

©Коллектив авторов

ЛИПИДОМНЫЕ МАРКЕРЫ ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А.О. Токарева^{1}, Н.Л. Стародубцева^{1,2}, В.В. Чаговец¹,
В.В. Родионов¹, В.В. Кометова¹, К.С. Чингин³, В.Е. Франкевич¹*

¹Национальный медицинский исследовательский центр
акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова,
117513, Москва, ул. академика Опарина, 4 стр. 2; *эл. почта: alisa.tokareva@phystech.edu

²Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе Федерального исследовательского
центра химической физики им. Н.Н. Семенова Российской Академии Наук, 119334, Москва

³Jiangxi Key Laboratory for Mass Spectrometry and Instrumentation, East China University of Technology,
Nanchang 330013, P. R. China

Исследование механизмов прогрессирования рака, а также влияние опухолевой прогрессии на метаболизм опухолевых клеток и метаболизм клеток микроокружения опухоли является важным элементом для разработки препаратов для целевой терапии рака. В данной работе исследовали изменение липидного профиля опухолевых тканей и пограничных тканей опухоли, ассоциированное со следующими клинико-морфологическими характеристиками: размер опухоли, стадия рака, мультифокальность, степень дифференцировки опухоли, число узлов, затронутых процессом регионарного метастазирования, Ноттингемский прогностический индекс, суммарный балл злокачественности, уровень белка Ki67. Липидное профилирование выполнено при помощи обратно-фазового хромато-масс-спектрометрического анализа липидного экстракта тканей с идентификацией липидов по характерным фрагментам. В опухолевой ткани было выделено 13 липидов, которые статистически значимо коррелировали не менее чем с пятью клинико-морфологическими характеристиками. Восемь из 13 липидов относились к классу фосфатидилхолинов. В пограничной ткани 13 липидов статистически значимо коррелировали не менее чем с пятью клинико-морфологическими характеристиками, которые относились к окисленным липидам (4 соединения), сфингомиелинам (4 соединения) и фосфатидилэтаноламинам (4 соединения). Выявлена корреляция липидного профиля окружающих тканей ("опухолевое поле") с размером и стадией опухоли, степенью дифференцировки, числом метастатических аксиллярных лимфоузлов, Ноттингемским прогностическим индексом. Липидный профиль первичной опухоли коррелировал с размером и степенью дифференцировки опухоли, суммарным баллом злокачественности, числом метастатических аксиллярных лимфоузлов.

Ключевые слова: масс-спектрометрия; липидомика; рак молочной железы; микроокружение опухоли; прогрессирование рака

DOI: 10.18097/PBMC20226802144

ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее актуальной проблемой современной онкологии. Согласно данным GLOBOCAN (совместного проекта Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и Международного агентства исследований рака (IARC)) в 2018 г. в мире было зарегистрировано более 2 млн. больных РМЖ [1]. На долю РМЖ приходится 25,2% случаев злокачественных новообразований (ЗНО) у женщин. В Российской Федерации в 2018 г. было выявлено 73918 новых случая РМЖ [2].

В процессы, связанные с прогрессированием новообразований, помимо клеток опухоли, вовлечены и клетки микроокружения, к которым относятся инфильтрирующие опухоль лимфоциты, естественные клетки-киллеры, ассоциированные с опухолью макрофаги [3, 4]. В статье Giallourou и соавт. было продемонстрировано влияние злокачественной опухоли молочной железы на липидный профиль здоровых тканей, выражающееся в росте уровня лизофосфатидилхолинов и окисленных

эфиров жирных кислот при падении уровня церамидов, диацилглицеролов, фосфатидилхолинов и фосфатидилэтаноламинов непосредственно в опухолевой ткани [5]. Изучение и учёт характера метаболических изменений в опухолевом микроокружении являются необходимыми для разработки таргетной раковой терапии [6, 7]. Жидкостная хромато-масс-спектрометрия (ЖХ-МС) является эффективным методом молекулярного профилирования, позволяющим эффективно производить поиск соединений-потенциальных маркеров [8, 9]. В данной работе был произведён корреляционный анализ клинических параметров опухоли с липидным профилем опухолевой ткани и липидным профилем пограничной с опухолью ткани.

МЕТОДИКА

В работе было исследовано по 86 образцов пограничной с опухолью ткани молочной железы (опухолевое поле) и непосредственно опухолевой ткани молочной железы, полученных в ходе

операций по удалению опухолей, проводимых на базе Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова. Сбор образцов производили на протяжении одного года (2018-2019 г.г.). Образцы тканей замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C до ЖХ-МС анализа, выполненного в конце 2019 г. Средний возраст пациентов составил 56 лет (37-80 лет). 20 пациенток имели стадию $T_1N_0M_0$, 20 — $T_2N_0M_0$, 10 имели стадию $T_1N_1M_0$, 24 — $T_2N_1M_0$, 8 — $T_2N_2M_0$, 4 — $T_2N_3M_0$. Клинико-морфологическая характеристика опухолей приведена в таблице 1.

Липиды из тканей выделяли методом Фолча [10]. Разделение липидных экстрактов осуществляли методом жидкостной хроматографии на Dionex UltiMate 3000 Thermo Scientific с использованием обратно-фазовой колонки Zorbax C18 (длина 15 см, внутренний диаметр 2,1 мм, размер частиц 5 мкм, “Agilent”, США) и следующих элюентов, подаваемых со скоростью потока 35 мкл/мин с поддерживаемой температурой колонки 50°C , в качестве подвижной фазы: элюент А — ацетонитрил/вода (60/40, о/о) с добавлением 0,1% муравьиной кислоты и 10 мМ формиата аммония; элюент В — ацетонитрил/изопропанол/вода, (90/8/2, о/о/о), с добавлением 0,1% муравьиной кислоты и 10 мМ формиата аммония. Состав подвижной фазы в ходе анализа изменялся следующим образом:

0-0,5 мин — 30% В, до 20-ой минуты объёмная доля элюента В росла до 99% и сохраняла значение до 30-ой минуты и за полминуты возвращалась к значению 30%. МС анализ производили с использованием прибора Maxis Impact (“Bruker”, США) со следующими настройками: диапазон 100-1800 m/z с напряжением на капилляре 4,1 кВ в режиме положительных ионов и 3,0 в режиме отрицательных ионов, давлением распыляющего газа 0,7 бар, скорости потока осушающего газа 6 л/мин и температурой 200°C . Тандемный МС анализ производили зависимым сканированием, с энергией столкновения 35 эВ, окном изоляции 5 Да и временем исключения 2 мин.

Данные, полученные в ходе анализа в виде .d файлов, преобразовывали в формат MzXml посредством программного обеспечения msConvert (Proteowizard, 3.0.9987) и преобразовывали с использованием алгоритма, предоставленного Koelmel [11], программного обеспечения MzMine [12]. Идентификацию липидов осуществляли программой Lipid Match [11]. Номенклатуру ионов использовали согласно Lipid Maps терминологии в сокращённой форме записи [13]. Был проведён поиск корреляций уровня липидов в образцах пограничных тканей и первичной опухоли с размером опухоли, количеством опухолевых узлов, степенью дифференцировки, суммарным баллом злокачественности [14], Ноттингемским прогностическим индексом [15],

Таблица 1. Клинико-морфологическая характеристика опухолей

Параметр	Значение
Размер опухоли, см	2,68 (1,3–10,0)
Количество опухолевых узлов (мультифокальность)	1 (70; 81%) 2 (10; 12%) 3 (6; 7%)
Гистологические варианты	Неспецифический (24; 28%) Лобулярный (16; 19%) Смешанный (34; 40%) Специфический (12; 14%)
Подтипы	Люминальный А (32; 38%) Люминальный В, Her2 негативный (42; 49%) Люминальный В, Her2 позитивный (2; 3%) Нелюминальный, Her2 позитивный (2; 3%) Тройной негативный (8; 9%)
Степень дифференцировки, G	1 (6; 7%) 2 (46; 53%) 3 (34; 40%)
Суммарный балл злокачественности	14,6 (8–18)
Ноттингемский прогностический индекс	4,6 (2,3–7)
Число метастазов в регионарные лимфоузлы	2,3 (0–16)
Стадия рака	I (20; 23%) IIa (28; 32%) IIb (22; 25%) IIIa (8; 9%) IIIc (8; 9%)
Эстрогеновые рецепторы	есть (76; 88%) нет (10; 12%)
Прогестероновые рецепторы	есть (62; 72%) нет (24; 28%)
Уровень Ki67	34,6 (5–98)

Примечание. Описание распространённости категориальных клинико-морфологических параметров дано в формате (N; P), где N — число пациентов, имеющих заданное категориальное значение параметра, P — процентная доля числа пациентов с заданным категориальным значением параметра относительно всей выборки.

числом метастазов в регионарные лимфоузлы, стадией рака, уровнем экспрессии Ki67 с использованием теста Спирмена и граничным значением статистической значимости 0,05. Различия в липидном профиле пациентов, связанные с гистологической группой опухоли и её подтипом, были проанализированы с использованием теста Крускалла-Уоллиса с граничным значением статистической значимости 0,05. Для обработки данных использовали возможности языка R 3.4.1 в свободно распространяемой среде RSudio версии 1.4.1717.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследования обнаружена статистически значимая корреляция с размером опухоли для 64 липидов в пограничной ткани и 85 липидов в опухолевой ткани в режиме положительных ионов и для 90 липидов в пограничной ткани и 88 липидов в опухолевой ткани в режиме отрицательных ионов. При этом 75 липидов, которые относятся к церамидам, кардиолипинам, (лизо)фосфатидилхолинам, фосфатидилэтаноламинам, липидам с простой эфирной связью и сфингомиелинам, и в пограничных, и в опухолевых тканях продемонстрировали статистически значимую положительную корреляцию с размером опухоли, а уровни TG 14:1_14:1_16:1 и в пограничных тканях, и в опухолевых падали при росте опухоли (дополнительные материалы 1 табл. 1). В пограничных и опухолевых тканях выявлена выраженная положительная корреляция уровней церамидов, диацилглицеролов, моногалактозилдиацилглицеролов, фосфатидилхолинов, фосфатидилэтаноламинов, липидов с простой эфирной связью, фосфатидилинозитолов, сфингомиелинов с размером опухоли (дополнительные материалы 2). В таблице 2 приведены липиды, чьи уровни продемонстрировали умеренную корреляцию ($R > 0,4$) с размером опухоли.

Для 87 липидов в пограничной ткани и 15 липидов в опухолевой ткани в режиме положительных ионов и для 87 липидов в пограничной ткани и 6 липидов в опухолевой ткани в режиме отрицательных ионов была обнаружена статистически значимая корреляция со стадией заболевания. При этом 10 липидов имели положительную корреляцию и в пограничной, и в опухолевой ткани; TG 16:1_16:1_18:3 отрицательно коррелировали со стадией заболевания и в пограничной, и в опухолевой ткани. Знаки коэффициента корреляции 3 сфингомиелинов в пограничной и в опухолевой ткани различались: “+” в пограничной ткани, “-” в опухолевой ткани (дополнительные материалы 1 табл. 1). Можно говорить о положительной связи уровней церамидов, диацилглицеролов, фосфатидилэтаноламинов и фосфатидилхолинов с простой эфирной связью, моногалактозилдиацилглицеролов, кардиолипинов, сфингомиелинов и фосфатидилхолинов (за исключением отдельных соединений) в пограничной с опухолью ткани со стадией опухолевого процесса (дополнительные материалы 2). В таблице 3 приведены липиды, умеренно коррелирующие со стадией заболевания ($R > 0,4$).

Таблица 2. Коэффициенты корреляций уровней липидов в пограничной ткани и в опухолевой ткани с размером опухоли (R), доверительный интервал (ДИ), вероятность равенства коэффициента корреляции нулю (значение p)

Липид	R	ДИ	p
пограничная ткань			
Cer-NS d18:1/22:0	0,47	0,29 – 0,62	<0,001
Cer-NS d18:1/24:0	0,43	0,23 – 0,59	<0,001
DG 18:0_18:1	0,43	0,24 – 0,59	<0,001
DG 18:1_20:0	0,45	0,26 – 0,60	<0,001
DG 18:1_22:1	0,41	0,21 – 0,57	<0,001
MGDG 20:2_20:2	0,49	0,30 – 0,63	<0,001
OxPC 20:3_18:2(OOO)	0,47	0,29 – 0,62	<0,001
PC 16:0_20:1	0,54	0,37 – 0,68	<0,001
PC 18:1_20:0	0,47	0,28 – 0,62	<0,001
PC O-18:1/18:2	0,45	0,26 – 0,61	<0,001
SM d18:1/22:0	0,45	0,26 – 0,60	<0,001
SM d20:0/18:1	0,42	0,22 – 0,58	<0,001
SM d22:0/18:1	0,44	0,25 – 0,60	<0,001
SM d22:0/20:1	0,47	0,28 – 0,62	<0,001
TG 10:0_18:1_18:3	0,43	0,24 – 0,59	<0,001
опухолевая ткань			
HexCer-NDS d18:0/16:1	0,43	0,23 – 0,59	<0,001
PC 14:0_16:0	0,45	0,26 – 0,61	<0,001
PC O-16:1/18:0	0,42	0,22 – 0,58	<0,001
PC O-18:0/16:0	0,42	0,22 – 0,58	<0,001
PC O-18:1/18:0	0,43	0,23 – 0,59	<0,001
PE 18:0_20:4	0,42	0,23 – 0,59	<0,001
PS 18:0_18:1	-0,44	-0,59 – -0,24	<0,001

Таблица 3. Коэффициенты корреляций уровней липидов в пограничной ткани со стадией заболевания (R), доверительный интервал (ДИ), вероятность равенства коэффициента корреляции нулю (значение p)

Липид	R	ДИ	p
Cer-NS d16:1/24:1	0,42	0,23 – 0,58	<0,001
Cer-NS d18:1/22:0	0,46	0,27 – 0,61	<0,001
CL 18:0_18:1_18:2_18:3	0,41	0,21 – 0,57	<0,001
CL 18:1_18:1_22:6_22:6	0,43	0,23 – 0,59	<0,001
CL 20:2_20:2_20:2_22:6	0,48	0,29 – 0,63	<0,001
DG 18:0_18:1	0,48	0,30 – 0,63	<0,001
OxCL 16:0_20:4_22:5_22:5(OOH)	0,45	0,26 – 0,60	<0,001
OxPC 20:3_18:2(OOO)	0,45	0,26 – 0,61	<0,001
PC 16:0_20:1	0,44	0,25 – 0,60	<0,001
PC 18:1_20:0	0,41	0,22 – 0,58	<0,001
PC O-16:0/20:3	0,43	0,23 – 0,59	<0,001
PC O-16:0/20:4	0,42	0,22 – 0,58	<0,001
PC O-16:1/18:1	0,44	0,25 – 0,60	<0,001
PC O-16:1/18:2	0,48	0,30 – 0,63	<0,001
PC O-18:1/18:2	0,46	0,27 – 0,61	<0,001
PC O-18:1/18:2	0,51	0,34 – 0,66	<0,001
PC P-16:0/18:1	0,42	0,23 – 0,58	<0,001
SM d16:0/16:0	0,53	0,36 – 0,67	<0,001
SM d18:1/20:0	0,41	0,21 – 0,57	<0,001
SM d18:1/22:0	0,52	0,34 – 0,66	<0,001
SM d20:0/18:1	0,47	0,29 – 0,63	<0,001
SM d20:1/16:0	0,41	0,21 – 0,57	<0,001
SM d22:0/18:1	0,47	0,28 – 0,62	<0,001
SM d22:1/18:1	0,43	0,24 – 0,59	<0,001
TG 10:0_18:1_18:3	0,53	0,36 – 0,67	<0,001

Для 38 липидов в пограничной ткани и 71 липида в опухолевой ткани в режиме положительных ионов и для 4 липидов в пограничной ткани и 34 липидов в опухолевой ткани в режиме отрицательных ионов была обнаружена статистически значимая корреляция с суммарным баллом злокачественности (TMS). При этом для липидов PC 14:0_18:4, PC 16:0_18:4 выявлена положительная корреляция и в пограничной, и в опухолевой тканях; для 14 липидов, большая часть которых относятся к триацилглицеролам, выявлена отрицательная корреляция и в пограничной, и в опухолевых тканях (дополнительные материалы 1 табл. 1). Выявлена преимущественно отрицательная корреляция уровней моногалактозилдиацилглицеролов, триацилглицеролов, сфингомиелинов в пограничной с опухолью ткани с TMS и отрицательная корреляция уровней церамидов, диацилглицеролов, фосфатидилэтаноламинов, сфингомиелинов и триацилглицеролов, а также положительная корреляция уровней фосфатидилхолинов в опухолевой ткани с TMS (дополнительные материалы 2). В таблице 4 приведены липиды, умеренно коррелирующие с TMS ($R>0,4$).

Таблица 4. Коэффициенты корреляций уровней липидов в опухолевой ткани с суммарным баллом злокачественности (R), доверительный интервал (ДИ), вероятность равенства коэффициента корреляции нулю (значение p)

Липид	R	ДИ	p
DG 18:0_20:3	-0,47	-0,60 – -0,26	<0,001
PE 18:1_20:1	-0,45	-0,57 – -0,23	<0,001

Для 31 липида в пограничной ткани и 66 липидов в опухолевой ткани в режиме положительных ионов и для 13 липидов в пограничной ткани и 52 липидов в опухолевой ткани в режиме отрицательных ионов была обнаружена статистически значимая корреляция со степенью дифференцировки опухоли. При этом для 16 липидов, большая часть которых относятся к фосфатидилхолинам, выявлена положительная корреляция уровней и в пограничной, и в опухолевой ткани обнаружена в случае MGDG 18:3_22:0, PC 18:0_20:5, TG 14:1_16:1_18:2. (дополнительные материалы 1 табл. 1). Выявлена положительная корреляция уровней фосфатидилхолинов, липидов с простой эфирной связью, фосфатидилэтаноламинов и кардиолипинов со степенью дифференцировки опухоли (дополнительные материалы 2). В таблице 5 приведены липиды, умеренно коррелирующие со степенью дифференциации опухоли ($R>0,4$).

Для 52 липидов в пограничной ткани и 76 липидов в опухолевой ткани в режиме положительных ионов и для 20 липидов в пограничной ткани и 29 липидов в опухолевой ткани в режиме отрицательных ионов была обнаружена статистически значимая корреляция с уровнем Ki67. При этом уровни 9 липидов, преимущественно относящихся к классу фосфатидилхолинов, росли в пограничной и опухолевой тканях, уровни 9 липидов падали

Таблица 5. Коэффициенты корреляций уровней липидов в пограничной ткани и в опухолевой ткани со степенью дифференцировки опухоли (R), доверительный интервал (ДИ), вероятность равенства коэффициента корреляции нулю (значение p)

Липид	R	ДИ	p
пограничная ткань			
HexCer-NDS d18:0/16:1	-0,51	-0,66 – -0,34	<0,001
PC 16:0_18:4	0,41	0,21 – 0,57	<0,001
опухолевая ткань			
PS 18:0_18:1	-0,49	-0,64 – -0,31	<0,001
OxPC 16:0_20:3(1O)	0,54	0,37 – 0,67	<0,001
PC 14:0_14:0	0,48	0,30 – 0,63	<0,001
PC 14:0_16:1	0,54	0,36 – 0,67	<0,001
PC 14:0_18:2	0,51	0,33 – 0,65	<0,001
PC 14:0_18:4	0,56	0,39 – 0,69	<0,001
PC 16:0_16:1	0,58	0,42 – 0,71	<0,001
PC 16:0_18:0	0,42	0,23 – 0,58	<0,001
PC 16:0_18:4	0,61	0,45 – 0,73	<0,001
PC 16:1_18:2	0,42	0,23 – 0,58	<0,001
PC 16:1_18:2	0,42	0,22 – 0,58	<0,001
PC 16:1_18:4	0,52	0,35 – 0,66	<0,001
PC 16:1_20:5	0,41	0,21 – 0,57	<0,001
PC O-16:0/20:4	0,41	0,22 – 0,58	<0,001
PC P-22:1/18:1	0,42	0,22 – 0,58	<0,001
PE 16:0_16:1	0,57	0,41 – 0,70	<0,001
PG 16:0_22:6	0,47	0,28 – 0,62	<0,001
PI 16:0_20:3	0,51	0,33 – 0,65	<0,001

в пограничной и опухолевой тканях с увеличением уровня Ki67 (дополнительные материалы 1 табл. 1). Выявлена выраженная отрицательная корреляция уровней диацилглицеролов, триацилглицеролов, сфингомиелинов и положительной корреляции фосфатидилхолинов в опухолевой ткани и выраженной отрицательной корреляции уровней кардиолипинов, липидов с простой эфирной связью, фосфатидилэтаноламинов и церамидов в пограничных тканях с уровнем Ki67 (дополнительные материалы 2). В таблице 6 приведены липиды, умеренно коррелирующие с уровнем Ki67 ($R>0,4$).

Для 37 липидов в пограничной ткани и 44 липидов в опухолевой ткани в режиме положительных ионов и для 60 липидов в пограничной ткани и 26 липидов в опухолевой в режиме отрицательных ионов была установлена корреляция с числом метастазов в регионарные лимфоузлы. При этом для 4 липидов было зафиксировано повышение уровня в обоих типах тканей, для 11 липидов, относящихся в основном к фосфатидилхолинам и сфингомиелинам, рост уровня в пограничных тканях и падение в опухолевых при увеличении числа метастазов в регионарные лимфоузлы (дополнительные материалы 1 табл. 1). Выявлен преимущественный рост уровня кардиолипинов, фосфатидилхолинов, липидов с простой эфирной связью и сфингомиелинов в пограничной ткани и падение уровня сфингомиелинов, фосфатидилглицеролов, фосфатидилхолинов в опухолевой ткани при росте числа метастазов в регионарные лимфоузлы (дополнительные материалы 2). Умеренная

ЛИПИДОМНЫЕ МАРКЕРЫ ПРОГРЕССИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Таблица 6. Коэффициенты корреляций уровней липидов в опухолевой и в пограничной тканях с уровнем Ki67 (R), доверительный интервал (ДИ), вероятность равенства коэффициента корреляции нулю (значение *p*)

Липид	R	ДИ	<i>p</i>
пограничная ткань			
HexCer-NDS d18:0/16:1	-0,47	-0,62 – -0,29	<0,001
PC 18:0_18:1	-0,41	-0,57 – -0,21	<0,001
опухолевая ткань			
DG 18:0_20:4	-0,48	-0,64 – -0,30	<0,001
OxPC 16:0_20:3(10)	0,54	0,37 – 0,68	<0,001
PC 14:0_14:0	0,51	0,34 – 0,66	<0,001
PC 14:0_16:0	0,47	0,29 – 0,62	<0,001
PC 14:0_16:1	0,56	0,39 – 0,69	<0,001
PC 14:0_18:2	0,53	0,36 – 0,67	<0,001
PC 14:0_18:3	0,42	0,22 – 0,58	<0,001
PC 14:0_18:4	0,58	0,41 – 0,70	<0,001
PC 16:0_16:1	0,57	0,40 – 0,70	<0,001
PC 16:0_18:4	0,61	0,45 – 0,73	<0,001
PC 16:1_18:2	0,41	0,21 – 0,57	<0,001
PC 16:1_18:4	0,54	0,37 – 0,68	<0,001
PE 16:0_16:1	0,46	0,28 – 0,62	<0,001
PI 16:0_20:3	0,50	0,32 – 0,65	<0,001
PC O-16:0/16:0	0,42	0,23 – 0,59	<0,001
SM d18:1/18:0	-0,51	-0,65 – -0,32	<0,001
SM d18:1/18:1	-0,56	-0,67 – -0,37	<0,001
SM d20:1/16:0	-0,41	-0,57 – -0,22	<0,001

отрицательная корреляция с региональным метастазированием (число аксиллярных метастазов) обнаружена для SM d18:2/18:3 ($R=0,46$; ДИ -0,62 – -0,28; $p<0,001$).

Для 47 липидов в пограничной ткани и 35 липидов в опухолевой ткани в режиме положительных ионов и для 74 липидов в пограничной ткани и 27 липидов в опухолевой ткани в режиме отрицательных ионов была установлена корреляция с Ноттингемским прогностическим индексом (NPI). При этом, для 19 липидов, относящихся к фосфатидилхолинам, окисленным липидам и фосфатидилэтаноламинам, наблюдался рост уровня, для 3 триацилглицеролов наблюдалось падение уровня и в пограничных, и в опухолевых тканях при росте NPI (дополнительные материалы 1 табл. 1). Выявлена устойчивая положительная корреляция уровней диацилглицеролов, фосфатидилхолинов, кардиолипинов, липидов с простой эфирной связью, сфингомиелинов, фосфатидилинозитолов в пограничной ткани и положительной корреляции уровней фосфатидилхолинов, липидов с простой эфирной связью, фосфатидилэтаноламинов и отрицательной корреляцией уровней триацилглицеролов в опухолевой ткани с ростом NPI (дополнительные материалы 2). В таблице 7 приведены липиды, умеренно коррелирующие с NPI ($R>0,4$).

Обнаружена корреляция между количеством опухолевых узлов и уровнями 49 липидов в пограничной ткани и 50 липидов в опухолевой ткани в режиме положительных ионов и для 20 липидов в пограничной ткани и 18 липидов в опухолевой ткани в режиме отрицательных ионов.

Таблица 7. Коэффициенты корреляций уровней липидов в опухолевой ткани с NPI (R), доверительный интервал (ДИ), вероятность равенства коэффициента корреляции нулю (значение *p*)

Липид	R	ДИ	<i>p</i>
PS 18:0_18:1	-0,42	-0,58 – 0,22	<0,001
PC 16:0_18:4	0,41	0,21 – 0,57	<0,001
PI 16:0_20:3	0,45	0,26 – 0,60	<0,001

При этом для 23 липидов, относящихся в основном к фосфатидилэтаноламинам и окисленным липидам, наблюдается понижение уровня и в опухолевой, и в пограничной тканях, для OxTG 16:0_18:1_8:0(CHO) наблюдается повышение уровня в пограничной ткани и падение уровня в опухолевой ткани при увеличении числа фокусов опухоли. Выявлена положительная корреляция уровней триацилглицеролов и отрицательная корреляция уровней фосфатидилэтаноламинов и окисленных липидов в пограничной ткани и отрицательной корреляции уровней диацилглицеролов, окисленных липидов и фосфатидилэтаноламинов в опухолевой ткани и числа фокусов опухоли (дополнительные материалы 2). Однако соединений с умеренной корреляцией ($R>0,4$) с числом опухолевых узлов обнаружено не было.

Уровень 13 липидов в пограничных тканях коррелирует не менее чем с 5 клинико-морфологическими параметрами опухоли из 8: G, экспрессия Ki67, количество аксиллярных метастазов, число опухолевых фокусов, NPI, стадия заболевания, TMS (рис. 1).

Уровень 13 липидов в опухолевой ткани коррелирует не менее чем с 5 клинико-морфологическими параметрами опухоли из 8: G, экспрессия Ki67, число метастазов, число фокусов, NPI, стадия рака, TMS (рис. 2).

Липиды, выделенные как характеризующие клинико-морфологические характеристики опухоли в пограничной ткани, в наибольшей степени характеризуют стадию рака, процессы метастазирования, уровень Ki67, G, размер опухоли, NPI, TMS, количество фокусов (в порядке убывания). Липиды, выделенные как характеризующие клинико-морфологические характеристики опухоли в опухолевой ткани, в наибольшей степени характеризуют G, уровень Ki67, TMS, NPI, размер опухоли, стадию рака, количество фокусов, процессы метастазирования. Наблюдается выраженная положительная корреляция уровня DG 18:0_20:4 и отрицательная корреляция уровня TG 14:1_16:1_18:2 в опухолевой ткани с липидами-маркерами пограничной ткани (рис. 3). В наибольшей степени с клинико-морфологическими параметрами опухоли в пограничной ткани коррелировали окисленные липиды (4 соединения), сфингомиелины (4 соединения) и фосфатидилэтаноламины (4 соединения), в то время как в опухолевой ткани эти липиды относились к фосфатидилхолинам (8 соединений). 4 соединения, выбранные как в наибольшей степени характеризующие

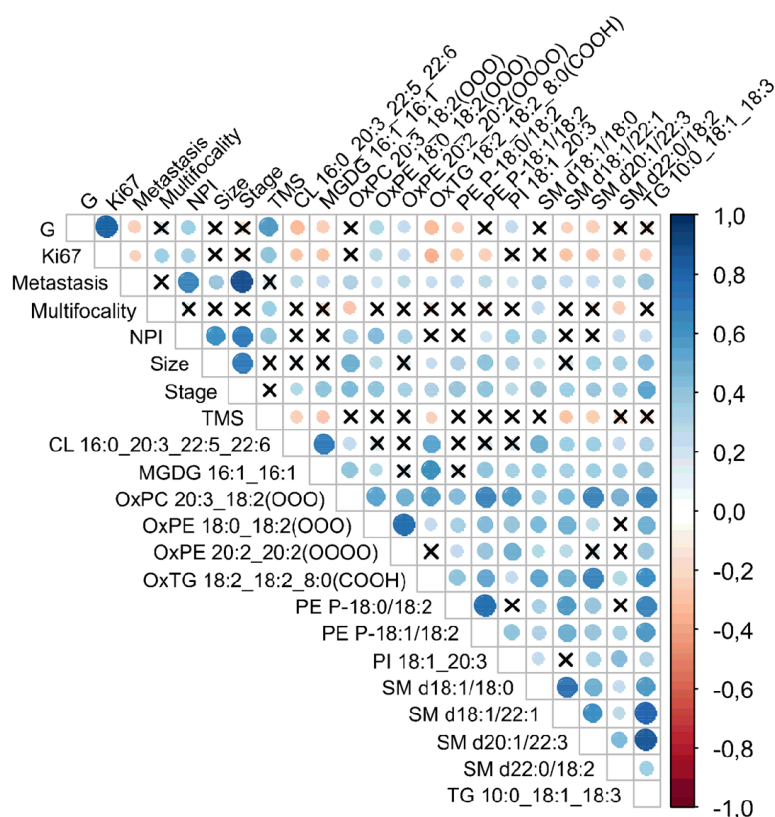


Рисунок 1. Матрица корреляций клинко-морфологических параметров опухоли с уровнем липидов в пограничной с опухолью ткани. Здесь и на рисунке 2: G — степень злокачественности, Ki67 — уровень экспрессии Ki67, Metastasis — количество аксиллярных метастазов, Multifocality — число опухолевых фокусов, NPI — Ноттингемский прогностический индекс, Size — размер опухолевого очага, Stage — стадия заболевания, TMS — суммарный балл злокачественности.

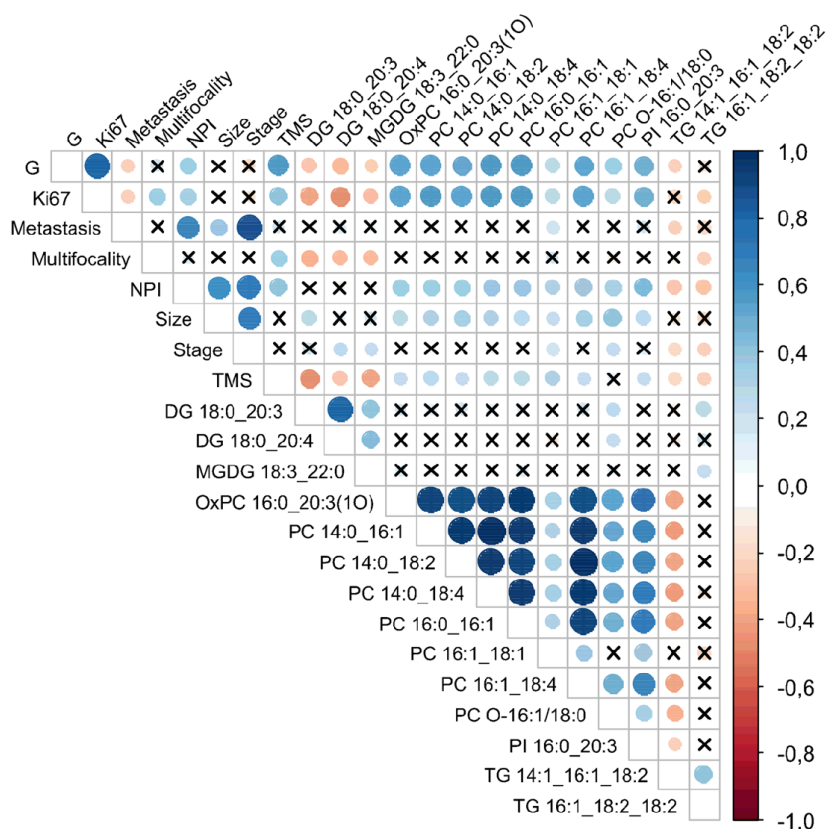


Рисунок 2. Матрица корреляций гистологических параметров опухоли с уровнем липидов в опухолевых тканях.

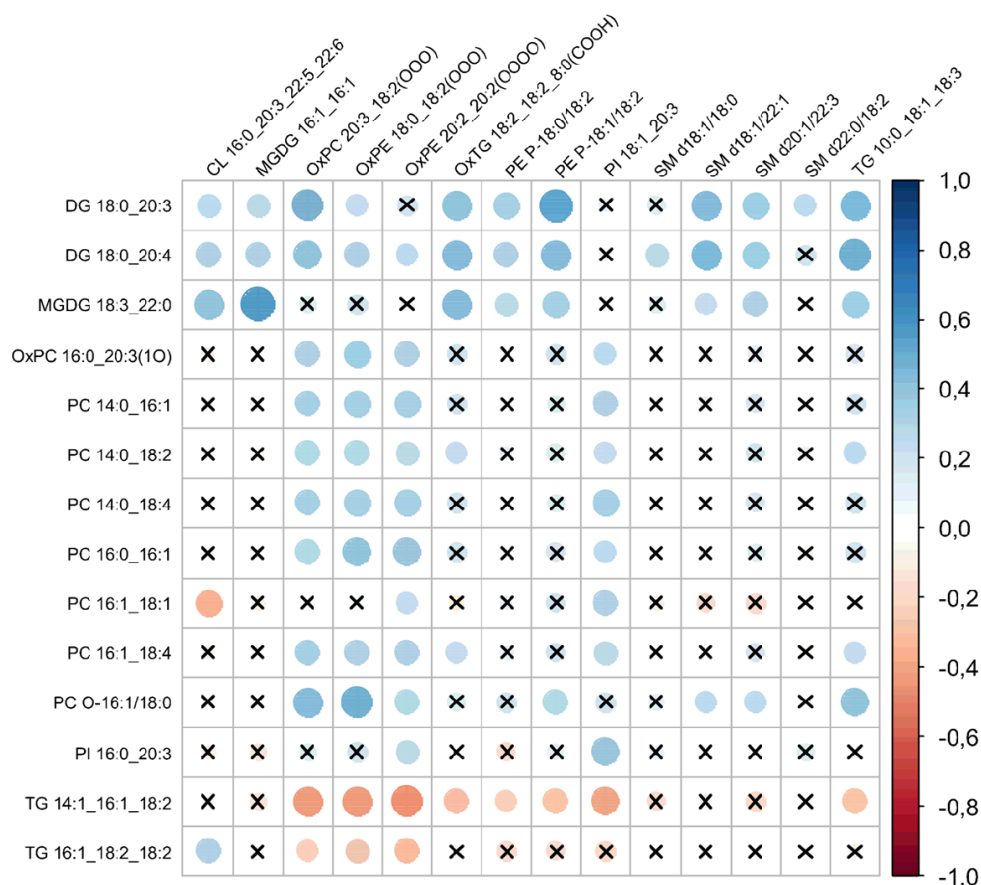


Рисунок 3. Матрица корреляций уровней липидов, связанных с клинико-морфологическими параметрами опухоли в опухолевой ткани (строки) и в пограничной ткани (столбцы).

патологические характеристики опухоли, относились к классу окисленных липидов. В исследованиях показано влияние окисления жирных кислот на противоопухолевый иммунный ответ [16, 17].

NPI и стадия рака являются производными характеристиками: NPI вычисляется на основе информации о размере опухоли, её степени дифференциации и количества метастазов, стадия рака определяется на основе размера опухоли и наличия/количества метастазов. Это относит параметр “стадия рака” к экологической характеристике опухоли, вместе с наличием/числом метастазов и размером опухоли [18, 19]. NPI же является характеристикой, зависящей и от эко-потенциала опухоли, и от эво-потенциала опухоли, так как содержит степени дифференцировки, являющейся эво-характеристикой опухоли, вместе с суммарным индексом злокачественности [18, 19]. Стоит заметить, что влияние эко-характеристик (размер опухоли, число метастаз, стадия рака) в большей мере отразилось на липидном профиле пограничных тканей, в то время как влияние эво-характеристик (степень дифференцировки опухоли и суммарный балл злокачественности) — на липидном профиле опухолевых тканей.

На двух линиях рака прямой кишки был показан статистически значимо более высокий уровень фосфатидилинозитолов, фосфатидиловых кислот, моноацилглицеролов, церамидов, глюкозил- и

лактозил-церамидов и более низкий уровень триацилглицеролов в липидном профиле более агрессивной линии рака [20]. В данном исследовании большая часть указанных выше классов липидов не была выделена в опухолевой ткани как характеризующие агрессивность рака (фосфатидилинозитолы, фосфатидиловые кислоты, моноацилглицеролы, глюкозил и лактозил церамиды), а церамиды имели направление корреляции обратное ожидаемому, если исходить из статьи [20]: их уровень падал при росте TMS, направление изменения уровня триацилглицеролов согласовывалось с результатами [20]: их уровень в опухоли падал при росте значений TMS и NPI. Различия в полученных результатах могут быть связаны с тем, что в работе [20] авторы исследовали ассоциацию изменений липидного профиля с одним конкретным механизмом, связанным с агрессивностью рака: системой репарации ДНК. Была показана положительная корреляция между уровнями лизофосфатидилхолинацилтрансферазы 1 (LPCAT1), участвующей в синтезе фосфатидилхолинов, и характеристиками опухоли: степенью дифференциации, стадией рака, размером опухоли [21, 22]. Это согласуется с полученными в данном исследовании результатами: выраженной корреляцией уровней фосфатидилхолинов со степенью дифференцировки опухоли, TMS и NPI (дополнительные материалы 1 табл. 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Злокачественная опухоль молочной железы, с одной стороны, имеет характерный “липидный портрет”, но, с другой стороны, оказывает влияние на липидный профиль окружающих тканей. Липидный метаболизм опухолевого поля коррелирует с такими клинико-морфологическими характеристиками, как размер первичного опухолевого очага, стадия опухолевого процесса, степень дифференцировки, NPI, число метастатических аксиллярных лимфоузлов. На липидный профиль первичной опухоли оказывают влияние такие параметры, как размер и степень дифференцировки опухоли, TMS, число метастатических аксиллярных лимфоузлов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при совместной финансовой поддержке РФФИ (№ 19-515-55021) и Государственного фонда естественных наук Китая (№ 81961138016).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все клинические исследования проводили в соответствии с принципами, изложенными в Хельсинкской декларации. Все пациенты прочитали и подписали информированное согласие, одобренное этическим комитетом Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени ак. В.И. Кулакова (протокол №9 от 22.11.2018).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Дополнительные материалы доступны в электронной версии статьи на сайте журнала (pbmc.ibmc.msk.ru).

ЛИТЕРАТУРА

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: Cancer J. Clin.*, **68**(6), 394-424. DOI: 10.3322/caac.21492
- Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. (2020) Злокачественные новообразования в России в 2019 году (Заболеваемость и смертность), МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ “НМИЦ радиологии” Минздрава России, Москва, 250 стр. [Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Shakhzadova A.O. (2020) Zlokachestvennyye novoobrazovaniya v Rossii v 2019 godu (Zabolevaemost' i smertnost'), MNIOI P.A. Herzcena — filial FGBU “NMITS radiologii” Minzdrava Rossii, Moskva, 250 p.]
- Annaratone L., Cascardi E., Vissio E., Sarotto I., Chmielik E., Sapino A., Berrino E., Marchiò C. (2020) The multifaceted nature of tumor microenvironment in breast carcinomas. *Pathobiology*, **87**(2), 125-142. DOI: 10.1159/000507055
- Renner K., Singer K., Koehl G.E., Geissler E.K., Peter K., Siska P.J., Kreutz M. (2017) Metabolic hallmarks of tumor and immune cells in the tumor microenvironment. *Front. Immunol.*, **8**, 1-11. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00248
- Giallourou N., Urbaniak C., Puebla-Barragan S., Vorkas P.A., Swann J.R., Reid G. (2021) Characterizing the breast cancer lipidome and its interaction with the tissue microbiota. *Communications Biology*, **4**(1), 1229. DOI: 10.1038/s42003-021-02710-0
- Huang H., Li S., Tang Q., Zhu G. (2021) Metabolic reprogramming and immune evasion in nasopharyngeal carcinoma. *Front. Immunol.*, **12**, 1-18. DOI: 10.3389/fimmu.2021.680955
- Cui M.Y., Yi X., Zhu D.X., Wu J. (2021) Aberrant lipid metabolism reprogramming and immune microenvironment for gastric cancer: A literature review. *Transl. Cancer Res.*, **10**(8), 3829-3842. DOI: 10.21037/tcr-21-655
- Nguyen A., Rudge S.A., Zhang Q., Wakelam M.J. (2017) Using lipidomics analysis to determine signalling and metabolic changes in cells. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **43**, 96-103. DOI: 10.1016/j.copbio.2016.10.003
- Preedy V.R., Patel V.B. (eds.) (2015) in: General Methods In Biomarker Research And Their Applications; Series Abbreviated Title Biomarkers in Disease: Methods, Discoveries and Applications; Springer Dordrecht Heidelberg New York London, **1-2**, 1-1316. DOI: 10.1007/978-94-007-7696-8
- Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**(1), 497-509.
- Koelmel J.P., Kroeger N.M., Ulmer C.Z., Bowden J.A., Patterson R.E., Cochran J.A., Beecher C.W.W., Garrett T.J., Yost R.A. (2017) LipidMatch: An automated workflow for rule-based lipid identification using untargeted high-resolution tandem mass spectrometry data. *BMC Bioinformatics*, **18**(1), 331. DOI: 10.1186/s12859-017-1744-3
- Pluskal T., Castillo S., Villar-Briones A., Orešič M. (2010) MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics*, **11**, 395. DOI: 10.1186/1471-2105-11-395
- Sud M., Fahy E., Cotter D., Brown A., Dennis E.A., Glass C.K., Merrill A.H., Murphy R.C., Raetz C.R.H., Russell D.W., Subramaniam S. (2007) LMSD: LIPID MAPS structure database. *Nucl. Acids Res.*, **35**(Suppl. 1), 527-532. DOI: 10.1093/nar/gkl838
- Кометова В., Занкин В., Хайруллин Р., Родионов В. (2013) Способ прогнозирования пятилетней выживаемости пациенток с инфильтрующим раком молочной железы путем определения суммарного балла злокачественности № 2013156541/15 от 18.12.2013 г. Москва, Федеральная служба по интеллектуальной собственности. [Kometova V., Zankin V., Khajrullin R., Rodionov V. (2013) Method for predicting five-year survival rate in patients with infiltrating breast cancer by determining total score of malignancy, Federal service for intellectual property, No 2013156541/15 of 18.12.2013]
- Haybittle J.L., Blamey R.W., Elston C.W., Johnson J., Doyle P.J., Campbell F.C., Nicholson R.I., Griffiths K. (1982) A prognostic index in primary breast cancer. *Br. J. Cancer*, **45**(3), 361-366. DOI: 10.1038/bjc.1982.62
- Cao W., Ramakrishnan R., Tuyrin V.A., Veglia F., Condamine T., Amoscato A., Mohammadyani D., Johnson J.J., Zhang L.M., Klein-Seetharaman J., Celis E., Kagan V.E., Gabrilovich D.I. (2014) Oxidized lipids block antigen

- cross-presentation by dendritic cells in cancer. *J. Immunol.*, **192**(10), 4935-4935. DOI: 10.4049/jimmunol.1490017
17. Al-Khami A.A., Zheng L., del Valle L., Hossain F., Wyczechowska D., Zabaleta J., Sanchez M.D., Dean M.J., Rodriguez P.C., Ochoa A.C. (2017) Exogenous lipid uptake induces metabolic and functional reprogramming of tumor-associated myeloid-derived suppressor cells. *OncoImmunology*, **6**(10), e1344804. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1344804
 18. Maley C.C., Aktipis A., Graham T.A., Sottoriva A., Boddy A.M., Janiszewska M., Silva A.S., Gerlinger M., Yuan Y., Pienta K.J., Anderson K.S., Gatenby R., Swanton C., Posada D., Wu C.I., Schiffman J.D., Hwang E.S., Polyak K., Anderson A.R.A., Brown J.S., Greaves M., Shibata D. (2017) Classifying the evolutionary and ecological features of neoplasms. *Nat. Rev. Cancer*, **17**(10), 605-619. DOI: 10.1038/nrc.2017.69
 19. Merlo L.M.F., Pepper J.W., Reid B.J., Maley C.C. (2006) Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat. Rev. Cancer*, **6**(12), 924-935. DOI: 10.1038/nrc2013
 20. Peng W., Tan S., Xu Y., Wang L., Qiu D., Cheng C., Lin Y., Liu C., Li Z., Li Y., Zhao Y., Li Q. (2018) LC-MS/MS metabolome analysis detects the changes in the lipid metabolic profiles of dMMR and pMMR cells. *Oncology Reports*, **40**(2), 1026-1034. DOI: 10.3892/or.2018.6510
 21. Du Y., Wang Q., Zhang X., Wang X., Qin C., Sheng Z., Yin H., Jiang C., Li J., Xu T. (2017) Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 upregulation and concomitant phospholipid alterations in clear cell renal cell carcinoma. *J. Exper. Clin. Cancer Res.*, **36**(1), 1-11. DOI: 10.1186/s13046-017-0525-1
 22. Abdelzaher E., Mostafa M.F. (2015) Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1) upregulation in breast carcinoma contributes to tumor progression and predicts early tumor recurrence. *Tumor Biol.*, **36**(7), 5473-5483. DOI: 10.1007/s13277-015-3214-8

Поступила в редакцию: 17. 02. 2022.
После доработки: 10. 03. 2022.
Принята к печати: 11. 03. 2022.

LIPIDOMIC MARKERS OF TUMOR PROGRESS IN BREAST CANCER PATIENTS

A.O. Tokareva^{1*}, N.L. Starodubtseva^{1,2}, V.V. Chagovets¹,
V.V. Rodionov¹, V.V. Kometova¹, K.S. Chingis³, V.E. Frankevich¹

¹Academician V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, 4 bld. 2 Oparina str., Moscow, 117513 Russia; *e-mail: alisa.tokareva@phystech.edu

²V.L. Talrose Institute for Energy Problems of Chemical Physics, N.N. Semenov Federal Center of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

³Jiangxi Key Laboratory for Mass Spectrometry and Instrumentation, East China University of Technology, Nanchang 330013, P. R. China

Research of cancer progression mechanisms and their impact on metabolism of tumor cells and tumor microenvironment cells is an important element in drug development for cancer target therapy. In this study, changes in tumor tissue and margin tissue lipid profiles, were associated with the following clinical and morphological characteristics: tumor size, cancer stage, multifocalite, tumor grade, number of lymph node metastasis, Nottingham prognostic index, total malignancy score, level of Ki67 protein. Lipid profiling was performed by reverse-phase chromat-mass spectrometry analysis of lipid tissue extract with lipid identification by characteristic fragments. In the lipid profile of tumor tissue 13 characteristic lipids were selected. Their levels significantly correlated with at least 5 clinical and morphological features. Eight of 13 belonged to phosphatidylcholines. In lipid profile of tumor microenvironment tissue 13 lipid features were selected. Their levels significantly correlated with at least 5 clinical and morphological features. Four of 13 belonged to oxidized lipids, 4 lipid features belonged to sphingomyelins, four of 13 belonged to phosphatidylethanolamines. The tumor microenvironment tissue lipid profile correlated with tumor size, cancer stage, tumor grade, number of axillary metastases, Nottingham prognostic index. The tumor tissue lipid profile correlated with tumor size, tumor grade, total malignant score, and number of axillary metastases.

Key words: mass-spectrometry; lipidomics; breast cancer; tumor microenvironment; cancer progression

Funding. The reported study was jointly funded by RFBR (no. 19-515-55021) and National Natural Science Foundation of China (no. 81961138016).

Received 17.02.2022; revised 10.03.2022; accepted 11.03.2022.