

УДК 577.29

ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ БИОПТАТОМ ОПУХОЛИ НА РАЗНЫХ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОГНОСТИЧЕСКИХ СТАДИЯХ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© 2021 г. А. И. Аутеншлюс^{1,2,*}, А. А. Студеникина^{1,2},
Н. А. Вараксин³, академик РАН В. В. Ляхович²

Поступило 27.11.2020 г.
После доработки 01.12.2020 г.
Принято к публикации 02.12.2020 г.

Выявлены различия в продукции цитокинов биоптатами опухоли в зависимости от патологических прогностических стадий The American Joint Committee on Cancer (AJCC) инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа (ИКНТ). Пациенты с отсутствием метастазов в сочетании с тройным негативным молекулярным подтипом отличаются по цитокинпродуцирующему ресурсу опухоли IL-18, IL-1 β , IL-1Ra, TNF- α , GM-CSF и MCP-1 от пациентов других патологических прогностических стадий.

Ключевые слова: цитокины, рак молочной железы

DOI: 10.31857/S2686738921020037

Цитокины, являющиеся плеiotропными молекулами, оказывают влияние на активность опухолевых клеток в зависимости от уровня экспрессии биомаркеров [1]. Большинство исследований, посвященных изучению продукции цитокинов, связанных с риском развития рака молочной железы либо его метастазированием, проводятся на клеточных линиях рака молочной железы [2] или на образцах крови пациентов [3], однако нет исчерпывающей информации и исследований на образцах молочной железы и ее микроокружения у пациентов с инвазивной карциномой неспецифического типа (ИКНТ). Сочетание гормонально-рецепторного статуса и анатомических стадий TNM, предложенное в 8 издании комитета The American Joint Committee on Cancer (AJCC) [4], которое по сравнению с 7 изданием позволяет более точно прогнозировать клинические исходы и ответ на лечение у пациентов ИКНТ. Например, селективные модуляторы ER замедляют прогрессирование ER-позитивных и PR-позитивных опухолей [5], а использование в лечении HER2-таргетных препаратов улучшает прогноз у паци-

ентов с его гиперэкспрессией [6]. В нашем исследовании мы изучали продукцию цитокинов в образцах опухолей пациентов, не получавших химио- или лучевую терапию, с последующим сопоставлением цитокинового профиля со стадиями AJCC, полученными после операционного вмешательства, что дает возможность оценить цитокиновый профиль каждой стадии и спрогнозировать степень тяжести заболевания.

Цель исследования – оценить цитокинпродуцирующий ресурс биоптатов больных раком молочной железы на разных патологических прогностических стадиях 8-го издания AJCC 2017 г.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали образцы опухолей молочной железы 111 пациентов с ИКНТ в возрасте от 23 до 75, средний возраст 56 лет, которым была проведена мастэктомия молочной железы на базе онкологического отделения ГКБ № 1 г. Новосибирска. Неoadъювантная терапия пациентам не проводилась, у них не было обострения очагов хронической инфекции. Сведения о TNM и иммуногистохимических маркерах предоставлены патологоанатомами. Пациенты были распределены на основе патологической прогностической классификации 8-го издания AJCC и представлены в табл. 1. Все пациенты имели размер опухоли T1-T2 и G2 – умеренную дифференцировку опухоли. Из-за малого количества пациентов, а также наличия лимфогенного метастазирования и боль-

¹ ФГБОУ ВО “Новосибирский государственный медицинский университет”, г. Новосибирск, Россия

² “Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики” – структурное подразделение ФГБНУ ФИЦ ФТМ, г. Новосибирск, Россия

³ АО “Вектор-Бест”, г. Новосибирск, Россия

*e-mail: lrciip@211.ru

Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов

8-ed AJCC	T		N				ER		PR		HER2	
	T1	T2	N0	N1	N2	N3	+	-	+	-	+	-
IA <i>n</i> = 61	62%	38%	84%	16%	—	—	97%	3%	92%	8%	31%	69%
IB <i>n</i> = 22	18%	82%	27%	55%	18%	—	95%	5%	73%	27%	50%	50%
IIA <i>n</i> = 17	18%	82%	94%	6%	—	—	6%	94%	—	100%	23%	77%
III <i>n</i> = 11	9%	91%	—	45%	18%	37%	27%	73%	36%	64%	45%	55%

Примечание: диаметр опухоли (Т), лимфогенное метастазирование (N), экспрессия рецепторов: эстрогена (ER), прогестерона (PR), эпидермального фактора роста человека второго типа (HER2).

шего размера опухоли, пациенты IB стадии (5 пациентов), IIIA стадии (5 пациентов) и IIIC стадии (1 пациент) были объединены в одну группу – III, в которую вошли 11 пациентов.

У пациентов IA стадии средний возраст составил 57 лет (от 35 до 75), у IB – 55 лет (от 23 до 75), у IIA – 57 лет (от 38 до 75), у III – 52 года (от 39 до 69).

Парные образцы опухолей объемом 8 мм³ получали методом трепанобиопсии из одного участка опухоли, чем обеспечивался их одинаковый клеточный состав, что исключает необходимость определения опухолевых клеток в каждом из образцов. После чего образцы помещали в 2 флакона: в первый – образец для определения спонтанной продукции (СП) цитокинов, инкубировали в питательной среде DMEM-F12 в объеме 1 мл, а во второй – образец для определения индуцированной продукции (ИП) цитокинов, инкубировали в таком же объеме среды с добавлением в нее поликлональных активаторов (ПА): фитогемагглютина 4 мкг/мл, конканавалина А 4 мкг/мл и липополисахарида 2 мкг/мл) (набор Стимул Бест, “Вектор-Бест”, Россия). Образцы инкубировали 72 ч при 37°C, затем центрифугировали при 900 g 15 мин, в полученном супернатанте оценивали концентрацию IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A, IL-18, IL-1β, IL-1Ra, TNF-α, IFN-γ, G-CSF, GM-CSF, VEGF, MCP-1 с помощью иммуноферментных наборов реагентов производства АО “Вектор-Бест”, Новосибирск. Влияние ПА на продукцию цитокинов биоптатами опухоли оценивали по индексу влияния поликлональных активаторов (ИВПА), выраженного в условных единицах (у.е.) по формуле А/Б, где А – концентрация цитокина при ИП, а Б – концентрация цитокина при СП. Такой подход позволяет получать объективные данные, так как в каждом случае существует свой индивидуальный контроль – спонтанная продукция цитокинов с точно таким же количеством опухолевых клеток, которые находятся в образце ткани молочной железы при культивировании его с поликлональным активатором. Достоверность различий результатов определяли с помощью критерия U Манна–Уит-

ни, используя программный пакет SPSSv17.0 for Windows. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$. Результаты исследования представлены как медиана и интерквартильный размах (Me; Q₁-Q₃).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Данные о спонтанной и индуцированной ПА продукции цитокинов образцами ткани молочной железы пациентов с ИКНТ, достоверно отличающиеся в зависимости от стадий согласно классификации 8 издания AJCC, представлены в табл. 2.

СП IL-18 у пациентов IIA группы была выше по сравнению с IA и IB группами, кроме того, у пациентов III группы СП этого цитокина выше по сравнению с IA, что отражает роль IL-18 как про-онкогенного цитокина при более злокачественной стадии. СП MCP-1 у пациентов III группы была ниже по сравнению с IA и IIA группами.

У пациентов III группы продукция IL-1β и IL-1Ra при воздействии ПА была низкой по сравнению с группой IA, а стимулированная ПА продукция TNF-α и GM-CSF была ниже у пациентов с ИКНТ IIA по сравнению с пациентами IA группы.

Пациенты с ИКНТ IIA группы отличались низким цитокинпродуцирующим ресурсом по шести цитокинам от пациентов с ИКНТ других групп, что связано как с высокой СП цитокинов, так и со слабым влиянием ПА во IIA группе. Для пациентов с ИКНТ IIA группы характерен низкий ИВПА на продукцию: IL-18 и IL-1Ra по сравнению с IA группой и IL-18, IL-1Ra и TNF-α по сравнению с IA и IB группами (рис. 1), эти цитокины опосредуют активацию внутриклеточных сигнальных путей NF-κB и MAPK, стимулирующих пролиферацию опухоли и ангиогенез [7–9], а также GM-CSF по сравнению с пациентами с ИКНТ других патологических прогностических стадий (рис. 2). Этот цитокин (макрофагальный фактор роста) направляет пролиферацию макрофагов в про-опухолевой фенотип M2 [10]. ИВПА

Таблица 2. Спонтанная и индуцированная ПА концентрация цитокинов (пг/мл) в супернатанте опухоли молочной железы пациентов с инвазивной карциномой неспецифического типа (ИКНТ), распределенных согласно стадиям AJCC

Цитокины	IA <i>n</i> = 61	IB <i>n</i> = 22	IIA <i>n</i> = 17	III <i>n</i> = 11
СП				
IL-18	42.0 (19.6–102.0)	64.6 (27.0–160.5) pIB-IIA = 0.016	217.3 (57.4–1135.3) pIA-IIA = 0.006	155.2 (43.8–324.0) pIA-III = 0.021
MCP-1	1773.0 (294.3–6160.9) pIA-III = 0.022	1404.0 (383.6–2984.3)	1695.6 (752.4–2664.9) pIIA-III = 0.010	375.4 (167.4–1157.0)
ИП				
IL-1β	273.1 (51.4–582.5)	253.5 (58.9–562.5)	76.0 (27.2–484.0)	55.1 (20.0–221.1) pIA-III = 0.033
IL-1Ra	6850.9 (2702.2–15325.6)	8853.7 (2799.5–19131.5)	2261.0 (1331.9–16025.0)	2977.1 (1307.2–5407.0) pIA-III = 0.030
TNF-α	16.9 (2.6–53.8) pIA-IIA = 0.020	8.6 (2.1–23.0)	3.1 (1.3–11.8)	3.9 (1.7–33.6)
GM-CSF	86.3 (14.5–194.1) pIA-IIA = 0.019	38.2 (10.0–138.0)	18.7 (4.6–42.9)	35.3 (8.8–346.0)

Примечание: в табл. 2 представлены только те цитокины, по которым имелись статистически значимые различия между стадиями AJCC.

на продукцию MCP-1 пациентов IIA группы был ниже по сравнению с пациентами IA и III групп, MCP-1 в ткани опухоли способствует ангиогенезу и привлекает макрофаги в опухолевый очаг [11]. ИВПА на продукцию IL-1β IIA группы был ниже по сравнению с IA и IB группами.

Отличительной чертой пациентов с ИКНТ III группы был более низкий ИВПА на продукцию

IL-1β по сравнению с пациентами IA и IB групп, что обусловлено высокой СП этого цитокина в III группе, который в свою очередь повышает экспрессию MCP-1, что согласно данным литературы, способствует ангиогенезу, миграции и инвазии опухолевых клеток [12].

Высокая гетерогенность продукции цитокинов внутри одной прогностической стадии может

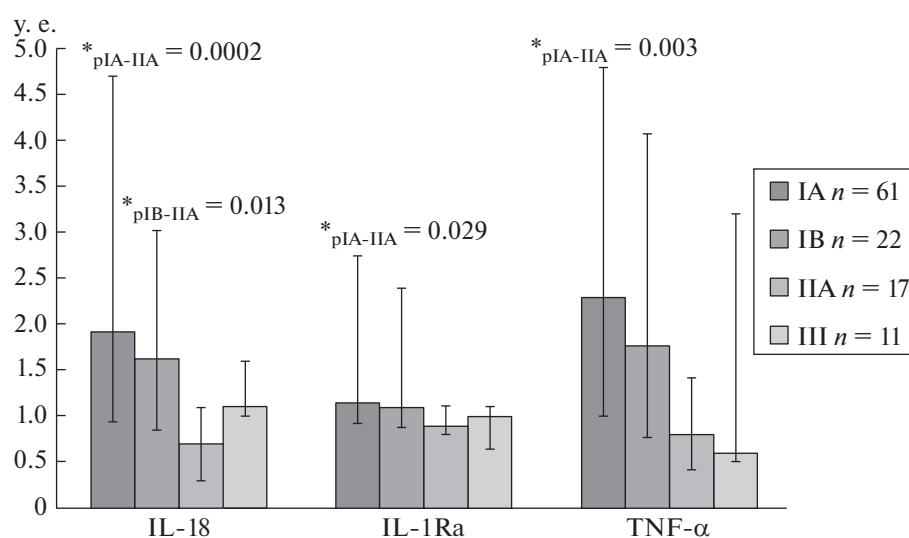


Рис. 1. Индекс влияния поликлональных активаторов на продукцию IL-18, IL-1Ra и TNF-α (у.е.) в супернатантах образцов ткани молочной железы пациентов с инвазивной карциномой неспецифического типа (ИКНТ), распределенных согласно стадиям AJCC.

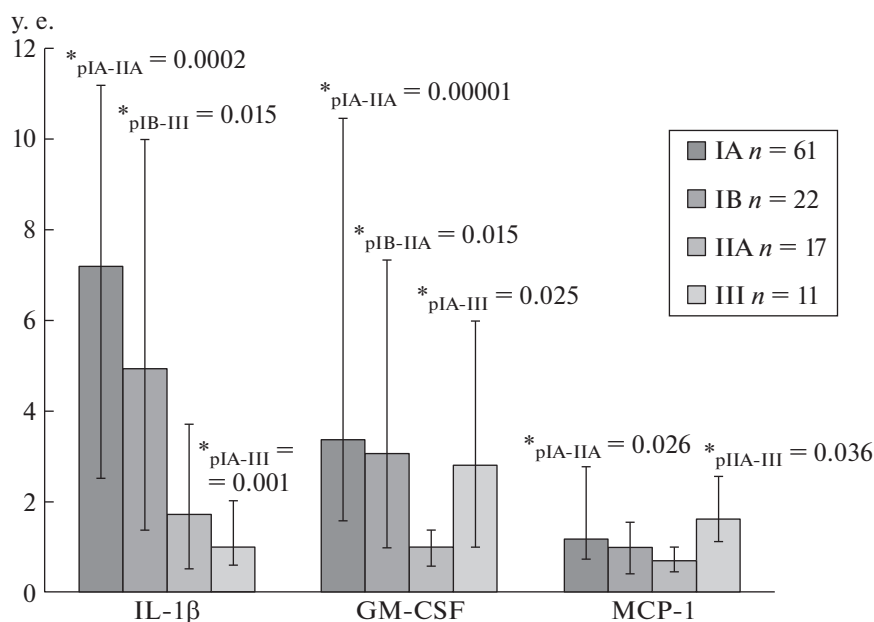


Рис. 2. Индекс влияния поликлональных активаторов на продукцию IL-1 β , GM-CSF и MCP-1 (у.е.) в супернатантах образцов ткани молочной железы пациентов с инвазивной карциномой неспецифического типа (ИКНТ), распределенных согласно стадиям AJCC.

быть обусловлена несколькими факторами: различной экспрессией рецепторов гормонов и HER2 в рамках одной стадии, возрастными особенностями, а также состоянием иммунной системы у каждого отдельного пациента.

Таким образом, различия в цитокинпродуцирующем ресурсе биоптатов опухоли связаны с патологическими прогностическими стадиями, отражают изменения, происходящие в опухоли и ее микроокружении, и позволяют судить о тяжести опухолевой прогрессии.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования были проведены в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации. Все лица, участвующие в исследовании, дали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено комитетом по этике Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики подразделения Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gatti-Mays M.E., Balko J.M., Gameiro S.R.* If we build it they will come: targeting the immune response to breast cancer // *N.P.J. Breast Cancer*. 2019. V. 5. P. 37.
2. *Ortiz-Montero P., Londoño-Vallejo A., Vernot J.P.* Senescence-associated IL-6 and IL-8 cytokines induce a self- and cross-reinforced senescence/inflammatory milieu strengthening tumorigenic capabilities in the MCF-7 breast cancer cell line // *Cell Commun. Signal*. 2017. V. 15. № 1. P. 17.
3. *Ma Y., Ren Y., Dai Z. J.* IL-6, IL-8 and TNF- α levels correlate with disease stage in breast cancer patients // *Adv. Clin. Exp. Med*. 2017. V. 26. № 3. P.421–426.
4. *Gabriel N.H., James L.C., Carl J.D.* // *American Joint Committee on Cancer staging manual 8th ed.* – N.Y.: Springer. 2017. P. 589–628.
5. *Kast K.* Impact of breast cancer subtypes and patterns of metastasis on outcome // *Breast Cancer Res. Treat*. 2015. V. 150. № 3. P. 621–629.
6. *Moasser M.M., Krop I.E.* The Evolving Landscape of HER2 Targeting in Breast Cancer // *JAMA Oncol*. 2015. V. 1. № 8. P. 1154–1161.
7. *Yu P.F., Huang Y., Han Y.Y.* TNF alpha-activated mesenchymal stromal cells promote breast cancer metastasis by recruiting CXCR2 (+) neutrophils // *Oncogene*. 2017. V. 36. P. 482–490.

8. Yasuda K., Nakanishi K., Tsutsui H. Interleukin-18 in Health and Disease // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 3. P. 649.
9. Baker K.J., Houston A., Brint E. IL-1 Family Members in Cancer; Two Sides to Every Story // *Front Immunol.* 2019. V. 10. P. 1197.
10. Su S., Liu Q., Chen J. A positive feedback loop between mesenchymal-like cancer cells and macrophages is essential to breast cancer metastasis // *Cancer Cell.* 2014. V. 25. № 5. P. 605–620.
11. Kersten K., Coffelt S. B., Hoogstraat M. Mammary tumor-derived CCL2 enhances pro-metastatic systemic inflammation through upregulation of IL1 β in tumor-associated macrophages // *Oncoimmunology.* 2017. V. 6. № 8. P. e1334744.
12. Liubomirski Y., Lerrer S., Meshel T. Tumor-Stroma-Inflammation Networks Promote Pro-Metastatic Chemokines and Aggressiveness Characteristics in Triple-Negative Breast Cancer // *Front Immunol.* 2019. V. 10. P. 757.

CYTOKINE PRODUCTION BY TUMOR BIOPTATE AT DIFFERENT PATHOLOGICAL PROGNOSTIC STAGES IN BREAST CANCER

**A. I. Autenshlyus^{a,b,#}, A. A. Studenikina^{a,b}, N. A. Varaksin^c,
and Academician of the RAS V. V. Lyakhovich^b**

^a *Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation*

^b *Institute of Molecular Biology and Biophysics – subdivision of Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation*

^c *JSC Vector-Best, Novosibirsk, Russian Federation*

[#] *e-mail: lpciip@211.ru*

Differences in the production of cytokines by tumor biopsy specimens were revealed depending on the pathological prognostic stages of The American Joint Committee on Cancer (AJCC) of invasive nonspecific breast carcinoma (INBC). Patients with a predominantly absence of metastases in combination with a triple negative molecular subtype differ in the cytokine-producing resource of a tumor of IL-18, IL-1 β , IL-1Ra, TNF- α , GM-CSF and MCP-1 from patients with other pathological prognostic stages.

Keywords: cytokines, breast cancer