

©Коллектив авторов

ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫМИ КЛЕТКАМИ КРОВИ, ОПУХОЛЬЮ И ЕЁ МИКРООКРУЖЕНИЕМ, ОСОБЕННОСТИ СОСТОЯНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА У БОЛЬНЫХ ИНВАЗИВНОЙ КАРЦИНОМОЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ТИПА

А.И. Ауteniлюс^{1,2}, К.И. Давлетова¹, А.А. Студеникина¹, Е.С. Михайлова^{1,2},
Н.А. Вараксин³, И.П. Жураковский^{1,2}, А.В. Проскура², С.В. Сидоров⁴, В.В. Ляхович²*

¹Новосибирский государственный медицинский университет,

Новосибирск, 630091, Красный проспект, 52; *эл. почта: lrciir@211.ru

²Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики – структурное подразделение
Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины,
630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2/12

³АО “Вектор-Бест”, 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область,
Научно-производственная зона, корпус 36

⁴Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

Исследовали спонтанную и стимулированную поликлональными активаторами продукцию цитокинов иммунокомпетентными клетками крови, опухолью и её микроокружением, а также состояние внеклеточного матрикса у 95 пациенток с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа при лимфогенном метастазировании. С помощью иммуноферментного анализа определяли концентрацию IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1 β , IL-1Ra, TNF- α , IFN- γ , G-CSF, GM-CSF, VEGF и MCP-1. При изучении внеклеточного матрикса оценивали состояние волокнистого компонента, содержание нейтральных гликопротеинов и сульфатированных гликозаминогликанов. Метастазы в регионарные лимфатические узлы присутствовали у 35 из 95 пациенток. Исследование показало, что при наличии или отсутствии лимфогенного метастазирования индекс влияния поликлональных активаторов на продукцию цитокинов иммунокомпетентными клетками крови различался по трём показателям (IL-6, IL-8 и IL-1 β), а индекс влияния поликлональных активаторов на продукцию цитокинов клетками опухоли и её микроокружения по двум (IL-2 и IL-17). Наличие лимфогенных метастазов соответствовало повышению спонтанной продукции цитокинов, а их отсутствию – повышению продукции, стимулированной поликлональными активаторами. Значения индексов влияния поликлональных активаторов на продукцию цитокинов иммунокомпетентными клетками крови свидетельствовали о высоком стимулирующем эффекте поликлональных активаторов, а значения индексов влияния поликлональных активаторов на продукцию цитокинов клетками опухоли и её микроокружения – о низком и даже отсутствующем эффекте поликлональных активаторов. На основании полученных данных было составлено соотношение индексов влияния поликлональных активаторов для оценки вероятности лимфогенного метастазирования в дооперационном периоде. При оценке состояния внеклеточного матрикса был выявлен порог, который в 100% случаев показал соответствие состояния внеклеточного матрикса наличию метастазов в регионарных лимфатических узлах. На основании полученных результатов была предложена группа риска по метастазированию среди женщин, не имеющих на момент исследования метастазов в лимфатических узлах.

Ключевые слова: цитокины; поликлональные активаторы; внеклеточный матрикс; рак молочной железы

DOI: 10.18097/PBMC20196505424

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что для рака молочной железы характерен преимущественно лимфогенный путь метастазирования [1]. Важнейшими регуляторами как прогрессии, так и супрессии опухолевого роста признаются внеклеточный матрикс (ВКМ) и иммунокомпетентные клетки (ИКК), которые, попадая из периферической крови в опухоль, формируют зону инфильтрации; однако механизмы, обеспечивающие то или иное воздействие этих компонентов на опухолевую прогрессию, остаются не ясными [2].

Считается, что влияние иммунной системы на прогрессию и исход рака молочной железы зависит как от молекулярно-генетического подтипа опухоли, так и от функционального состояния ИКК [3]. На первом этапе взаимодействия иммунной системы

с атипичными клетками возникает острый воспалительный ответ, что сопровождается выработкой провоспалительных цитокинов, прежде всего IFN- γ и IL-12, которые, запуская каскад событий, способствуют выработке специфичных к антигенам опухоли CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. Непосредственно развитие событий может происходить в двух направлениях – это либо полное уничтожение, либо эволюция и селективный отбор атипичных клеток, избегающих воздействия противоопухолевого иммунитета. В последнем случае воспаление постепенно переходит от острого к хроническому, а атипичные клетки окончательно выходят из-под иммунного надзора. С этого момента ИКК микроокружения оказывают преимущественно стимулирующее влияние на малигнизацию клона атипичных клеток. Таким образом, воздействие ИКК

оказывает как стимулирующий, так и супрессирующий эффект на опухоль, что, скорее всего, зависит от их функциональной активности [4, 5].

Помимо этого, aberrантное (патологическое) ремоделирование ВКМ, которое осуществляется преимущественно опухоль-ассоциированными фибробластами и ИКК микроокружения опухоли, включает два противоположных процесса: первый – деградация внеклеточного матрикса металлопротеиназами (MMPs), второй – десмопластическая реакция стромы, представляющая собой активный синтез фибриллярных коллагенов, обуславливающих увеличение жёсткости и плотности опухолевой ткани. Эти процессы способствуют повышению миграции как опухолевых, так и ИКК, а также оказывают влияние на дифференцировку стволовых клеток [6, 7].

Всё вышеизложенное определило цель исследования: изучить продукцию цитокинов иммунокомпетентными клетками крови, опухолью и её микроокружением и оценить состояние внеклеточного матрикса у больных инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа при лимфогенном метастазировании.

МЕТОДИКА

Исследование было проведено на постоперационном материале (биоптате опухоли) и в пробах периферической крови 95 пациенток с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа, средний возраст которых составил 57 (от 23 до 77 лет). На момент проведения исследования метастазы в регионарные лимфатические узлы присутствовали у 35 пациенток (средний возраст 56 (от 23 до 75 лет)), в то время как у остальных 60 пациенток (средний возраст 58 (от 38 до 77 лет)) метастазы отсутствовали. В течение 30 дней от начала обследования всем больным было проведено операционное вмешательство, а окончательный диагноз устанавливали на основании патоморфологического исследования. Согласно международной патоморфологической классификации злокачественных новообразований по системе TNM, включающей оценку первичной опухоли (T), регионарных лимфатических узлов (N) и отдалённых метастазов (M), была определена анатомическая стадия заболевания [8]. У 31 пациентки была диагностирована стадия IA, у 41 – IIA, у 14 – IIB, у 5 – IIIA и у 4 – IIIC. Согласно гистологической градации дифференцировки опухоли, 83 пациентки имели вторую степень злокачественности, 6 – первую и ещё 6 – третью [8]. Неoadьювантная (дооперационная) терапия ни одной из пациенток не проводилась.

Для исследования спонтанной и митоген-индуцированной продукции цитокинов клетками крови использовали специально разработанный для этих целей стандартизированный набор реагентов “Цитокин-стимул-бест” производства “Вектор-Бест” (Россия). Непосредственно после отбора из кубитальной вены 1 мл крови вносили во флакон, содержащий 4 мл поддерживающей среды (DMEM), гепарин (2,5 ед./мл),

гентамицин (100 мкг/мл), и L-глутамин (0,6 мг/мл). Этот флакон использовали для изучения спонтанной продукции цитокинов. Для митогенной стимуляции 1 мл полученной разбавленной крови переносили во флакон со смесью поликлональных активаторов (ПА): фитогемагглютинин (4 мкг/мл), конканавалин А (4 мкг/мл) и липополисахарид (2 мкг/мл). Выбор сочетания митогенов и их концентрации был обусловлен наиболее эффективной стимуляцией продукции различных цитокинов клетками цельной крови, как это было показано ранее [9]. Оба флакона инкубировали в течение суток при 37°C, затем клетки крови осаждали на центрифуге при 900 g в течение 15 мин при комнатной температуре.

Биоптаты опухолей объёмом 8 мм³, полученные методом трепанобиопсии, помещали в 2 флакона, в одном из которых находилась только питательная среда DMEM (1 мл), а в другом – раствор ПА в таком же объёме среды, и инкубировали при 37°C в течение 72 ч. Для получения супернатанта опухоль извлекали, а оставшиеся клетки осаждали центрифугированием при 900 g в течение 15 мин при комнатной температуре.

Супернатанты после отделения осадка замораживали и хранили при -40°C до проведения количественного анализа цитокинов. В полученных супернатантах с помощью твердофазного иммуноферментного анализа определяли концентрацию следующих цитокинов (в скобках приведена минимальная чувствительность набора): IL-2 (2,0 пг/мл), IL-6 (0,5 пг/мл), IL-8 (2,0 пг/мл), IL-10 (1,0 пг/мл), IL-17 (2,0 пг/мл), IL-18 (2,0 пг/мл), IL-1β (1,0 пг/мл), IL-1Ra (10,0 пг/мл), TNF-α (1,0 пг/мл), IFN-γ (2,0 пг/мл), G-CSF (2,0 пг/мл), GM-CSF (2,0 пг/мл), VEGF (10,0 пг/мл) и MCP-1 (15,0 пг/мл) с использованием наборов реагентов производства “Вектор-Бест”.

Влияние ПА на продукцию цитокинов ИКК крови и клетками биоптата опухоли оценивали по индексу влияния поликлональных активаторов (ИВПА), выраженному в условных единицах (у.е.), который высчитывали по формуле: ИВПА = А/Б, где А – концентрация цитокина в супернатанте после инкубации с ПА, а Б – концентрация цитокина в супернатанте без стимуляции ПА (спонтанная продукция) [10]. Значение ИВПА менее 1,2 у.е. свидетельствовало об отсутствии влияния ПА на продукцию цитокинов ИКК крови и клетками биоптата опухоли, а значение ИВПА, равное 1,2 и более (превышение на 20% и более) – о влиянии ПА на продукцию цитокинов. Такой подход позволяет получать объективные данные за счёт нивелирования различий между содержанием ИКК в образцах периферической крови и клеток в биоптате опухоли.

При изучении внеклеточного матрикса (ВКМ) в биоптатах опухолей оценивали состояние волокнистого компонента, содержание нейтральных гликопротеинов, сульфатированных гликозаминогликанов, а также инфильтрация ВКМ ИКК и степень выраженности отёка в ней. Степень изменения признаков оценивали в баллах (от 0 до 3), где 0 – отсутствие изменений, а 3 – наличие выраженных изменений ВКМ (табл. 1).

ЦИТОКИНЫ И ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ МАТРИКС ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Таблица 1. Балльная оценка состояния внеклеточного матрикса

Исследуемые параметры внеклеточного матрикса	Баллы
1. Деградация коллагеновых волокон	
1.1. Отсутствие изменений коллагеновых волокон	0
1.2. Разволокнение пучков коллагена	1
1.3. Разволокнение пучков коллагена, размытость их контуров, слабая фрагментированность коллагеновых волокон	2
1.4. Сильная фрагментированность, вплоть до полной деградации коллагеновых волокон	3
2. Изменения тинкториальных свойств коллагеновых волокон	
2.1. Отсутствие изменений тинкториальных свойств коллагеновых волокон	0
2.2. От 1-го до 3-х мелких участков, площадь каждого не превышает 1/3 поля зрения на всём препарате при увеличении 400× (объектив 40×, окуляр 10×), с изменением окраски коллагеновых волокон по сравнению с их типичной окраской в неизменённых участках препарата	1
2.3. Более 3-х мелких участков, площадь каждого не превышает 1/3 поля зрения на всём препарате при увеличении 400× (объектив 40×, окуляр 10×), с изменением окраски коллагеновых волокон по сравнению с их типичной окраской в неизменённых участках препарата	2
2.4. Появление крупных участков, площадь каждого больше 1/3 поля зрения на всём препарате при увеличении 400× (объектив 40×, окуляр 10×), с изменением окраски коллагеновых волокон по сравнению с их типичной окраской в неизменённых участках препарата	3
3. Содержание нейтральных гликопротеинов	
3.1. Отсутствие изменения в содержании нейтральных гликопротеинов	0
3.2. От 1 до 3 мелких участков, площадь каждого не превышает 3000 мкм ² , с усилением интенсивности окрашивания по сравнению с их окраской в неизменённых участках препарата	1
3.3. Более 3 мелких участков, площадь каждого не превышает 3000 мкм ² , с усилением интенсивности окрашивания по сравнению с их окраской в неизменённых участках препарата	2
3.4. Появление крупных участков, площадь каждого равна или больше 3000 мкм ² , с усилением интенсивности окрашивания по сравнению с их окраской в неизменённых участках препарата	3
4. Содержание сульфатированных гликозаминогликанов	
4.1. Отсутствие изменения в содержании сульфатированных гликозаминогликанов	0
4.2. От 1 до 3 мелких участков, площадь каждого не превышает 3000 мкм ² , с уменьшением интенсивности окрашивания по сравнению с их окраской в неизменённых участках препарата	1
4.3. Более 3 мелких участков, площадь каждого не превышает 3000 мкм ² , с частичной утратой окрашивания по сравнению с их окраской в неизменённых участках препарата	2
4.4. Появление крупных участков, площадь каждого равна или больше 3000 мкм ² , с полной утратой окрашивания по сравнению с их окраской в неизменённых участках препарата	3
5. Инфильтрация внеклеточного матрикса иммунокомпетентными клетками	
5.1. Отсутствие инфильтрации	0
5.2. Инфильтрация обнаруживается только в одном поле зрения на всём препарате при увеличении 400× (объектив 40×, окуляр 10×), с неплотным распределением иммунокомпетентных клеток (клеточные элементы находятся на расстоянии более трёх диаметров клетки)	1
5.3. Инфильтрация обнаруживается в более чем одном поле зрения на всём препарате при увеличении 400× (объектив 40×, окуляр 10×), с неплотным распределением иммунокомпетентных клеток (клеточные элементы находятся на расстоянии более трёх диаметров клетки)	2
5.4. Инфильтрация обнаруживается в более чем одном поле зрения на всём препарате при увеличении 400× (объектив 40×, окуляр 10×), с плотным распределением иммунокомпетентных клеток (клеточные элементы находятся на расстоянии менее или равным трём диаметрам клетки)	3
6. Отёк в зоне инфильтрации внеклеточного матрикса иммунокомпетентными клетками	
6.1. Отсутствие отёка	0
6.2. Волокнистые компоненты внеклеточного матрикса занимают более 3/4 поля зрения во всей зоне инфильтрации при увеличении 400× (объектив 40×, окуляр 10×)	1
6.3. Волокнистые компоненты внеклеточного матрикса занимают от 1/4 до 3/4 поля зрения во всей зоне инфильтрации при увеличении 400× (объектив 40×, окуляр 10×)	2
6.4. Волокнистые компоненты внеклеточного матрикса занимают менее 1/4 поля зрения во всей зоне инфильтрации при увеличении 400× (объектив 40×, окуляр 10×)	3
7. Нейтральные гликопротеины в стенках кровеносных сосудов	
7.1. Отсутствие нейтральных гликопротеинов в стенках кровеносных сосудов	0
7.2. Нейтральные гликопротеины содержатся в стенках от 1 до 5 кровеносных сосудов	1
7.3. Нейтральные гликопротеины содержатся в стенках от 6 до 10 кровеносных сосудов	2
7.4. Нейтральные гликопротеины содержатся в стенках более чем в 10 кровеносных сосудов	3

Коллагеновые волокна были окрашены по ван Гизону смесью кислотного фуксина (смесь сульфонатных фуксинов) и пикриновой кислоты (2,4,6-тринитрофенолом). Смесью этих красителей, называемая пикрофуксином, реагирует с основными группами окрашиваемых волокон белкового типа за счёт образования ионных связей. Так, кислотный фуксин окрашивает коллагеновые волокна в красный цвет, а пикриновая кислота – эластические волокна в жёлтый, что объясняется отсутствием у последних регулярных вторичных и третичных структур. В процессе деградации коллагеновых волокон происходит расщепление пептидных связей в определённых участках спирализованных областей коллагена и его распад до первичной структуры, в результате чего он теряет способность окрашиваться кислотным фуксином в красный цвет, но приобретает жёлтую окраску за счёт пикриновой кислоты [11, 12].

Для оценки содержания нейтральных гликопротеинов гистологические срезы были окрашены ШИК-реакцией по Мак-Манусу. В данной реакции йодная кислота служит окислителем и разрывает ковалентные связи в соединениях, содержащих 1,2-гликолевые, первичные аминные (1-гидрокси-2-амино), вторичные аминные (1-гидрокси-2-алкиламино) и 1-гидрокси-2-кетонные группы, превращая такие соединения в диальдегид. Образовавшиеся при этом альдегиды выявляются при помощи реактива Шиффа (фуксин-сернистая кислота), в результате чего нейтральные гликопротеины окрашиваются в ярко-красный цвет [11, 13].

Содержание в образцах сульфатированных гликозаминогликанов оценивали с помощью альцианового синего, который при pH 1,0 образует ионные связи с сульфатными и сульфоновыми группами гликозаминогликанов, окрашивая их в синий цвет [11, 14].

Учитывая тот факт, что во время ангиогенеза, ассоциированного с опухолью, активируется экспрессия различных нейтральных гликопротеинов в стенках новообразующихся сосудов, была разработана композиция, содержащая водные растворы толудинового и альцианового синих, а также реактив Шиффа [15]. Данная композиция обеспечивает получение контрастной картины нейтральных гликопротеинов в стенках кровеносных сосудов системы микроциркуляторного русла. Взаимодействие толудинового и альцианового синих с гликозаминогликанами, а реактива Шиффа с нейтральными гликопротеинами обеспечивает сине-фиолетовое окрашивание основного вещества внеклеточного матрикса, что способствует хорошей визуализации нейтральных гликопротеинов в стенках кровеносных сосудов, имеющих ярко-красный цвет.

Для статистической обработки результатов использовали программный пакет SPSS v 17.0 for Windows. При определении характера распределения данных применяли уравнение Колмогорова-Смирнова с определением поправки Лиллифорса. Поскольку распределение отличалось от нормального, проводили анализ с использованием непараметрического критерия Уилкоксона-Манна-Уитни. Статистическую

значимость различий между данными, выраженными в процентах, определяли с помощью точного критерия Фишера. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Полученные в ходе исследования данные представлены как медиана (Me) и интерквартильный размах ($Q_{0,25}$; $Q_{0,75}$). Качество полученных результатов проверяли с помощью ROC-анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице 2 представлены значения ИВПА на продукцию цитокинов ИКК крови у больных инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа при наличии и отсутствии лимфогенного метастазирования. Статистически значимые различия были получены по трём показателям: IL-6, IL-8 и IL-1 β .

Полученные результаты свидетельствуют о снижении значений ИВПА на продукцию только IL-6, IL-8 и IL-1 β при лимфогенном метастазировании, что связано с высоким уровнем спонтанной и низким уровнем стимулированной ПА продукцией цитокинов ИКК крови. Таким образом, наличие лимфогенных метастазов соответствует повышению спонтанной продукции цитокинов, а их отсутствию – повышению продукции цитокинов ИКК крови, стимулированной ПА. Следовательно, особенностью лимфогенного метастазирования является более слабая стимуляция ПА продукции IL-6, IL-8 и IL-1 β , по сравнению с аналогичными показателями при отсутствии метастазов в регионарных лимфатических узлах.

Известно, что IL-6 является многофункциональным цитокином, обладающим широким диапазоном биологической активности. Продукция IL-6 регулируется IL-1 по принципу отрицательной обратной связи (IL-1 стимулирует синтез IL-6, а он, в свою очередь, снижает продукцию IL-1) [16]. IL-6 способствует опухолевой прогрессии, оказывая антиапоптотическое и проангиогенное действие (последнее связано с индукцией синтеза VEGF и MMPs) [16, 17].

IL-8, относящийся к провоспалительным цитокинам, подобно IL-6 функционально взаимодействует с IL-1 по принципу отрицательной обратной связи [16]. Как проангиогенный фактор, IL-8 способствует выработке VEGF и увеличивает экспрессию рецепторов VEGFR. Индуцируя выработку MMP-2, разрушающей коллаген IV типа (основной компонент базальных мембран), IL-8 содействует миграции опухолевых клеток. Помимо этого, через IL-6, который усиливает эндогенную экспрессию MMP-8 в клетках рака молочной железы, происходит не только деградация коллагеновых волокон I, II и III типа, но и индукция синтеза IL-8, регулирующего, помимо прочего, хемотаксис нейтрофилов, на мембране которых присутствуют рецепторы CXCR-1 и CXCR-2 [16, 18].

IL-1 представляет собой плейотропный цитокин, имеющий две изоформы – IL-1 α и IL-1 β – которые выполняют сходные биологические функции, но различаются по компартиментализации внутри

ЦИТОКИНЫ И ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ МАТРИКС ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Таблица 2. Индексы влияния поликлональных активаторов на продукцию цитокинов иммунокомпетентными клетками крови у больных инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа

Цитокин	Больные с метастазами в лимфатических узлах n = 35; ИВПА (Me; Q _{0,25} ; Q _{0,75}) у.е.	Больные без метастазов в лимфатических узлах n = 60; ИВПА (Me; Q _{0,25} ; Q _{0,75}) у.е.	p
IL-2	9,00 (4,95; 12,10)	6,85 (3,42; 13,55)	0,318
IL-4	2,35 (1,25; 4,85)	2,10 (1,25; 5,50)	0,752
IL-6	12,98 (4,30; 55,33)	31,51 (10,02; 170,82)	0,017*
IL-8	4,55 (1,40; 27,28)	18,99 (3,16; 50,54)	0,014*
IL-10	28,14 (13,20; 69,66)	35,04 (14,08; 58,38)	0,823
IL-17	47,80 (12,05; 137,60)	29,52 (17,47; 79,22)	0,624
IL-18	1,30 (1,16; 1,50)	1,30 (1,11; 1,50)	0,856
IL-1β	16,20 (9,80; 45,70)	38,28 (13,18; 126,40)	0,033*
IL-1Ra	8,80 (4,00; 14,23)	8,04 (5,57; 13,55)	0,829
TNF-α	113,70 (44,42; 290,20)	169,81 (60,00; 301,08)	0,367
IFN-γ	225,10 (76,20; 565,50)	179,67 (76,66; 512,55)	0,994
G-CSF	51,10 (16,30; 118,30)	61,40 (22,04; 253,07)	0,265
GM-CSF	13,20 (6,50; 24,40)	15,05 (7,26; 25,72)	0,490
VEGF	2,60 (1,68; 3,50)	2,50 (1,70; 3,37)	0,823
MCP-1	1,40 (1,00; 12,18)	1,70 (1,04; 3,53)	0,165

Примечание. Здесь и в таблицах 3 и 4: * – статистически значимые различия при $p < 0,05$, определённые с помощью критерия Уилкоксона-Манна-Уитни.

продуцирующей клетки. IL-1β активен в своей секретированной форме, а IL-1α – преимущественно в клеточно-ассоциированных формах. Известно, что IL-1β влияет на пролиферацию, дифференцировку и функции ИКК, за счёт чего способен как стимулировать, так и супрессировать противоопухолевый иммунитет [16, 19].

Из всего вышеперечисленного можно заключить, что между IL-6, IL-8 и IL-1β прослеживается последовательная цепь событий, непосредственно связанных с опухолевой прогрессией, на основании чего было составлено соотношение ИВПА IL-6 x IL-1β/IL-1Ra, которое было использовано для оценки вероятности лимфогенного метастазирования в дооперационном периоде [16]. Значение соотношения, равное 80 и меньше, соответствовало наличию метастазов, а значение, равное 81 и больше – отсутствию метастазов ($p=0,004$).

Анализ значений ИВПА на продукцию цитокинов клетками опухоли и её микроокружения у больных инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа показал статистически значимые различия только по IL-2 и IL-17 (табл. 3). Судя по верхнему и нижнему квартилю, влияние ПА на продукцию цитокинов у пациенток с лимфогенным метастазированием было низким или даже отсутствовало (ИВПА ниже 1,2 у.е.) за счёт высокой спонтанной активности клеток опухоли и её микроокружения.

IL-2 относят к провоспалительным цитокинам, оказывающим антиапоптотическое действие на клетки опухоли. IL-2 также проявляет иммуносупрессивные эффекты, участвуя

в индуцированной активации гибели Т-лимфоцитов и обеспечении гомеостаза регуляторных Т-клеток, ответственных за толерантность к аутоантигенам, в том числе и к опухолеассоциированным [16, 20].

IL-17 является плейотропным цитокином, индуцирующим синтез проангиогенных и проопухолевых факторов. IL-17 ускоряет пролиферацию и ингибирует апоптоз как эндотелиальных, так и опухолевых клеток, способствуя миграции последних. Данный цитокин может оказывать и противоопухолевое действие за счёт индукции синтеза IFN-γ [16, 21].

Что касается состояния ВКМ у больных с наличием и отсутствием лимфогенного метастазирования, то исследование показало статистически значимые различия по всем исследуемым патогистологическим параметрам (табл. 4).

Таким образом, основываясь на статистически значимых различиях между исследуемыми параметрами ВКМ при наличии и отсутствии лимфогенного метастазирования, был выявлен порог, который в 100% случаев показал соответствие состояния ВКМ наличию метастазов в лимфатических узлах. Сумма баллов, равная 10 и более, свидетельствовала о наличии метастазов, а сумма баллов менее 10 – об их отсутствии. Чувствительность оценки составила – 100%, специфичность – 87%, а точность – 92%. Значение площади под кривой в ROC-анализе свидетельствовало об отличном качестве модели (AUC = 0,975). Что касается пациенток, у которых было диагностировано отсутствие лимфогенного метастазирования, то в 87% случаев (52 чел.) сумма баллов свидетельствовала об отсутствии

Таблица 3. Индексы влияния поликлональных активаторов на продукцию цитокинов клетками опухоли и её микроокружения у больных инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа

Цитокин	Больные с метастазами в лимфатических узлах n = 35; ИВПА (Me; Q _{0,25} ; Q _{0,75}) у.е.	Больные без метастазов в лимфатических узлах n = 60; ИВПА (Me; Q _{0,25} ; Q _{0,75}) у.е.	P
IL-2	1,00 (0,68; 2,00)	2,00 (1,00; 4,55)	0,025*
IL-4	0,82 (0,57; 1,22)	1,10 (0,87; 2,14)	0,079
IL-6	1,45 (0,82; 2,73)	2,07 (1,04; 2,74)	0,186
IL-8	1,45 (0,85; 2,93)	1,57 (1,00; 3,19)	0,392
IL-10	1,00 (0,70; 2,20)	1,08 (0,66; 3,25)	0,422
IL-17	1,00 (0,71; 1,60)	1,59 (0,98; 4,45)	0,031*
IL-18	1,16 (0,60; 2,81)	1,77 (0,97; 3,29)	0,184
IL-1β	4,71 (0,74; 15,09)	6,17 (2,47; 22,62)	0,110
IL-1Ra	0,99 (0,68; 1,86)	1,23 (0,88; 2,63)	0,279
TNF-α	1,00 (0,59; 5,00)	1,51 (0,82; 4,60)	0,670
IFN-γ	1,08 (0,72; 2,53)	1,00 (0,68; 2,76)	0,734
G-CSF	1,47 (0,94; 3,16)	1,32 (0,96; 4,72)	0,571
GM-CSF	2,38 (0,95; 7,94)	2,32 (1,08; 6,15)	0,716
VEGF	0,73 (0,32; 1,16)	0,81 (0,45; 1,39)	0,255
MCP-1	0,95 (0,44; 1,58)	1,04 (0,58; 2,35)	0,165

Таблица 4. Оценка состояния внеклеточного матрикса (ВКМ) в биоптатах опухолей у больных инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа

Исследуемые параметры ВКМ	Больные с метастазами в лимфатических узлах n = 35; (Me; Q _{0,25} ; Q _{0,75}) (в баллах)	Больные без метастазов в лимфатических узлах n = 60; (Me; Q _{0,25} ; Q _{0,75}) (в баллах)	P
Деградация коллагеновых волокон	3,00 (2,00; 3,00)	1,00 (0,00; 2,00)	0,000001*
Изменения тинкториальных свойств коллагеновых волокон	3,00 (1,00; 3,00)	1,00 (0,00; 2,00)	0,000006*
Содержание нейтральных гликопротеинов	2,00 (1,00; 3,00)	1,00 (0,00; 2,00)	0,001*
Содержание сульфатированных гликозаминогликанов	1,00 (1,00; 2,00)	1,00 (0,00; 1,00)	0,005*
Инфильтрация внеклеточного матрикса иммунокомпетентными клетками	2,00 (1,00; 2,00)	1,00 (0,00; 1,00)	0,000004*
Отек в зоне инфильтрации внеклеточного матрикса иммунокомпетентными клетками	2,00 (1,00; 3,00)	1,00 (0,00; 2,00)	0,000005*
Нейтральные гликопротеины в стенках кровеносных сосудов	2,00 (1,00; 3,00)	0,00 (0,00; 1,00)	0,000003*
Сумма баллов	13,00 (12,00; 16,00)	7,00 (4,75; 9,00)	0,000000000003*

метастазов, а в 13% (8 чел.) – соответствовала их наличию. По предложенному соотношению ИВПА: IL-6 x IL-1β/IL-1Ra группу из этих 8 человек можно разделить на 2 подгруппы: в половине случаев это соотношение свидетельствовало о наличии метастазов в лимфатических узлах. В связи с этим уместно привести сведения о мета-анализе, в котором приняли участие 150000 женщин, больных нематастатическим раком молочной железы; у 30% из них, даже на фоне адьювантной (послеоперационной) терапии в дальнейшем развивались метастазы [22]. Поэтому не исключено, что именно те пациентки, которые по состоянию ВКМ и предложенному

соотношению ИВПА IL-6 x IL-1β/IL-1Ra показали наличие метастазов, могут составить группу риска по лимфогенному метастазированию в послеоперационном периоде.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Полученные результаты показали, что состояние ВКМ и продукция цитокинов ИКК крови, опухолью и её микроокружением непосредственно связаны с опухолевой прогрессией. ВКМ служит не только резервуаром цитокинов и факторов роста, но и источником биоактивных пептидов, а также сигналов повреждения, модулирующих иммунные

ответы [23]. В процессе ремоделирования ВКМ образуются так называемые “матрикины”, являющиеся хемоаттрактантами с провоспалительным действием, сходным с таковым у цитокинов [24]. Полученные в результате деградации коллагена пептиды, содержащие последовательность RGR, являются структурными гомологами IL-8, CXCL1 и CXCL2 и хемоаттрактантами для нейтрофилов, а полученные из эластина матрикины, содержащие последовательность VGVARG, являются хемоаттрактантами для фибробластов и моноцитов, а также индукторами экспрессии MMPs [23, 24]. Не исключено, что спонтанная продукция цитокинов клетками опухоли и её микроокружения сопряжена с деградацией коллагена. Таким образом, ВКМ и ИКК связаны двусторонними взаимодействиями, в которых ВКМ является не просто “мишенью” для воздействия ИКК, но и сам способен отвечать на их влияние.

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.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Libson S., Lippman M. (2014) *Int. Rev. Psychiatry*, **26**(1), 4-15.
2. Korpos E., Wu C., Song J. (2010) *Cell Tissue Res.*, **339**(47), 47-57.
3. Zhu J., Xiong G., Trinkle C., Xu R. (2014) *Histol. Histopathol.*, **29**(9), 1083-1092.
4. Bates J.P., Derakhshandeh R., Jones L., Webb T.J. (2018) *BMC Cancer*, **18**, 556. DOI:10.1186/s12885-018-4441-3.
5. Esquivel-Velazquez M., Ostoa-Saloma P., Palacios-Arreola M.I., Nava-Castro K.E., Castro J.I., Morales-Montor J. (2015) *J. Interferon Cytokine Res.*, **35**(1), 1-16.
6. Kaushik S., Pickup M.W., Weaver V.M. (2016) *Cancer Metastasis Rev.*, **35**(4), 655-667.
7. Insua-Rodriguez J., Oskarsson T. (2016) *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **1**(97), 41-55.
8. Koh J., Kim M. (2019) *Kor. J. Radiol.*, **20**(1), 69-82.
9. Рыжикова С.Л., Дружинина Ю.Г., Рябичева Т.Г., Вараксин Н.А. (2011) *Клин. Лаб. Диагн.*, №11, 49-53. [Ryzhikova S.L., Druzhinina Yu.G., Ryabicheva T.G., Varaksin N.A. (2011) *Klin. Lab. Diagn.*, №11, 49-53.]
10. Sosnina A.V., Autenshlyus A.I., Velikaya N.V., Varaksin N.A., Rukhovichnikov M.Y., Mikhailova E.S., Morozov D.V., Fursov S.A., Agarina N.V. (2011) *Med. Imm.*, **13**(2-3), 197-204.
11. Prento P. (2009) *Biotech Histochem.*, **84**(4), 139-158.
12. Kazlouskaya V., Malhotra S., Lambe J., Idriss M.H., Elston D., Andres C. (2013) *J. Cutan Pathol.*, **40**(2), 211-225.
13. Cathro H.P., Shen S.S., Truong L.D. (2018) *Semin. Diagn. Pathol.*, **35**(6), 360-369.
14. Khoury T., Malik D., Fan C., Tan D., Kulkarni S. (2010) *Arch. Pathol. Lab Med.*, **134**(10), 1513-1519.
15. Mongiat M., Andreuzzi E., Tarticchio G., Paulitti A. (2016) *Int. J. Mol. Sci.*, **17**(11), 1822.
16. Соснина А.В., Великая Н.В., Вараксин Н.А., Гришаев М.П., Аутеншлюс А.И. (2014) Роль цитокинов в патогенезе злокачественных новообразований. Новосибирск: Offset, 128 с. [Sosnina A.V., Velikaya N.V., Varaksin N.A., Grishaev M.P., Autenshlyus A.I. (2014) in: *The role of cytokines in the pathogenesis of malignant neoplasms*. Novosibirsk: Offset, 128 p.]
17. Abana C.O., Bingham B.S., Cho J.H., Graves A.J., Koyama T., Pilarski R.T., Chakravarthy A.B., Xia F. (2017) *PLoS One*, **12**(7), e0181725. DOI:10.1371/journal.pone.0181725.
18. Thirkettle S., Decock J., Arnold H., Pennington C.J., Jaworski D.M., Edwards D.R. (2013) *J. Biol. Chem.*, **288**(23), 16282-16294.
19. Mendez-Garcia L.A., Nava-Castro K.E., Ochoa-Mercado T.L., Palacios-Arreola M.I., Ruiz-Manzano R.A., Segovia-Mendoza M., Solleiro-Villavicencio H., Cazarez-Martinez C., Morales-Montor J. (2019) *J. Interferon Cytokine Res.*, **39**(1), 39-55.
20. Li X., Lu P., Li B., Zhang W., Yang R., Chu Y., Luo K. (2017) *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **87**, 1-7.
21. Welte T., Xiang Z. (2015) *Mediators Inflamm.*, **2015**, 804347. DOI:10.1155/2015/804347.
22. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) (2005) *Lancet*, **365**(9472), 1687-1717.
23. Boyd D.F., Thomas P.G. (2017) *Cytokine*, **98**, 79-86.
24. Tomlin H., Piccinini A.M. (2018) *Immunology*, **155**(2), 186-201.

Поступила в редакцию: 15. 08. 2019.
 После доработки: 17. 09. 2019.
 Принята к печати: 18. 09. 2019.

**CYTOKINE PRODUCTION BY BLOOD IMMUNE CELLS, TUMOR
AND ITS MICROENVIRONMENT, CHARACTERISTIC OF EXTRACELLULAR MATRIX
IN PATIENTS WITH INVASIVE DUCTAL CARCINOMA OF NO SPECIAL TYPE**

A.I. Autenshlyus^{1,2}, K.I. Davletova¹, A.A. Studenikina¹, E.S. Mikhaylova^{1,2},
N.A. Varaksin³, I.P. Zhurakovskiy^{1,2}, A.V. Proskura², S.V. Sidorov¹, V.V. Lyakhovich²*

¹Novosibirsk State Medical University,

52 Krasnyi ave., Novosibirsk, 630091 Russia; *e-mail: lpciip@211.ru

²Institute of Molecular Biology and Biophysics, 2/12 Timakov str., Novosibirsk, 630117 Russia

³JSC “Vector-Best”, Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559 Russia

⁴Novosibirsk State University, 2 Pirogova str., Novosibirsk, 630090 Russia

The aim of this research was to study cytokine production by blood immune cells, tumor, and its microenvironment, and characterize extracellular matrix of patients with invasive ductal carcinoma of no special type and lymphatic metastases. Spontaneous and polyclonal activators stimulated production of cytokines by blood immune cells, tumor and its microenvironment were studied in 95 patients with invasive ductal carcinoma of no special type. The concentration of IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1 β , IL-1Ra, TNF- α , IFN- γ , G-CSF, GM-CSF, VEGF and MCP-1 was determined by the solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. The condition of fibrous component and presence of neutral glycoproteins and sulfated glycosaminoglycans were evaluated during the research of extracellular matrix. Regional lymphatic metastases were detected in 35 of 95 patients. It was shown that in the presence or absence of lymphatic metastases index of polyclonal activators influence on the production of cytokines by blood immune cells was different for IL-6, IL-8, and IL-1 β ; while in the case of cytokine production by tumor and its microenvironment the index of influence was different for IL-2 and IL-17. The presence of lymphatic metastases corresponded with the rise of cytokines spontaneous production, while the absence of lymphatic metastases corresponded with the rise of cytokines production stimulated by polyclonal activators. The value of indices of polyclonal activators influence on the production of cytokines by blood immune cells pointed to the highly stimulating effect of polyclonal activators while the value of indices of polyclonal activators influence on cytokines production by tumor and its microenvironments pointed to the low and sometimes even absent effect of polyclonal activators. Basing on these data we propose a ratio of indices of polyclonal activators influence for better evaluation of the probability of lymphatic metastases during preoperative period. After characterizing extracellular matrix we found out a point threshold, which, in 100% of cases, predicted the presence of lymphatic metastases basing on the condition of extracellular matrix. Using the data acquired, we are proposing a risk group for metastasis among women with no lymphatic metastases in the moment of check-up.

Key words: cytokines; polyclonal activators; extracellular matrix; breast cancer

Funding. This research was financially supported by the State Assignment of Ministry of Health of the Russian Federation (№ AAAA-A18-118030790008-7).

Received: 15.08.2019, revised: 17.09.2019, accepted: 18.09.2019.