

DOI: 10.21294/1814-4861-2023-22-3-66-75

УДК: 618.19-006.6-039.36-037

Для цитирования: Крахмаль Н.В., Завьялова М.В., Вторушин С.В., Таширева Л.А., Перельмутер В.М. Феномен краудинга при раке молочной железы как фактор прогноза. Сибирский онкологический журнал. 2023; 22(3): 66–75. – doi: 10.21294/1814-4861-2023-22-3-66-75

For citation: Krakhmal N.V., Zavyalova M.V., Vtorushin S.V., Tashireva L.A., Perelmuter V.M. Crowding phenomenon in breast cancer as a prognostic factor. Siberian Journal of Oncology. 2023; 22(3): 66–75. – doi: 10.21294/1814-4861-2023-22-3-66-75

ФЕНОМЕН КРАУДИНГА ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КАК ФАКТОР ПРОГНОЗА

Н.В. Крахмаль^{1,2}, М.В. Завьялова^{1,2}, С.В. Вторушин^{1,2},
Л.А. Таширева¹, В.М. Перельмутер¹

Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный
исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия¹
Россия, 634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5. E-mail: krakhmal@mail.ru¹
ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России,
г. Томск, Россия²
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2²

Аннотация

Цель исследования – оценить морфологические проявления феномена краудинга при инвазивной карциноме молочной железы и сопоставить полученные данные с параметрами прогрессирования опухолевого процесса. **Материал и методы.** В группу исследования включены 107 больных раком молочной железы (средний возраст – $57,2 \pm 11,2$ года) без неoadъювантной химиотерапии. Проводили морфологическое и иммуногистохимическое исследование образцов опухоли молочной железы, полученных в результате оперативного лечения. Гистологический тип рака молочной железы устанавливали согласно рекомендациям ВОЗ (The WHO Classification of Breast Tumours, 5th Edition, 2019). В исследование включали только случаи с инвазивной карциномой неспецифического типа. Оценку клинических параметров проводили на основании данных анализа медицинских карт пациентов. Статистический анализ проведен с помощью программы Statistica 10.0, различия считались значимыми при уровне статистической значимости $p < 0,05$. **Результаты.** Феномен краудинга в опухоли при раке молочной железы ассоциирован с лимфогенным метастазированием, при этом особое значение имеет внутриопухолевая гетерогенность (различные опухолевые структуры). Во всех случаях ($n=40$) с лимфогенными метастазами в солидных структурах морфологически зарегистрирован феномен краудинга, при этом в солидных структурах опухоли отмечено снижение уровня индекса пролиферативной активности Ki67. В участках опухоли с наличием краудинга в солидных структурах инфильтративного компонента при метастатическом поражении лимфатических узлов значимо реже регистрировалась позитивная экспрессия интегрин $\beta 1$. **Заключение.** На основании результатов исследования высказывается предположение, что в основе механизма, инициирующего процесс опухолевой инвазии, могут лежать краудинг и базальная клеточная экструзия, при этом обнаруженные закономерности являются проявлением изменений свойств клеток с приобретением более высокого потенциала в отношении подвижности и клеточной миграции.

Ключевые слова: феномен краудинга, клеточная экструзия, опухолевая инвазия, рак молочной железы.

CROWDING PHENOMENON IN BREAST CANCER AS A PROGNOSTIC FACTOR

N.V. Krakhmal^{1,2}, M.V. Zavyalova^{1,2}, S.V. Vtorushin^{1,2},
L.A. Tashireva¹, V.M. Perelmuter¹

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center,
Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia¹

5, Kooperativny St., 634009, Tomsk, Russia. E-mail: krakhmal@mail.ru¹

Siberian State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Tomsk, Russia²

2, Moskovsky tract, 634050, Tomsk, Russia²

Abstract

Purpose: to evaluate the crowding-induced morphological changes in invasive breast carcinoma and compare the data obtained with the parameters of the tumor progression. **Material and Methods.** The study group included 107 patients (mean age: 57.2 ± 11.2 years) who did not receive neoadjuvant chemotherapy. Breast cancer morphological and immunohistochemical images were studied. The histological type of breast cancer was determined according to WHO recommendations (The WHO Classification of Breast Tumors, 5th Edition, 2019). The study included only cases with invasive breast carcinoma of no specific type. Clinical parameters were assessed using the patients' medical history. Statistical analysis was carried out using the Statistica 10.0 program. A p-value of 0.05 or lower was considered statistically significant. **Results.** The phenomenon of crowding in breast cancer was shown to be associated with lymph node metastases, with intratumoral heterogeneity of particular importance. The phenomenon of crowding was morphologically confirmed in all cases ($n=40$) with lymph node metastases in solid tumors. In these solid tumor structures, a decrease in the expression level of the proliferative index Ki67 was observed. In tumor sites with the evidence of crowding phenomenon in solid structures with lymph node metastasis, positive expression of integrin $\beta 1$ was less frequently observed. **Conclusion.** The results obtained suggest that the mechanism that initiates the process of tumor cell invasion may be based on crowding and basal cell extrusion, while the patterns found are a manifestation of changes in cell properties with the acquisition of a higher potential for mobility and cell migration.

Key words: phenomenon of crowding, cell extrusion, cancer invasion, breast cancer.

Введение

Опухолевая инвазия представляет собой первый шаг, начальное звено в процессе прогрессирования злокачественного новообразования. Механизмы, которые лежат в основе данного процесса и его регулируют, несмотря на значительный прогресс в изучении карцином, остаются изученными не до конца [1]. Известно, что опухолевая инвазия осуществляется посредством двух основных типов инвазивного клеточного роста: коллективной (групповой) и индивидуальной (инвазия отдельными клетками). При коллективной инвазии происходит миграция целых групп опухолевых клеток, которые соединены друг с другом посредством коммуникационных контактов и молекул адгезии. В свою очередь, индивидуальная инвазия характеризуется миграцией отдельных опухолевых клеток, распространяющихся в окружающие ткани изолированно друг от друга [2–6]. При изучении данных литературы выяснилось, что ряд исследователей при детальном рассмотрении механизмов инвазивного роста описывают такой феномен, как краудинг, который лежит в основе самых первых проявлений как коллективной, так и индивидуальной опухолевой инвазии [1, 7].

Краудинг (от англ. Crowding – сгущивание, вытеснение), собственно, явление «сгущивания»

клеток, возникает в тот момент, когда количество эпителиальных клеток начинает превышать в определенном объеме ткани нормальные цифры в 1,6–1,8 раза [7]. Вслед за этим на клеточной мембране «лишней» клетки, которая в физиологических условиях является клеткой, завершившей свой жизненный цикл, экспрессируется Sphingosine-1-Phosphate (S1P), вследствие чего на соседних клетках активируется рецептор Sphingosine-1-Phosphate receptor 2 (S1P2). Эти процессы одновременно сопровождаются определенной переориентацией микротубул. В результате происходит апикальная экструзия – «выдавливание» погибающей, завершившей жизненный цикл клетки из пласта эпителия в противоположном от базальной мембраны направлении [8, 9]. Так в эпителиальных тканях происходят процессы физиологической регенерации, посредством которых в структуре пласта эпителия поддерживается постоянное количество клеток. Апикальная экструзия не нарушает барьерной функции эпителия благодаря полному сохранению целостности эпителиального пласта и базальной мембраны [8, 10–12].

Однако некоторые мутации могут приводить к изменениям, при которых злокачественно трансформированные эпителиальные клетки в условиях роста и усиленного деления начинают

осуществлять клеточную экструдию в базальном направлении, проникая через мембрану в подлежащие ткани, где под воздействием определенных хемотаксических сигналов становятся способными к миграции [8, 13].

К возникновению базальной экструдии может приводить нарушение адекватной перестройки микротубул [14]. Полагают, что базальной экструдии может способствовать секреция опухолевыми клетками металлопротеиназ или же клетки могут проникать в межклеточный матрикс без деградации базальной мембраны. Клетки, подвергшиеся базальной экструдии, сохраняют способность к делению, в них отмечена позитивная экспрессия Е-кадгерина. Комплексы таких клеток способны к коллективному движению [1, 11]. Одной из причин базальной экструдии может быть мутация в гене *K-Ras*, которая приводит к невозможности апикальной экструдии клеток вследствие нарушения активации рецепторов S1P and S1P2. В этих условиях происходит сокращение актина в области апикального края, что и приводит в итоге к базальной экструдии клеток [1]. Высказывается предположение, что в основе механизма, инициирующего процесс опухолевой инвазии, могут лежать краудинг и базальная клеточная экструдия [1, 13, 15].

Морфологически феномен апикальной или базальной экструдии в опухоли достоверно определить трудно. В отличие от клеточной экструдии краудинг может быть выявлен при исследовании препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином. Изменения на светооптическом уровне, характерные для данного феномена, морфологически проявляются формированием участков «скупенности» или «наслоения» ядер опухолевых клеток. На наш взгляд, не исключено, что обнаружение данных морфологических изменений в различных структурах опухоли может быть сопряжено с параметрами прогрессирования опухолевого процесса.

Рак молочной железы (РМЖ) представляет собой крайне гетерогенное злокачественное новообразование [16–19]. В инфильтративном компоненте опухоли отмечается большое разнообразие морфологических структур, являющихся, в определенном отношении, проявлением различных вариантов инвазивного роста. Понимание механизмов, лежащих в основе инициации опухолевой клеточной инвазии, может иметь существенное значение для разработки способов ее ингибирования [1, 20]. Таким образом, можно предположить, что краудинг и клеточная экструдия самым тесным образом могут быть связаны с морфогенезом различных структур инвазивного рака молочной железы, обладающих разными потенциями к прогрессированию. В связи с этим представляется интересным оценить феномен краудинга при инвазивной карциноме молочной железы и определить наличие возмож-

ной взаимосвязи с параметрами прогрессирования опухолевого процесса.

Цель исследования состоит в оценке морфологических проявлений краудинга при инвазивной карциноме молочной железы и сопоставлении полученных данных с параметрами прогрессирования опухоли.

Материал и методы

Группу исследования составили 107 больных раком молочной железы стадии T1–4N0–3M0 в возрасте 29–85 лет (средний возраст – $57,2 \pm 11,2$ года), проходивших лечение в отделении общей онкологии НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН». Неоадьювантная терапия не проводилась. Основные клинико-морфологические характеристики представлены в табл. 1.

В работе выполняли морфологическое исследование операционного материала. Макроскопически оценивали ткань первичной опухоли и все удаленные аксиллярные лимфатические узлы. Проводку материала и изготовление гистологических препаратов осуществляли по стандартной методике с окраской срезов гематоксилином и эозином. Морфологическое исследование выполняли с использованием светового микроскопа Carl Zeiss Axio Lab.A1 (Германия). Гистологический тип рака молочной железы устанавливали согласно рекомендациям ВОЗ (The WHO Classification of Breast Tumours, 5th Edition, 2019). В исследование включали только случаи с инвазивной карциномой неспецифического типа. В каждом случае оценивали степень злокачественности карциномы молочной железы, анализируя морфологически в баллах наличие тубулярных структур в опухоли, ядерный полиморфизм и количество митозов (Nottingham histological Grade). В каждом случае определяли молекулярно-генетический тип опухоли (luminal A-like; luminal B-like HER2-negative; luminal B-like HER2-positive; HER2-positive; triple-negative) на основе оценки экспрессии в опухоли рецепторов эстрогенов, прогестерона, белка ERBB2 (HER2) и Ki67 (13th St. Gallen International Breast Cancer Conference; 2013). В инфильтративном компоненте опухоли молочной железы определяли различные паттерны с определением альвеолярных, трабекулярных, тубулярных и солидных структур, а также дискретных групп опухолевых клеток. В каждом случае оценивали количество разных типов структур в инфильтративном компоненте, которое варьировало от 1 до 5 соответственно. Во всех присутствующих в опухоли многоклеточных типах структур (альвеолярные, трабекулярные, тубулярные и солидные структуры) определяли наличие либо отсутствие морфологических проявлений феномена краудинга (рис. 1). Далее при наличии краудинга в каждом из присутствующих типов структур карциномы молочной железы оценивали его вариант – вариант по типу «скупивания» или

Таблица 1/Table 1

Клинико-морфологическая характеристика больных инвазивной карциномой неспецифического типа молочной железы

Clinical and morphological characteristics of patients with invasive breast carcinoma of no special type

Параметры/Parameters		Частота встречаемости/ Frequency of occurrence
Объем операции/ Extent of surgery	Радикальная мастэктомия/Radical mastectomy	52 (49 %)
	Секторальная резекция/Sectoral resection	55 (51 %)
Возраст/Age	>35 лет/>35 years	2 (2 %)
	35–50 лет/35–50 years	25 (23 %)
	<50 лет/<50 years	80 (75 %)
Менструальная функция сохранена/Preserved menstrual function		31 (29 %)
Менопауза/Menopaus		76 (71 %)
Стадия заболевания/ Stage	I стадия/Stage I	49 (46 %)
	IIA стадия/Stage IIA	33 (31 %)
	IIB стадия/Stage IIB	14 (13 %)
	IIIA стадия/Stage IIIA	9 (8 %)
	IIIB стадия/Stage IIIB	1 (1 %)
	IIIC стадия/Stage IIIC	1 (1 %)
Размер первичной опухоли/ Size of primary tumor (T)	<2 см (T1)/<2 cm (T1)	63,5 % (n=68)
	2–5 см (T2)/2–5 cm (T2)	34,5 % (n=37)
	>5 см (T3)/>5 cm (T3)	1 (1 %)
	T4	1 (1 %)
Локализация первичной опухоли/ Localization of primary tumor	Наружные квадранты/Outer quadrants	53 (48 %)
	Внутренние квадранты/Inner quadrants	28 (25,5 %)
	Граница квадрантов/Quadrant boundary	27 (24,5 %)
	Центральные отделы/Central parts	2 (2 %)
Молекулярно- генетический тип/ Molecular genetic type	Luminal A-like	39 (36 %)
	Luminal B-like HER2-negative	36 (34 %)
	Luminal B-like HER2-positive	14 (13 %)
	Triple-negative	14 (13 %)
	HER2-positive	4 (4 %)
Лимфогенные метастазы/ Lymph node metastases	Присутствуют/Present	40 (37 %)
	Отсутствуют/Absent	67 (63 %)

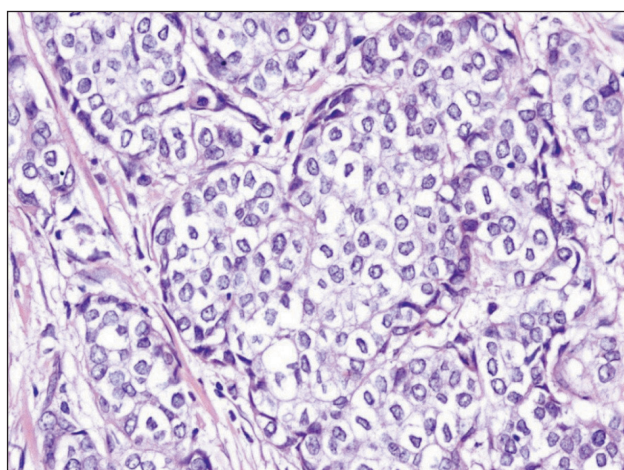


Рис. 1. Сплошной паттерн инфильтративного компонента инвазивной карциномы неспецифического типа молочной железы с отсутствием краудинга. Окраска гематоксилином и эозином, ×400

Fig. 1. Solid pattern of infiltrative component of invasive breast carcinoma of no special type without Crowding. Hematoxylin and eosin stain, ×400

вариант по типу «наслоения» клеток. Морфологически при краудинге по типу «скупивания» клеток (тип 1) мы понимали наличие в структурах опухоли участков с близким расположением клеток и их ядер друг к другу (ближе, чем средний диаметр ядра опухолевых клеток) (рис. 2). При варианте краудинга по типу «наслоения» клеток (тип 2) понимали наличие в структурах опухоли участков с отчетливо определяемым наслоением ядер этих клеток друг на друга (рис. 3).

Оценку индекса пролиферативной активности опухоли (Ki67) выполняли с использованием метода иммуногистохимии (стандартный протокол, антитело к Ki67; клон MIB-1, RTU). Экспрессию Ki67 в опухоли (общий процент экспрессии Ki67) оценивали по процентному содержанию клеток, ядра которых имели позитивную экспрессию маркера (в 10 полях зрения на 1000 клеток при ×400). Далее в каждом случае во всех имеющихся типах структур инфильтративного компонента карциномы оценивали процент экспрессии Ki67 в участках с отсутствием краудинга, а при наличии краудинга

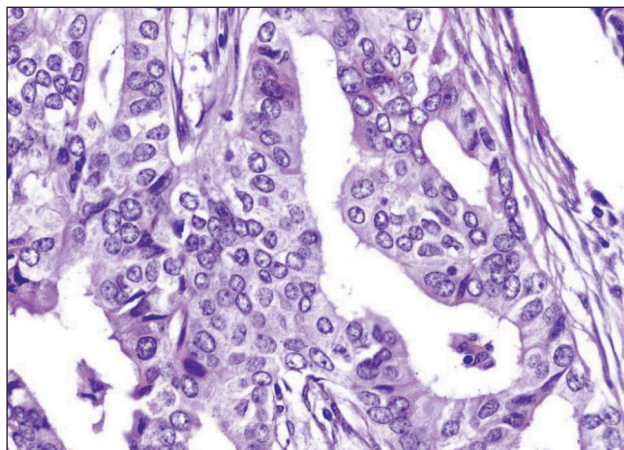


Рис. 2. Краудинг по типу «скупивания» (тип 1) в структурах инфильтративного компонента инвазивной карциномы неспецифического типа молочной железы. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$

Fig. 2. Crowding (type 1) in the structures of infiltrative component of invasive breast carcinoma of no special type. Hematoxylin and eosin stain, $\times 400$

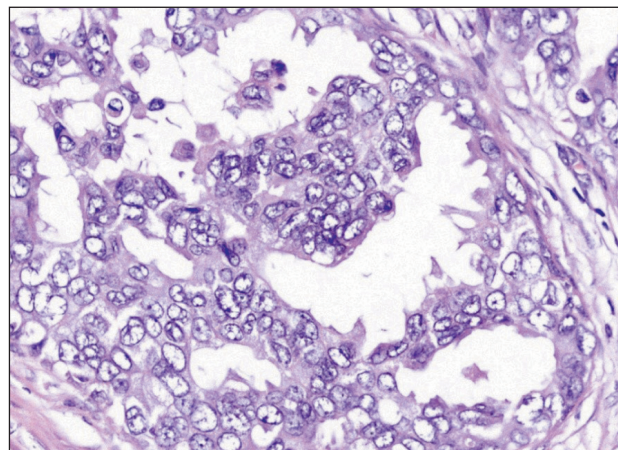


Рис. 3. Краудинг по типу «наслоения» (тип 2) в структурах инфильтративного компонента инвазивной карциномы неспецифического типа молочной железы. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$

Fig. 3. Crowding (type 2) in the structures of infiltrative component of invasive breast carcinoma of no special type. Hematoxylin and eosin stain, $\times 400$

оценивали данный параметр в участках краудинга (краудинг тип 1 и краудинг тип 2).

При морфологическом исследовании в стромах опухоли оценивали наличие и выраженность гиалиноза и воспалительной инфильтрации по 3-балльной системе (1 балл – слабая степень выраженности, 2 балла – умеренная степень выраженности, 3 балла – показатель резко выражен).

Иммуногистохимическое исследование проводили в соответствии со стандартным протоколом с использованием антител к интегину $\beta 3$ ab75872 (Clone EPR2417Y; rabbit monoclonal; 1:250; Abcam) и к интегину $\beta 1$ ab3167 (Clone 4B7R; mouse monoclonal; 1:20; Abcam). Оценивали наличие экспрессии (позитивная экспрессия) маркеров в разных структурах инфильтративного компонента инвазивной карциномы неспецифического типа молочной железы в участках с наличием морфологических проявлений краудинга.

Во всех удаленных и взятых при макроскопическом исследовании лимфатических узлах оценивали наличие очагов метастатического поражения. Оценку клинических параметров проводили на основании данных анализа медицинских карт пациентов. Исследование одобрено на заседании этического комитета ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России 24.02.14 (регистрационный номер 3593).

Статистический анализ проведен с помощью программы Statistica 10.0. Количественные признаки, распределение которых отличалось от нормального, представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха ($Q1-Q3$). Номинальные признаки описывали с указанием абсолютных значений и процентных долей. Для сравнения независимых совокупностей использовали непараме-

трический U-критерий Манна–Уитни. Сравнение номинальных данных проводилось при помощи критерия χ^2 Пирсона и точного теста Фишера. Различия считались статистически значимыми при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

Результаты

Краудинг в структурах инфильтративного компонента опухоли был обнаружен в 91 (85 %) случае. Оценка частоты феномена краудинга в зависимости от ряда клинко-морфологических параметров представлена в табл. 2. Оценка частоты лимфогенного метастазирования в зависимости от наличия и типа краудинга в опухоли (морфологическая гетерогенность опухоли не учитывалась) не выявила значимых различий (табл. 3).

Определенный интерес представляла оценка наличия краудинга в опухоли и его варианта с учетом различных паттернов инфильтративного компонента новообразования (морфологическая гетерогенность). Результаты работы позволили определить наличие взаимосвязи между лимфогенным метастазированием и наличием краудинга в определенных опухолевых структурах инфильтративного компонента инвазивной карциномы молочной железы. При наличии краудинга в солидных структурах значимо чаще регистрировались регионарные метастазы, важно отметить, что в этой группе изучаемый морфологический признак выявлен в 100 % случаев в отличие от больных без метастатического поражения лимфоузлов (100 vs 83 %; $\chi^2=5,1$; $p=0,02$) (табл. 4). Вариант краудинга в разнообразных паттернах инфильтративного компонента новообразования не имел значимых различий у пациентов с позитивным и негативным нодальным статусом.

Таблица 2/Table 2

**Частота встречаемости краудинга в инвазивной карциноме молочной железы
в зависимости от клинико-морфологических параметров**

Frequency of crowding occurrence in invasive breast carcinoma depending on clinical and morphological parameters

Параметры/Parameters	Краудинг/Crowding	
	Отсутствует/Absent (n=16)	Присутствует/Present (n=91)
Возраст/Age, Me (Q1÷Q2)	55,5 (52,0÷62,0)	58,0 (49,0÷65,0)
Менструальная функция сохранена/ Menstrual function preserved	6/16 (37,5 %)	25/91 (27,4 %)
Менопауза/Menopaus	10/16 (62,5 %)	66/91 (72,5 %)
Размер первичной опухоли/Size of primary tumor (T)		
T1	10/16 (62,5 %)	58/91 (64 %)
T2	6/16 (37,5 %)	31/91 (34 %)
T3	0/16	1/91 (1 %)
T4	0/16	1/91 (1 %)
Степень гистологической злокачественности/Degree of histological grade		
Grade 1	3/16 (19 %)	8/91 (9 %)
Grade 2	10/16 (63 %)	69/91 (76 %)
Grade 3	3/16 (18 %)	14/91 (15 %)
Паттерн инфильтративного компонента/Pattern of infiltrative component		
Альвеолярный/Alveolar	10/16 (63 %)	68/91 (75 %)
Тубулярный/Tubular	9/16 (56 %)	44/91 (48 %)
Трабекулярный/Trabecular	12/16 (75 %)	79/91 (87 %)
Солидный/Solid	7/16 (44 %)	62/91 (68 %)
Дискретные клетки/Discrete cells	12/16 (75 %)	68/91 (75 %)
Количество паттернов в опухоли/ Number of patterns in a tumor, Me (Q1÷Q2)	3,0 (2,0÷4,0)	4,0 (3,0÷4,0)
Выраженность гиалиноза в строме/Severity of hyalinosis in the stroma		
Слабо выражен/Mild	14/16 (88 %)	70/91 (77 %)
Умеренно выражен/Moderate	2/16 (12 %)	14/91 (15 %)
Резко выражен/Severe	0/16	7/91 (8 %)
Выраженность воспалительной инфильтрации в строме/Severity of inflammatory infiltration in the stroma		
Слабо выражена/Mild	11/16 (69 %)	39/91 (43 %)
Умеренно выражена/Moderate	3/16 (19 %)	28/91 (31 %)
Резко выражена/Severe	2/16 (12 %)	24/91 (26 %)
Молекулярно-генетический тип/Molecular genetic type		
Luminal A-like	6/16 (37,5 %)	34/91 (37 %)
Luminal B-like HER2-negative	6/16 (37,5 %)	29/91 (32 %)
Luminal B-like HER2-positive	3/16 (19,75 %)	11/91 (12 %)
Triple-negative	1/16 (6,25 %)	13/91 (14 %)
HER2-positive	0/16	4/91 (5 %)
Процент экспрессии Ki67/percentage of Ki67 expression, Me (Q1÷Q2)	22,4 (15,3÷34,0)	25,0 (13,0÷36,0)
Лимфогенные метастазы/Lymph node metastases		
Отсутствуют/Absent	10/16 (62,5 %)	57/91 (63 %)
Присутствуют/Present	6/16 (37,5 %)	34/91 (37 %)

При исследовании показателя пролиферативной активности опухоли было установлено, что общий процент экспрессии Ki67 не имел значимых различий в группах больных с наличием (n=40) и отсутствием (n=67) лимфогенных метастазов – 25,5 (15,5÷33,0) vs 24,0 (13,1÷39,8). Однако изучение данного показателя в разных структурах инфильтративного компонента опухоли с учетом особенностей краудинга позволило обнаружить, что в группе с наличием лимфогенных метастазов

процент Ki67 в солидных структурах в участках с наличием краудинга 1-го типа (вариант краудинга по типу «скупивания» клеток) имеет более низкие значения по сравнению со случаями, в которых отсутствовало метастатическое поражение лимфатических узлов – 20,5 (12,5÷30,0) vs 56,0 (38,0÷60,0) (p=0,002).

Полученные результаты позволяют рассценивать данную связь как прогностический признак, ассоциированный с лимфогенной диссеминацией.

Таблица 3/Table 3

Частота лимфогенного метастазирования в зависимости от наличия и варианта краудинга
The frequency of lymph node metastases depending on the presence and type of crowding

Параметры/Parameters	Лимфогенные метастазы/Lymph node metastases	
	Отсутствуют/Absent	Присутствуют/Present
Краудинг в опухоли/Crowding in the tumor		
Отсутствуют/Absent	10/67 (15 %)	6/40 (15 %)
Присутствуют/Present	57/67 (85 %)	34/40 (85 %)
Вариант краудинга в опухоли/Type of crowding in the tumor		
Вариант краудинга по типу «скупивания» клеток (тип 1)/ Type 1 of Crowding	29/57 (51 %)	16/34 (47 %)
Вариант краудинга по типу «наслоения» клеток (тип 2)/ Type 2 of Crowding	28/57 (49 %)	18/34 (53 %)

Таблица 4/Table 4

Частота лимфогенного метастазирования в зависимости от наличия краудинга в различных структурах инфильтративного компонента опухоли (морфологическая гетерогенность)
The frequency of lymph node metastases depending on the crowding presence in different structures of infiltrative component of tumor (morphological heterogeneity)

Параметры/Parameters	Лимфогенные метастазы/ Lymph node metastases	
	Отсутствуют/Absent	Присутствуют/Present
Краудинг в альвеолярных структурах/Crowding in alveolar structures		
Отсутствуют/Absent	7/41 (17 %)	8/27 (30 %)
Присутствуют/Present	34/41 (83 %)	19/27 (70 %)
Краудинг в тубулярных структурах/Crowding in tubular structures		
Отсутствуют/Absent	15/27 (55 %)	7/17 (41 %)
Присутствуют/Present	12/27 (45 %)	10/17 (59 %)
Краудинг в трабекулярных структурах/Crowding in trabecular structures		
Отсутствуют/Absent	1/49 (2 %)	3/30 (10 %)
Присутствуют/Present	48/49 (98 %)	27/30 (90 %)
Краудинг в солидных структурах/Crowding in solid structures		
Отсутствуют/Absent	6/35 (17 %)	0/27
Присутствуют/Present	29/35 (83 %)	27/27 (100 %)

Для уточнения фундаментальных аспектов обнаруженной взаимосвязи проведено иммуногистохимическое исследование с оценкой экспрессии поверхностных рецепторов в опухолевых клетках – интегринов, осуществляющих взаимодействие со структурами внеклеточного матрикса и определяющих такие особые для миграции свойства, как форма и подвижность [21, 22]. Установлено, что у пациенток с метастатическим поражением лимфатических узлов именно в солидных структурах в участках с наличием краудинга значимо реже регистрировалась позитивная экспрессия интегрин $\beta 1$, чем у больных без метастазов, – 50 vs 94 % ($\chi^2=5,4$; $p=0,01$). При изучении особенностей экспрессии интегрин $\beta 3$ подобной взаимосвязи с лимфогенной диссеминацией опухоли не выявлено.

Обсуждение

Наличие феномена краудинга в злокачественной опухоли свидетельствует об увеличении количества клеток в единице объема новооб-

разования. Представляется, что описанные два морфологических проявления краудинга могут быть последовательными фазами одного процесса. Краудинг по типу «скупивания» клеток (тип 1) демонстрирует первую фазу, а краудинг по типу «наслоения» (тип 2) – вторую. В пользу такой очередности свидетельствует тот факт, что «скупивание» клеток опухоли может быть изолированным, в то время как феномен «наслоения» клеток всегда сочетается с их «скупиванием». Таким образом, переход одной фазы краудинга в другую может свидетельствовать о сохранении значительного увеличения количества клеток в единице объема опухолевой ткани вследствие нарушения механизмов как апикальной, так и базальной экстррузии. В доступной литературе нам не встретилось подобного сравнения двух морфологических вариантов проявления краудинга.

Морфологические проявления краудинга «скупивание» и «наслоение» свидетельствуют о патологии процесса обновления эпителия. В

условиях физиологической нормы своевременно развивающаяся апикальная экструзия с апоптозом экструдированных клеток предотвращает не только наложение, но и скучивание [23]. Результаты исследования позволили показать, что подобного рода изменения в клетках опухоли оказались связанными с такой формой опухолевой прогрессии, как лимфогенное метастазирование, при этом особое значение имела внутриопухолевая гетерогенность новообразования. Во всех случаях с метастатическим поражением регионарных лимфоузлов регистрировался краудинг в солидных структурах, при этом необходимо отметить, что в участках краудинга по типу «скучивания» клеток зарегистрирован меньший процент экспрессии Ki67, что может говорить о возможном снижении пролиферативной активности опухоли в участках, характеризующихся избыточным количеством опухолевых клеток. Важным является и тот факт, что в

изучаемых участках опухоли с наличием краудинга в солидных структурах инфильтративного компонента в случаях с метастатическим поражением лимфатических узлов значимо реже регистрировалась позитивная экспрессия интегрина $\beta 1$.

Заключение

Выявленная закономерность теоретически может быть проявлением изменений свойств клетки с приобретением более высокого потенциала в отношении подвижности и клеточной миграции. Таким образом, краудинг по типу «скучивания» в солидных структурах инфильтративного компонента опухоли при инвазивной карциноме неспецифического типа молочной железы, по-видимому, определяя базальную экструзию, приводит к появлению инвазивных «клеток-семян», что может являться одним из первых звеньев в процессе лимфогенного метастазирования.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Slattum G.M., Rosenblatt J. Tumour cell invasion: an emerging role for basal epithelial cell extrusion. *Nat Rev Cancer*. 2014 Jul; 14(7): 495–501. doi: 10.1038/nrc3767. Epub 2014 Jun 19.
2. Panková K., Rösel D., Novotný M., Brábek J. The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cell Mol Life Sci*. 2010 Jan; 67(1): 63–71. doi: 10.1007/s00018-009-0132-1.
3. Friedl P., Locker J., Sahai E., Segall J.E. Classifying collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol*. 2012 Aug; 14(8): 777–83. doi: 10.1038/ncb2548.
4. Spano D., Heck C., De Antonellis P., Christofori G., Zollo M. Molecular networks that regulate cancer metastasis. *Semin Cancer Biol*. 2012 Jun; 22(3): 234–49. doi: 10.1016/j.semcancer.2012.03.006.
5. Cheung K.J., Gabrielson E., Werb Z., Ewald A.J. Collective invasion in breast cancer requires a conserved basal epithelial program. *Cell*. 2013 Dec 19; 155(7): 1639–51. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.029.
6. Haeger A., Wolf K., Zegers M.M., Friedl P. Collective cell migration: guidance principles and hierarchies. *Trends Cell Biol*. 2015 Sep; 25(9): 556–66. doi: 10.1016/j.tcb.2015.06.003.
7. Eisenhoffer G.T., Loftus P.D., Yoshigi M., Otsuna H., Chien C.B., Morcos P.A., Rosenblatt J. Crowding induces live cell extrusion to maintain homeostatic cell numbers in epithelia. *Nature*. 2012; 484(7395): 546–9. doi: 10.1038/nature10999.
8. Slattum G., Gu Y., Sabbadini R., Rosenblatt J. Autophagy in oncogenic K-Ras promotes basal extrusion of epithelial cells by degrading S1P. *Curr Biol*. 2014 Jan 6; 24(1): 19–28. doi: 10.1016/j.cub.2013.11.029.
9. Gudipaty S.A., Rosenblatt J. Epithelial cell extrusion: Pathways and pathologies. *Semin Cell Dev Biol*. 2017; 67: 132–140. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.05.010.
10. Tabasinezhad M., Samadi N., Ghanbari P., Mohseni M., Saei A.A., Sharifi S., Saeedi N., Pourhassan A. Sphingosin 1-phosphate contributes in tumor progression. *J Cancer Res Ther*. 2013; 9(4): 556–63. doi: 10.4103/0973-1482.126446.
11. Kuipers D., Mehonic A., Kajita M., Peter L., Fujita Y., Duke T., Charras G., Gale J.E. Epithelial repair is a two-stage process driven first by dying cells and then by their neighbours. *J Cell Sci*. 2014 Mar 15; 127(Pt 6): 1229–41. doi: 10.1242/jcs.138289.
12. Ngo P.A., Neurath M.F., López-Posadas R. Impact of Epithelial Cell Shedding on Intestinal Homeostasis. *Int J Mol Sci*. 2022 Apr 9; 23(8): 4160. doi: 10.3390/ijms23084160.
13. Gu Y., Forostyan T., Sabbadini R., Rosenblatt J. Epithelial cell extrusion requires the sphingosine-1-phosphate receptor 2 pathway. *J Cell Biol*. 2011 May 16; 193(4): 667–76. doi: 10.1083/jcb.201010075.
14. Slattum G., McGee K.M., Rosenblatt J. P115 RhoGEF and microtubules decide the direction apoptotic cells extrude from an epithelium. *J Cell Biol*. 2009 Sep 7; 186(5): 693–702. doi: 10.1083/jcb.200903079.
15. Kelley L.C., Lohmer L.L., Hagedorn E.J., Sherwood D.R. Traversing the basement membrane in vivo: a diversity of strategies. *J Cell Biol*. 2014; 204(3): 291–302. doi: 10.1083/jcb.201311112.
16. Tamimi R.M., Colditz G.A., Hazra A., Baer H.J., Hankinson S.E., Rosner B., Marotti J., Connolly J.L., Schnitt S.J., Collins L.C. Traditional breast cancer risk factors in relation to molecular subtypes of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Jan; 131(1): 159–67. doi: 10.1007/s10549-011-1702-0.
17. Prat A., Ellis M.J., Perou C.M. Practical implications of gene-expression-based assays for breast oncologists. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011 Dec 6; 9(1): 48–57. doi: 10.1038/nrclinonc.2011.178.
18. Denisov E.V., Litviakov N.V., Zavyalova M.V., Perelmuter V.M., Vtorushin S.V., Tsyganov M.M., Gerashchenko T.S., Garbukov E.Y., Slonimskaya E.M., Cherdynseva N.V. Intratumoral morphological heterogeneity of breast cancer: neoadjuvant chemotherapy efficiency and multidrug resistance gene expression. *Sci Rep*. 2014 Apr 16; 4: 4709. doi: 10.1038/srep04709.
19. Lüönd F., Tiede S., Christofori G. Breast cancer as an example of tumour heterogeneity and tumour cell plasticity during malignant progression. *Br J Cancer*. 2021 Jul; 125(2): 164–175. doi: 10.1038/s41416-021-01328-7.
20. Goldhirsch A., Winer E.P., Coates A.S., Gelber R.D., Piccart-Gebhart M., Thürlimann B., Senn H.J.; Panel members. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*. 2013 Sep; 24(9): 2206–23. doi: 10.1093/annonc/mdt303.
21. Romagnoli M., Bresson L., Di-Cicco A., Pérez-Lanzón M., Legoix P., Baulande S., de la Grange P., De Arcangelis A., Georges-Labouesse E., Sonnenberg A., Deugnier M.A., Glukhova M.A., Faraldo M.M. 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.
22. Smeland H.Y., Askeland C., Wik E., Knutsvik G., Molven A., Edelman R.J., Reed R.K., Warren D.J., Gullberg D., Stühr L., Akslen L.A. Integrin $\alpha 1 \beta 1$ is expressed in breast cancer stroma and associates with aggressive tumor phenotypes. *J Pathol Clin Res*. 2020 Jan; 6(1): 69–82. doi: 10.1002/cjp2.148.
23. Andrade D., Rosenblatt J. Apoptotic regulation of epithelial cellular extrusion. *Apoptosis*. 2011 May; 16(5): 491–501. doi: 10.1007/s10495-011-0587-z.

Поступила/Received 07.06.2022

Одобрена после рецензирования/Revised 25.07.2022

Принята к публикации/Accepted 15.08.2022

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Крахмаль Надежда Валерьевна, кандидат медицинских наук, доцент, старший научный сотрудник отделения общей и молекулярной патологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук; доцент кафедры патологической анатомии, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (г. Томск, Россия). E-mail: krakhmal@mail.ru. SPIN-код: 1543-6546. Researcher ID (WOS): S-3799-2016. Author ID (Scopus): 56678622400. ORCID: 0000-0002-1909-1681.

Завьялова Марина Викторовна, доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник отделения общей и молекулярной патологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук; заведующая кафедрой патологической анатомии, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (г. Томск, Россия). SPIN-код: 1229-0323. ORCID: 0000-0001-9429-9813.

Вторушин Сергей Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделением общей и молекулярной патологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук; профессор кафедры патологической анатомии, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (г. Томск, Россия). SPIN-код: 2442-4720. Researcher ID (WOS): S-3789-2016. Author ID (Scopus): 26654562300. ORCID: 0000-0002-1195-4008.

Таширева Любовь Александровна, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник отделения общей и молекулярной патологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 4371-5340. ORCID: 0000-0003-2061-8417.

Перельмутер Владимир Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник отделения общей и молекулярной патологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 6252-5319. ORCID: 0000-0002-7633-9620.

ВКЛАД АВТОРОВ

Крахмаль Надежда Валерьевна: сбор и обработка данных, морфологическое исследование материала, иммуногистохимическое исследование, написание статьи.

Завьялова Марина Викторовна: морфологическое исследование материала, статистическая обработка, анализ полученных результатов.

Вторушин Сергей Владимирович: анализ научной работы, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Таширева Любовь Александровна: анализ научной работы, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Перельмутер Владимир Михайлович: разработка концепции научной работы, анализ научной работы, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Финансирование

Это исследование не потребовало дополнительного финансирования.

Конфликт интересов

Авторы объявляют, что у них нет конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Nadezhda V. Krakhmal, MD, PhD, Associate Professor, Senior Researcher, Department of General and Molecular Pathology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences; Associate Professor, Pathology Department, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Tomsk, Russia). E-mail: krakhmal@mail.ru. Researcher ID (WOS): S-3799-2016. Author ID (Scopus): 56678622400. ORCID: 0000-0002-1909-1681.

Marina V. Zavyalova, MD, DSc, Professor, Leading Researcher, Department of General and Molecular Pathology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences; Head of Pathology Department, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Tomsk, Russia). ORCID: 0000-0001-9429-9813.

Sergey V. Vtorushin, MD, DSc, Professor, Head of Department, Department of General and Molecular Pathology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences; Professor of Pathology Department, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): S-3789-2016. Author ID (Scopus): 26654562300. ORCID: 0000-0002-1195-4008.

Lubov A. Tashireva, MD, DSc, Senior Researcher, Department of General and Molecular Pathology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). ORCID: 0000-0003-2061-8417.

Vladimir M. Perelmutter, MD, DSc, Professor, Chief Researcher, Department of General and Molecular Pathology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). ORCID: 0000-0002-7633-9620.

AUTHOR CONTRIBUTION

Nadezhda V. Krakhmal: data collection and analysis, morphological study, immunohistochemistry study, drafting the manuscript.

Marina V. Zavyalova: morphological study, statistical analysis, study analysis.

Sergey V. Vtorushin: study analysis, critical revision for the important intellectual content.

Lubov A. Tashireva: study analysis, critical revision for the important intellectual content.

Vladimir M. Perelmutter: study design and conception, study analysis, critical revision for the important intellectual content.

Funding

This study required no funding.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.