

*На правах рукописи*

**Бернадо Альбина Владимировна**

**БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЁРЫ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ И  
ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ МОЛОЧНОЙ  
ЖЕЛЕЗЫ**

**03.01.04 – биохимия**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» и в федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, профессор

**Аутеншлюс Александр Исаевич**

**Официальные оппоненты:**

**Бунева Валентина Николаевна**, доктор биологических наук, профессор, институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, главный научный сотрудник лаборатории ферментов репарации

**Кондакова Ирина Викторовна**, доктор медицинских наук, профессор, научно-исследовательский институт онкологии федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр российской академии наук», заведующая лабораторией биохимии опухолей.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт экологии человека», подразделение федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр угля и углекислоты Сибирского отделения Российской академии наук»

**Защита диссертации состоится** «\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 001.048.04 на базе федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» по адресу: 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» и на сайте <http://ficftm.ru>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 202 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета, к.б.н.

**Русских Галина Сергеевна**

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность и степень разработанности темы исследования.**

Опухолевые клетки секретируют и выделяют характерные белки с большей скоростью, чем здоровые клетки, и многие из этих белков обнаруживаются в крови или других жидкостях организма малоинвазивным способом (Ankney J.A. et al., 2019). Секретируемые белки, играют важную роль в нормальных физиологических процессах и являются критическими участниками патологических процессов, таких как ангиогенез рака, инвазия и метастазирование (Faria S.S. et al., 2017).

Патогенез рака молочной железы (РМЖ) в большинстве случаев остается неясным. Идентифицированы многие факторы риска, включая доброкачественные пролиферативные заболевания молочной железы. Последние связаны с повышенным риском развития и являются фоном для последующего РМЖ (Dyrstad S.W. et al., 2015; Hartmann L.C. et al., 2015). Одним из процессов, знаменующих начало злокачественной прогрессии, является эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), поэтому его обнаружение в тканях молочной железы можно рассматривать как первый признак наличия клеточной атипии. ЭМП относится к короткому периоду, происходящему в начале существования злокачественной опухоли, а его обнаружение с помощью маммографической визуализации не представляется возможным (Lin J.H. et al., 2019).

В настоящее время существует неясность в биомаркерах, которые можно было бы использовать не только для обнаружения РМЖ, но и для прогнозирования развития злокачественной прогрессии у женщин с диагнозом, входящим в определение доброкачественного заболевания молочной железы (Posso M. et al., 2017). Поэтому поиск дополнительных маркеров гормонозависимого рака молочной железы, особенно на фоне имеющихся незлокачественных заболеваний, и их корреляция с маркерами ЭМП является актуальной проблемой медицинской биохимии.

**Цель исследования:** оценить экспрессию матричной РНК гистидин-богатого гликопротеина, продукцию белков при злокачественных и доброкачественных заболеваниях молочной железы и выделить наиболее вероятные биомаркеры риска развития рака молочной железы.

### **Задачи исследования:**

1. Определить экспрессию мРНК гистидин-богатого гликопротеина в образцах ткани при злокачественных и доброкачественных заболеваниях молочной железы.

2. Определить концентрацию в сыворотке крови, в супернатанте клеток крови, а также спонтанную, индуцированную поликлональным активатором и фактором дифференцировки HLDF продукцию гистидинбогатого гликопротеина, Е-кадгерина, белка теплового шока 90 $\alpha$ A1, интерлейкина 12, муцина 1, ингибитора активатора плазминогена типа 1, рецептора прогестерона и рецептора эстрогена  $\alpha$  образцами ткани молочной железы при её заболеваниях.

3. Определить экспрессию Е-кадгерина,  $\beta$ -1-интегрина и коллагена II типа в образцах ткани молочной железы при её злокачественных и доброкачественных заболеваниях.

4. Изучить взаимосвязь между продукцией белков и показателями экспрессии маркёров эпителиально-мезенхимального перехода при заболеваниях молочной железы.

5. Определить особенности продукции белков при злокачественной трансформации ткани молочной железы.

**Научная новизна исследования.** Впервые обнаружено, что в тех образцах, где имелась мРНК HRG, выше была концентрация PR в сыворотке крови и ниже концентрация HRG в супернатантах клеток крови и образцов ткани молочной железы, по сравнению с образцами, в которых отсутствовала мРНК HRG.

Впервые показано, что у пациентов с фиброаденомой молочной железы выше индекс влияния поликлональных активаторов на продукцию HRG образцами ткани молочной железы по сравнению с пациентами с фиброаденоматозом и инвазивной карциномой неспецифического типа.

Впервые показано, что у пациентов с фиброаденомой по сравнению с пациентами с инвазивной карциномой неспецифического типа выше концентрации PR в сыворотке крови. Индекс влияния поликлональных активаторов на продукцию PR образцами ткани молочной железы находится в обратной корреляционной связи с экспрессией СИ в образцах ткани молочной железы.

Впервые показано, что у пациентов с фиброаденоматозами ниже концентрация IL-12 и выше концентрация CDH1 в супернатантах клеток крови по сравнению с больными инвазивной карциномой неспецифического типа. Концентрация IL-12 и ER $\alpha$  в сыворотке крови находится в прямой корреляционной связи, а концентрация CDH1 в супернатанте клеток крови - в обратной корреляционной связи с экспрессией CDH1 в образцах ткани молочной железы.

Впервые установлено, что индекс влияния HLDF на продукцию CDH1 выше в тех образцах, в которых присутствовала мРНК HRG, а индекс влияния HLDF на продукцию HRG ниже в тех образцах, в которых присутствовала мРНК HRG. Индекс влияния HLDF на продукцию ER $\alpha$  образцами ткани молочной железы при инвазивной карциноме неспецифического типа ниже, чем при доброкачественных заболеваниях молочной железы.

**Теоретическое и практическое значение.** Полученные данные, характеризующие продукцию белков, в совокупности с данными об их связи с наличием мРНК гистидин-богатого гликопротеина и иммуногистохимических маркёров у пациентов со злокачественными и доброкачественными заболеваниями, могут быть положены в основу создания и внедрения в практику дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных заболеваний молочной железы. В частности, значения концентрации IL-12 и ER $\alpha$  в сыворотке крови, CDH1 в супернатанте клеток крови, а также индекс влияния поликлональных активаторов на продукцию PR образцами ткани могут быть

использованы в качестве маркёров эпителиально-мезенхимального перехода. Кроме того, данные о том, что фактор дифференцировки HLDF оказывает влияние на продукцию белков в большей степени при инвазивной карциноме неспецифического типа и при фиброаденоматозе, позволяет рассматривать его как кандидата в средства дифференцирующей терапии.

**Методология и методы исследования.** Объектом диссертационного исследования являются инвазивная карцинома неспецифического типа и доброкачественные заболевания молочной железы. Предметом – их биохимические маркёры. С целью выполнения поставленных задач были проведены выделение мРНК, обратная транскрипция и ПЦР-РВ для обнаружения мРНК *HRG*. Для определения спонтанной, при влиянии ПА и при влиянии HLDF продукции белков проведено культивирование клеток крови и образцов ткани и дальнейший ИФА их супернатантов, а также образцов сыворотки крови. Маркёры ЭМП определяли с помощью иммуногистохимического метода. Статистическую обработку данных выполняли с помощью программного пакета Statistica V6.0.

#### **Основные положения, выносимые на защиту.**

1. В образцах, в которых обнаружена мРНК *HRG*, выше концентрация PR в сыворотке крови и ниже концентрации *HRG* в супернатантах клеток крови по сравнению с образцами, в которых мРНК *HRG* нет.

2. У пациентов с фиброаденомой молочной железы по сравнению с пациентами с инвазивной карциномой неспецифического типа выше концентрация PR в сыворотке крови, а индекс влияния поликлональных активаторов на продукцию PR образцами ткани молочной железы находится в обратной корреляционной связи с экспрессией СП в образцах ткани молочной железы. Индекс влияния поликлональных активаторов на продукцию *HRG* образцами ткани молочной железы у пациентов с фиброаденомой молочной железы выше по сравнению с пациентами с фиброаденоматозом и инвазивной карциномой неспецифического типа.

3. У пациентов с фиброаденоматозом ниже концентрация IL-12 и выше концентрация CDH1 в супернатанте клеток крови, по сравнению с больными инвазивной карциномой неспецифического типа. Концентрация IL-12 и ER $\alpha$  в сыворотке крови находится в прямой корреляционной связи, а концентрация CDH1 в супернатанте клеток крови - в обратной корреляционной связи с экспрессией CDH1 в образцах ткани молочной железы.

4. Индекс влияния HLDF на продукцию CDH1 выше, а индекс влияния HLDF на продукцию *HRG* ниже в образцах, в которых обнаружена мРНК *HRG*, по сравнению с теми образцами, в которых мРНК *HRG* отсутствует. Индекс влияния HLDF на продукцию ER $\alpha$  образцами ткани молочной железы при инвазивной карциноме неспецифического типа ниже, чем при доброкачественных заболеваниях молочной железы.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Полученные результаты имеют высокую степень достоверности, которая подтверждается

использованием современных методов исследования и адекватной статистической обработкой полученных результатов.

Основные результаты работы доложены и обсуждены на: X Российской (итоговой) научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Авиценна-2019» - получен диплом первой степени (Новосибирск, 2019); V Всероссийской Конференции по молекулярной онкологии с международным участием (Москва, 2019); VII Молодежной Школе-Конференции по Молекулярной и Клеточной биологии Института Цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2020); BGRS/SB-2020: 12th International Multiconference “Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology” (Новосибирск, 2020).

**Личный вклад автора.** Личный вклад автора в исследование составляет основную часть работы. Автор занимался сбором и анализом информации по теме исследования, постановкой цели и задач выполненной работы. Автором самостоятельно проведены все молекулярные исследования, определение концентраций белков и экспрессии биомаркеров, статистическая обработка полученных результатов.

**Объём и структура диссертации.** Диссертация написана в традиционном стиле и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения и выводов. Диссертация изложена на 125 страницах машинописного текста, включающего 18 таблиц, 16 рисунков. Список литературы состоит из 241 источников, российских 5, зарубежных-236.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Материалы.** Материалом для проведения полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени (ПЦР-РВ) и для иммуногистохимического исследования (ИГИ) служили образцы ткани молочной железы 85 пациентов. Из них у 67 пациентов имелся диагноз инвазивная карцинома неспецифического типа (ИКНТ). И 18 пациентов с доброкачественными заболеваниями молочной железы (ДЗМЖ). Всем пациентам не проводилась предоперационная адьювантная терапия. Отсутствие предоперационной терапии было важно, так как она оказывает влияние на экспрессию исследованных нами белков (Huang Y. et al., 2019; Li X. et al., 2020).

Распределение пациентов с ИКНТ по молекулярным подтипам: люминальный тип А - 29 пациентов, люминальный тип В HER2- - 12, люминальный тип В HER2+ - 5, тройной негативный - 14, HER2+ - 7.

Из 18 пациентов с ДЗМЖ 9 имело диагноз фиброаденома, 8 – очаговый фиброаденоматоз и в 1 случае – внутрипротоковый папилломатоз на фоне фиброаденоматоза. Средний возраст всех пациентов составил  $52 \pm 1,9$  (от 18 до 74). Возраст больных ИКНТ в среднем  $54 \pm 1,4$  (от 23 до 74), а пациентов с ДЗМЖ  $45,4 \pm 3,6$  лет (от 18 до 67 лет).

Материалом для иммуноферментного анализа служила сыворотка крови, супернатант клеток крови и образцы ткани молочной железы 54 паци-

ентов. Средний возраст этих пациентов составил  $50,7 \pm 1,9$  лет (от 18 до 72). Из них 39 имели ИКНТ и 15 – с ДЗМЖ.

Из 15 пациентов с ДЗМЖ в 9 случаях имелся диагноз фиброаденома, в 5 случаях очаговый фиброаденоматоз и в 1 случае – внутрипротоковый папилломатоз на фоне фиброаденоматоза. Среди фиброаденом 2 было с гиперплазией, 2 смешанного типа и 1 с инволютивными изменениями. В случае очагового фиброаденоматоза в 2 образцах имелся склерозирующий аденоз, а также имелся образец с участками гиперплазии и склерозирующим аденозом. Кроме того, в 1 случае был обнаружен узловой фиброз с микрокальцинатами, а в другом - пролиферирующая форма фиброзокистозной болезни с перидуктальным воспалением. Средний возраст пациентов с ДЗМЖ составил  $42,6 \pm 3,7$  года (от 18 до 63 лет).

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 (протокол № 3, 2016).

**Методы исследования.** Для ПЦР-РВ образцы ткани объемом 8 мм<sup>3</sup>, полученные методом трепанобиопсии немедленно замораживали в 500 мкл лизирующего раствора и хранили при  $-80$  °С. Перед выделением мРНК, ткань в течение 5 минут гомогенизировали с помощью TissueLyser LT (QIAGEN) с частотой 40 Гц. Выделение мРНК проводили с помощью набора РеалБест экстракция 1000 (АО «Вектор-Бест», Россия) по стандартной методике, приложенной к этому набору. Тотальную РНК, полученную на этом этапе, переносили в новую пробирку и использовали в реакции обратной транскрипции для получения комплементарной ДНК (комплементарная ДНК к матричной РНК, кДНК) с помощью набора реагентов для проведения обратной транскрипции (ОТ) (ООО «СИНТОЛ», Россия), основываясь на приложенной к набору инструкции, с использованием специфичных праймеров (Таблица 1). При составлении набора для выявления мРНК HRG пара праймеров была подобрана таким образом, чтобы праймер HRG\_R располагался в экзонах IV и V. Для контроля качества выделения РНК использовали систему выявления мРНК ТВР (TATA-box binding protein), праймер ТВР\_R также располагался на разных экзонах. К выделенной на предыдущем этапе тотальной РНК добавляли 20 пМоль каждого прямого праймера (HRG\_F и ТВР\_F) и бидистиллированной воды до объема 13 мкл. Инкубировали 10 минут при  $65$  °С для отжига праймеров. Затем пробирки доставали на лёд и добавляли 10 мкл 2,5X реакционной смеси и 50 единиц активности ревертазы MMLV-RT. Полученную реакционную смесь инкубировали в течение 1 часа при  $37$  °С.

**Таблица 1.** Праймеры для определения экспрессии HRG и TBP

Название	Последовательность 5'-3'
HRG_F*	AGTACAAAGAGGAGAATGATGACTT
HRG_R*	CATTTCTTCCCCTCCTCTCAC
TBP_F	ACTGTGAGCCACCGATTCCAGACGTCCAT
TBP_R	TAGTCTTAGATGTGCAAGAATCGGA

Примечание: F - прямой праймер, R - обратный праймер.

Для проведения ПЦР-РВ использовался амплификатор BIO-RAD iQ™. Реакцию проводили с помощью набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии EVA Green (ООО «СИНТОЛ», Россия), основываясь на приложенной к набору инструкции. Реакцию проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 200 мкМ dNTP; 10X ПЦР буфер Б; 2 пМоль обратного праймера; 12 мкл смеси, получившейся на этапе обратной транскрипции (содержащей, в том числе, прямые праймеры и кДНК); 1,5 единицы активности *SynTaq* ДНК-полимеразы. Реакцию проводили в дублях для каждого праймера. Реакцию проводили с предварительным нагревом до 98 °С в течение 2 мин, с последующими 40 циклами амплификации включающими денатурацию при 98°С в течение 5 секунд; отжиг праймеров при 60°С в течение 30 секунд. Съем флюоресценции в реальном времени проводился в течение 30 секунд при температуре 55°С. Для контроля специфичности получаемого продукта амплификации использовали кривые плавления. Отрицательный контроль служили пробы, включающие в себя все компоненты реакции, но вместо смеси, получившейся на этапе обратной транскрипции, в отрицательный контроль вносили соответствующее количество бидистиллированной воды. Относительный уровень экспрессии генов оценивали с использованием значений пороговых циклов *Ct* по методу  $\Delta Ct$  (разница между пороговыми значениями циклов *HRG* и *TBP*).

Супернатант клеток крови получали следующим образом: цельную кровь в количестве 1 мл, помещали в стерильный флакон с 4 мл питательной среды DMEM-F12 (модифицированная Dulbecco Eagle Medium/питательная смесь F-12) и культивировали при 37 °С в течение 24 ч, затем осаждали центрифугированием при 2000 об/мин, 15 мин. Полученную надосадочную жидкость аликвотировали и использовали для исследования концентрации белков в крови.

Образцы ткани, полученные методом трепанобиопсии, делили на три части по 8 мм<sup>3</sup>. Одну часть инкубировали в 1 мл питательной среды DMEM-F12 при 37 °С в течение 72 ч для определения спонтанной продукции (СП), а другую – в таком же объеме среды при 37 °С в течение 72 ч с комплексом ПА для определения индуцированной продукции (ИП) (набор «Стимул-Бест», производства АО Вектор-Бест, в состав которого входят фитогемагглютинин М в концентрации 2 мкг/мл, фитогемагглютинин Р в концентрации 2 мкг/мл, конконавалин А в концентрации 4 мкг/мл и липополисахарид в концентрации 2 мкг/мл), третью часть инкубировали при тех же условиях с HLDF (Human



Leukemia Differentiation Factor) в концентрации 20 мкг/мл (предоставленного сотрудниками Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова), после чего клетки осаждали центрифугированием при 2000 об/мин, 15 мин и получали супернатант.

Концентрации белков в супернатантах определяли с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием наборов производства Cloud-Clone Corp. (США) согласно прилагаемым инструкциям (чувствительность анализа составила ER $\alpha$  – 0,239 нг/мл, PR – 0,128 нг/мл, HRG – 0,22 нг/мл, CDH1 – 25,1 пг/мл, PAI-1 – 5,5 пг/мл, IL-12 – 1,31 пг/мл, HSP90 $\alpha$ A1 – 0,65 нг/мл и MUC1 – 0,266 нг/мл).

Индекс влияния поликлональных активаторов (ИВПА) и индекс влияния HLDF (ИВHLDF) на продукцию белков образцами ткани высчитывали по формуле: ИВПА (ИВHLDF) = А/Б, где А – концентрация белка в супернатанте после инкубации образца с ПА (HLDF), а Б – концентрация белка в супернатанте образца без стимуляции ПА (HLDF).

Для подтверждения наличия эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), в срезах ткани молочной железы определяли экспрессию маркёров ЭМП: коллагена II типа (СII),  $\beta$ -1-интегрин (CD29) и E-кадгерин (CDH1). Иммуногистохимическое исследование экспрессии СII, CD29 и CDH1 проводили на парафиновых срезах образца ткани молочной железы с использованием набора “Vectastain Universal Elite ABC Kit” (“Vector Laboratories”, USA), согласно инструкции. Анализ экспрессии изучаемых маркёров 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 каждого пациента оценивалось по 10 изображений (площадь каждого составляла 95578 мкм<sup>2</sup>). Подсчитывали относительное количество клеток, либо экспрессирующих, либо не экспрессирующих каждый маркёр. Для удобства оценки использовали отношения экспрессирующих клеток к неэкспрессирующим. Иммуногистохимическое исследование проводилось под руководством доктора биологических наук Архипова С.А..

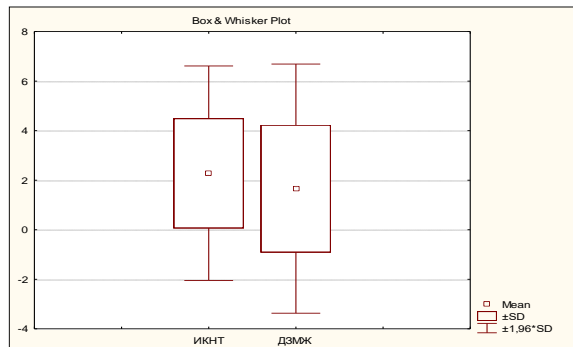
Статистическую обработку данных выполняли с помощью программного пакета Statistica V6.0. При определении характера распределения данных использовали уравнение Колмогорова-Смирнова с определением поправки Лиллифорса. Для определения различий в экспрессии мРНК HRG использовали t-критерий Стьюдента. Поскольку распределение продукции белков отличалось от нормального, проводили статистический анализ данных с использованием непараметрического критерия Уилкоксона-Манна-Уитни. Показатели продукции белков 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

### Экспрессия мРНК гистидин-богатого гликопротеина в образцах ткани при заболеваниях молочной железы

При проведении ПЦР-РВ результаты, подлежащие учёту, получены в 89,4%, то есть из 85 изученных образцов анализировать результаты можно только при анализе данных 76 образцов ткани молочной железы. В 9 случаях в образцах было недостаточно генетического материала, так как мРНК референсного гена ТВР (TATA-box binding protein), в норме присутствующего во всех ядерных клетках, не была обнаружена.

По результатам проведенной ПЦР-РВ мРНК HRG была обнаружена в 63,2% (48 из 76) всех случаев. При ИКНТ мРНК HRG была выявлена в 57,6% случаев (34 из 59), а при ДЗМЖ в 82,4% (14 из 17). При этом, мРНК HRG присутствовала в 9 из 27 образцов ИКНТ люминального типа А (33%), в 1 из 4 образцов ИКНТ люминального тип В HER2- (25%), в 3 из 10 образцов ИКНТ люминального типа В HER2+ (30%), в 6 из 11 образцов ИКНТ тройного негативного (55%) и в 4 из 7 образцов ИКНТ HER2+ (57%). Соответственно, количество образцов с мРНК HRG в процентном соотношении больше в случае подтипов, с худшим прогнозом – HER2+ и тройной негативный. При ДЗМЖ три образца, в которых отсутствовала мРНК HRG, представляли собой фиброаденомы, у которых не было отмечено каких-либо особенностей в виде гиперплазии или инволюции. При всех фиброаденоматозах имелась мРНК HRG, а также при фиброаденомах с гиперплазией. Таким образом, наличие мРНК HRG в образцах ткани молочной железы при ДЗМЖ может свидетельствовать о возможных рисках трансформации клеток. Экспрессия мРНК HRG, которую оценивали по  $\Delta Ct$  (разница между пороговым числом циклов ТВР и HRG), не отличалась при ИКНТ и ДЗМЖ (рис.1).



**Рис. 1.** Диаграмма размаха  $\Delta Ct$  (по оси ординат) при инвазивной карциноме неспецифического типа (ИКНТ) и доброкачественных заболеваниях молочной железы (ДЗМЖ).

Примечание: Mean – среднее значение,  $\pm SD$  – стандартное отклонение.

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. Поэтому HRG исследовали с помощью двух различных подходов, таких как ПЦР-РВ и иммуноферментный анализ.

### **Продукция белков клетками крови и образцами ткани молочной железы при её злокачественных и доброкачественных заболеваниях**

Уже после первых измерений концентраций HSP90 $\alpha$ A1 и MUC1 в сыворотке крови стало ясно, что концентрации этих белков находятся ниже уровня чувствительности используемых для проведения ИФА наборов, поэтому определение концентраций HSP90 $\alpha$ A1 и MUC1 проводили только в супернатанте клеток крови и в супернатанте образцов ткани молочной железы во всех вариантах исследования. Показатели концентраций белков, а также индексы влияния ПА и HLDF в виде медианы – Me, и нижнего и верхнего квартилей (Q1; Q3), представлены в таблицах 3,4 и 5.

Концентрации белков в сыворотке крови и в супернатанте клеток крови у пациентов с ДЗМЖ и ИКНТ статистически значимо не отличались.

При сравнении концентраций белков в супернатанте образцов ткани при спонтанной продукции статистически значимо выше была концентрация HRG ( $p=0,049$ ) и IL-12 ( $p=0,039$ ) в супернатантах образцов, полученных от больных ИКНТ, по сравнению с ДЗМЖ (таблица 2). Полученные результаты согласуются с известными сведениями о том, что HRG присутствует в строме большинства опухолей (Eksteen J.J. et al., 2020). Более высокая концентрация IL-12 при ИКНТ может быть обусловлена обратной корреляцией между IL-12 и экспрессией гормональных рецепторов при некоторых молекулярных подтипах рака, которые включены в наше исследование (Nicolini A. et al., 2020).

При анализе концентраций белков в супернатанте образцов ткани молочной железы при влиянии на них ПА, статистически значимых различий между ИКНТ и ДЗМЖ получено не было, как не было получено статистически значимых различий по ИВПА на продукцию этих белков.

При сравнении концентраций белков в супернатанте образцов ткани при влиянии на них фактора дифференцировки HLDF статистически значимо выше была концентрация CDH1 ( $p=0,029$ ) у пациентов с ДЗМЖ по сравнению с ИКНТ и концентрация IL-12 ( $p=0,044$ ) у пациентов с ИКНТ по сравнению с ДЗМЖ (таблица 3). Возникшая разница между ИКНТ и ДЗМЖ под воздействием HLDF может свидетельствовать об избирательном индуцирующем влиянии фактора дифференцировки на атипичные клетки. Более высокая концентрация IL-12 при ИКНТ может быть обусловлена тем, что под воздействием HLDF повышается относительное количество высокодифференцированных клеток, следовательно, они становятся «видимыми» для иммунной системы, а IL-12, как известно, может оказывать существенное противоопухолевое действие (Berraondo P. et al., 2019). Хотя, как и в первом случае, воздействие

HLDF на образцы ткани не было статистически значимым, ни при ИКНТ, ни при ДЗМЖ.

При оценке ИВНЛДФ на продукцию белков образцами ткани статистически значимо выше были ИВНЛДФ на продукцию ER $\alpha$  ( $p=0,035$ ) у пациентов с ДЗМЖ, по сравнению с ИКНТ, что может быть обусловлено его более высокой спонтанной продукцией при ИКНТ (таблица 2), а также статистически значимым ингибирующим влиянием ИВНЛДФ на продукцию ER $\alpha$  образцами ИКНТ ( $p=0,004$ ).

**Таблица 2.** Концентрации белков, для которых получены статистически значимые различия, при спонтанной продукции, при продукции под воздействием HLDF и индекс влияния HLDF на продукцию этих белков (ИВНЛДФ)

Белок, единицы измерения	Спонтанная продукция образцом ткани		Продукция образцом ткани под воздействием HLDF		ИВНЛДФ у.е.	
	Me (Q1;Q3)					
	1.ДЗМЖ	2.ИКНТ	3.ДЗМЖ	4.ИКНТ	5.ДЗМЖ	6.ИКНТ
ER $\alpha$ нг/мл	0,9 (0,3;2,5)	1,5 (1,0;4,1)	0,5 (0,3;1,4)	0,8 (0,3;1,2)	0,6 (0,3;1,0)	0,3 (0,2;0,9)
	$p_{5,6}=0,035$					
HRG нг/мл	2207 (1618; 2807)	2726 (2188; 3436)	675 (532; 1207)	1150 (605;1707 )	0,3 (0,2;0,5)	0,4 (0,2;0,5)
	$p_{1,2}=0,049$					
CDH1 пг/мл	8647 (6776;96 81)	7150 (3978;120 13)	10181 (5167;120 13)	5836 (3320;944 2)	1,1 (0,8;1,5)	0,7 (0,3;1,6)
	$p_{3,4}=0,029$					
PAI1 пг/мл	770 (241; 3126)	1333 (720; 3766)	545 (112; 1172)	571 (415; 2672)	0,6 (0,4;1,0)	0,6 (0,4;0,7)
	$p_{1,2}=0,039$					
IL-12 пг/мл	10,0 (6,4;19,4)	25,6 (10,2;41,0 )	6,2 (2,6;12,4)	13,8 (9,0;29,2)	0,6 (0,4;1,0)	0,7 (0,5;1,0)
	$p_{3,4}=0,044$					

Так как группа ДЗМЖ являлась неоднородной по своему составу, было решено разделить её на две группы. В одну были включены пациенты с фиброаденомами (ФА, N=9), а в другую – с очаговыми фиброаденоматозами (ФАМ, N=6). Эти группы сравнивали между собой, а также с группой больных ИКНТ.

В сыворотке крови статистически значимо выше была концентрация PR ( $p=0,017$ ) в группе пациентов с ФА по сравнению с группой больных ИКНТ. Рецептор прогестерона PR может активировать транскрипционный

процесс, участвующий в пролиферации молочной железы, что возможно и происходит при фиброаденоме (Lou P. et al., 2017).

При сравнении концентраций белков в супернатанте клеток крови были получены статистически значимые различия по концентрации CDH1 и IL-12. Причём концентрация CDH1 была выше в группе ФАМ по сравнению как с ФА ( $p=0,011$ ), так и с ИКНТ ( $p=0,030$ ). Более высокая концентрация CDH1 может быть связана с усиленной пролиферацией, гибелью клеток, а также CDH1 может действовать как критический супрессор инвазии (Sommariva M., Gagliano N., 2020). Концентрация IL-12 была выше при ИКНТ по сравнению с ФАМ ( $p=0,039$ ), но не отличалась от его концентрации при ФА (Таблица 3). Полученный результат может объяснить те противоречия, которые имеются в научной литературе, относительно уровня IL-12 при заболеваниях молочной железы. Так, одни авторы получили данные о значительном дефиците IL-12 в крови у пациентов с ИКНТ по сравнению с пациентами с ДЗМЖ (Youssef S.S., Mohammad M.M., Ezz-El-Agab L.R., 2015), а другие, наоборот, сообщали о более высоких уровнях IL-12 в крови у пациентов с ИКНТ по сравнению с ДЗМЖ (Chavey C. et al., 2017). Данное противоречие может быть обусловлено гетерогенностью групп пациентов с ДЗМЖ.

**Таблица 3.** Концентрации белков, для которых получены статистически значимые различия, в сыворотке и в супернатанте клеток крови при фиброаденомах (ФА), фиброаденоматозах (ФАМ) и при инвазивной карциноме неспецифического типа (ИКНТ)

Белок, единицы измерения	Сыворотка крови			Супернатант клеток крови		
	Me (Q1;Q3)					
	1.ФА	2.ФАМ	3.ИКНТ	4.ФА	5.ФАМ	6.ИКНТ
PR нг/мл	51,1 (15,5; 63,2)	25,2 (19,1; 34,7)	17,8 (10,9; 51,1)	56,5 (40,5; 68,0)	38,0 (31,0; 43,5)	55,5 (38,0; 84,0)
	$p_{1,3}=0,017$					
CDH1 пг/мл	71750 (37250; 74310)	47910 (46890; 49820)	66958 (51950; 78075)	8355 (5343; 8907)	9707 (9137; 13003)	7393 (6442; 8731)
				$p_{4,5}=0,011$ ; $p_{5,6}=0,030$		
IL-12 пг/мл	195 (129; 236)	85,0 (78,0; 89,0)	170 (96,0; 197)	193 (125; 397)	136 (135; 171)	284 (157; 488)
				$p_{5,6}=0,039$		

При спонтанной продукции белков образцами ткани различия были получены по концентрациям PR, ER $\alpha$ , HRG и IL-12. Спонтанная продукция PR была выше при ФА, чем при ФАМ ( $p=0,013$ ) и чем при ИКНТ ( $p=0,013$ ). В то время как между ИКНТ и ФАМ различий получено не было. Спонтанная продукция ER $\alpha$  также была выше при ФА по сравнению с ФАМ ( $p=0,049$ ) и при

ИКНТ по сравнению с ФАМ ( $p=0,029$ ). Следовательно, подтверждается гормонально-запускаемый механизм патогенеза ФА, что связано с их ранним возникновением во время менопаузы, ростом во время беременности и терапии эстрогенами, регрессией во время менопаузы (Klings G., Bean G.R., Chen Y.Y., 2017). В то же время, тот факт, что продукция  $ER\alpha$  также была выше при ИКНТ по сравнению с ФАМ говорит о том, что пусковым фактором возникновения как ФА так и ИКНТ является гормональный дисбаланс, а следовательно и дисбаланс в рецепторах стероидных гормонов.

Наоборот, спонтанная продукция HRG при ИКНТ была выше, чем при ФАМ ( $p=0,019$ ). Следовательно, различия, полученные между ИКНТ и ДЗМЖ, были обусловлены присутствием в группе ДЗМЖ пациентов с ФАМ.

Также как при ИКНТ была выше спонтанная продукция образцами ткани IL-12, чем при ФАМ ( $p=0,039$ ) (таблица 4), что повторяет картину, наблюдаемую в супернатанте клеток крови.

При сравнении индуцированной ПА продукции белков образцами ткани молочной железы, статистически значимые различия были получены по концентрациям PR,  $ER\alpha$ , HRG и CDH1. Индуцированная ПА продукция PR была выше при ФА по сравнению с ИКНТ ( $p=0,028$ ), но не отличалась от ФАМ, как это наблюдалось при спонтанной продукции, так как ПА оказал статистически значимое индуцированное влияние только на образцы ФАМ ( $p=0,02$ ) и не оказал статистически значимое воздействие на ФА и ИКНТ. Индуцированная ПА продукция  $ER\alpha$  также была выше при ФА по сравнению с ФАМ ( $p=0,007$ ), но уже не было различий между ИКНТ и ФАМ, как при спонтанной продукции. ПА оказал статистически значимое супрессирующее влияние на продукцию  $ER\alpha$  в образцах ИКНТ ( $p=0,004$ ), нежели в образцах ДЗМЖ, хотя во всех случаях концентрация  $ER\alpha$  при влиянии ПА уменьшилась.

Индуцированная ПА продукция HRG была выше при ФА по сравнению с ФАМ ( $p=0,020$ ). Несмотря на то, что под влиянием ПА концентрация этого белка также уменьшалась, статистически значимое супрессирующее влияние ПА оказал только на образцы ФАМ ( $p=0,03$ ) и ИКНТ ( $p=0,000002$ ) и статистически значимо не изменил продукцию HRG при ФА.

В то же время индуцированная ПА продукция CDH1, была выше при ФАМ по сравнению с ФА ( $p=0,025$ ), а также по сравнению с ИКНТ ( $p=0,012$ ), причём ПА индуцировал продукцию CDH1 при ФАМ – концентрация статистически значимо увеличилась ( $p=0,05$ ), при ФА и при ИКНТ концентрация статистически значимо не увеличивалась (таблица 4). Данная картина, повторяет результаты, полученные при сравнении концентрации этого белка в супернатантах клеток крови – самая высокая концентрация наблюдалась при ФАМ (таблица 4).

**Таблица 4.** Концентрации белков, для которых получены статистически значимые различия, в супернатанте образцов ткани при спонтанной и индуцированной ПА продукции при фиброаденомах (ФА), фиброаденоматозах (ФАМ) и при инвазивной карциноме неспецифического типа (ИКНТ)

Белок, единицы измерения	Спонтанная продукция образцом ткани			Индуцированная ПА продукция образцом ткани		
	Me (Q1;Q3)					
	1.ФА	2.ФАМ	3.ИКНТ	4.ФА	5.ФАМ	6.ИКНТ
PR нг/мл	21,9 (17,4; 39,3)	11,5 (8,1; 13,9)	15,4 (10,3; 52,4)	23,3 (21,8; 38,1)	18,6 (15,0; 25,7)	18,6 (12,5; 40,9)
	p <sub>1,2</sub> =0,013; p <sub>1,3</sub> =0,013			p <sub>4,6</sub> =0,028		
ERα нг/мл	2,3 (1,5; 3,7)	0,4 (0,3; 0,8)	1,5 (1,0; 4,1)	1,3 (0,9; 1,8)	0,3 (0,3; 0,4)	0,9 (0,3; 1,8)
	p <sub>1,2</sub> =0,049; p <sub>2,3</sub> =0,029			p <sub>4,5</sub> =0,007		
HRG нг/мл	2359 (1939; 2807)	1728 (1378; 2309)	2726 (2188; 3436)	1834 (1317; 2711)	808 (507; 1163)	1464 (1009; 2024)
	p <sub>2,3</sub> =0,019			p <sub>4,5</sub> =0,020		
CDH1 пг/мл	7738 (6494; 9582)	9114,5 (7776; 9681)	7150,0 (3978,0; 12178,5)	7134,0 (4916,0; 8892,0)	10963 (9483; 11396)	5431 (3434; 9969)
				p <sub>4,5</sub> =0,025; p <sub>5,6</sub> =0,012		
PAI1 пг/мл	393 (241; 1517)	1948,4 (316; 3178)	1333 (720; 3766)	335 (206; 3165)	2498 (1717; 3706)	989 (450; 1874)
	IL-12 пг/мл	14,2 (6,4; 24,6)	8,4 (6,8; 10,0)	25,6 (10,2; 41,0)	5,2 (2,8; 17,8)	7,2 (6,2; 7,6)
p <sub>2,3</sub> =0,039						

При сравнении продукции белков под воздействием HLDF статистически значимые различия были получены по продукции ERα, CDH1, PAI1, IL-12 и HSP90αA1. Продукция ERα была выше при ФА по сравнению с ФАМ (p=0,038). Такие же различия были получены при сравнении индуцированной ПА продукции, HLDF оказал статистически значимое ингибирующее влияние на продукцию ERα в образцах ИКНТ (p=0,0002), а в образцах ДЗМЖ статистически значимого воздействия не было, хотя во всех случаях концентрация ERα при воздействии HLDF уменьшалась (таблица 5). Продукция CDH1 была выше при ФАМ по сравнению с ИКНТ (p=0,012), но не отличалась при сравнении показателей ФАМ и ФА. При этом не обнаружено статистически значи-

мого изменения концентрации между спонтанной продукцией и продукцией при воздействии HLDF на образцы ткани как ИКНТ, так и ФАМ и ФА.

Продукция PAI1 образцами ткани молочной железы под воздействием HLDF была выше при ФАМ по сравнению с ФА ( $p=0,018$ ) и при ИКНТ по сравнению с ФА ( $p=0,018$ ), но не отличалась между ФАМ и ИКНТ (таблица 5). Причём HLDF статистически значимо уменьшал продукцию PAI1 образцами ткани молочной железы только при ИКНТ ( $p=0,05$ ). Известно, что раковые клетки продуцируют высокий уровень эндогенного PAI-1 (Fortenberry Y.M. et al., 2016), поэтому снижение PAI1 под влиянием HLDF может быть одной из положительных функций HLDF в отношении раковых клеток.

Продукция IL-12 под воздействием HLDF была выше при ИКНТ по сравнению с ФАМ ( $p=0,049$ ) (таблица 5), что отмечалось при спонтанной продукции образцами ткани и клетками крови (таблица 3 и 4). HLDF не оказал статистически значимого воздействия на продукцию IL-12 образцами ткани молочной железы при её заболеваниях.

Кроме того, при ФА была выше продукция HSP90 $\alpha$ 1 по сравнению с ФАМ ( $p=0,028$ ) (таблица 9), то есть HLDF более выражено снижал концентрацию HSP90 $\alpha$ 1 именно при ФАМ ( $p=0,01$ ), хотя и при ФА концентрация статистически значимо снижалась ( $p=0,04$ ). Дисфункция HSP90 с помощью природных и синтетических ингибиторов ослабляет пролиферацию, выживаемость и клеточную диссеминацию при многих типах рака (Tsutsumi S., Beebe K., Neckers L., 2019).

При сравнении ИВПА и ИВHLDF статистически значимые различия были получены только по ИВПА на продукцию HRG. Этот показатель был выше при ФА по сравнению с ФАМ ( $p=0,049$ ) и при ФА по сравнению с ИКНТ ( $p=0,048$ ) (таблица 5). Таким образом, ПА оказал на ФА наименьший ингибирующий эффект в отношении продукции HRG – не было получено статистически значимых различий в его продукции, в то время как при ФАМ и при ИКНТ концентрация достоверно снижалась ( $p=0,03$  и  $p=0,02$  соответственно).



**Таблица 5.** Концентрации белков, для которых получены статистически значимые различия, в супернатанте образцов ткани при воздействии на них HLDF и индекс влияния ПА на продукцию этих белков (ИВПА) при фиброаденомах (ФА), фиброаденоматозах (ФАМ) и при инвазивной карциноме неспецифического типа (ИКНТ)

Белок, единицы измерения	Продукция образцами ткани под воздействием HLDF			ИВПА, у.е.		
	Me (Q1;Q3)					
	1.ФА	2.ФАМ	3.ИКНТ	4.ФА	5.ФАМ	6.ИКНТ
ERα нг/мл	1,4 (0,7; 2,2)	0,3 (0,18; 0,29)	0,8 (0,3; 1,2)	0,5 (0,4; 1,0)	0,7 (0,3; 1,0)	0,5 (0,3; 1,0)
	p <sub>1,2</sub> =0,038					
HRG нг/мл	769,9 (627; 1889)	603,4 (76,6; 1017)	1150,1 (604,6; 1707,0)	0,8 (0,6; 0,9)	0,5 (0,3; 0,6)	0,5 (0,3; 0,6)
				p <sub>4,5</sub> =0,049; p <sub>4,6</sub> =0,048		
CDH1 пг/мл	9980 (3656; 11447)	10306,5 (8696; 12013)	5836 (3320; 9442)	0,9 (0,6; 1,0)	1,3 (1,1; 1,4)	0,9 (0,3; 1,6)
	p <sub>2,3</sub> =0,012					
PAI1 пг/мл	215 (99,6; 549,0)	1417 (545; 1837)	571 (415; 2672)	1,1 (0,9; 2,6)	1,2 (0,5; 3,0)	0,8 (0,4; 1,6)
	p <sub>1,2</sub> =0,018; p <sub>1,3</sub> =0,018					
IL-12 пг/мл	2,8 (2,6; 19,2)	6,2 (2,6; 10,6)	13,8 (9,0; 29,2)	0,4 (0,4; 0,9)	0,8 (0,7; 1,7)	0,6 (0,4; 1,0)
	p <sub>2,3</sub> =0,049					
HSP90αA1 нг/мл	41,1 (35,6; 42,7)	12,7 (8,0; 19,9)	31,6 (16,1; 52,4)	0,7 (0,5; 1,3)	0,9 (0,4; 1,1)	0,7 (0,3; 1,0)
	p <sub>1,2</sub> =0,028					

Таким образом, разделение группы пациентов с ДЗМЖ на группу с ФА и с ФАМ позволило выявить различия, которых не наблюдалось при сравнении ИКНТ и ДЗМЖ в целом.

#### **Продукция белков при наличии и отсутствии мРНК HRG**

Так как мРНК *HRG* была обнаружена как в образцах с ИКНТ, так и в образцах ДЗМЖ, было решено сравнить продукцию белков у пациентов, в образцах которых была обнаружена мРНК *HRG* с теми, в образцах которых мРНК *HRG* не было.

При сравнении продукции белков в образцах, в которых имеется мРНК *HRG* с образцами, в которых она отсутствует, были обнаружены стати-

стически значимые различия. В частности, концентрация PR была статистически значимо выше в сыворотке крови ( $p=0,044$ ), супернатанте образцов ткани при спонтанной продукции ( $p=0,015$ ) и при индуцированной ПА продукции ( $p=0,021$ ) в тех образцах, в которых имелась мПНК HRG (Таблицы 6,7). Кроме того, имелись статистически значимые различия в продукции CDH1 при воздействии HLDF ( $p=0,007$ ) и ИВHЛDF ( $p=0,003$ ) – оба показателя были выше в образцах с мПНК HRG (Таблица 8).

**Таблица 6.** Концентрации белков в сыворотке и в супернатанте клеток крови при наличии (HRG+) и отсутствии (HRG-) мПНК HRG

Белок, единицы измерения	Сыворотка крови		Супернатант клеток крови	
	Me (Q1;Q3)			
	1.HRG +	2.HRG -	3.HRG +	4.HRG -
PR нг/мл	30,8 (14; 63,2)	14,5 (10,1; 37,6)	58,0 (43,0; 88,0)	43,3 (28,5;68,5)
	$p_{1,2}=0,044$			
HRG нг/мл	214000 (143000; 263000)	160000 (104000; 230000)	2413 (2071;3033)	3640 (2667; 2835)
			$p_{3,4}=0,008$	

**Таблица 7.** Концентрации белков при спонтанной продукции, при индуцированной поликлональными активаторами (ПА) продукции и индекс влияния поликлональных активаторов на продукцию этих белков при наличии (HRG+) и отсутствии (HRG-) мПНК HRG

Белок, единицы измерения	Спонтанная продукция образцом ткани		Индуцированная ПА продукция образцом ткани		ИВПА, у.е.	
	Me (Q1;Q3)					
	1.HRG+	2.HRG-	3.HRG+	4.HRG-	5.HRG+	6.HRG-
PR нг/мл	20,5 (12,8; 52,4)	14,5 (7,8; 28,9)	21,8 (15,6; 49,4)	17,3 (8,5; 24,3)	1,1 (0,8; 2,3)	1,4 (0,9; 2,8)
	$p_{1,2}=0,015$		$p_{3,4}=0,021$			
HRG нг/мл	2359 (1618; 2823)	3193 (2579;346 1)	1102 (667;170 3)	1835 (1277; 2687)	0,5 (0,3;0,7)	0,6 (0,4;0,8)
	$p_{1,2}=0,031$		$p_{3,4}=0,021$			

Наиболее интересный результат, на наш взгляд, получился при сравнении продукции HRG – статистически значимо выше были концентрации этого белка в супернатанте клеток крови ( $p=0,008$ ), при спонтанной продукции образцами ткани ( $p=0,031$ ), при индуцированной ПА продукции образцами ткани ( $p=0,021$ ), при продукции под воздействием HLDF ( $p=0,003$ ), а также

статистически значимо выше был ИВHЛDF на его продукцию ( $p=0,006$ ) в тех образцах, в которых отсутствовала мРНК HRG (Таблицы 6,7,8).

**Таблица 8.** Концентрации белков при спонтанной продукции, при продукции под воздействием HLDF и индекс влияния HLDF на продукцию этих белков (ИВHЛDF) при наличии (HRG+) и отсутствии (HRG-) мРНК HRG

Белок, единицы измерения	Продукция образцом ткани под воздействием HLDF		ИВHЛDF, у.е.	
	Me (Q1;Q3)			
	1.HRG+	2.HRG-	3.HRG+	4.HRG-
PR нг/мл	28,1 (19,7;45,3)	20,1 (12,6; 44,3)	1,2 (0,7; 2,0)	1,3 (1,0; 2,3)
HRG нг/мл	627,3 (532; 1207)	1539 (776;2475)	0,3 (0,1;0,4)	0,5 (0,3;0,7)
	$p_{1,2}=0,003$		$p_{3,4}=0,006$	
CDH1 пг/мл	8796 (4837;10535)	4555 (1460;7851)	1,1 (0,5;1,6)	0,5 (0,3;0,9)
	$p_{1,2}=0,007$		$p_{3,4}=0,003$	

Тот факт, что концентрация HRG была выше в тех образцах, в которых отсутствовала мРНК этого белка можно объяснить тем, что, несмотря на транскрипцию мРНК HRG, по каким-то, пока непонятым, причинам не наблюдается экспрессия конечного продукта – гистидин-богатого гликопротеина. Это может быть связано с ключевыми биологическими механизмами, такими как альтернативный сплайсинг и посттрансляционная модификация белков. Вероятно, мРНК HRG играет роль ингибитора для транспортировки HRG макрофагами, поэтому при наличии мРНК HRG концентрация самого гликопротеина оказывается ниже, чем в том случае, когда мРНК обнаружено не было.

#### **Экспрессия Е-кадгерина, $\beta$ -1-интегрина и коллагена II типа в образцах ткани при заболеваниях молочной железы**

Сравнение маркёров ЭМП показало, что по экспрессии CDH1 статистически значимые различия между ДЗМЖ и ИКНТ отсутствуют. Это объясняется тем, что группа пациентов с ДЗМЖ была гетерогенна, при некоторых ДЗМЖ наблюдалась нормальная экспрессия CDH1, а при других экспрессия CDH1 была снижена. Эти можно объяснить отсутствие различий между экспрессией этого маркёра при ИКНТ и при ДЗМЖ

Сравнение маркёров ЭМП показало, что в целом статистически значимо были выше показатели экспрессии CD29 в образцах ткани при ИКНТ, чем при ДЗМЖ ( $p=0,04$ ). Тем не менее, группа ДЗМЖ включала как образцы, в которых экспрессия CD29 отсутствовала, так и образцы, где экспрессия CD29 была отмечена. В образцах ИКНТ экспрессия CD29 также была выражена.

По показателям экспрессии СII также не было обнаружено статистически значимых различий. Экспрессия данного маркёра была незна-

чительной во многих исследованных образцах. Тем не менее, образцы ИКНТ и некоторые образцы ДЗМЖ демонстрировали наличие данного маркера.

### **Взаимосвязь между продукцией белков и показателями экспрессии иммуногистохимических маркеров при заболеваниях молочной железы**

Чтобы оценить взаимосвязь продукции белков и экспрессии маркеров ЭМП проведён корреляционный анализ путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (R).

При изучении сопряженности между показателями экспрессии маркеров ЭМП в образцах ткани молочной железы и концентрацией белков в сыворотке крови обнаружены умеренные прямые корреляционные связи между концентрациями ER $\alpha$  и IL-12 и экспрессией маркера CDH1. То есть, их концентрации находятся в обратной зависимости с прогрессированием ЭМП.

Обнаружена умеренная прямая корреляционная связь между концентрацией PAI-1 в супернатанте клеток крови и показателями экспрессии СП в образцах ткани молочной железы (Таблица 9). Полученные данные могут объясняться перестройкой микроокружения - повышенная концентрация PAI-1 связана с активацией сигнальных путей, которые модифицируют микроокружение опухоли, предотвращают апоптоз и стимулируют ангиогенез посредством прямого ингибирования протеаз (Lal I., Dittus K. and Holmes C.E., 2013). 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 (Franchi M. et al., 2019).

Обнаружена умеренная обратная связи между концентрациями PR и CDH1 и экспрессией CDH1. Довольно интересен тот факт, что экспрессия в ткани и концентрация CDH1 в сыворотке находятся в обратной зависимости. Вероятно, это может быть связано с процессами гибели эпителиальных клеток, за счёт чего повышается концентрация CDH1 в сыворотке крови и снижается его экспрессия в ткани (Shamir E.R., Ewald A.J., 2016)

Анализ корреляционных связей между экспрессией маркеров ЭМП и концентрацией белков в супернатанте при воздействии на образцы ткани HLDF обнаружил умеренную обратную связь между концентрацией CDH1 и экспрессией СП (Таблица 9). Соответственно, увеличение продукции CDH1 под влиянием HLDF сильнее в тех случаях, когда экспрессия СП ниже, то есть, в образцах с наименее выраженным ЭМП, а, следовательно, и с менее выраженной клеточной атипией.

При оценке корреляционных связей между экспрессией маркеров ЭМП и ИВПА на продукцию белков образцами ткани молочной железы была обнаружена умеренная обратная корреляционная связь между показателями экспрессии СП и ИВПА на продукцию PR (Таблица 9). Следовательно, влияние ПА ниже в тех случаях, когда экспрессия СП наиболее выражена, то есть в образцах, с выраженным ЭМП и, вероятно, с выраженной атипией.

**Таблица 9.** Коэффициенты ранговой корреляции Спирмена (R) между показателями концентрации белков и показателями экспрессии маркёров ЭМП, для которых была обнаружена статистическая значимость (p-level)

Сравниваемые показатели*	R	p-level
ER $\alpha$ в СК и CDH1	0,500	0,013
IL-12 в СК и CDH1	0,679	0,0003
CDH1 в СПК и CDH1	-0,407	0,02
ИВПА на продукцию PR и СИ	-0,415	0,02

**Примечание\*:** СК – сыворотка крови, СПК - супернатант клеток крови, ИВПА – индекс влияния поликлональных активаторов.

## ВЫВОДЫ

1. мРНК HRG обнаружена в 57,6% образцов ткани молочной железы при инвазивной карциноме неспецифического типа, а при доброкачественных заболеваниях молочной железы в 82,4%. Экспрессия мРНК HRG не отличается при ИКНТ и ДЗМЖ, что свидетельствует о схожести патогенеза этих заболеваний и об участии в нём HRG. В образцах ткани, в которых обнаружена мРНК HRG, выше концентрация PR в сыворотке крови, но ниже концентрация HRG в супернатантах клеток крови, по сравнению с образцами, в которых мРНК HRG отсутствовала.
2. Установлено, что экспрессия CD29 выше при инвазивной карциноме неспецифического типа по сравнению с доброкачественными заболеваниями молочной железы, в то время как экспрессия CDH1 и СИ не отличается при этих заболеваниях, что свидетельствует о наличии эпителиально-мезенхимального перехода при этих патологиях.
3. Показано, что у пациентов с фиброаденомой молочной железы выше индекс влияния поликлональных активаторов на продукцию HRG образцами ткани по сравнению с пациентами с фиброаденоматозом и с инвазивной карциномой неспецифического типа, что свидетельствует об избирательном влиянии поликлональных активаторов на продукцию HRG.
4. Установлено, что у пациентов с фиброаденомой молочной железы по сравнению с пациентами с инвазивной карциномой неспецифического типа выше концентрации PR в сыворотке крови. Индекс влияния поликлональных активаторов на продукцию PR образцами ткани молочной железы находится в обратной корреляционной связи с экспрессией СИ в образцах ткани молочной железы. Это свидетельствует о том, что изменение продукции PR под влиянием поликлональных активаторов сопряжено с эпителиально-мезенхимальным переходом в тканях молочной железы.
5. Показано, что у пациентов с фиброаденоматозами ниже концентрация IL-12 и выше концентрации CDH1 в супернатанте клеток крови, чем у больных инвазивной карциномой неспецифического типа. Концентрация IL-12 и ER $\alpha$  в сыворотке крови находится в прямой корреляционной связи, а концентрация CDH1 в супернатанте клеток крови в обратной корреляционной связи с экс-

прессией CDH1 в образцах ткани молочной железы, что свидетельствует о эпителиально-мезенхимальном переходе при фибroadеноматозе.

6. Выявлено, что индекс влияния HLDF на продукцию CDH1 выше, а индекс влияния HLDF на продукцию HRG ниже, в тех образцах, в которых присутствовала мРНК HRG. Индекс влияния HLDF на продукцию ERα образцами инвазивной карциномы неспецифического типа ниже, чем при доброкачественных заболеваниях молочной железы, что свидетельствует об избирательном влиянии HLDF на атипичные клетки.

#### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Аутеншлюс А.И., Голованова А.В., Студеникина А.А., Брусенцов И.И., Проскура А.В., Жураковский И.П., Архипов С.А., Сидоров С.В., Вавилин В.А., Ляхович В.В. / Персонализированный подход к оценке экспрессии мРНК гистидинбогатого гликопротеина и иммуногистохимических маркёров при заболеваниях молочной железы // Доклады академии наук. 2019. Т. 484, № 5. С. 624-628

2. Аутеншлюс А.И., Бернадо А.В., Студеникина А.А., Проскура А.В., Давлетова К.И., Журнаковский И.П., Архипов С.А., Вараксин Н.А., Сидоров С.В., Ляхович В.В. / Персонализированный подход к определению гистидинбогатого гликопротеина и кадгерина-Е в супернатантах иммунокомпетентных клеток крови и биоптата молочной железы при её злокачественном и незлокачественном заболевании // Доклады академии наук. 2020. Т. 490. С. 7-10.

3. Аутеншлюс А.И., Бернадо А.В., Давлетова К.И., Архипов С.А., Жураковский И.П., Михайлова Е.С., Проскура А.В., Богачук А.П., Липкин В.М., Ляхович В.В. / Белковые и иммуногистохимические маркёры заболеваний молочной железы // Биомедицинская химия. 2020. Т. 66, № 2, С. 167-173.

Тезисы конференций:

4. Аутеншлюс А.И., Голованова А.В., Студеникина А.А., Брусенцов И.И., Проскура А.В., Сидоров С.В., Вавилин В.А. / Взаимосвязь экспрессии гистидинбогатого гликопротеина с молекулярными подтипами рака молочной железы // Успехи молекулярной онкологии. 2018. Т. 5 (Приложение). № 4. С. 122.

5. Бернадо А.В., Студеникина А.А. / Экспрессия матричной РНК гистидинбогатого гликопротеина в диагностике злокачественных и доброкачественных заболеваний молочной железы // Материалы X Российской (итоговой) научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Авиценна-2019», посвященной 90-летию заслуженного деятеля науки РФ, профессора М.И. Лосевой. 2019. Т. 2. С. 101-102.

6. Бернадо А.В., Студеникина А.А. / Протеины супернатантов иммунокомпетентных клеток крови и биоптатов при злокачественных и доброкачественных заболеваниях молочной железы // Успехи молекулярной онкологии. 2019. Т. 6 (Приложение). № 4. С. 107.

7. Бернадо А.В., Давлетова К.И., Студеникина А.А. / Влияние фактора дифференцировки HLDF на продукцию белков и цитокинов при заболеваниях молочной железы // Гены & Клетки. 2020. Т. XV, №5 (Приложение), С.78-79.

8. Davletova K.I., Bernado A.V., Arkhipov S.A., Zhurakovsky I.P., Varaksin N. A., Autenshlyus A.I. / Proteins and Cytokines of Blood Cells Supernatant and Histological Atypical Cells Markers in the Brast Diseases // Cognitive Sciences, Genomics and Bioinformatics (CSGB). 2020. P. 212-214.

9. Давлетова К.И., Бернадо А.В. / Протеины и цитокины супернатанта кле-ток крови в различных возрастных группах при заболеваниях молочной железы // Материалы Девятой Всероссийской научно-практической конференции «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов». 2020, С. 48-50.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

CDH1 (E-cadherin) – E-кадгерин

ER $\alpha$  (estrogen receptor  $\alpha$ ) – рецептор эстрогена  $\alpha$

HLDF (Human Leukemia Differentiation Factor) - фактор дифференцировки

HRG (histidine rich glycoprotein) – гистидиобогатый гликопротеин

HSP90 $\alpha$ A1 (heat shock protein 90 alpha family class A member 1) - белок теплового шока 90 Альфа семейство класс А член 1

IL-12 (interleukin 12) – Интерлейкин 12

MUC1 (mucin 1) - муцин 1

PAI-1 (plasminogen Activator Inhibitor-1) - ингибитор активатора плазминогена типа 1

PR (progesterone receptor) – рецептор прогестерона

ПА – комплекс поликлональных активаторов

ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

ДЗМЖ – доброкачественные заболевания молочной железы

РМЖ – рак молочной железы

ИКНТ – инвазивная карцинома неспецифического типа

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция с детекцией в реальном времени

ИГИ – иммуногистохимическое исследование

ИФА – иммуноферментный анализ

ФА – фиброаденома

ФАМ – фиброаденоматоз