

СОПРЯЖЕННОСТЬ КЛЕТОЧНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ОПУХОЛИ С ЦИТОКИНПРОДУЦИРУЮЩИМ РЕЗЕРВОМ ПРИ ЛЮМИНАЛЬНЫХ И НЕЛЮМИНАЛЬНЫХ ПОДТИПАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Мангазеева Е.Д.¹, Студеникина А.А.^{1,2}, Рыжикова С.Л.³,
Аутеншлюс А.И.^{1,2}

¹ ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск, Россия

² Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

³ АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия

Резюме. Существует прямая взаимосвязь между выраженностью функционального, морфологического и биохимического атипизма клеток опухоли и степенью ее злокачественности. Выделяют пять молекулярно-генетических подтипов рака молочной железы. При этом известно, что наиболее агрессивным течением характеризуются нелюминальные подтипы, в особенности — тройной негативный рак молочной железы. Целью работы явилось определение сопряженности между относительным содержанием клеток различной степени дифференцировки с продукцией цитокинов биоптатами рака молочной железы при люминальных и нелюминальных подтипах рака молочной железы. Материалом исследования служили биоптаты 49 женщин с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа, средний возраст которых составил 59 лет. Пациенты были разделены на три группы в зависимости от принадлежности к тому или иному молекулярно-генетическому подтипу опухоли. В I группу включены пациенты с люминальным подтипом А, во вторую — с люминальным В и в III — с нелюминальными подтипами рака молочной железы. Изучали спонтанную и стимулированную поликлональными активаторами продукцию цитокинов. Значение цитокинпродуцирующего резерва биоптатов выражали с помощью индекса влияния поликлональных активаторов ввиду его точности, позволяющей избежать ошибки за счет одинаковых размеров биоптата каждого пациента и условий их инкубирования. Относительное содержание опухолевых клеток различной степени дифференцировки в образцах оценивали с помощью светооптической микроскопии с учетом Ноттингемской градирующей системы. При оценке спонтанной и стимулированной продукции цитокинов, а также степени дифференцировки клеток образцов опухоли выявлены прямые и обратные корреляционные связи между исследуемыми группами. Наиболее важным показателем оказался индекс влияния поликлонального активатора на продукцию биоптатами IL-10 и VEGF-A. Благодаря этому мы

Адрес для переписки:

Мангазеева Екатерина Дмитриевна
ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный
медицинский университет»
630091, Россия, г. Новосибирск, Красный пр., 52.
Тел./факс: 8 (383) 226-35-60.
E-mail: lpciip@211.ru

Address for correspondence:

Ekaterina D. Mangazeeva
Novosibirsk State Medical University
52 Krasnyy Ave
Novosibirsk
630091 Russian Federation
Phone/fax: +7 (383) 226-35-60.
E-mail: lpciip@211.ru

Образец цитирования:

Е.Д. Мангазеева, А.А. Студеникина, С.Л. Рыжикова,
А.И. Аутеншлюс «Сопряженность клеточной
дифференцировки опухоли с цитокинпродуцирующим
резервом при люминальных и нелюминальных подтипах
рака молочной железы» // Медицинская иммунология,
2025. Т. 27, № 1. С. 97–106.
doi: 10.15789/1563-0625-AOT-2989

© Мангазеева Е.Д. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.D. Mangazeeva, A.A. Studenikina, S.L. Ryzhikova,
A.I. Autenshlyus “Association of tumor cell differentiation
with cytokine-producing reserve in luminal and non-luminal
subtypes of breast cancer”, Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 1,
pp. 97–106.
doi: 10.15789/1563-0625-AOT-2989

© Mangazeeva E.D. et al., 2025

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-AOT-2989

можем представить персонифицированные сведения по каждому пациенту по этим двум цитокинам еще до начала лечения. Анализ ROC-кривых показал хорошее качество и оптимальные значения точек отсечения концентраций цитокинов и относительного содержания низкодифференцированных клеток, которые могли бы наилучшим образом предсказать наличие неблагоприятных нелиминальных подтипов рака молочной железы. Основываясь на полученных нами данных, можно сделать вывод о том, что цитокинпродуцирующий резерв сопряжен с клеточной дифференцировкой и зависит от молекулярно-генетического подтипа опухоли.

Ключевые слова: рак молочной железы, биоптаты, цитокины, молекулярно-генетические подтипы, клеточная дифференцировка, поликлональный активатор

ASSOCIATION OF TUMOR CELL DIFFERENTIATION WITH CYTOKINE-PRODUCING RESERVE IN LUMINAL AND NON-LUMINAL SUBTYPES OF BREAST CANCER

Mangazeeva E.D.^a, Studenikina A.A.^{a,b}, Ryzhikova S.L.^c, Autenshlyus A.I.^{a,b}

^a Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

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

^c Vector-Best JSC, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. There is a direct association between the functional, morphologic and biochemical atypic features of cellular tumor expression and malignancy. Five molecular-genetic subtypes of breast cancer are recognized. The most aggressive course is known to be characterized by non-luminal subtypes, in particular, a triple-negative breast cancer. The aim of this research is to determine the association between the percentage of the cells showing distinct differentiation types, and cytokine production by breast cancer biotates in both luminal and non-luminal breast cancer subtypes. Biopates of 49 women with the invasive breast carcinoma of non-specific type, at the average age of 59 years, were used as the material for the study. The patients were divided into three groups according to the molecular-genetic subtype of cancer. Group I included patients with luminal subtype A, group II – with luminal B and group III – with non-luminal subtypes of breast cancer. Spontaneous and *in vitro* stimulated by polyclonal activators production of cytokines was evaluated. The level of cytokine-producing reserve by the biopsy specimens was expressed as the influence index of polyclonal activators, due to its accuracy, thus making it possible to avoid errors due to the similar sizes of biopates from each patient and their incubation conditions. The percentage of tumor cells of varying degrees of differentiation in the samples was assessed using light microscopy by means of the Nottingham grading system. When assessing spontaneous and stimulated production of cytokines, as well as degree of cell differentiation of tumor samples, direct and reverse correlations were revealed between the study groups. The most important parameter was the influence index of the polyclonal activator which characterized production of IL-10 and VEGF-A by the biopates. Therefore, we can provide personalized information for each patient, in particular, for these two cytokines, even before starting the treatment. The analysis of ROC-curves showed good quality and optimal level of cytokine concentration and percentage of low-differentiated cells. This approach could predict the presence of unfavorable non-luminal breast cancer subtypes in the best way. In general, we can make a conclusion that cytokine-producing reserve is connected with cellular differentiation and depends on molecular-genetic subtype of the tumor.

Keywords: breast cancer, tumor biopsies, cytokines, molecular subtypes, cell differentiation, polyclonal activator

Введение

Согласно современным научным данным сформировалось представление о неоднозначной роли цитокинов в прогрессии и метастазировании опухолей. Известно, что цитокины, являясь важнейшими факторами связанного с раком воспаления, формируют сети, активирующие клеточные сигнальные пути, способствующие вы-

живанию, пролиферации, инвазии и миграции опухолевых клеток [2, 11, 21]. Так, например, показано, что IL-6, IL-8, IL-18, IL-1 и его рецепторный антагонист IL-1ra продуцируются опухолевыми клетками и клетками микроокружения и посредством активации ангиогенеза, способствуют скорейшему метастазированию [2, 9, 10]. Представители семейства широкоизученных

регуляторов ангиогенеза VEGF-A способны повышать сосудистую проницаемость и обеспечивать образование новых кровеносных сосудов в опухоли, соответственно концентрация VEGF-A должна быть сопряжена с прогрессированием опухолевого процесса [5, 19]. Согласно последним литературным данным, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор G-CSF способствует эпителиально-мезенхимальному переходу, представляющим собой начальный этап метастазирования [14, 16].

Известно, что опухоли обладают морфологическим атипизмом — тканевым и клеточным. При этом тканевый атипизм, характеризующийся нарушением гистотипической дифференцировки, встречается и при доброкачественных заболеваниях, тогда как клеточный отражает нарушение цитотипической дифференцировки и может быть выражен в разной степени вплоть до крайней степени катаплазии, когда строение опухоли упрощается и она становится однородной по клеточному составу [3, 23]. Именно такие низко- и недифференцированные опухоли характеризуются наибольшей степенью злокачественности [3, 7, 23].

В настоящее время выделяют 5 основных молекулярно-генетических подтипов рака молочной железы (РМЖ), которые предоставляют прогностическую информацию и определяют терапевтический подход: люминальный А (LumA); люминальный В HER2-отрицательный (LumB⁻); люминальный В HER2-положительный (LumB⁺); HER2-положительный, не люминальный (HER2⁺) и тройной негативный РМЖ (TNBC) [4, 17].

При этом известно, что люминальные подтипы, в особенности люминальный А, обладают наилучшим прогнозом, тогда как нелюминальные, в частности тройной негативный — наихудшим среди других молекулярных подтипов [4, 17, 20].

В нашей лаборатории были определены взаимосвязи цитокинпродуцирующего резерва опухоли с такими иммуногистохимическими параметрами, как экспрессия эстрогена, прогестерона и маркера пролиферации Ki-67. Также анализировались гистопатологические параметры [1, 2]. Полученные данные свидетельствуют о сложных механизмах, опосредованных цитокинами, обеспечивающими инвазивный рост злокачественной опухоли. Тем не менее в литературе нет данных о сопряженности относительного содержания клеток различной степени дифференцировки с цитокинпродуцирующим резервом биоптатов, в том числе и при различных молекулярно-генетических подтипах РМЖ.

Цель исследования — определить сопряженность между относительным содержанием клеток различной степени дифференцировки с продукцией цитокинов биоптатами инвазивной карци-

номы молочной железы неспецифического типа (ИКНТ) при люминальных и нелюминальных подтипах РМЖ.

Материалы и методы

Материалом исследования служили биоптаты 49 женщин в возрасте 39-77 лет с ИКНТ II и III степени злокачественности и супернатанты, полученные при их культивировании *in vitro*, проходивших лечение в Новосибирском областном онкологическом диспансере. Все исследования были проведены в соответствии с Хельсинкской декларацией после получения письменного информированного добровольного согласия каждого пациента на получение биопсии опухоли и дальнейшее проведение исследования. (Бразилия, Форталеза, 2013) [22]. Этический комитет Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики дал разрешение на проведение этого исследования, протокол № 2016-3 от 15.03.2016 г.

Критерием включения в исследования являлся впервые выявленный РМЖ. Критериями исключения — наличие отдаленных метастазов, обострение хронических заболеваний, проведение неoadъювантной терапии.

Пациенты были разделены на 3 группы в соответствии с принадлежностью к тому или иному молекулярно-генетическому подтипу опухоли. Ввиду небольшого количества испытуемых и сходных терапевтических и прогностических подходов было решено объединить люминальные В «+» и В «-», а также HER2⁺ и тройной негативный РМЖ.

В итоге в первую группу были включены 12 больных с люминальным подтипом А. Вторую группу составили 30 пациентов с люминальным подтипом В. Третья группа — 7 пациентов с нелюминальными подтипами (HER2⁺ и тройной негативный).

Для оценки цитокинпродуцирующего резерва опухоли и ее микроокружения применяли комплекс поликлональных активаторов (ПА), состоящий из фитогемагглютинаина в концентрации 4 мкг/мл, конканавалина А в концентрации 4 мкг/мл и липополисахарида в концентрации 2 мкг/мл. В исследовании использовали стандартизованный набор реагентов «ЦИТОКИН-СТИМУЛ-БЕСТ» производства АО «Вектор-Бест». Биоптаты опухолей, полученные методом трепанобиопсии, объемом 8 мм³, помещали в 2 стеклянных флакона, в одном из которых находилась только питательная среда DMEM-F12 (спонтанная продукция), а в другом — раствор ПА в таком же объеме среды (продукция, индуцированная ПА). Далее биоптаты ИКНТ извлекали из среды и фиксировали в нейтральном растворе формалина для проведения дальнейшего патогистологического исследования. С целью

получения очищенного от клеток супернатанта оставшиеся клетки опухоли осаждали центрифугированием при 2000 об/мин в течение 15 мин. После осаждения клеток опухоли с помощью иммуноферментного анализа определяли концентрацию цитокинов (IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1 β , IL-1ra, TNF α , IFN γ , G-CSF, GM-CSF, VEGF-A, MCP-1) с использованием наборов реагентов производства АО «Вектор-Бест». Индекс влияния поликлонального активатора (ИВПА) на продукцию цитокинов опухолью и клетками ее микроокружения высчитывали по формуле: ИВПА = А/Б, где А – концентрация цитокина в супернатанте биоптата после стимуляции опухоли поликлональными активаторами, Б – спонтанная продукция цитокина в супернатанте биоптата без стимуляции [2, 8].

Для проведения патогистологического исследования зафиксированные в формалине биоптаты ИКНТ обезвоживали и заключали в парафин с последующим приготовлением гистологических срезов толщиной 4–5 мкм. Процессы депарафинизации и регидратации образцов ИКНТ проводили по стандартной методике с использованием проводки ксилол-этанол. Полученные срезы окрашивались гематоксилином и эозином по стандартной методике. Исследование проводили с помощью световой микроскопии с использованием объектива $\times 40$.

Степень дифференцировки опухолевых клеток в образцах ИКНТ оценивали по определенным цитоморфологическим критериям: степени выраженности клеточного, в частности ядерного полиморфизма, и ядерной атипии (ядерно-цитоплазматического отношения) с учетом Ноттингемской градирующей системы [18]. Для высокодифференцированных клеток (ВД) был характерен фенотип, приближенный к нормальным клеткам ткани молочной железы: ядра незначительно крупнее по сравнению с нормальными структурами, с ровными контурами, небольшой вариацией в размерах, отмечалось преобладание цитоплазмы над ядром. Низкодифференцированные клетки (НД), напротив, отличались выраженными различиями в форме и размерах ядер (полиморфизмом), часто с заметными ядрышками, высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, наличием большого количества митозов, включая патологические. Умеренно дифференцированные (УД) характеризовались как тип клеток, занимающих промежуточное положение между ВД и НД по наличию и степени выраженности перечисленных признаков [12]. Оценка клеток проводилась в 10 полях зрения с последующим подсчетом относительно содержания клеток с той или иной степенью дифференцировки.

Уровень статистической значимости различий между группами определялся с помощью непар-

аметрического критерия Вилкоксона–Манна–Уитни. Показатели выражали в виде медианы (Me), нижнего и верхнего квартилей ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Вычисления медиан и нижнего и верхнего квартилей, корреляционный анализ по Спирмену с учетом его достоверности (p), а также ROC-анализ для определения точки отсчета концентрации цитокинов и для оценки качества моделей проводили с помощью пакета программ IBM SPSS Statistics v. 22.0.

Результаты

Исследование показало, что спонтанная продукция IL-1ra в группе III более чем в три раза превышает аналогичный показатель в группах I и II. При воздействии ПА такая закономерность сохраняется, однако различия в группах менее существенны, хоть и достоверны. При оценке ИВПА на продукцию этого цитокина в исследуемых группах достоверных различий не получено. Группы I и III характеризовались более высокой спонтанной продукцией IL-10 и G-CSF, при оценке влияния ПА на продукцию G-CSF в группах также отмечаются достоверные различия. Показатели ИВПА на продукцию G-CSF и GM-CSF снижены в группе III по сравнению с группой II, что указывает на истощение резерва синтеза данных цитокинов у пациентов с нелюминальными подтипами РМЖ. Напротив, ИВПА на продукцию VEGF-A повышен у пациентов третьей группы по сравнению с группой II. При сравнении между люминальными подтипами РМЖ (группа I и II) выявлена исходно высокая спонтанная продукция MCP-1 при люминальном А-подтипе, достоверно большая стимулированная ПА продукция IL-10 и G-CSF. При оценке ИВПА на продукцию цитокинов было выявлено различие между исследуемыми группами по IL-2, IL-17, IFN γ (табл. 1).

При оценке относительного содержания клеток различной степени дифференцировки выявлен достоверно больший процент НД в группе III (Me = 30; $Q_{0,25}$ = 12; $Q_{0,75}$ = 35) по сравнению с группами I (Me = 10; $Q_{0,25}$ = 2; $Q_{0,75}$ = 23,25; p = 0,04) и II (Me = 15; $Q_{0,25}$ = 4,75; $Q_{0,75}$ = 25; p = 0,04), что подтверждает более злокачественное течение заболевания у пациентов с нелюминальными подтипами РМЖ.

При анализе сопряженности между относительным содержанием клеток различной степени дифференцировки и продукцией цитокинов в исследуемых группах, были выявлены определенные корреляционные связи. В частности установлено, что в группе I имеется отрицательная корреляционная связь между процентом НД и спонтанной продукцией VEGF-A и IL-6, а также положительная корреляционная связь между относительным содержанием ВД и стимулированной ПА продукцией IFN γ . При оценке ИВПА на

ТАБЛИЦА 1. СПОНТАННАЯ И СТИМУЛИРОВАННАЯ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫМИ АКТИВАТОРАМИ (ПА) ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ, А ТАКЖЕ ИВПА НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ БИОПТАТАМИ ИНВАЗИВНОЙ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ТИПА (ИКНТ) В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ

TABLE 1. SPONTANEOUS AND STIMULATED BY POLYCLONAL ACTIVATORS (PA) PRODUCTION OF CYTOKINES, AS WELL AS IPAЕ ON THE PRODUCTION OF CYTOKINES IN BIOPTATES OF INVASIVE BREAST CARCINOMA OF A NONSPECIFIC TYPE (ICNT) IN THE STUDY GROUPS

Цитокины Cytokine	Группы пациентов с ИКНТ Group of patients with ICNT			p		
	Группа I Group I	Группа II Group II	Группа III Group III	Группы I и II Groups I and II	Группы I и III Groups I and III	Группы II и III Groups II and III
	Спонтанная продукция цитокинов (пг/мл), Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) Spontaneous production of cytokines (pg/mL), Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)					
IL-10	19,95 (7,85-40,13)	8,00 (3,25-13,48)	16,3 (12,40-43,30)	0,004	n*	0,009
IL-1ra	7957,5 (5455,0-9950,0)	6525 (1637,68-16710,00)	21375 (15855,0-36055,0)	n*	0,001	0,018
G-CSF	3096,75 (954,38-3695,38)	1503,5 (599,85-2654,75)	2850,5 (2767,5-2974,5)	0,008	n*	0,002
MCP-1	10088,5 (2592,25-13570,18)	1971,05 (1123,70-5785,58)	6524 (3840,3-9241,6)	0,002	n*	n*
	Стимулированная ПА продукция цитокинов (пг/мл), Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) PA-stimulated cytokine production (pg/mL), Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)					
IL-10	76,8 (10,88-223,63)	9,65 (2,38-23,53)	33,0 (10,10-86,60)	0,003	n*	n*
IL-1ra	17015,0 (11651,13-27025,00)	15087,8 (10058,75-30545,00)	35120 (21010,0-50985,0)	n*	0,028	0,01
G-CSF	2986,5 (2025,38-3720,50)	2487,5 (1275,9-2850,5)	2939,0 (1897,0-3077,0)	0,021	n*	0,048
	ИВПА на продукцию цитокинов, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) IPAЕ on cytokine production, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)					
IL-2	3,6 (1,96-9,16)	1,23 (1,00-2,67)	6,0 (0,71-13,80)	0,02	n*	n*
IL-17	3,19 (1,24-11,81)	1,05 (0,71-1,75)	1,5 (0,84-3,90)	0,013	n*	n*
IFN γ	0,47 (0,21-2,79)	1,34 (0,84-2,90)	1,47 (0,60-9,45)	0,025	n*	n*
G-CSF	1,09 (0,95-3,36)	1,57 (0,98-2,13)	0,98 (0,70-1,04)	n*	n*	0,038
GM-CSF	3,18 (2,24-7,73)	5,0 (1,88-10,30)	1,2 (1,05-3,75)	n*	n*	0,030
VEGF	0,66 (0,34-1,10)	0,5 (0,30-0,88)	1,2 (0,5-1,7)	n*	n*	0,018

Примечание. n* – недостоверные различия ($p \geq 0,05$); группа I – люминальный А, группа II – люминальный В, группа III – нелюминальные молекулярные подтипы.

Note. n*, unreliable differences ($p \geq 0.05$); group I, luminal A; group II, luminal B; group III, non-luminal subtypes.

продукцию G-CSF обнаружена обратная зависимость с процентом ВД. Выявлены пять вариантов корреляционных связей между спонтанной продукцией IL-2, IL-18, IL-1 β , IL-1ra, G-CSF и содержанием НД и УД, пять вариантов между

стимулированной ПА продукцией IL-2, IL-18, GM-CSF и процентом УД и НД в группе II. При оценке ИВПА в этой группе пациентов обнаружены прямые корреляционные связи между относительным содержанием УД и IL-8, IL-1ra,

ТАБЛИЦА 2. КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ СВЯЗИ МЕЖДУ СПОНТАННОЙ, СТИМУЛИРОВАННОЙ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫМИ АКТИВАТОРАМИ (ПА) ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ, ИВПА НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ БИОПТАТАМИ ИНВАЗИВНОЙ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ТИПА (ИКНТ) И ОТНОСИТЕЛЬНОГО СОДЕРЖАНИЯ КЛЕТОК РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ

TABLE 2. CORRELATIONS BETWEEN SPONTANEOUS, STIMULATED BY POLYCLONAL ACTIVATORS (PA) CYTOKINE PRODUCTION, IPAЕ ON CYTOKINE PRODUCTION IN BIOPATES OF INVASIVE NONSPECIFIC BREAST CARCINOMA (ICNT) AND THE PERCENTAGE OF THE CELLS HAVING VARIOUS DIFFERENTIATION IN THE STUDY GROUPS

Группа пациентов Patient group	Выявленные корреляции Identified correlations	Коэффициент корреляции, r Correlation coefficient, r	p
Группа I Group I (n = 12)	IL-6/% НД / IL-6/% LD	-0,581	0,047
	VEGF/% НД / VEGF/% LD	-0,599	0,040
	ПА IFNγ/% ВД / PA IFNγ/% HD	0,626	0,030
	ИВПА G-CSF/% ВД / IPAЕ G-CSF/% HD	-0,604	0,038
Группа II Group II (n = 30)	IL-2/% НД / IL-2/% LD	-0,400	0,029
	IL-18/% НД / IL-18/% LD	0,524	0,003
	IL-1β/% НД / IL-1β/% LD	0,327	0,043
	IL-1ra/% УД / IL-1ra/% MD	-0,493	0,006
	G-CSF/% УД / G-CSF/% MD	-0,376	0,041
	ПА IL-2/% НД / PA IL-2/% LD	-0,386	0,035
	ПА IL-2/% УД / PA IL-2/% MD	0,493	0,006
	ПА IL-18/% НД / PA IL-18/% LD	0,504	0,005
	ПА GM-CSF/% НД / PA GM-CSF/% LD	-0,440	0,015
	ПА GM-CSF/% УД / PA GM-CSF/% MD	0,493	0,006
	ИВПА IL-8/% УД / IPAЕ IL-8/% MD	0,468	0,009
	ИВПА IL-1ra/% УД / IPAЕ IL-1ra/% MD	0,458	0,011
	ИВПА G-CSF/% УД / IPAЕ G-CSF/% MD	0,430	0,018
Группа III Group III (n = 7)	IL-1β/% УД / IL-1β/% MD	-0,815	0,025
	ПА IL-6/% УД / PA IL-6/% MD	-0,775	0,041
	ПА IL-8/% УД / PA IL-8/% MD	-0,075	0,041
	ПА IFNγ/% УД / PA IFNγ/% MD	-0,793	0,033
	ИВПА IL-17/% УД / IPAЕ IL-17/% MD	-0,778	0,039

Примечание. Группа I – люминальный А, группа II – люминальный В, группа III – нелюминальные молекулярные подтипы; НД – низкодифференцированные клетки, УД – умеренно дифференцированные клетки, ВД – высокодифференцированные клетки опухолей.

Note. Group I, luminal A; group II, luminal B; group III, non-luminal molecular subtypes; LD, low-differentiated cells; MD, moderate-differentiated cells; HD, high-differentiated cells.

G-CSF. В группе III выявлена обратная зависимость между спонтанной продукцией IL-1 β и процентом УД, три отрицательные корреляционные связи между стимулированной ПА продукцией IL-6, IL-8 и IFN γ с относительным содержанием УД и отрицательная связь между ИВПА на IL-17 и процентом УД (табл. 2).

Полученные статистически значимые различия между группами позволили предположить, что по уровню спонтанной и стимулированной ПА продукции определенных цитокинов, а также по относительному содержанию клеток различной степени дифференцировки можно с высокой

степенью вероятности отнести пациента к тому или иному молекулярно-генетическому подтипу и, следовательно, определить прогноз в каждом индивидуальном случае. Для подтверждения нашего предположения в группах был проведен ROC-анализ полученных данных в каждой испытуемой группе (табл. 3).

ROC-кривые позволили оценить качество моделей по эффективности разделения всех пациентов на группы в зависимости от принадлежности к люминальному А, люминальному В или нелюминальному подтипу.

ТАБЛИЦА 3. ОЦЕНКА СПОНТАННОЙ, СТИМУЛИРОВАННОЙ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫМИ АКТИВАТОРАМИ (ПА) ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ, ИВПА НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ БИОПТАТАМИ ИНВАЗИВНОЙ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ТИПА (ИКНТ), А ТАКЖЕ ОТНОСИТЕЛЬНОГО СОДЕРЖАНИЯ КЛЕТОК РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ ПРИ ПОМОЩИ РОС-АНАЛИЗА

TABLE 3. ASSESING OF SPONTANEOUS AND STIMULATED BY POLYCLONAL ACTIVATORS (PA) PRODUCTION OF CYTOKINES, IPAЕ ON THE PRODUCTION OF CYTOKINES IN BIOPATES OF INVASIVE BREAST CARCINOMA OF A NONSPECIFIC TYPE (ICNT), AS WELL AS THE PERCENTAGE OF THE CELLS HAVING VARIOUS DIFFERENTIATION IN THE STUDY GROUPS USING ROC ANALYSIS

Группа Group	Показатель Mark	Площадь под кривой Area under the curve (AUC)	Пороговые значения (пг/мл) или % Limit (pg/mL) or %	Чувстви- тельность (%) Sensitivity (%)	Специ- фичность (%) Specificity (%)	р
Спонтанная продукция цитокинов (пг/мл) или % клеток различной степени дифференцировки в образцах из флакона с питательной средой Spontaneous production of cytokines (pg/mL) or % of cells having various differentiation in samples from a bottle with a nutrient medium						
I	IL-10	0,738	15,5	67	73	0,014
	G-CSF	0,739	2882,25	67	81	0,014
	MCP	0,775	6732,5	66,7	78,4	0,005
II	УД	0,695	55,5	70	63,2	0,023
III	IL-1ra	0,837	15820,0	86	79	0,005
	НД (LD)	0,775	26,5	71,4	85,7	0,032
Стимулированная ПА продукция цитокинов (пг/мл) или % клеток различной степени дифференцировки в образцах из флакона с ПА PA-stimulated production of cytokines (pg/mL) or % of cells having various differentiation in samples from a bottle with PA						
I	IL-10	0,757	20,80	75	67,6	0,008
II	не получены удовлетворительные модели no satisfactory models have been obtained					
III	IL-1ra	0,813	21002,5	86	71	0,009
	НД (LD)	0,735	22,5	71,4	71,4	0,044
ИВПА на продукцию цитокинов IPAЕ on the production of cytokines						
I	IL-17	0,727	1,65	66,7	70,3	0,019
II	не получены удовлетворительные модели no satisfactory models have been obtained					
III	VEGF	0,767	0,85	71,4	71,4	0,025

Примечание. Группа I – люминальный А, группа II – люминальный В, группа III – нелюминальные молекулярные подтипы; при оценке площади под кривой учитывалось: AUC = 1,0-0,9 – отличное, 0,9-0,8 – очень хорошее, 0,8-0,7 – хорошее, 0,7-0,6 – среднее, 0,6-0,5 – неудовлетворительное качество модели.

Note. Group I, luminal A; group II, luminal B; group III, non-luminal molecular subtypes; when assessing the area under the curve, the following were taken into account: AUC = 1.0-0.9, excellent; 0.9-0.8, very good; 0.8-0.7, good; 0.7-0.6, average; 0.6-0.5, unsatisfactory quality of the model.

Установлено, что наиболее качественные модели, характеризующие отличие образцов ИКНТ пациентов группы I формируются при использовании в качестве параметров сравнения спонтанной продукции IL-10, G-CSF, MCP-1, стимулированной ПА продукции IL-10 и ИВПА IL-17 (табл. 2, рис. 1А). При оценке этих показателей получены модели хорошего качества (AUC > 0,7).

Величины AUC для концентрации IL-1ra, стимулированной ПА продукции IL-1ra и ИВПА на продукцию VEGF-А в группе III составили 0,837; 0,813 и 0,767 соответственно, что свидетельствует об очень хорошем (AUC > 0,8) или хорошем (AUC > 0,7) качестве моделей (табл. 2, рис. 1Б).

Величины AUC для относительного содержания НД клеток в биоптатах пациентов, относя-

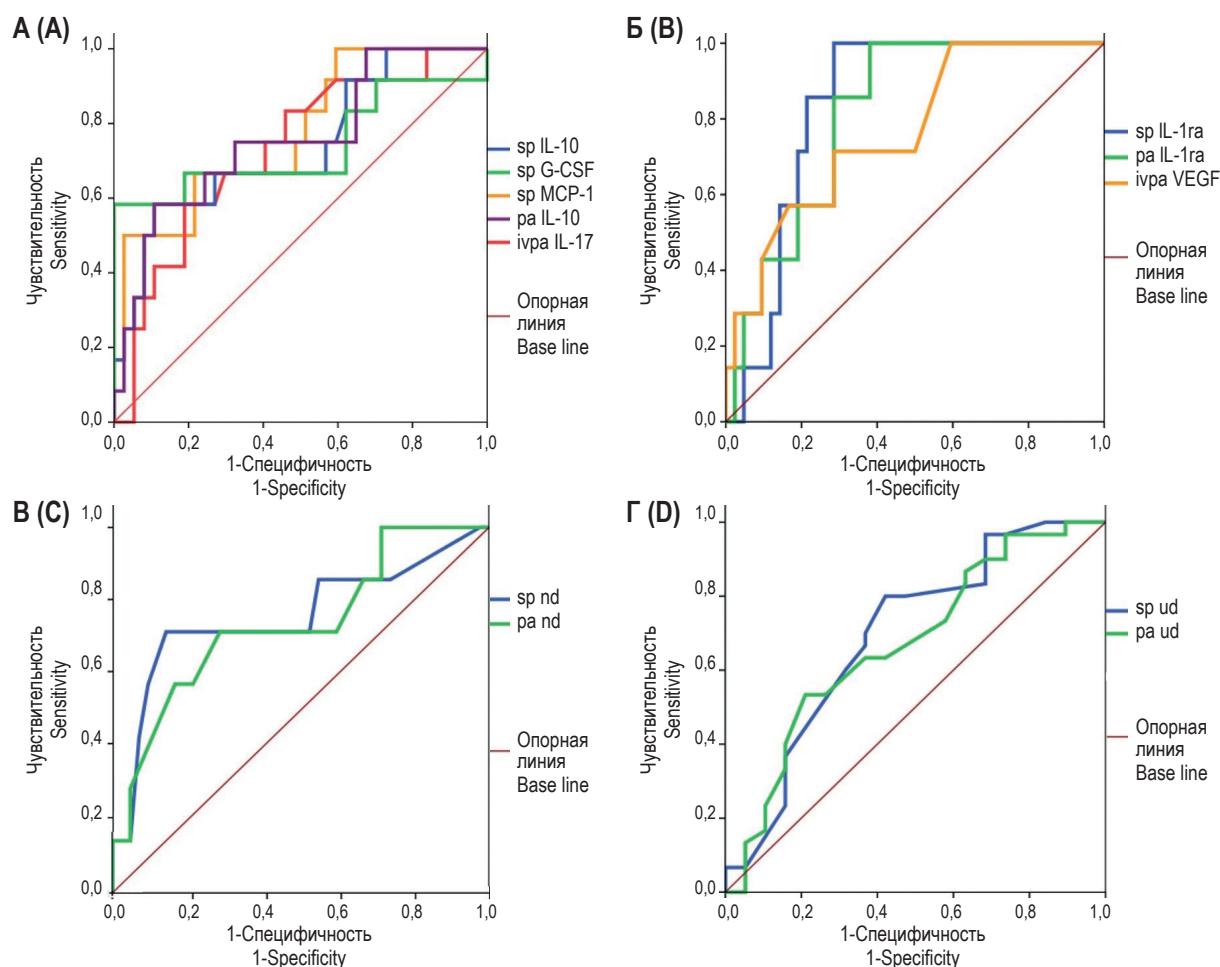


Рисунок 1. ROC-кривые, характеризующие качество ROC-моделей в группах в зависимости от принадлежности к молекулярно-генетическим подтипам РМЖ

Примечание. sp – спонтанная продукция цитокинов; pa – продукция цитокинов после воздействия ПА; ivpa – индекс влияния поликлонального активатора; sp nd – % НД в биоптатах только с питательной средой; sp ud – % УД в биоптатах только с питательной средой; pa nd – % НД в биоптатах с ПА; pa ud – % УД в биоптатах с ПА; А – группа I, Б – группа III, В – группа III, Г – группа II.

Figure 1. ROC-curves characterizing the quality of ROC models in groups according to the molecular-genetic subtype of breast cancer

Note. sp, spontaneous production of cytokines; pa, production of cytokines after exposure to PA; ivpa, index of the polyclonic activators effect; sp nd, % LD in biotates with nutrient medium only; sp ud, % MD in biotates with nutrient medium only; pa nd, % LD in biotates with PA; pa ud, % MD in biotates with PA. A, group I; B, group III; C, group III; D, group II.

щихся к группе III, как инкубированных только в питательной среде, так и в среде с добавлением ПА, составили 0,775 и 0,735, что также соответствует хорошему качеству моделей (табл. 2, рис. 1В). В то же время величина AUC для относительного содержания УД клеток в биоптатах пациентов, относящихся к люминальному В-подтипу, соответствовала удовлетворительному качеству модели и составила 0,695, что приближало ее к хорошему качеству (табл. 2, рис. 1Г).

Обсуждение

Исследование показало, что при всех полученных данных наиболее значимыми явились показатели ИВПА на продукцию биоптатами ци-

токинов, так как этот показатель является наиболее точным, потому что при всех вариантах исследования позволяет избежать ошибки за счет одинаковых размеров биоптата каждого пациента и условий их инкубирования, благодаря чему мы можем представить персонифицированные сведения по каждому пациенту, в частности по двум цитокинам: IL-10 и VEGF-A. ИВПА на продукцию IL-10 при люминальном подтипе А отражает повышенный резерв IL-10, который, несмотря на неоднозначность функции [5, 12], при люминальном подтипе А оказывает противовоспалительный эффект и препятствует ангиогенезу, не исключено, что именно этим обусловлена более редкая встречаемость гематогенного ме-

тастазирования при этом подтипе [13]. Анализируя ИВПА на продукцию VEGF-A при нелюминальном подтипе, выявлено его достоверное повышение по сравнению с другими группами, что свидетельствует о высоком резерве продукции этого цитокина, отвечающего за ангиогенез, а, следовательно, и прогрессирование процесса, инвазивность, метастазирование и худший прогноз [6, 5, 19].

Заключение

Таким образом, основываясь на полученных нами данных, можно сделать вывод о том, что цитокинпродуцирующий резерв сопряжен с точной дифференцировкой, которая в свою очередь зависит от молекулярно-генетического подтипа опухоли.

Список литературы / References

1. Аутеншлюс А.И., Архипов С.А., Михайлова Е.С., Архипова В.В., Вараксин Н.А. Сопряженность цитокинового профиля супернатанта инвазивной карциномы молочной железы с ее молекулярными и гистопатологическими характеристиками // Сибирский онкологический журнал, 2023. Т. 22, № 6. С. 92-102. [Autenshlyus A.I., Arkhipov S.A., Mikhaylova E.S., Arkhipova V.V., Varaksin N.A. Relationship between the cytokine profile of supernatants of invasive breast carcinoma and its molecular and histopathological characteristics. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology*, 2023, Vol. 22, no. 6, pp. 92-102. (In Russ.)]
2. Архипов С.А., Михайлова Е.С., Кунц Т.А., Карпухина К.В., Могильная Е.Д., Соловьев К.А., Вараксин Н.А., Аутеншлюс А.И. Цитокинпродуцирующий резерв иммунокомпетентных клеток крови и инвазивного протокового рака молочной железы, его взаимосвязь с патогистологическими и иммуногистохимическими параметрами злокачественного новообразования // Медицинская иммунология, 2016. Т. 1, № 5. С. 459-468. [Arkhipov S.A., Mikhaylova E.S., Kunts T.A., Karpukhina K.V., Mogilnaya E.D., Solovyev K.A., Varaksin N.A., Autenshlyus A.I. Cytokine-producing reserve of immunocompetent cells from blood and invasive ductal breast cancer tissues: its correlation with histopathological and immunohistochemical parameters of malignant neoplasia. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 1, no. 5, pp. 459-468. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-459-468.
3. Пауков В.С. Клиническая патология. М.: Литтерра, 2018. 768 с. [Paukov V.S. Clinical pathology]. Moscow: Litterra, 2018. 768 p.
4. Поспехова Н.И., Головина Д.А., Филиппова М.Г., Семьянихина А.В., Дранко С.Л., Данишевич А.М., Строганова А.М. Молекулярно-биологические подтипы рака молочной железы у носителей мутаций в гене BRCA1 // Успехи молекулярной онкологии, 2020. Т. 7, № 4. С. 29-36. [Pospekhova N.I., Golovina D.A., Filippova M.G., Semyanikhina A.V., Dranko S.L., Danishevich A.M., Stroganova A.M. Molecular biological subtypes of breast cancer in brca1 mutation carriers. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology*, 2020, Vol. 7, no. 4, pp. 29-36. (In Russ.)]
5. Соснина А.В., Великая Н.В., Вараксин Н.А., Гришаев М.П., Аутеншлюс А.И. Роль цитокинов в патогенезе злокачественных новообразований. Новосибирск: Офсет, 2014. 128 с. [Sosnina A.V., Velikaya N.V., Varaksin N.A., Grishaev M.P., Autenshlyus A.I. The role of cytokines in the pathogenesis of malignant neoplasms]. Novosibirsk: Ofset, 2014. 128 p.
6. Al Kawas H., Saaid I., Jank P., Westhoff C.C., Denkert C., Pross T., Weiler K.B.S., Karsten M.M. How VEGF-A and its splice variants affect breast cancer development – clinical implications. *Cell. Oncol. (Dordr.)*, 2022, Vol. 45, no. 2, pp. 227-239.
7. Abelev G.I. Differentiation mechanisms and malignancy. *Biochemistry (Mosc.)*, 2000, Vol. 65, no. 1, pp. 107-116.
8. Autenshlyus A., Arkhipov S., Mikhaylova E., Marinkin I., Arkhipova V., Mogilnaya E., Varaksin N., Rukavishnikov M. Cytokine production in mammary adenocarcinoma and its microenvironmental cells in patients with or without metastases in regional lymph nodes. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 2017, Vol. 30, no. 3, pp. 308-314.
9. Faria S.S., Costantini S., de Lima V.C.C., de Andrade V.P., Rialland M., Cedric R., Budillon A., Magalhães K.G. NLRP3 inflammasome-mediated cytokine production and pyroptosis cell death in breast cancer. *J. Biomed. Sci.*, 2021, Vol. 28, no. 1, 26. doi: 10.1186/s12929-021-00724-8.
10. Felcher C.M., Bogni E.S., Kordon E.C. IL-6 Cytokine Family: A putative target for breast cancer prevention and treatment. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 3, 1809. doi: 10.3390/ijms23031809.
11. Habanjar O., Bingula R., Decombat C., Diab-Assaf M., Caldefie-Chezet F., Delort L. Crosstalk of Inflammatory Cytokines within the Breast Tumor Microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 4, 4002. doi: 10.3390/ijms24044002.
12. Hamidullah, Changkija B., Konwar R. Role of interleukin-10 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, Vol. 133, no. 1, pp. 11-21.
13. Holm-Rasmussen E.V., Jensen M.B., Balslev E., Kroman N., Tvedskov T.F. Reduced risk of axillary lymphatic spread in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2015, Vol. 149, no. 1, pp. 229-236.
14. Liu L., Wu Y., Zhang C., Zhou C., Li Y., Zeng Y., Zhang C., Li R., Luo D., Wang L., Zhang L., Tu S., Deng H., Luo S., Chen Y.G., Xiong X., Yan X. Cancer-associated adipocyte-derived G-CSF promotes breast cancer malignancy via Stat3 signaling. *J. Mol. Cell Biol.*, 2020, Vol. 12, no. 9, pp. 723-737.
15. Mesa-Eguizaray I., Wild S.H., Rosenberg P.S., Bird S.M., Brewster D.H., Hall P.S., Cameron D.A., Morrison D., Figueroa J.D. Distinct temporal trends in breast cancer incidence from 1997 to 2016 by molecular subtypes: a population-based study of Scottish cancer registry data. *Br. J. Cancer*, 2020, Vol. 123, no. 5, pp. 852-859.
16. Mouchemore K.A., Anderson R.L., Hamilton J.A. Neutrophils, G-CSF and their contribution to breast cancer metastasis. *FEBS J.*, 2018, Vol. 285, no. 4, pp. 665-679.

17. Nielsen T.O., Jensen M.B., Burugu S., Gao D., Jørgensen C.L., Balslev E., Ejlersen B. High-risk premenopausal luminal a breast cancer patients derive no benefit from adjuvant cyclophosphamide-based chemotherapy: results from the DBCG77B Clinical Trial. *Clin. Cancer Res.*, 2017, Vol. 23, no. 4, pp. 946-953.
18. Rakha E.A., Reis-Filho J.S., Baehner F., Dabbs D.J., Decker T., Eusebi V., Fox S.B., Ichihara S., Jacquemier J., Lakhani S.R., Palacios J., Richardson A.L., Schnitt S.J., Schmitt F.C., Tan P.H., Tse G.M., Badve S., Ellis I.O. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res.*, 2010, Vol. 12, no. 4, 207. doi: 10.1186/bcr2607.
19. Smolanka I.I., Bagmut I.Y., Movchan O.V., Sheremet M.I., Bilyi O.M., Lyashenko A.O., Dosenko I.V., Loboda A.D., Ivankova O.M., Kolisnyk I.L. Features of VEGF and IL-6 expression in patients with inflammatory breast cancer considering molecular-biological characteristics. *J. Med. Life*, 2023, Vol. 16, no. 1, pp. 153-159.
20. Sørli T., Perou C.M., Tibshirani R., Aas T., Geisler S., Johnsen H., Hastie T., Eisen M.B., van de Rijn M., Jeffrey S.S., Thorsen T., Quist H., Matese J.C., Brown P.O., Botstein D., Lønning P.E., Børresen-Dale A.L. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2001, Vol. 98, no. 19, pp. 10869-10874.
21. Tan C., Hu W., He Y., Zhang Y., Zhang G., Xu Y., Tang J. Cytokine-mediated therapeutic resistance in breast cancer. *Cytokine*, 2018, Vol. 108, pp. 151-159.
22. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*, 2013, Vol. 310, no. 20, pp. 2191-2194.
23. Yan R., Ren F., Li J., Rao X., Lv Z., Zheng C., Zhang F. Nuclei-Guided Network for Breast Cancer Grading in HE-Stained Pathological Images. *Sensors (Basel)*, 2022, Vol. 22, no. 11, 4061. doi: 10.3390/s22114061.

Авторы:

Мангазеева Е.Д. — младший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск, Россия

Студеникина А.А. — к.м.н., научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет»; научный сотрудник, Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

Рыжикова С.Л. — начальник лаборатории АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия

Аутеншлюс А.И. — д.б.н., профессор, заведующий центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет»; главный научный сотрудник, Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Mangazeeva E.D., Research Associate, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Studenikina A.A., PhD (Medicine), Research Associate, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University; Research Associate, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

Ryzhikova S.L., Head of Laboratory, Vector-Best JSC, Novosibirsk, Russian Federation

Autenshlyus A.I., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University; Chief Research Associate, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 11.04.2024
Отправлена на доработку 29.05.2024
Принята к печати 14.09.2024

Received 11.04.2024
Revision received 29.05.2024
Accepted 14.09.2024