dijke P. TGF- $\beta$ -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *Int. J. Mol Sci.* 2019. vol. 20. no. 11. P. 2767. DOI: 10.3390/ijms20112767.
4. Fernandez-Garcia B., Eiro N., Marin L., Gonzalez-Reyes S., Gonzalez L.O., Lamelas M.L., Vizoso F.J. Expression and prognostic significance of fibronectin and matrix metalloproteases in breast cancer metastasis. *Histopathology.* 2014. vol. 64. P. 512-522. DOI: 10.1111/his.12300.
5. Malumbres M., Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer.* 2009. no. 9. P. 153-166. DOI: 10.1038/nrc2602.
6. Tchakarska G., Sola B. The double dealing of cyclin D1. *Cell Cycle.* 2020. vol. 19. no. 2. P. 163-178. DOI: 10.1080/15384101.2019.1706903.
7. Casimiro M.C., Crosariol M., Loro E., Li Z., Pestell R.G. Cyclins and cell cycle control in cancer and disease. *Genes Cancer.* 2012. vol. 3. no. 11-12. P. 649-657. DOI: 10.1177/1947601913479022.
8. Hydbring P., Malumbres M., Sicinski P. Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016. vol. 17. P. 280-292. DOI: 10.1038/nrm.2016.27.
9. Wang G., Gormley M., Qiao J., Zhao Q., Wang M., Di Sante G., Deng S., Dong L., Pestell T., Ju X., Casimiro M.C., Addya S., Ertel A., Tozeren A., Li Q., Yu Z., Pestell R.G. Cyclin D1-mediated microRNA expression signature predicts breast cancer outcome. *Theranostics.* 2018. vol. 8. no. 8. P. 2251-2263. DOI: 10.7150/thno.23877.
10. Autenshlyus A.I., Golovanova A.V., Studenikina A.A., Brusentsov I.I., Proskura A.V., Zhurakovskiy I.P., Arkhipov S.A., Sidorov S.V., Vavilin V.A., Lyakhovich V.V. Personalized Approach to Assessing mRNA Expression of Histidine-Rich Glycoprotein and Immunohistochemical Markers in Diseases of the Breast. *Dokl Biochem Biophys.* 2019. vol. 484. no. 1. P. 59-62. DOI: 10.1134/S1607672919010162.
11. Autenshlyus A.I., Bernado A.V., Studenikina A.A., Proskura A.V., Davletova K.I., Zhurakovskiy I.P., Arkhipov S.A., Varaksin N.A., Sidorov S.V., Lyakhovich V.V. Personalized Approach to Determination of Histidine-Rich Glycoprotein and E-Cadherin in Supernatants of Immunocompetent Blood Cells and Breast Biopsy Specimens in Breast Malignant and Non-Malignant Disease. *Dokl Biochem Biophys.* 2020. vol. 490. no. 1. P. 1-4. DOI: 10.1134/S1607672920010019.
12. Yang L., Wang X.W., Zhu L.P., Wang H.L., Wang B., Zhao Q., Wang X.Y. Significance and prognosis of epithelial-cadherin expression in invasive breast carcinoma. *Oncol Lett.* 2018. vol. 16. no. 2. P. 1659-1665. DOI: 10.3892/ol.2018.8836.
13. Zhang L., Yang C., Pfeifer J.D., Caprioli R.M., Judd A.M., Patterson N.H., Reyzer M.L., Norris J.L., Maluf H.M. Histopathologic, immunophenotypic, and proteomics characteristics of

low-grade phyllodes tumor and fibroadenoma: more similarities than differences. *NPJ Breast Cancer*. 2020. no. 6. P. 27. DOI: 10.1038/s41523-020-0169-8.

14. Arnold A., Papanikolaou A. Cyclin D1 in breast cancer pathogenesis. *J. Clin Oncol*. 2005. vol. 23. P. 4215-4224. DOI: 10.1200/JCO.2005.05.064.

15. Friedl P., Mayor R. Tuning Collective Cell Migration by Cell-Cell Junction Regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017. vol. 9. no. 4. P. a029199. DOI: 10.1101/cshperspect.a029199.