

ОНКОЛОГИЯ ONCOLOGY

АНАЛИЗ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ СЫВОРОТКИ КРОВИ И СУПЕРНАТАНТОВ ОПУХОЛИ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Гергенретер Ю.С.¹,
Захарова Н.Б.²,
Барулина М.А.³,
Масляков В.В.⁴,
Фёдоров В.Э.²

¹ ГБУЗ МО «Московский областной онкологический диспансер» (143900, г. о. Балашиха, ул. Карбышева, 6, Россия)

² ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России (410012, г. Саратов, ул. Большая Казачья, 112, Россия)

³ Институт проблем точной механики и управления РАН (410028, г. Саратов, ул. Рабочая, 24, Россия)

⁴ Саратовский медицинский университет «Реавиз» (410076, г. Саратов, ул. Дегтярная площадь, 1А, Россия)

Автор, ответственный за переписку:

Гергенретер Юлия Сергеевна,
e-mail: yuliya-gergenreter@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Решающую роль в развитии рака выполняет микроокружение опухоли (МкО) – микросреда, которая формируется в результате взаимодействия между опухолевой тканью и клетками макроорганизма. Концентрация цитокинов МкО в крови изменяется в зависимости от активности опухоли и наличия метастатического процесса. Существующий медиаторный дисбаланс МкО, его характерные особенности в процессе развития опухоли целесообразно изучать для диагностики и прогнозирования опухолевого процесса.

Цель: выявить маркеры прогрессирования опухолевого процесса при изучении тканевых и сывороточных цитокинов у женщин с диагнозом «рак молочной железы» (РМЖ).

Материалы и методы. Объект исследования – цитокины сыворотки крови и супернатантов опухоли (MCP-1, VEGF, TNF- α , IFN- γ , TGF- β 1, G-CSF, GM-CSF). В исследовании участвовало 80 пациенток с РМЖ в возрасте 50-69 лет и 26 практически здоровых женщин в возрасте от 41 до 62 лет. Проведено стандартное обследование женщин; исследование цитокинового профиля проводилось до назначения терапии. Для изучения цитокинового профиля на тканевом уровне выполнялась инкубация биоптатов опухоли ($n = 30$) и биоптатов неизменённой ткани молочной железы ($n = 6$) с определением продукции MCP-1, VEGF, TNF- α , IFN- γ , TGF- β 1, G-CSF, GM-CSF.

Результаты. Выявлена умеренная положительная корреляционная связь между стадией заболевания и уровнем TGF- β 1, MCP-1 сыворотки крови, слабая – с G-CSF. В инкубируемой опухолевой ткани высокая положительная корреляционная зависимость цитокинов от стадии заболевания отмечается у факторов роста: VEGF ($R = 0,79; p > 0,05$) и TGF- β 1 ($R = 0,61; p > 0,05$).

Заключение. Проведённое исследование выявило характерные особенности цитокинового профиля сыворотки крови и опухолевой ткани при РМЖ на локальных и распространённых стадиях. Выявленные различия в уровне цитокинов целесообразно использовать в качестве дополнительных диагностических показателей степени активности и распространённости опухолевого процесса.

Ключевые слова: микроокружение опухоли, цитокины, корреляционный анализ, рак молочной железы, сыворотка крови, инкубация культуры ткани

Статья получена: 29.11.2021

Статья принята: 30.03.2022

Статья опубликована: 20.05.2022

Для цитирования: Гергенретер Ю.С., Захарова Н.Б., Барулина М.А., Масляков В.В., Фёдоров В.Э. Анализ цитокинового профиля сыворотки крови и супернатантов опухоли при раке молочной железы. *Acta biomedica scientifica*. 2022; 7(2): 134-146. doi: 10.29413/ABS.2022-7.2.15

ANALYSIS OF THE CYTOKINE PROFILE OF BLOOD SERUM AND TUMOR SUPERNATANTS IN BREAST CANCER

Gergenreter Yu.S.¹,
Zakharova N.B.²,
Barulina M.A.³,
Maslyakov V.V.⁴,
Fedorov V.E.²

¹ Moscow Regional Oncologic Dispensary (Karbysheva str. 6, Balashikha 143900, Russian Federation)

² Saratov State Medical University named after V.I. Razumovskiy (Bolshaya Kazachia str. 112, Saratov 410012, Russia)

³ Institute of Precision Mechanics and Control, Russian Academy of Sciences (Rabochaya str. 24, Saratov 410028, Russian Federation)

⁴ Samara Medical University Reaviz (Degtyarnaya ploshchad str. 1A, Saratov 410076, Russian Federation)

Corresponding author:
Yulia S. Gergenreter,
e-mail: yuliya-gergenreter@mail.ru

ABSTRACT

Background. A crucial role in the development of cancer is played by the tumor microenvironment (TM) – a microenvironment that is formed as a result of the interaction between the tumor tissue and macroorganism cells. The concentration of TM cytokines in the blood varies depending on the activity of the tumor and the presence of a metastatic process. It is advisable to study the existing mediator imbalance of TM, its characteristic features in the process of tumor development for the diagnosis and prognosis of the tumor process.

The aim. To identify markers of tumor progression in the study of tissue and serum cytokines in women diagnosed with breast cancer.

Materials and methods. The object of the study is blood serum cytokines and tumor supernatants (MCP-1, VEGF, TNF- α , IFN- γ , TGF- β 1, G-CSF, GM-CSF). The study involved 80 patients with breast cancer aged 50–69 years and 26 practically healthy women aged 41 to 62 years. A standard examination of women was conducted; a cytokine profile study was conducted before the appointment of therapy. To study the cytokine profile at the tissue level, tumor biopsies ($n = 30$) and biopsies of unchanged breast tissue ($n = 6$) were incubated to determine the production of MCP-1, VEGF, TNF- α , IFN- γ , TGF- β 1, G-CSF, GM-CSF.

Results. There was a moderate positive correlation between the stage of the disease and the level of TGF- β 1, MCP-1 blood serum, a weak one – with G-CSF. In the incubated tumor tissue, a high positive correlation of cytokines on the stage of the disease is observed in growth factors: VEGF ($R = 0.79$; $p > 0.05$) and TGF- β 1 ($R = 0.61$; $p > 0.05$).

Conclusion. The study revealed the characteristic features of the cytokine profile of blood serum and tumor tissue in breast cancer at local and widespread stages. The revealed differences in the level of cytokines should be used as additional diagnostic indicators of the degree of activity and prevalence of the tumor process.

Key words: tumor microenvironment, cytokines, correlation analysis, breast cancer, blood serum, tissue culture incubation

Received: 29.11.2021
Accepted: 30.03.2022
Published: 20.05.2022

For citation: Gergenreter Yu.S., Zakharova N.B., Barulina M.A., Maslyakov V.V., Fedorov V.E. Analysis of the cytokine profile of blood serum and tumor supernatants in breast cancer. *Acta biomedica scientifica*. 2022; 7(2): 134-146. doi: 10.29413/ABS.2022-7.2.15

ВВЕДЕНИЕ

Решающую роль в развитии рака выполняет микроокружение опухоли (МКО) – микросреда, формирующаяся в результате взаимодействия между опухолевой тканью и клетками макроорганизма. МКО – сложная экосистема, состоящая из стромальных, иммунных клеток, макромолекул внеклеточного матрикса и ферментов [1, 2]. Основой для развития рака молочной железы (РМЖ) служат фенотипы клеток, способные к эпителиально-мезенхимальному переходу. К числу медиаторов, влияющих на развитие эпителиально-мезенхимального перехода, опухолевый рост и метастазирование, относят более 30 эндогенных молекул (цитокинов): «интерлейкины (IL), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), основной фактор роста фибробластов (bFGF), трансформирующие факторы роста альфа и бета (TGF- α , TGF- β 1), фактор некроза опухоли альфа (TNF- α), тромбоцитарный фактор роста эндотелия (PDGF), плацентарный фактор роста (PLGF), моноцитарный хемоаттрактантный протеин (MCP-1) и другие медиаторы» [3, 4]. Общими свойствами цитокинов являются: синтез в процессе иммунного ответа, активность в низких концентрациях, плеiotропность; возможность как синергизма, так и антагонизма действия. Цитокины могут участвовать в туморогенезе как факторы опухолевой прогрессии и в то же время тормозить развитие опухоли. Концентрация цитокинов МКО в крови изменяется в зависимости от активности опухоли и наличия метастатического процесса, поэтому они были рекомендованы в качестве иммуноонкологических маркеров [5, 6]. Трудность изучения этой темы связана не только с многообразием клеток системы иммунитета и продуктов их синтеза, но и способностью каждой из клеток оказывать противоположное действие, изменяя функции и фенотип иммунных клеток [5, 7]. До настоящего времени не полностью ясна роль иммунитета в агрессии МКО и в динамике опухолевого процесса. В мире проводятся многочисленные исследования МКО, однако данная тема находится в фазе накопления и анализа информации, и только лишь часть изученного материала вошла в практическую медицину. Благодаря исследованию МКО становится возможной иммунотерапия при различных злокачественных образованиях, в том числе и при триплекс-негативном раке молочной железы; ингибиторы ангиогенеза стали частью схем лечения при колоректальном раке, а колониестимулирующие факторы – компонентом сопроводительной терапии. Дальнейшее изучение МКО опухоли должно открыть новые возможности для диагностики и лечения злокачественных новообразований. Для РМЖ пока не существует предиктивных биомаркеров иммунотерапии. Изучение МКО и системного иммунного ответа может облегчить поиск биомаркеров [5]. Важно изучить компоненты МКО, чтобы переориентировать последние в пользу макроорганизма для усиления противоопухолевой защиты. Активное изучение и разработка новых биомаркеров дают возможность прогнозировать поведение опухоли [8]. Мы мало знаем об изменении МКО во время прогрессирования рака [9]. Разработка

стандартных наборов молекулярных маркеров важна для ранней диагностики, мониторинга и определения тактики лечения. Исследование МКО позволит открыть новые маркеры, контролирующие развитие метастатического процесса при РМЖ, и определять важные молекулярные мишени противоопухолевых препаратов [10].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выявить маркеры прогрессирования опухолевого процесса при изучении тканевых и сывороточных цитокинов у женщин с диагнозом «рак молочной железы».

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В условиях ГУЗ «Областной клинический онкологический диспансер» г. Саратова проведено научное исследование, объектом которого стали 80 пациенток с РМЖ, в возрасте 50-69 лет, проходивших лечение в 2017–2018 гг.

Критерии включения: возраст 50–69 лет, РМЖ I–IV стадий, подписанное информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии исключения: злокачественные образования других локализаций, острые инфекционные заболевания, хронические заболевания в стадии обострения, суб- и декомпенсации.

Критерии включения в группу сравнения (группу здоровых женщин): подписанное информированное согласие на участие в исследовании, отсутствие клинических и инструментальных признаков обострения хронических, острых инфекционных и онкологических заболеваний.

Группу сравнения составили 26 практически здоровых женщин от 41 до 62 лет. Исследование было одобрено локальным комитетом по этике в Филиале частного учреждения образовательной организации высшего образования «Медицинский университет «Реавиз» в городе Саратов (протокол № 7 от 21.07.2017).

Было проведено стандартное обследование пациенток и здоровых женщин группы сравнения. Разделение на стадии опухолевого процесса проведено согласно классификации TNM 7-го пересмотра (2012 г.). В первую исследуемую группу (локальный рак) вошли пациентки с I и II стадиями РМЖ, во вторую (распространённый рак) – с III и IV стадиями. Первую группу составили 37 (46 %) пациенток, вторую – 43 (54 %) пациентки.

До начала лечения в сыворотке крови пациенток ($n = 80$) и у женщин группы сравнения ($n = 26$) проведено исследование семи цитокинов – MCP-1 (моноцитарного хемоаттрактантного протеина-1), VEGF (фактора роста эндотелия сосудов), TNF- α (фактора некроза опухоли альфа), IFN- γ (интерферона гамма), TGF- β 1 (трансформирующего фактора роста бета 1), G-CSF (гранулоцитарного колониестимулирующего фактора), GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора). Концентрацию MCP-1, VEGF, TNF- α , IFN- γ определяли методом твердофазного ИФА с помощью наборов

реагентов (АО «Вектор Бест», Новосибирск). Для исследования TGF-β1, G-CSF, GM-CSF применяли трёхстадийный «сэндвич»-вариант ИФА с использованием моно- и поликлональных антител к цитокинам (R&D Systems, Великобритания). Для активации латентной формы TGF-β1 сыворотку крови перед проведением ИФА активировали (выдерживали в течение 60 мин в среде с рН 1–2,0, а затем проводили нейтрализацию до рН 7,2–7,6) (рис. 1).

Следующим этапом проводили инкубацию биоптатов опухоли и биоптатов неизменённой ткани молочной железы с определением спонтанной продукции цитокинов: MCP-1, VEGF, TNF-α, IFN-γ, TGF-β1, G-CSF, GM-CSF. Для данного этапа исследования выделено 30 пациенток с РМЖ. Выделено две группы: первая – 15 пациенток с локальным РМЖ (I–II стадия), вторая – 15 пациенток с распространённым РМЖ (III–IV стадия). В контрольную группу вошли 6 практически здоровых женщин, у которых была получена здоровая ткань молочной железы во время проведения эстетической операции. Объём биоптата, как опухоли, так и здоровой ткани составлял 8 мм³. Биоптаты опухолей помещали в питательную среду DMEM-F12 для инкубирования при 37 °С в течение 72 часов. В супернатантах после осаждения клеток крови и опухоли (центрифугирование при 2000 об./мин, 15 мин) методом ИФА определяли концентрацию TNF-α, IFN-γ, G-CSF, GM-CSF, VEGF, MCP-1, TGF-β1.

Для определения степени выраженности связи между вариационными рядами использовался метод корреляции, расчёт парных коэффициентов корреляций проводился по стандартной формуле. Нулевая гипотеза об отсутствии корреляции между исследуемыми значениями в различных группах отклонялась с уровнем статистической значимости 0,05 и доверительным интервалом 95 %. Оценка независимости выборок проводилась с помощью критерия Манна – Уитни, преимуществом которого яв-

ляется отсутствие необходимости в проверке нормальности распределения наборов данных и одинаковости их дисперсий. Корреляционная связь между параметрами признавалась умеренной при коэффициенте корреляции большем или равным 0,5 и при $p < 0,05$; слабой – при коэффициенте корреляции меньшим 0,5 и при $p < 0,05$. При $p > 0,05$ корреляционная связь признавалась несущественной при любом значении коэффициента корреляции.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Концентрация уровня цитокинов сыворотки крови (за исключением IFN-γ) на всех стадиях РМЖ была выше, чем у здоровых женщин группы сравнения. G-CSF, TNF-α статистически значимо повышались в группе с локальным ростом по сравнению с распространённым. MCP-1 повышался на распространённых стадиях по сравнению с локальными стадиями ($p < 0,05$). Содержание TGF-β1 в сыворотке крови у пациенток с распространённым ростом был повышен по сравнению с группой сравнения и женщинами с локальным ростом ($p < 0,05$) (табл. 1).

Проведён корреляционный анализ полученных результатов. Построены матрица и диаграммы корреляций с использованием коэффициентов корреляции Пирсона (рис. 2, 3), наглядно показывающие наличие или отсутствие зависимости показателей при парном сравнении цитокинов, а также уровня цитокинов со стадией РМЖ.

Из рисунка 3 видно, что наблюдается положительная корреляционная связь между стадией заболевания и уровнем цитокинов сыворотки крови: TGF-β1 ($R = 0,58; p < 0,05$), MCP-1 ($R = 0,5; p < 0,05$), слабая с G-CSF ($R = 0,43; p < 0,05$). Следовательно, умеренное повышение уровня TGF-β1, в меньшей степени – MCP-1 характерно при прогрессии



РИС. 1. Дизайн исследования

FIG. 1. Study design

ТАБЛИЦА 1
КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОКИНОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ
ПРИ I–IV СТАДИЯХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

TABLE 1
CONCENTRATION OF SERUM CYTOKINES IN STAGES I–IV
OF BREAST CANCER

Цитокины сыыворотки крови	Группа сравнения (n = 26)	Стадии РМЖ			
		Стадия 1 (n = 11)	Стадия 2 (n = 26)	Стадия 3 (n = 26)	Стадия 4 (n = 17)
G-CSF	7,1 (5,3–10,9) [4,7–14,5]	172,6^a (132,2–194,9) [110,4–529,0]	146,7 ^a (121,3–201,3) [68,5–372,0]	161,9 ^a (106,5–204,7) [80,2–345,0]	128,0 ^{a,b} (80,6–182,2) [4,7–529,0]
GM-CSF	1,0 (0,8–1,2) [0,7–1,2]	8,3 ^a (7,3–9,7) [5,9–11,5]	8,5^a (6,8–11,2) [5,6–33,0]	7,9 ^a (6,2–11,7) [5,9–35,2]	7,8 ^a (5,9–9,7) [0,7–35,2]
IFN-γ	20,9 (17,5–23,3) [13,3–25,6]	15,9 (14,8–2,6) [13,2–27,7]	15,7 (4,8–23,8) [3,7–28,1]	19,7 (16,2–24,7) [10,1–29,3]	18,7 (15,1–23,7) [3,7–30,6]
TNF-α	2,3 (1,9–2,7) [1,1–6,5]	8,9^a (5,0–11,3) [4,0–18,7]	6,4 ^a (3,4–9,6) [1,0–19,4]	7,5 ^a (4,6–8,8) [2,7–11,7]	5,7 ^{a,b} (3,3–8,7) [1,0–19,4]
MCP-1	136,8 (119,9–294,6) [66,9–331,2]	326,0 ^a (222,0–446,3) [172,0–684,0]	313,9 ^a (228,7–421,8) [92,8 – 864,2]	394,8^{a,b} (305,5–453,3) [126,9–678,0]	323,2 ^a (193,0–428,0) [66,9–1490,2]
VEGF	349,5 (249,6–432,4) [106,4–613,0]	545,0 ^a (419,2–616,3) [287,4–613,0]	493,7 ^a (380,6–628,3) [234,7–832,6]	570,5^a (457,3–627,1) [342,3–745,5]	495,0 ^a (374,8–518,1) [106,4–832,6]
TGF-β1	26675 (21300–29500) [16500–96000]	30800 ^a (26730–32950) [22200–38200]	35750 ^a (25617–40356) [24450–63500]	41800^{a,b} (33250–54675) [26850–77750]	36400 ^{a,b} (26735–49200) [16500–96000]

Примечание. ^a – p < 0,05 при сравнении с группой сравнения; ^b – p < 0,05 при сравнении групп локального роста (I и II стадии) с распространённым ростом (III и IV стадии); жирным шрифтом отмечено максимальное увеличение показателя.

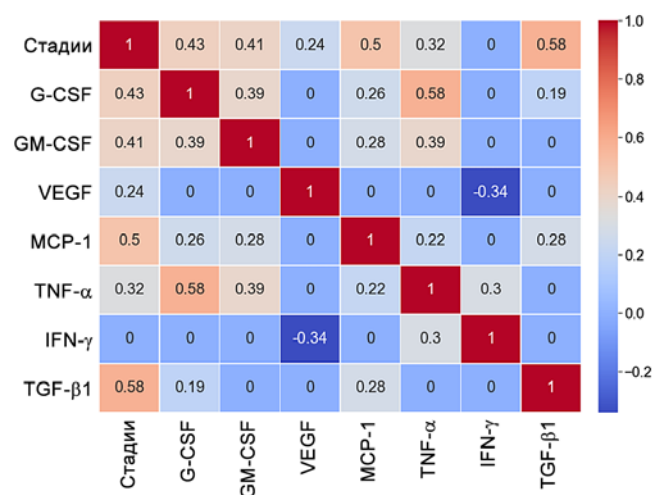


РИС. 2.
Матрица корреляций цитокинов сыыворотки крови и стадии заболевания

FIG. 2.
Matrix of correlations of blood serum cytokines and disease stage

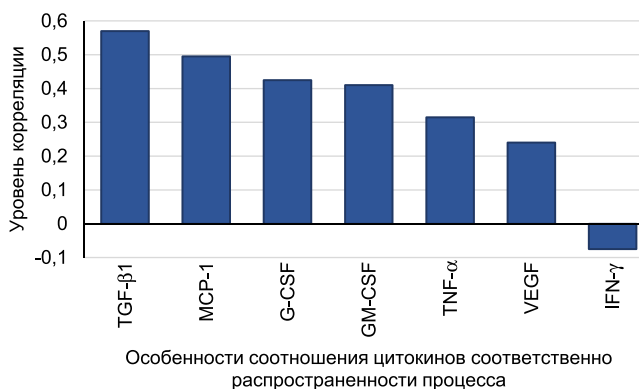


РИС. 3.
Диаграмма корреляции уровня цитокинов сыыворотки крови в динамике опухолевого процесса: ось x – особенности соотношения цитокинов соответственно распространённости процесса; ось y – уровень корреляции

FIG. 3.
Correlation diagram of serum cytokine levels in the dynamics of the tumor process: x-axis – features of the ratio of cytokines according to the prevalence of the process; y-axis – the level of correlation

заболевания на распространённых стадиях. Для GM-CSF ($R = 0,41; p > 0,05$), TNF- α ($R = 0,32; p > 0,05$), VEGF ($R = 0,24; p > 0,05$) корреляционная связь со стадией заболевания носит нелинейный характер. Диаграмма корреляции показала положительную связь между этими цитокинами и стадией заболевания, но дальнейший расчёт с помощью критерия Манна – Уитни показал недостаточный уровень статистической значимости такой корреляции.

Колонистимулирующие факторы сыворотки крови имеют максимальные значения на локальных стадиях РМЖ, на распространённых стадиях отмечается их снижение. Фактор некроза опухоли TNF- α , обладающий своей двойственной природой, обеспечивающей как защитную роль, так и проонкогенный эффект, не показывает выраженной корреляционной зависимости от стадии в сыворотке. VEGF не коррелирует со стадией заболевания при исследовании цитокинов сыворотки крови. IFN- γ показал слабую отрицательную корреляционную зависимость со стадией заболевания с недостаточным уровнем статистической значимости ($R = -0,08; p = 0,3$).

Проведён корреляционный анализ при парном сравнении отдельных цитокинов сыворотки крови. Положительная корреляционная связь выявлена для G-CSF и TNF- α ($R = 0,58; p < 0,05$), приведённые цитокины могут проявлять синергетический эффект. Они осуществляют функцию иммунологической защиты на ранних стадиях РМЖ. Снижение уровня и нарушение соотношения данных провоспалительных цитокинов на распространённых стадиях может нарушать их взаимодействие и механизмы защиты. Незначительное отрицательное корреляционное взаимодействие демонстрируют IFN- γ и VEGF ($R = -0,34; p > 0,05$).

Диаграммы рассеивания при корреляционном анализе показывают распределение цитокинов в норме и при злокачественном процессе (рис. 4).

При уровне колонистимулирующего фактора G-CSF от 0 до 15 пг/мл и TNF- α от 0 до 2,6 пг/мл ни одного случая рака молочной железы не встречается, более высокие показатели цитокинов характерны для локальной

и распространённой стадий РМЖ. Корреляционный анализ позволил определить пороговый уровень цитокинов сыворотки крови, при котором отсутствовал опухолевый рост (табл. 2).

ТАБЛИЦА 2
ПОРОГОВЫЙ УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ, ПГ/МЛ

TABLE 2
THRESHOLD LEVEL OF CYTOKINE INDICES, PG/ML

Цитокины сыворотки крови	Пороговый уровень, пг/мл
INF- γ	24
MCP-1	180
GM-CSF	2
G-CSF	15
VEGF	100
TGF- β 1	20000
TNF- α	2,5

На основании корреляционного анализа цитокинов сыворотки крови получены следующие результаты:

- 1) положительная корреляционная связь выявлена между стадией заболевания и уровнями цитокинов сыворотки крови: TGF- β 1 ($R = 0,58; p < 0,05$), MCP-1 ($R = 0,5; p < 0,05$), слабая – с G-CSF ($R = 0,43; p < 0,05$);
- 2) IFN- γ показал отрицательную корреляционную зависимость со стадией заболевания ($R = -0,08; p > 0,05$);
- 3) положительная корреляционная связь выявлена для G-CSF и TNF- α ($R = 0,58; p < 0,05$) – синергетический эффект.

TGF- β 1 и MCP-1 повышаются на распространённых стадиях (имеют положительную корреляцию со стадией

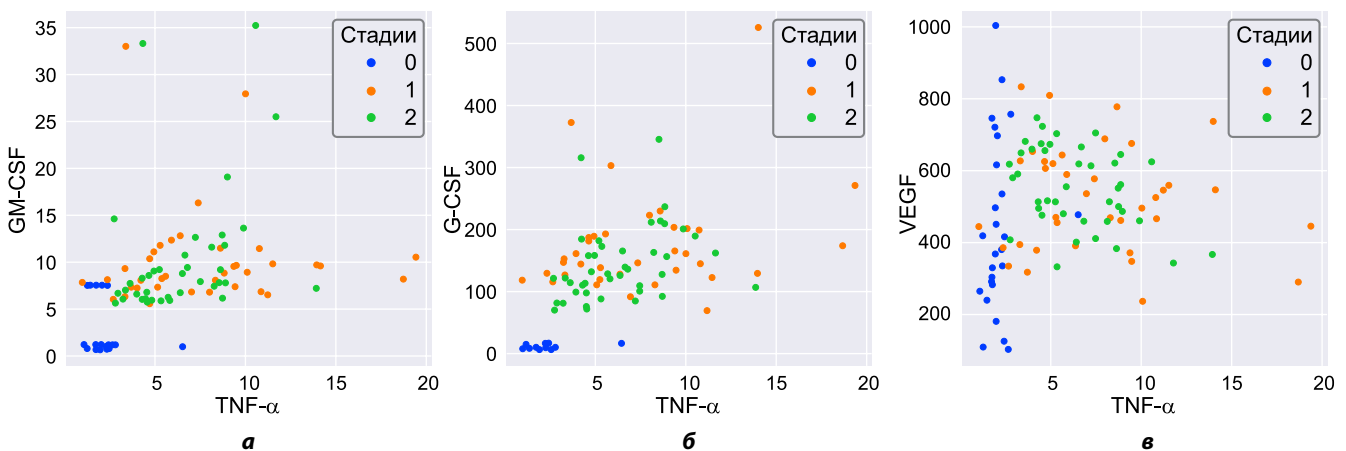


РИС. 4.
Диаграммы зависимости TNF- α с GM-CSF (а), G-CSF (б), VEGF (в): 0 – группа здоровых женщин; 1 – группа локального роста; 2 – группа с распространённым ростом

FIG. 4.
Dependence diagrams of TNF- α with GM-CSF (а), G-CSF (б), VEGF (в): 0 – a group of healthy women; 1 – a group of local growth; 2 – a group with widespread growth

процесса) и свидетельствуют о неблагоприятном прогнозе; колониестимулирующие факторы и факторы некроза опухоли имеют более высокий уровень на ранних стадиях РМЖ и, соответственно, слабую корреляцию со стадией заболевания.

Следующим этапом проведён анализ цитокинового профиля супернатантов опухоли при спонтанной инкубации. Уровень сывороточных цитокинов и их корреляция отличались от показателей цитокинов супернатантов опухолевой ткани. Спонтанная продукция цитокинов биоптатами опухоли в обеих группах характеризовалась высокой активностью по сравнению с группой здоровых женщин. IFN-γ при спонтанной инкубации статистически значимо увеличивался при локальном росте по сравнению со здоровыми женщинами и между группами в отличие от сыворотки крови. В образцах опухоли из группы с локальным ростом отмечено статистически значимое ($p < 0,05$) повышение спонтанной продукции следующих цитокинов: TNF-α – в 4,2, IFN-γ – в 3,6, MCP-1 – в 6,7 раза, фактора роста TGF-β1 – в 2,2 раза, VEGF – в 11,9 раза; максимально увеличились колониестимулирующие факторы: GM-CSF – в 15,6 раза, G-CSF – в 96,8 раза по сравнению с группой здоровых женщин [11].

В биоптатах опухолевой ткани в группе с распространённым ростом концентрация следующих цитокинов была статистически значимо выше по сравнению с группой здоровых женщин: TNF-α – в 4,8 раза, MCP-1 – в 6,3 раза, TGF-β1 – в 2,5 раза, VEGF – в 14,6 раза, GM-CSF – в 13,4 раза, G-CSF – в 79,5 раза. При проведении сравнения между группами с локальным и распространённым ростом статистически значимые отличия выявлены для колониестимулирующих факторов (GM-CSF, G-CSF) и IFN-γ – выше при локальном росте, VEGF и TGF-β1 – выше в группе с распространённым ростом (табл. 3) [11].

На диаграмме и матрице корреляций представлена зависимость уровня цитокинов при спонтанной инкуба-

ции от распространённости опухолевого процесса (рис. 5, 6). Как видно из рисунков, высокая положительная корреляционная зависимость со стадией заболевания выявлена у VEGF ($R = 0,79; p < 0,05$) и TGF-β1 ($R = 0,61; p < 0,05$), что ассоциировано с выраженностью пролиферативных процессов и ангиогенеза на распространённых стадиях.

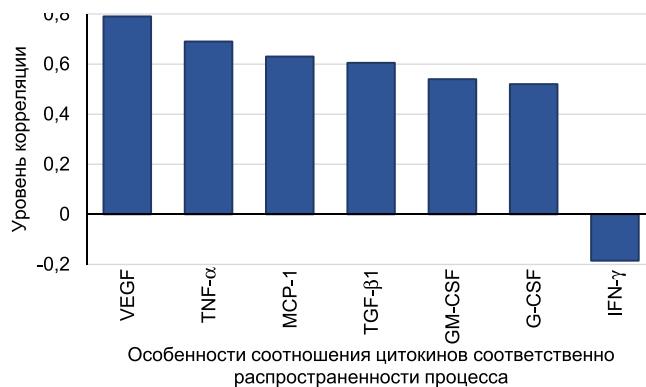


РИС. 5.

Диаграмма корреляции цитокинов супернатантов опухоли в динамике опухолевого процесса: ось x – особенности соотношения цитокинов соответственно распространённости процесса; ось y – уровень корреляции

FIG. 5.

Correlation diagram of cytokines of tumor supernatants in the dynamics of the tumor process: x-axis – features of the ratio of cytokines according to the prevalence of the process; y-axis – correlation level

Факторы роста максимально увеличиваются на распространённых стадиях в тканях. В сыворотке корреляция TGF-β1 со стадией заболевания менее выражена ($R = 0,58, p < 0,05$), а статистически значимой корреляционной зависимости VEGF от стадии заболевания выявлено не было. Максимальное повышение VEGF

ТАБЛИЦА 3

ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ ОПУХОЛИ (ЗДОРОВОЙ ТКАНИ) ПРИ СПОНТАННОЙ ИНКУБАЦИИ В ГРУППАХ С ЛОКАЛЬНЫМ РОСТОМ, РАСПРОСТРАНЁННЫМ РОСТОМ И В ГРУППЕ ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН

Цитокин, пкг/мл	Содержание цитокинов в биоптате молочной железы (пкг/мл), Me [25–75-й перцентили]		
	Группа здоровых женщин (n = 6)	Локальный рост опухоли (n = 15)	Распространённый рост опухоли (n = 15)
TNF-α	3,0 [1,9–4,5]	12,5 [2,95–16,1] ^a	14,4 [13,75–18,91] ^a
IFN-γ	2,85 [2,3–3,7]	10,2 [4,6–26,7] ^a	3,5 [2,3–4,9] ^{a,b}
MCP-1	212,3 [147,7–254,5]	1426,25 [1337,3–1730,8] ^a	1340,0 [1038–1925] ^a
GM-CSF	1,30 [1,2–1,7]	20,3 [12,5–25,4] ^a	17,4 [12,2–26,4] ^{a,b}
G-CSF	10,2 [4,7–26,7]	987,0 [562,5–1138] ^a	811,0 [668,1–1162,0] ^{a,b}
VEGF	141,4 [64,9–204,5]	1680,0 [1038–2450] ^a	2060 [1765–3190] ^{a,b}
TGF-β1	25700 [21200–28987,5]	57200 [47900–77712,5] ^a	65000 [45000–118000] ^{a,b}

Примечание. ^a – $p < 0,05$ при сравнении с группой здоровых женщин; ^b – $p < 0,05$ при сравнении групп с локальным и распространённым ростом.

TABLE 3

CYTOKINE PRODUCTION BY TUMOR CELLS (HEALTHY TISSUE) DURING SPONTANEOUS INCUBATION IN GROUPS WITH LOCAL GROWTH, WIDESPREAD GROWTH AND IN A GROUP OF HEALTHY WOMEN

и его влияние на ангиогенез проявляется на тканевом уровне [1, 2].

Также положительная корреляция при спонтанной инкубации в зависимости от распространённости процесса выявлена для фактора некроза опухоли TNF-α ($R = 0,69; p < 0,05$), хемокина MCP-1 ($R = 0,63; p < 0,05$). В сыворотке крови сохраняется умеренная корреляция MCP-1 со стадией заболевания ($R = 0,5$), для TNF-α сыворотки крови корреляция статистически не значимая ($R = 0,32$).

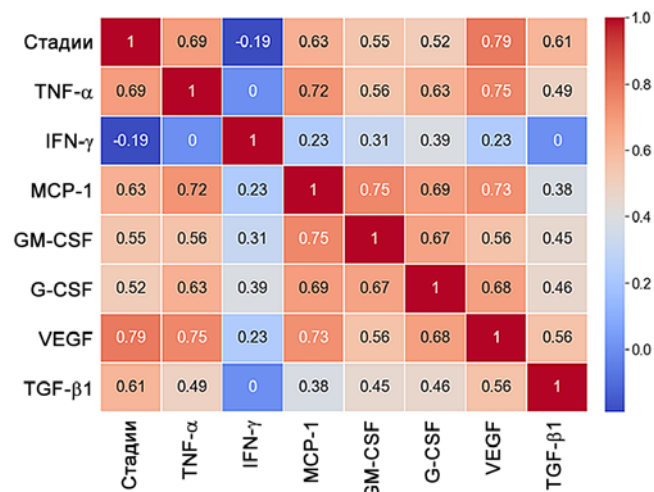


РИС. 6.
Матрица корреляции цитокинов супернатантов опухоли и стадии рака молочной железы

FIG. 6.
Cytokine correlation matrix of tumor supernatants and the stage of breast cancer

Колонистимулирующие факторы отличаются умеренной корреляционной зависимостью со стадией процесса: GM-CSF ($R = 0,55$), G-CSF ($R = 0,52$). В сыворотке крови корреляция GM-CSF ($R = 0,41$), G-CSF ($R = 0,43$) выраже-

ТАБЛИЦА 4
СРАВНЕНИЕ КОРРЕЛЯЦИИ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ И СТАДИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ НА СЫВОРОТОЧНОМ УРОВНЕ И В СУПЕРНАТАНТЕ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Цитокины	Сыворотка крови		Супернатант опухоли	
	Коэффициент корреляции	p	Коэффициент корреляции	p
TNF-α	0,32	> 0,05	0,69	< 0,05
MCP-1	0,50	< 0,05	0,63	< 0,05
G-CSF	0,43	> 0,05	0,52	< 0,05
GM-CSF	0,41	> 0,05	0,55	< 0,05
IFN-γ	-0,08	> 0,05	-0,19	> 0,05
TGF-β1	0,58	< 0,05	0,61	< 0,05
VEGF	0,24	< 0,05	0,79	< 0,05

на слабо. IFN-γ отличается отрицательной корреляционной зависимостью со стадией заболевания как в супернатанте ($R = -0,19$), так и в сыворотке крови ($R = -0,08$).

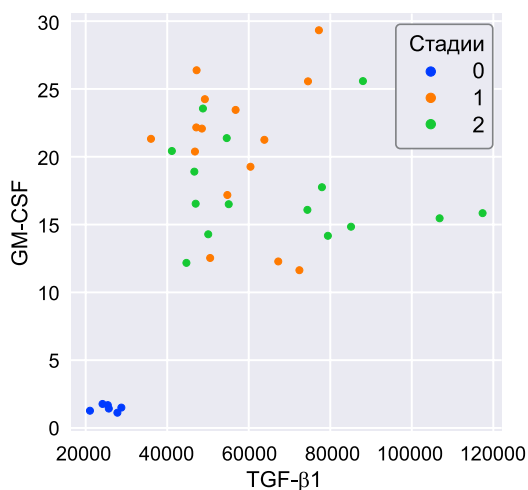
Сравнение цитокинового профиля сыворотки и супернатантов опухоли свидетельствует, что на тканевом уровне отмечается более высокая корреляционная зависимость исследуемых цитокинов со стадией процесса (табл. 4).

Попарная корреляция цитокинов супернатантов опухоли максимально выражена между MCP-1 и G-CSF ($R = 0,75; p < 0,05$), MCP-1 и VEGF ($R = 0,73; p < 0,05$), MCP-1 и TNF-α ($R = 0,72; p < 0,05$), VEGF и TNF-α ($R = 0,75; p < 0,05$).

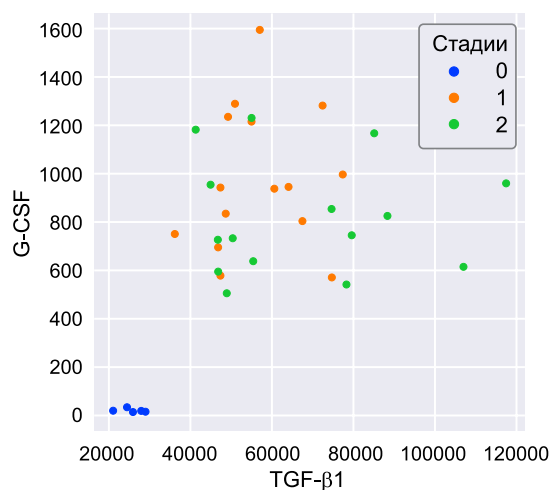
Построенные диаграммы рассеивания при попарном сравнении цитокинов наглядно показывают границы нормальных показателей и показателей злокачественного роста. Например, при GM-CSF от 1 до 2,5 и TGF-β1 от 20 000 до 30 000 пг/мл злокачественного роста не встречается (рис. 6). При корреляции VEGF с другими цитокинами на диаграммах рассеивания чётко определяются показатели группы сравнения и уровни, характерные для злокачественного процесса (рис. 7).

Особое значение приобретают диаграммы рассеивания IFN-γ в сочетании с другими цитокинами. Особенности корреляции изучаемых цитокинов с IFN-γ при спонтанной инкубации позволяет выделить уровни нормальных показателей, а также соответствующие локальной и распространённой стадиям процесса (рис. 8; табл. 2). Так, при корреляции IFN-γ с TGF-β1 выявлено, что для нормальной ткани характерны уровни TGF-β1 от 20 000 до 30 000 пг/мл; IFN-γ – от 2 до 4,0 пг/мл; для локальной стадии РМЖ – TGF-β1 от 45 000 до 75 000 пг/мл; IFN-γ – от 5 до 16 пг/мл; для распространённой стадии – TGF-β1 от 40 000 до 120 000 пг/мл; IFN-γ – от 2 до 3,8 пг/мл. Снижение уровня IFN-γ коррелирует с распространёнными стадиями и неблагоприятным прогнозом, особенно в сочетании с высоким уровнем факторов роста. На рисунке 9 наглядно представлено описанное распределение уровня IFN-γ при спонтанной инкубации с TGF-β1, MCP-1, GM-CSF, G-CSF.

TABLE 4
COMPARISON OF THE CORRELATION OF THE CYTOKINE PROFILE AND THE STAGE OF THE DISEASE AT THE SERUM LEVEL AND IN THE SUPERNATANT IN BREAST CANCER



а



б

РИС. 7.

Диаграммы корреляционной зависимости цитокинов супернатантов опухоли при спонтанной инкубации: TGF-β1 с GM-CSF (а), с G-CSF (б): 0 – группа здоровых женщин; 1 – группа локального роста; 2 – группа с распространённым ростом

FIG. 7. Correlation diagrams of cytokines of tumor supernatants during spontaneous incubation: TGF-β1 with GM-CSF (а), with G-CSF (б): 0 – a group of healthy women; 1 – a group of local growth; 2 – a group with widespread growth

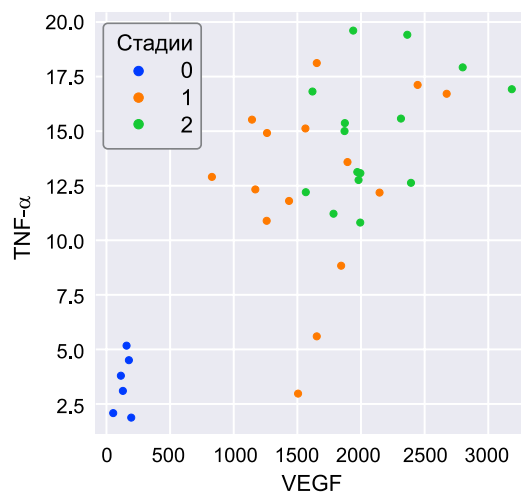
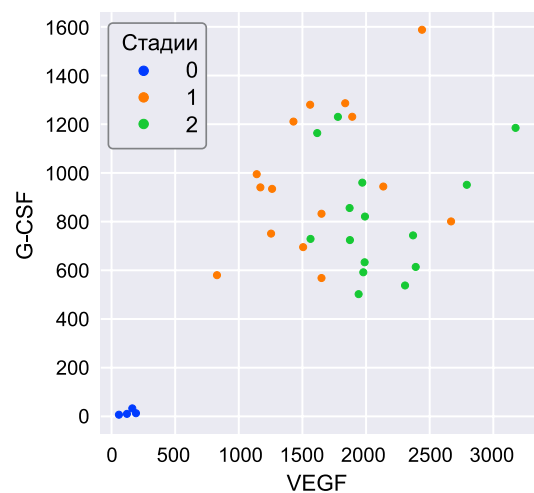
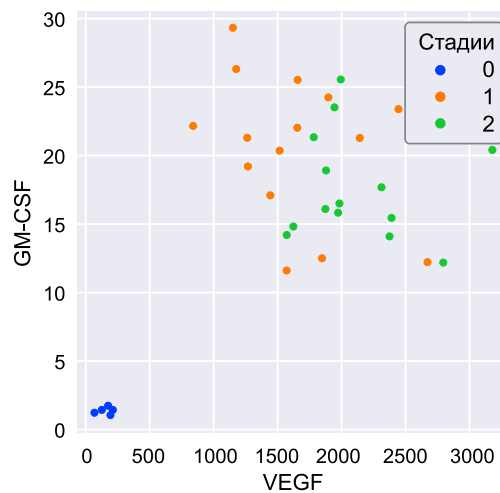
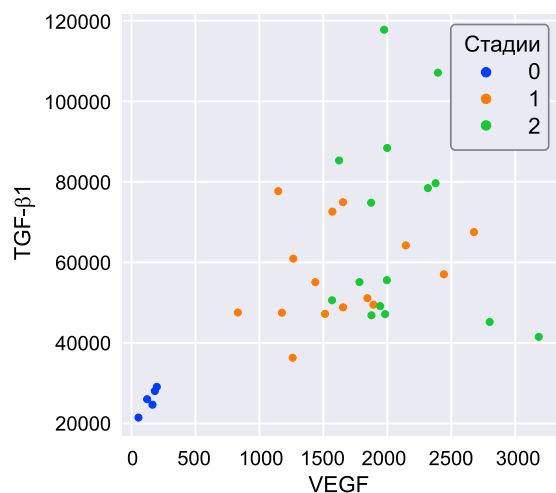


РИС. 8.

Диаграммы корреляционной зависимости цитокинов супернатантов опухоли при спонтанной инкубации: VEGF с TGF-β1, GM-CSF, G-CSF, TNF-α: 0 – группа здоровых женщин; 1 – группа локального роста; 2 – группа с распространённым ростом

FIG. 8.

Correlation diagrams of cytokines of tumor supernatants during spontaneous incubation: VEGF with TGF-β1, GM-CSF, G-CSF, TNF-α: 0 – a group of healthy women; 1 – a group of local growth; 2 – a group with widespread growth

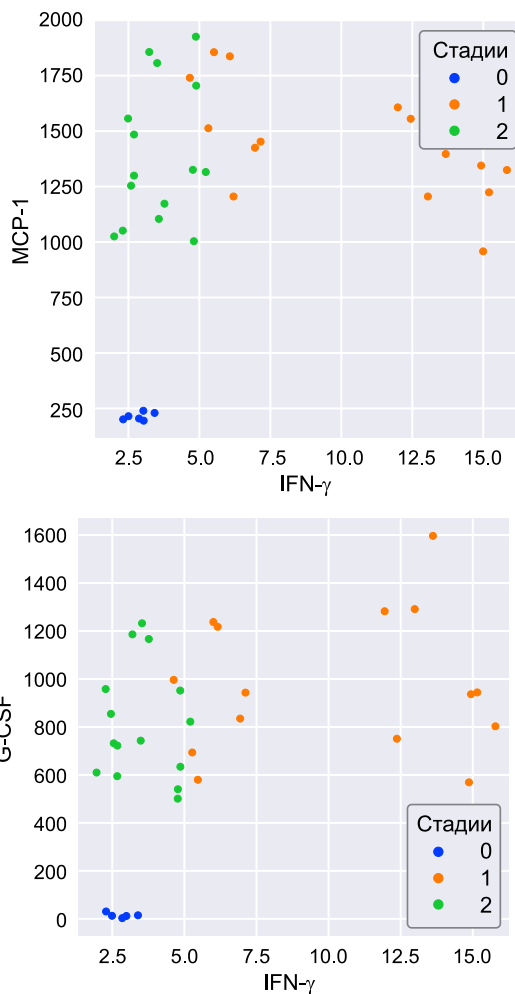
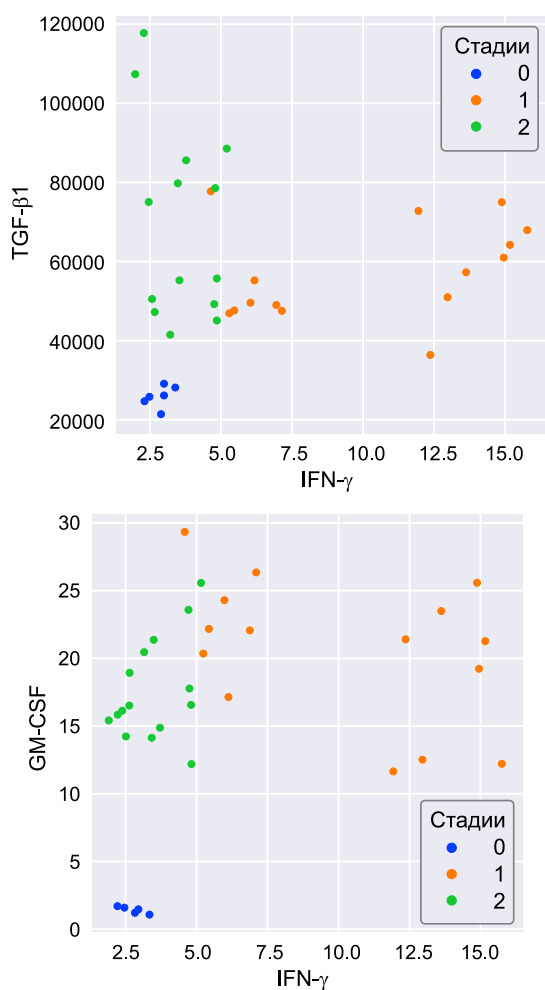


РИС. 9.
 Диаграммы корреляционной зависимости уровня IFN-γ при спонтанной инкубации с TGF-β1, MCP-1, GM-CSF, G-CSF: 0 – группа здоровых женщин; 1 – группа локального роста; 2 – группа с распространённым ростом

FIG. 9.
 Correlation diagrams of the level of IFN-γ during spontaneous incubation with TGF-β1, MCP-1, GM-CSF, G-CSF: 0 – a group of healthy women; 1 – a group of local growth; 2 – a group with widespread growth

ТАБЛИЦА 5
УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ СУПЕРНАТАНТОВ В ГРУППЕ ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН, ПРИ ЛОКАЛЬНЫХ И РАСПРОСТРАНЁННЫХ ФОРМАХ РМЖ

TABLE 5
THE LEVEL OF CYTOKINES OF THE SUPERNATANTS IN A GROUP OF HEALTHY WOMEN, WITH LOCAL AND COMMON FORMS OF BREAST CANCER

Цитокины	Группа контроля (пг/мл), min–max	Группа с локальным ростом (пг/мл), min–max	Группа с распространённым ростом (пг/мл), min–max
TNF-α	0–2,5	2,6–18	10–20,0
MCP-1	0–250	1000–1750	1000–2000
IFN-γ	0–5,0	5,0–15,0	4,0–6,0
G-CSF	0–60	600–1500	600–1300
GM-CSF	0–2,5	10–27	10–28
VEGF	0–250	500–2500	1500–3000
TGF-β1	0–30000	40 000–80 000	40 000–120 000

В результате корреляционного анализа цитокинового профиля инкубируемой опухолевой ткани выявлено, что самая высокая положительная зависимость цитокинов со стадией заболевания у факторов роста: VEGF ($R = 0,79$; $p < 0,05$) и TGF- β 1 ($R = 0,61$; $p < 0,05$). IFN- γ супернатантов опухоли отличается незначительной отрицательной корреляционной зависимостью со стадией заболевания. Показатели уровня цитокинов (min-max) при спонтанной инкубации отражены в таблице 5.

Можно считать, что опухоль стимулирует воспалительный тип ответа в период локального роста с увеличением продукции TNF- α , IFN- γ , MCP-1, GM-CSF, G-CSF. Второй тип характеризуется максимальным подъёмом факторов роста, VEGF и TGF- β 1, хемокина MCP-1, снижением IFN- γ и возникает на фоне диссеминации процесса при распространённых стадиях. Выявленная перестройка МкО является характерной особенностью течения рака молочной железы на начальных и распространённых стадиях. Проведённое исследование позволяет дополнить алгоритм диагностики при раке молочной железы исследованием цитокинов сыворотки крови (рис. 10).

Исследование цитокинов при раке молочной железы выявило различия между неизменённой и опухолевой тканью, локальным и распространённым опухоле-

вым ростом. Защитные свойства микроокружения опухоли при локальном опухолевом росте связаны с повышением продукции провоспалительных цитокинов (TNF- α , MCP-1, GM-CSF, G-CSF). Однако длительное воспаление становится фактором иммуносупрессии и способствует прогрессии опухоли. Способность опухолевых клеток к уклонению от иммунного ответа на распространённых стадиях рака сопровождается подъёмом факторов роста (VEGF и TGF- β 1), хемокина MCP-1, снижением IFN- γ . Данные изменения более выражены на тканевом уровне. Медиаторы МкО можно использовать в качестве диагностических показателей степени активности и распространённости опухолевого процесса, а также для построения прогностических моделей характера течения заболевания.

ВЫВОДЫ

Для начальных стадий РМЖ характерно преимущественное повышение уровня провоспалительных цитокинов (TNF- α , MCP-1), колониестимулирующих факторов (GM-CSF, G-CSF). Подъём факторов роста (VEGF и TGF- β 1), хемокина MCP-1 на фоне низкого IFN- γ на распространённых стадиях свидетельствует о прогрессировании опухоли. Выявлены положительные корреляци-

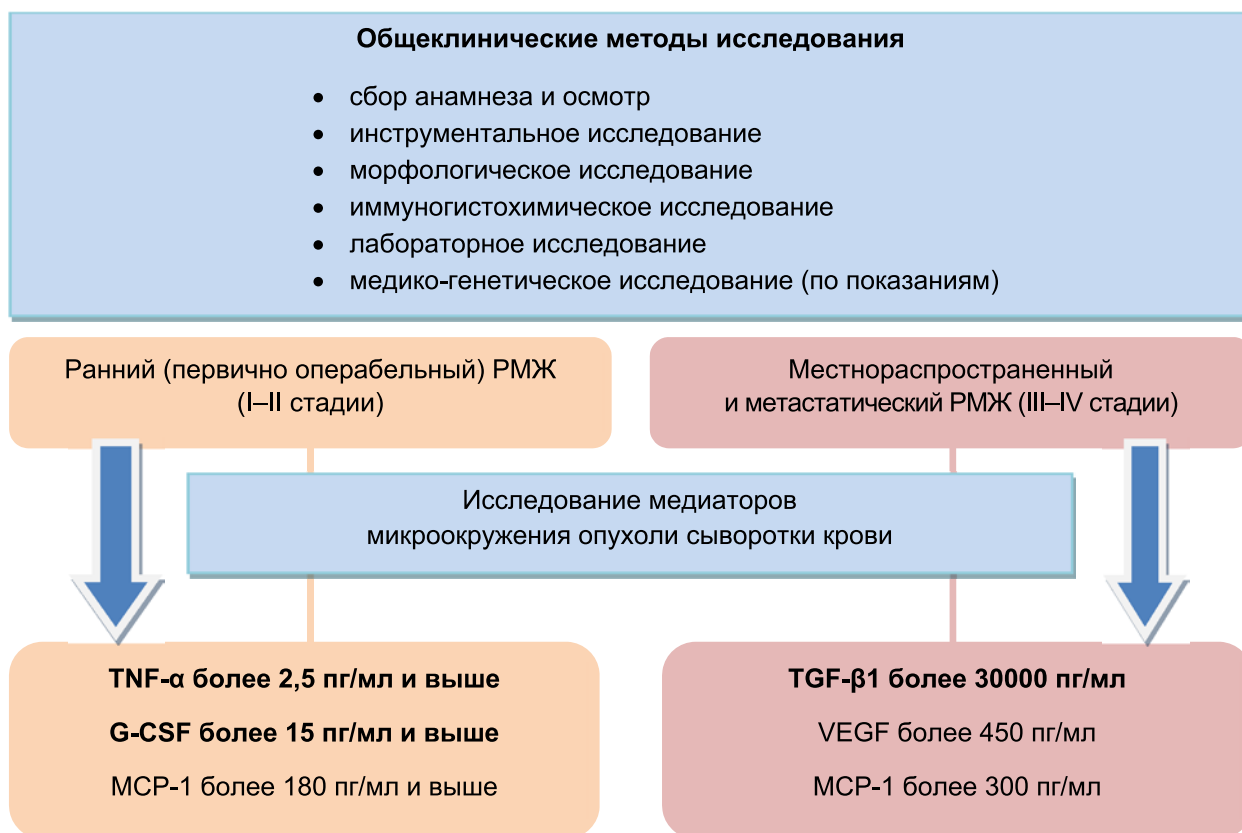


РИС. 10.
Алгоритм исследования пациенток при раке молочной железы

FIG. 10.
Algorithm for the study of patients with breast cancer

онные связи со стадией процесса для цитокинов TGF- β 1 и MCP-1 в сыворотке крови, для VEGF и TGF- β 1 – на уровне микроокружения. Установленные особенности продукции цитокинов в норме и при раке молочной железы представляют дополнительную информацию о прогрессировании заболевания. Медиаторы МКО можно рекомендовать в качестве диагностических показателей степени активности и распространённости опухолевого процесса, а также для построения прогностических моделей течения заболевания.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Korkaya H, Orsulic S. Editorial: The tumor microenvironment: recent advances and novel therapeutic approaches. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 8: 586176. doi: 10.3389/fcell.2020.586176
2. Zumsteg A, Christofori G. Corrupt policemen: Inflammatory cells promote tumor angiogenesis. *Curr Opin Oncol.* 2009; 21(1): 60-70. doi: 10.1097/CCO.0b013e32831bed7e
3. Семиглазов В.Ф. *Иммунология рака молочной железы*. М.: СИМК; 2019.
4. Jain KK. Biomarkers personalized medicine. In: *The Handbook of Biomarkers*. New York: Humana Press; 2017.
5. Brockhoff G, Seitz S, Weber F, Zeman F, Klinkhammer-Schalke M, Ortmann O, et al. The presence of PD-1 positive tumor infiltrating lymphocytes in triple negative breast cancers is associated with a favorable outcome of disease. *Oncotarget.* 2017; 9(5): 6201-6212. doi: 10.18632/oncotarget.23717
6. Талахадзе Н.Т., Стефано З., Воротников И.К., Чхиквадзе Н.В., Нечушкин М.И., Петровский А.В. и др. Классификация злокачественных опухолей молочной железы по системе TNM: необходимость перемен. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.* 2012; 23(1): 69-76.
7. Осинский С.П. Микроокружение опухолевых клеток. *Здоров'я України.* 2012; (12): 34-36.
8. Каприн А.Д., Рожкова Н.И. (ред.). *Маммология: национальное руководство*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2016.
9. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: Functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell.* 2012; 21(3): 309-322. doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.022

Сведения об авторах

Гергенретер Юлия Сергеевна – врач-онколог, ГБУЗ МО «Московский областной онкологический диспансер», e-mail: yuliya-gergenreter@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4483-6163>

Барулина Марина Александровна – доктор физико-математических наук, заведующая лабораторией анализа и синтеза динамических систем в прецизионной механике, Институт проблем точной механики и управления РАН, e-mail: marina@barulina.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3867-648X>

Масляков Владимир Владимирович – доктор медицинских наук, профессор кафедры хирургических болезней, Саратовский медицинский университет «Реавиз», e-mail: maslyakov@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6652-9140>

Захарова Наталья Борисовна – доктор медицинских наук, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики, ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России, e-mail: lipidgormon@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9410-2240>

Фёдоров Владимир Эдуардович – доктор медицинских наук, профессор кафедры хирургии и онкологии, ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России, e-mail: v.e.fedorov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4586-6591>

10. Немцова М.В., Кушлинский Н.Е. Молекулярно-биологические маркеры в практической онкологии. *Лабораторная служба.* 2014; 3(1): 14-22.

11. Гергенретер Ю.С. Морозова О.Л., Захарова Н.Б. Маркеры опухолевого микроокружения при спонтанной и индуцированной инкубации биоптатов рака молочной железы. *Сеченовский вестник.* 2021; 12(1): 71-80. doi: 10.47093/2218-7332.2021.12.1.50-59

REFERENCES

1. Korkaya H, Orsulic S. Editorial: The tumor microenvironment: recent advances and novel therapeutic approaches. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 8: 586176. doi: 10.3389/fcell.2020.586176
2. Zumsteg A, Christofori G. Corrupt policemen: inflammatory cells promote tumor angiogenesis. *Curr Opin Oncol.* 2009; 21(1): 60-70. doi: 10.1097/CCO.0b013e32831bed7e
3. Semiglazov VF. *Breast cancer immunology*. Moscow: SIMK; 2019. (In Russ.).
4. Jain KK. Biomarkers personalized medicine. In: *The Handbook of Biomarkers*. New York: Humana Press; 2017.
5. Brockhoff G, Seitz S, Weber F, Zeman F, Klinkhammer-Schalke M, Ortmann O, et al. The presence of PD-1 positive tumor infiltrating lymphocytes in triple negative breast cancers is associated with a favorable outcome of disease. *Oncotarget.* 2017; 9(5): 6201-6212. doi: 10.18632/oncotarget.23717
6. Talakhadze NT, Stefano Z, Vorotnikov IK, Chkhikvadze NV, Nechushkin MI, Petrovsky AV, et al. Classification of malignant breast tumors according to the TNM system: The need for change. *Journal of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center.* 2012; 23(1): 69-76. (In Russ.).
7. Osinsky SP. Microenvironment of tumor cells. *Zdorov'ya Ukraini.* 2012; (12): 34-36. (In Russ.).
8. Kaprin AD, Rozhkova NI (eds). *Mammology: National guidelines*. Moscow: GEOTAR-Media; 2016. (In Russ.).
9. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: Functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell.* 2012; 21(3): 309-322. doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.022
10. Nemtsova MV, Kushlinsky NE. Molecular biological markers in practical oncology. *Laboratory Service.* 2014; 3(1): 14-22. (In Russ.).
11. Gergenreter YuS, Morozova OL, Zakharova NB. Markers of tumor microenvironment during spontaneous and induced incubation of breast cancer biopsies. *Sechenov Medical Journal.* 2021; 12(1): 71-80. (In Russ.). doi: 10.47093/2218-7332.2021.12.1.50-59

Information about the authors

Yulia S. Gergenreter – oncologist, Moscow Regional Oncologic Dispensary, e-mail: yuliya-gergenreter@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4483-6163>

Marina A. Barulina – Dr. Sc. (Phys. and Math.), Head of Laboratory of the Analysis and Synthesis of Dynamic Systems in Precision Mechanics, Institute of Precision Mechanics and Control, Russian Academy of Sciences, e-mail: marina@barulina.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3867-648X>

Vladimir V. Maslyakov – Dr. Sc. (Med.), Professor at the Department of Surgical Diseases, Samara Medical University Reaviz, e-mail: maslyakov@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6652-9140>

Natalia B. Zakharova – Dr. Sc. (Med.), Professor at the Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Saratov State Medical University named after V.I. Razumovskiy, e-mail: lipidgormon@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9410-2240>

Vladimir E. Fedorov – Dr. Sc. (Med.), Professor, Professor at the Department of Surgery and Oncology, Saratov State Medical University named after V.I. Razumovskiy, e-mail: v.e.fedorov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4586-6591>