

## БИОМАРКЕРЫ КРОВИ И МАРКЕР ПРОЛИФЕРАЦИИ Ki-67 ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Студеникина А.А.<sup>1,2</sup>, Михайлова Е.С.<sup>1,2</sup>, Архипов С.А.<sup>1,2</sup>,  
Вараксин Н.А.<sup>3</sup>, Проскура А.В.<sup>2</sup>, Аутеншлюс А.И.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск, Россия

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

<sup>3</sup> АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия

**Резюме.** Метастазирование является ведущей причиной смерти у пациентов с раком молочной железы (РМЖ). Известно, что поражение опухолевыми клетками регионарных лимфатических узлов чаще встречается в опухолях с более высокой пролиферативной активностью, кроме того имеются литературные данные о том, что цитокины и протеины также могут оказывать влияние на миграционный потенциал опухоли. Цель работы – изучение сопряженности между концентрацией цитокинов, протеинов и экспрессией маркера пролиферации Ki-67 при РМЖ по гистологической форме инвазивная карцинома неспецифического типа. По данным патологоанатомов, у 16 пациентов отмечалось наличие метастазов в регионарных лимфатических узлах (I группа), а у 18 пациентов метастазы отсутствовали (II группа).

С помощью твердофазного иммуноферментного анализа определяли концентрацию 14 цитокинов в супернатантах иммунокомпетентных клеток крови: IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1 $\beta$ , IL-1 $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , G-CSF, GM-CSF, VEGF и MCP-1, а концентрации 6 протеинов определяли в сыворотке крови: рецепторов эстрогена и прогестерона, кадгерина-E (CDH1), активатора плазминогена типа 1 (PAI-1), муцина 1 (MUC1), белка теплового шока 90 $\alpha$ A1 (HSP90 $\alpha$ A1). Иммуно-гистохимическое исследование экспрессии Ki-67 проводили на парафиновых срезах опухолей с использованием моноклональных антител.

Исследование показало, что экспрессия Ki-67 в опухоли и концентрации в крови IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  были выше у пациентов I группы, а концентрации в крови CDH1 и PAI-1, наоборот, были выше у пациентов II группы. Было обнаружено что, Ki-67 имеет как обратные корреляционные связи с CDH1 и PAI1, так и прямые с IL-8 и TNF $\alpha$ . CDH1 имеет прямую корреляционную связь с PAI1, и обратные с IL-6, IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$ . Цитокины имеют прямые корреляционные связи между собой. Анализ ROC-кривых показал хорошее качество и оптимальные значения точек отсечения экспрессии Ki-67,

### Адрес для переписки:

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

### Address for correspondence:

Anastasia A. Studenikina  
Novosibirsk State Medical University  
52 Krasny Ave  
Novosibirsk  
630091 Russian Federation  
Phone: +7 (383) 226-35-60.  
E-mail: lpciip@211.ru

### Образец цитирования:

А.А. Студеникина, Е.С. Михайлова, С.А. Архипов,  
Н.А. Вараксин, А.В. Проскура, А.И. Аутеншлюс  
«Биомаркеры крови и маркер пролиферации Ki-67 при  
раке молочной железы» // Медицинская иммунология,  
2023. Т. 25, № 2. С. 357-366.  
doi: 10.15789/1563-0625-BBA-2570

© Студеникина А.А. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

A.A. Studenikina, E.S. Mikhaylova, S.A. Arkhipov,  
N.A. Varaksin, A.V. Proskura, A.I. Autenshlyus "Blood  
biomarkers and Ki-67 proliferation marker in breast cancer",  
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,  
2023, Vol. 25, no. 2, pp. 357-366.

doi: 10.15789/1563-0625-BBA-2570

© Studenikina A.A. et al., 2023

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

DOI: 10.15789/1563-0625-BBA-2570

концентраций цитокинов и протеинов, которые могли бы наилучшим образом предсказать наличие лимфогенного метастазирования. На основании полученных результатов, был предложен коэффициент, представляющий собой отношение концентрации CDH1 к сумме показателей концентраций IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  в крови, который может содействовать выявлению пациентов с РМЖ находящихся в группе риска по лимфогенному метастазированию.

*Ключевые слова:* цитокины, протеины, Ki-67, пролиферация, метастазирование, рак молочной железы

## BLOOD BIOMARKERS AND Ki-67 PROLIFERATION MARKER IN BREAST CANCER

Studenikina A.A.<sup>a, b</sup>, Mikhaylova E.S.<sup>a, b</sup>, Arkhipov S.A.<sup>a, b</sup>,  
Varaksin N.A.<sup>c</sup>, Proskura A.V.<sup>b</sup>, Autenshlyus A.I.<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>c</sup> JSC "Vector-Best", Novosibirsk, Russian Federation

**Abstract.** Metastasis is the leading cause of death in patients with breast cancer (BC). It is known that the lesion of regional lymph nodes by tumor cells is more common in tumors with higher proliferative activity. Moreover, there is literature evidence on effects of cytokines and proteins upon the migration potential of the tumor. The aim of our work was to study the correlation between the concentrations of cytokines, proteins, and expression of Ki-67 proliferation marker in breast cancer with histology of non-specific invasive carcinoma.

On the basis of pathological findings, 16 patients had metastases in regional lymph nodes (group I), and 18 patients had no detectable metastases (group II). Solid-phase enzyme immunoassay was used to determine concentrations of 14 cytokines in the supernatants of immunocompetent blood cells, i.e., IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1 $\beta$ , IL-1ra, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , G-CSF, GM-CSF, VEGF and MCP-1, and concentrations of 6 proteins were determined in blood serum: estrogen and progesterone receptors, cadherin-E (CDH1), plasminogen activator type 1 (PAI-1), mucin 1 (MUC1), heat shock protein 90 $\alpha$ A1 (HSP90 $\alpha$ A1). Immunohistochemical study of Ki-67 expression was performed in paraffin sections of tumors using monoclonal antibodies.

The study showed that Ki-67 expression in tumor tissues and blood concentrations of IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  were higher in group I patients. On the contrary, blood concentrations of CDH1 and PAI-1 were higher in group II patients. It was found that Ki-67 showed both inverse correlations with CDH1 and PAI1, and direct correlations with IL-8 and TNF $\alpha$ . CDH1 had a direct correlation with PAI1, and inverse correlations with IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$ . The studied cytokines showed direct correlations with each other. The analysis of ROC curves showed good quality and optimal values of the cut-off points for Ki-67 expression, cytokine and protein concentrations, thus allowing best prediction for detectable lymphatic metastasis.

On the basis of these results, a quotient was proposed, which represents a ratio of CDH1 contents to the sum of IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  concentrations in blood samples, which can help identification of the patients with breast cancer at risk for lymphatic metastasis.

*Keywords:* cytokines, proteins, Ki-67, proliferation, metastasis, breast cancer

## Введение

Метастазирование является ведущей причиной смерти у пациентов с раком молочной железы (РМЖ). Известно, что у 30% больных нематастатическим РМЖ на фоне адъювантной терапии в дальнейшем развиваются метастазы [12, 24]. Лимфоваскулярная инвазия чаще встречается в опухолях с более высокой пролиферативной активностью, которую оценивают с помощью иммуно-гистохимического маркера Ki-67 [4]. Известно, что высокая экспрессия Ki-67 связа-

на с более высоким риском рецидива и худшей выживаемостью у больных РМЖ [9]. Множество исследований подчеркивают клиническую обоснованность использования Ki-67 в качестве прогностического биомаркера эффективности лечения в условиях неоадъювантной терапии. Тем не менее основная проблема применения этого маркера заключается в его слабой воспроизводимости [11]. Использование дополнительных маркеров с помощью стандартных наборов и воспроизводимых методик может помочь в более объективной интерпретации данных экспрессии

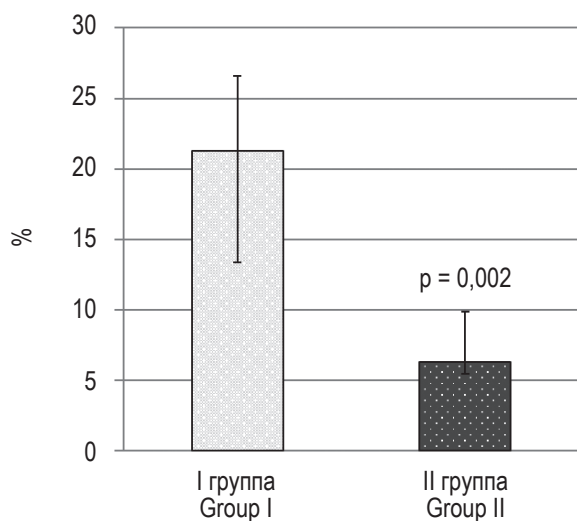
маркера пролиферации Ki-67. В качестве таких маркеров могут выступать показатели способности клеток крови к секреции цитокинов и концентрации протеинов сыворотки крови. Наиболее подходящим для этих целей, по нашему мнению, является изучение спонтанной продукции цитокинов *ex vivo* – в цельной крови это дает представление о том, насколько активированы иммунокомпетентные клетки *in vivo*. Концентрации цитокинов и протеинов подвергаются динамическим изменениям на разных этапах опухолевого роста [17], поэтому использование этих показателей пациентов с РМЖ может улучшить диагностические возможности Ki-67. Несмотря на множество статей, посвященных различным прогностическим факторам у пациентов с раком молочной железы, ранее не описывалась сопряженность между экспрессией Ki-67 и профилем цитокинов и протеинов и то, как они в совокупности связаны с наличием лимфогенного метастазирования.

**Целью работы** явилось изучение сопряженности между профилем цитокинов, протеинов и экспрессией Ki-67 при раке молочной железы.

## Материалы и методы

Материалом служили: кровь и образцы опухолей 34 пациентов с диагнозом РМЖ, с гистологическим типом – инвазивная карцинома неспецифического типа в возрасте 23-70 лет (средний возраст  $53,0 \pm 2,1$ ), со степенью злокачественности опухоли G1 и G2. Больные были разделены на группы: I группа – 16 пациентов с метастазами в регионарных лимфатических узлах в возрасте 23-70 лет (средний возраст  $50,4 \pm 2,7$ ) и II группа – 18 пациентов без метастатического поражения лимфатических узлов в возрасте 35-70 лет (средний возраст  $54,0 \pm 1,6$ ). Диагноз устанавливался врачом-онкологом и врачом-патологоанатомом. Забор крови у всех исследуемых пациентов осуществляли до оперативного вмешательства. Пациентам была проведена мастэктомия молочной железы на базе онкологического отделения ГКБ № 1 г. Новосибирска. Все исследования были проведены в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации 2016 года. От каждого пациента получено информированное согласие на проведение исследования и получения образцов опухолей, подписанное самим пациентом и заверенное врачом. Исследование одобрено комитетом по этике Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики подразделения Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины (протокол № 2016-3). На основании литератур-

ных данных и собственных исследований были изучены представленные ниже цитокины и протеины [1, 2, 7, 13, 20, 21]. Концентраций цитокинов и протеинов крови определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа. Для изучения спонтанной секреции цитокинов 1 мл крови в стерильных условиях вносили во флакон, содержащий 4 мл стерильной поддерживающей среды (DMEM), гепарин (2,5 ЕД/мл), гентамицин (100 мкг/мл) и L-глутамин (0,6 мг/мл), инкубировали при 37 °С в течение суток, после окончания инкубации клетки крови осаждали центрифугированием при 900 g в течение 15 мин. В полученных супернатантах лейкоцитов определяли концентрации: IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1 $\beta$ , IL-1ra, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , G-CSF, GM-CSF, VEGF и MCP-1 с использованием наборов реагентов АО «Вектор-Бест» (Россия). Концентрации следующих протеинов определяли в сыворотке крови: рецепторов эстрогена и прогестерона, кадгерина-Е (CDH1), активатора плазминогена типа 1 (PAI-1), муцина-1 (MUC1), белка теплового шока 90 $\alpha$ A1 (HSP90 $\alpha$ A1) с помощью наборов Cloud-CloneCorp. (США). Иммуно-гистохимическое исследование экспрессии Ki-67 проводили на парафиновых срезах опухолей с использованием моноклональных антител (Leica Biosystems Inc.) и системы визуализации VECTASTAIN ABC Kit (Vector Laboratories, США). Для статистической обработки результатов использовали программный пакет SPSS v. 22.0 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. С целью обнаружения взаимосвязи между исследуемыми показателями проводили корреляционный анализ путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (R). Статистически значимыми считались различия при  $p < 0,05$ . Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха – Me ( $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ ). Оптимальное значение точки отсечения экспрессии Ki-67 было проведено с помощью анализа receiver operating characteristic (ROC). Использовали оборудование центра коллективного пользования Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики – структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины».



**Рисунок 1. Экспрессия Ki-67 на парафиновых срезах опухолей пациентов с РМЖ (%)**

**Примечание.** I группа – пациенты с РМЖ с лимфогенным метастазированием, II группа – пациенты с РМЖ без лимфогенного метастазирования.

Figure 1. Ki-67 expression on paraffin sections of tumors of patients with breast cancer (%)

Note. Group I, patients with breast cancer with lymphatic metastasis; group II, patients with breast cancer without lymphatic metastasis.

## Результаты

Был проведен анализ экспрессии Ki-67 на опухолях пациентов с РМЖ, при этом у пациентов I группы (с лимфогенным метастазированием) экспрессия Ki-67 была статистически значимо выше, чем у пациентов II группы (рис. 1), что соответствует известным фактам, поскольку более высокая пролиферативная активность способствует гетерогенности опухолевого очага и возникновению более агрессивного, инвазивного типа клеток [3, 4, 9].

При сравнении концентрации протеинов в крови пациентов с РМЖ концентрации CDH1 и PAI1 были статистически значимо ниже у пациентов I группы по сравнению с пациентами II группы (табл. 1). По результатам исследования цитокинов в крови пациентов с РМЖ было выявлено, что статистически значимо между I и II группами различались концентрации провоспалительных цитокинов, а именно IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  (табл. 1).

С целью выявления взаимосвязей между показателями биомаркеров, различающихся у пациентов с РМЖ с лимфогенным метастазированием и без него, был проведен корреляционный анализ по методу Спирмена (табл. 2).

Анализ взаимосвязи между экспрессией Ki-67 в опухолевой ткани и концентрациями биомар-

**ТАБЛИЦА 1. ЗНАЧЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИТОКИНОВ И ПРОТЕИНОВ В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С РМЖ (пг/мл), Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

TABLE 1. VALUES OF CYTOKINE AND PROTEIN CONCENTRATIONS IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH BREAST CANCER (pg/mL), Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

Биомаркеры Biomarkers	I группа Group I	II группа Group II	p
CDH1	58335,0 (43425,0-64141,8)	75222,5 (64347,3-91088,0)	0,003
PAI1	974,7 (933,1-1077,1)	1033,7 (996,8-1675,8)	0,010
IL-6	116,4 (60,0-298,9)	21,2 (13,2-108,4)	0,030
IL-8	368,3 (237,2-603,4)	327,2 (216,0-381,3)	0,046
IL-1 $\beta$	40,3 (22,1-100,3)	8,4 (1,3-19,7)	0,001
TNF $\alpha$	3,9 (1,0-46,3)	1,0 (1,0-1,5)	0,002

**Примечание.** Значения концентраций цитокинов и протеинов указаны только при  $p < 0,05$ ; I группа – пациенты с РМЖ с лимфогенным метастазированием, II группа – пациенты с РМЖ без лимфогенного метастазирования.

Note. The concentration values of cytokines and proteins are indicated only at  $p < 0.05$ ; Group I, patients with breast cancer with lymphatic metastasis, group II, patients with breast cancer without lymphatic metastasis.



**ТАБЛИЦА 2. КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ СВЯЗИ МЕЖДУ ЭКСПРЕССИЕЙ МАРКЕРА ПРОЛИФЕРАЦИИ Ki-67 В ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ И КОНЦЕНТРАЦИЯМИ БИОМАРКЕРОВ В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С РМЖ**

TABLE 2. CORRELATIONS BETWEEN THE EXPRESSION OF THE Ki-67 PROLIFERATION MARKER IN TUMOR TISSUE AND THE CONCENTRATION OF BIOMARKERS IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH BREAST CANCER

Биомаркеры Biomarkers		CDH1	PAI1	IL-6	IL-8	IL-1β	TNFα
Ki-67	R	-0,400	-0,401	0,296	0,400	0,339	0,565
	p	0,028*	0,027*	0,089	0,040*	0,051	0,0005*
CDH1	R	–	0,576	-0,389	0,039	-0,451	-0,401
	p	–	0,0005*	0,023	0,828	0,007*	0,022*
PAI1	R	0,576	–	-0,466	-0,420	-0,400	-0,580
	p	0,0005	–	0,006*	0,015*	0,021*	0,0004*
IL-6	R	-0,401	-0,466	–	0,673	0,759	0,734
	p	0,023	0,006	–	0,00001*	0,00002*	0,00001*
IL-8	R	0,039	-0,420	0,673	–	0,402	0,536
	p	0,828	0,015	0,00001	–	0,026*	0,001*
IL-1β	R	-0,451	-0,400	0,759	0,402	–	0,604
	p	0,007	0,021	0,00002	0,026	–	0,0002*

Примечание. \* – значения при  $p < 0,05$ .

Note. \*, values at  $p < 0.05$ .

кер в сыворотке крови пациентов с РМЖ, показал, что Ki-67 имеет как обратные корреляционные связи с CDH1 и PAI1, так и прямые с IL-8 и TNFα. CDH1 имеет прямую корреляционную связь с PAI1 и обратные – с IL-6, IL-1β и TNFα. Цитокины имеют прямые корреляционные связи между собой (табл. 2).

Был проведен анализ кривой ROC для определения оптимального значения точки отсечения экспрессии Ki-67, которое могло бы наилучшим образом свидетельствовать о наличии лимфогенного метастазирования. На основе подсчитанных данных. Оптимальная точка отсечения экспрессии Ki-67 в нашем исследовании на основании данных ROC-анализа составила 12%. Значение маркера пролиферации Ki-67 равное 12% и выше свидетельствовало о наличии метастазов, а значения менее 12% – об их отсутствии.

Качество полученных результатов изучения концентраций цитокинов и протеинов в крови пациентов с РМЖ при наличии или отсутствии лимфогенного метастазирования, определенное с помощью ROC-анализа, что помимо оценки качества полученных данных позволило устано-

вить пороговые значения концентраций цитокинов и протеинов показатели которых, соответствовали наличию метастазов или их отсутствия у пациентов с РМЖ (табл. 3). При анализе ROC-кривых CDH1 и PAI1 наблюдалась следующая картина, а именно: превышение установленных пороговых концентраций соответствовало отсутствию лимфогенного метастазирования, а концентрации ниже пороговых значений – наличию метастазов в регионарных лимфатических узлах. На основании проведенных расчетов был предложен коэффициент – показатель лимфогенного метастазирования и сочетающий значения концентраций цитокинов и протеинов. Этот коэффициент, по нашему мнению, дает возможность определить отсутствие или наличие лимфогенного метастазирования у исследованных пациентов РМЖ. Этот коэффициент представляет собой отношение концентрации CDH1 к сумме показателей концентраций IL-1β и TNFα, он обладает более высокими показателями качества модели (0,872 – очень хорошее качество модели), чувствительности и специфичности по сравнению

**ТАБЛИЦА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ROC-АНАЛИЗА МОДЕЛИ ЛИМФОГЕННОГО МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ НА ОСНОВЕ ОЦЕНКИ КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИТОКИНОВ И ПРОТЕИНОВ В КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С РМЖ**

TABLE 3. RESULTS OF THE ROC-ANALYSIS OF A MODEL OF LYMPHATIC METASTASIS BASED ON THE ASSESSMENT OF THE CONCENTRATION OF CYTOKINES AND PROTEINS IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH BREAST CANCER

Биомаркер Biomarker	Площадь под кривой Area under curve	Пороговые значения, пг/мл Threshold values, pg/mL	Чувствительность, % Sensitivity, %	Специфичность, % Specificity, %
IL-6	0,719	51,1	80,3	61,0
IL-8	0,673	326,6	70,4	62,0
IL-1 $\beta$	0,826	20,4	81,3	77,8
TNF $\alpha$	0,806	1,2	75,0	77,8
CDH1	0,795	65500,0	77,8	81,2
PAI1	0,718	985,9	70,0	76,9

Примечание. Значения площади под кривой 0,9-1 – отличное качество модели; 0,8-0,9 – очень хорошее качество модели; 0,7-0,8 – хорошее качество модели; 0,6-0,7 – среднее качество модели; 0,5-0,6 – неудовлетворительное качество модели.

Note. Values area under curve 0.9-1, perfect model; 0.8-0.9, very good model; 0.7-0.8, good model; 0.6-0.7, adequate model; 0.5-0.6, unsatisfactory model.

**ТАБЛИЦА 4. ЗНАЧЕНИЯ КОЭФФИЦИЕНТА ЛИМФОГЕННОГО МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С РМЖ (у. е.)**

TABLE 4. VALUES OF THE COEFFICIENT OF LYMPHATIC METASTASIS IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH BREAST CANCER (с. у.)

Коэффициент Ratio	Me (Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> )	p	Площадь под кривой Area under curve	Встречаемость, % Occurrence, %	p
I группа Group I	1171,0 (443,1-2021,4)	0,0002	0,872	81,2	0,000001
II группа Group II	5094,4 (2493,7-18180,8)			88,9	

Примечание. I группа – пациенты с РМЖ с лимфогенным метастазированием, II группа – пациенты с РМЖ без лимфогенного метастазирования; p – значения непараметрического критерия Уилкоксона–Манна–Уитни; p – значения углового критерия Фишера. Значения площади под кривой: 0,9-1 – отличное качество модели; 0,8-0,9 – очень хорошее качество модели; 0,7-0,8 – хорошее качество модели; 0,6-0,7 – среднее качество модели; 0,5-0,6 – неудовлетворительное качество модели.

Note. Group I, patients with breast cancer with lymphatic metastasis; group II, patients with breast cancer without lymphatic metastasis; p, values of the nonparametric Wilcoxon–Mann–Whitney criterion; p, values of the Fisher angular criterion. Values area under curve: 0.9-1, perfect model; 0.8-0.9, very good model; 0.7-0.8, good model; 0.6-0.7, adequate model; 0.5-0.6, unsatisfactory model.

с показателями концентраций цитокинов и протеинов измеренных по отдельности. Значение коэффициента лимфогенного метастазирования равно 2069 условных единиц (у.е.) и меньше в 81% случаев соответствовало наличию метастазов, а значение, равное 2070 у. е. и больше в 89% случаев, – отсутствию метастазов (табл. 4).

## Обсуждение

Наше исследование не первое, которое отмечает более высокую экспрессию маркера пролиферации Ki-67 у пациентов с РМЖ с лимфогенным метастазированием, так в ряде исследований более высокая пролиферативная активность опу-

холи напрямую связана не только с наличием метастазов в лимфатических узлах, но и с инвазией, высокой степенью злокачественности и клинической стадией опухоли [3, 4, 9, 16].

Снижение концентрации CDH1 в крови пациентов с РМЖ с лимфогенным метастазированием (табл. 1) согласуется с литературными данными, согласно которым репрессия транскрипции молекулы адгезии CDH1 является признаком эпителиально-мезенхимального перехода, происходящего при повышенной пролиферации клеток и при метастазировании [19, 21]. Существуют противоречия относительно влияния PAI-1 на прогрессирование опухоли. Известно, что PAI-1 ингибирует uPA, что, в свою очередь, должно замедлять прогрессирование рака [22]. Кроме того, данный протеин, взаимодействуя с компонентами базальной мембраны и внеклеточного матрикса, опосредовано, способен препятствовать инвазии и миграции опухолевых клеток [7]. Но существуют и противоположные данные, согласно которым PAI-1 может способствовать опухолевой прогрессии. С этим связывают увеличение этого протеина в опухолевых клетках и в крови при более крупных опухолях, более высоких степенях злокачественности и инвазивных гистологических типах РМЖ [8].

Повышенные концентрации провоспалительных цитокинов в крови пациентов с лимфогенным метастазированием при РМЖ (табл. 1), вероятно, связано со способностью цитокинов активировать сигнальные пути, усиливающие миграционные свойства опухолевых клеток. Например, проопухолевые функции IL-6 связаны с сигнальными путями JAK-STAT3 и Notch, активирующими гены, ответственные за выживание опухолевых клеток, пролиферацию, ангиогенез, метастазирование [5]. Известно, что IL-8 также активирует онкогенные сигнальные пути PI3K, RAS/MAPK и JAK/STAT в опухолевых клетках, тем самым способствуя инвазии, миграции и пролиферации злокачественных клеток [10]. Кроме того, IL-8 опосредованно стимулирует секрецию матриксных металлопротеиназ, разрушающих внеклеточный матрикс, что обеспечивает необходимые условия для метастазирования опухолевых клеток [18]. Проопухолевая роль IL-6 и IL-8 отмечена в статье Narita D. и соавторов, согласно которой концентрации этих цитокинов в крови пациентов с РМЖ были выше по сравнению со здоровыми донорами и положительно коррелировали со стадией заболевания и смертностью [15]. TNF $\alpha$  может воздействовать непосредственно на опухолевые клетки, вызывая в них метаболические нарушения, усиливая их инвазивные свойства [6]. Помимо этого, извест-

но, что TNF $\alpha$  необходим для миграции опухолевых клеток, что связано с усилением регуляции транскрипционного репрессора TWIST1 посредством активации IKK $\beta$  и NF- $\kappa$ B и индукцией эпителиально-мезенхимального перехода [14]. TNF $\alpha$  совместно с IL-1 $\beta$  повышают экспрессию IL-8, MCP-1 и CCL5 что способствует ангиогенезу и миграции опухолевых клеток [23]. Таким образом, провоспалительные цитокины, активируя онкогенные сигнальные пути и регулируя взаимодействия опухолевых и стромальных клеток, повышают агрессивность неоплазмы.

Обратные корреляционные связи, возникающие между маркером пролиферации Ki-67 в опухолевых клетках и протеинами в крови пациентов с РМЖ, а именно CDH1 и PAI-1 (табл. 2), ожидаемы и согласуются с полученными ранее результатами. В литературе нет информации относительно взаимосвязей между концентрациями CDH1 и PAI-1 в крови и Ki-67 в опухоли, но имеются данные о корреляциях Ki-67 и маркеров эпителиально-мезенхимального перехода [3, 7, 19, 21]. Например, подробно описана взаимосвязь Ki-67 и одним из основных маркеров эпителиально-мезенхимального перехода — виментином, что связано с ослаблением межклеточных контактов и сопровождается усилением экспрессии виментина, при этом «свободные» опухолевые клетки проявляют повышенную пролиферативную активность, что в свою очередь сопровождается повышением экспрессии Ki-67 [3]. Полученные в результате исследования прямые корреляционные связи между маркером пролиферации Ki-67 в опухолевых клетках и цитокинами в крови пациентов с РМЖ (табл. 2), соотносятся с литературными данными. Например, известно, что в опухолевой ткани TNF $\alpha$  и IL-1 $\beta$  увеличивают пролиферацию опухолевых клеток в модели подавленной метастазированием клеточной линии тройного негативного РМЖ и в комбинации с IL-6 и IL-8 также клеток люминального А подтипа [5]. Следовательно, взаимосвязи, возникающие между цитокинами, протеинами и маркером пролиферации Ki-67 могут отражать эпителиально-мезенхимальный переход, происходящий в опухолевых клетках и наделяющий их повышенным миграционным потенциалом. При этом отсутствие взаимосвязи между Ki-67 и IL-6, IL-1 $\beta$  могут быть обусловлены тем, что цитокины крови являются динамичными молекулами, и их уровень слишком быстро изменяется.

Результаты ROC-анализа модели лимфогенного метастазирования на основе оценки концентрации биомаркеров в крови у пациентов с РМЖ обладают достаточно высокой чувствительностью и специфичностью, особенно пока-

затели концентрации IL-1 $\beta$ , демонстрирующие очень хорошее качество модели (табл. 3). Кроме того, предложенный в ходе исследования коэффициент лимфогенного метастазирования, представляющий собой отношения концентрации CDH1 к сумме показателей концентраций IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$ , обладает лучшим качеством модели, нежели определение концентраций только IL-1 $\beta$ . Не исключено, что использование этого коэффициента позволит сформировать группы риска пациентов с РМЖ, склонных к лимфогенному метастазированию. Не соответствовали точке отсечения предложенного коэффициента лимфогенного метастазирования только 5 пациентов, у двух из них – пациентов без лимфогенного метастазирования, но с низкими значениями коэффициента отмечалась гистологическая степень злокачественности G2, размер опухоли T2 и люминальный А молекулярный подтип, возраст обеих составил 69 лет. У одной из них отмечалась сниженная концентрация CDH1 при высоких концентрациях IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  (что соответствует показателям концентраций при лимфогенном метастазировании), у второй была повышена только концентрация IL-1 $\beta$ . Три пациента с лимфогенным метастазированием, но с высокими значениями коэффициента характеризовались: гистологической степенью злокачественности G2, размером опухоли T2, у двоих был люминальный В отрицательный, а у одной HER2/neu положительный молекулярный подтип. У пациентов с люминальным В отрицательным молекулярным подтипом была снижена концентрация IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  (что соответствует показателям концентраций без лимфогенного метастазирования), у третьей пациентки с HER2/neu положительным

молекулярным подтипом отмечалась повышенная концентрация CDH1 в сочетании с низкими концентрациями IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  (что соответствует показателям концентраций без лимфогенного метастазирования).

## Заключение

Использование Ki-67 в клинической практике рекомендуется ВОЗ и проводится практически в каждой клинике, но из-за различных методических подходов, результаты определения экспрессии этого маркера сильно варьируются. Поэтому у пациентов с РМЖ использование Ki-67 в комплексе с определением биомаркеров крови, таких как TNF $\alpha$  и CDH1, с помощью наборов с хорошо воспроизводимыми результатами даст возможность объективно оценить пролиферативную активность опухолевых клеток и использовать эти данные для составления персонализированного плана лечения пациентов. Определение отношения концентрации CDH1 к сумме показателей концентраций IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  может содействовать выявлению пациентов находящихся в группе риска по лимфогенному метастазированию. Соответственно в силу малой инвазивности, простоты и рутинности метода показатель предложенного коэффициента может способствовать предоперационному прогнозу относительно наличия или отсутствия лимфогенного метастазирования у пациентов с РМЖ.

### Финансирование

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

## Список литературы / References

1. Аутеншлюс А.И., Бернадо А.В., Давлетова К.И., Архипов С.А., Жураковский И.П., Михайлова Е.С., Проскура А.В., Богачук А.П., Липкин В.М., Ляхович В.В. Белковые и иммуногистохимические маркеры заболеваний молочной железы // Биомедицинская химия, 2020. Т. 66, № 2. С. 163-173. [Autenschlyus A.I., Bernado A.V., Davletova K.I., Arkhipov S.A., Zhurakovskiy I.P., Mikhailova E.S., Proskura A.V., Bogachuk A.P., Lipkin V.M., Lyakhovich V.V. Proteins and immunohistochemical markers of breast diseases. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*, 2020, Vol. 66, no. 2, pp. 167-173. (In Russ.)]
2. Давлетова К.И., Михайлова Е.С., Вараксин Н.А., Жураковский И.П., Проскура А.В., Сидоров С.В., Аутеншлюс А.И. Продукция цитокинов иммунокомпетентными клетками крови у больных инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа в различных возрастных группах при лимфогенном метастазировании // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 6. С. 1115-1126. [Davletova K.I., Mikhailova E.S., Varaksin N.A., Zhurakovskiy I.P., Proskura A.V., Sidorov S.V., Autenshlyus A.I. Cytokines production by blood immune cells in patients of different age groups with invasive ductal carcinoma of no special type and lymphatic metastases. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 6, pp. 1115-1126. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1115-1126.



3. Arafah M.A., Ouban A., Ameer O.Z., Quek K.J. KI-67 LI Expression in Triple-Negative Breast Cancer Patients and Its Significance. *Breast Cancer (Auckl.)*, 2021, Vol. 30, no. 15, 11782234211016977. doi: 10.1177/11782234211016977.
4. Asaoka M., Patnaik S.K., Zhang F., Ishikawa T., Takabe K. Lymphovascular invasion in breast cancer is associated with gene expression signatures of cell proliferation but not lymphangiogenesis or immune response. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2020, Vol. 181, no. 2, pp. 309-322.
5. Baram T., Rubinstein-Achiasaf L., Ben-Yaakov H., Ben-Baruch A. Inflammation-driven breast tumor cell plasticity: Stemness/EMT, therapy resistance and dormancy. *Front. Oncol.*, 2021, Vol. 10, 614468. doi: 10.3389/fonc.2020.614468.
6. Ben-Baruch A. Tumor necrosis factor  $\alpha$ : Taking a personalized road in cancer therapy. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 903679. doi: 10.3389/fimmu.2022.903679.
7. Humphries B.A., Buschhaus J.M., Chen Y.C., Haley H.R., Qyli T., Chiang B., Shen N., Rajendran S., Cutter A., Cheng Y.-H., Chen Y.-T., Cong J., Spinosa P.C., Yoon E., Luker K.E., Luker G.D. Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI1) promotes actin cytoskeleton reorganization and glycolytic metabolism in triple-negative breast cancer. *Mol. Cancer Res.*, 2019, Vol. 17, no. 5, pp. 1142-1154.
8. Lampelj M., Arko D., Cas-Sikosek N., Kavalar R., Ravnik M., Jezersek-Novakovic B., Dobnik S., Dovnik N.F., Takac I. Urokinase plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) in breast cancer – correlation with traditional prognostic factors. *Radiol. Oncol.*, 2015, Vol. 49, no. 4, pp. 357-364.
9. Liang Q., Ma D., Gao R.F., Yu K.D. Effect of Ki-67 Expression levels and histological grade on breast cancer early relapse in patients with different immunohistochemical-based subtypes. *Sci. Rep.*, 2020, Vol. 10, no. 1, 7648. doi: 10.1038/s41598-020-64523-1.
10. Łukaszewicz-Zajac M., Pączek S., Mroczko B. The significance of chemokine CXCL-8 in esophageal carcinoma. *Arch. Med. Sci.*, 2020, Vol. 16, no. 2, pp. 475-480.
11. Maranta A.F., Broder S., Fritzsche C., Knauer M., Thürlimann B., Jochum W., Ruhstaller T. Do YOU know the Ki-67 index of your breast cancer patients? Knowledge of your institution's Ki-67 index distribution and its robustness is essential for decision-making in early breast cancer. *Breast*, 2020, Vol. 51, pp. 120-126.
12. Mariotto A.B., Etzioni R., Hurlbert M., Penberthy L., Mayer M. Estimation of the number of women living with metastatic breast cancer in the United States. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 2017, Vol. 26, pp. 809-815.
13. Matutino A., Joy A.A., Brezden-Masley C., Chia S., Verma S. Hormone receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer: redrawing the lines. *Curr. Oncol.*, 2018, Vol. 25, pp. 131-141.
14. Mercogliano M.F., Bruni S., Elizalde P.V., Schillaci R. Tumor necrosis factor  $\alpha$  blockade: an opportunity to tackle breast cancer. *Front. Oncol.*, 2020, Vol. 10, 584. doi: 10.3389/fonc.2020.00584.
15. Narita D., Seclaman E., Anghel A., Iliina R., Cireap N., Negru S., Sirbu I.O., Ursoniu S., Marian C. Altered levels of plasma chemokines in breast cancer and their association with clinical and pathological characteristics. *Neoplasma*, 2016, Vol. 63, no. 1, pp. 141-149.
16. Petrelli F., Viale G., Cabiddu M., Barni S. Prognostic value of different cut-off levels of KI 67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2015, Vol. 153, pp. 477-491.
17. Posso M., Corominas J.M., Serrano L., Román M., Torá-Rocamora I., Domingo L., Romero A., Quintana M.J., Vernet-Tomas M., Baré M., Vidal C., Sánchez M., Saladié F., Natal C., Ferrer J., Servitja S., Sala M., Castells X.; BELE Study Group. Biomarkers expression in benign breast diseases and risk of subsequent breast cancer: a case-control study. *Cancer Med.*, 2017, Vol. 6, no. 6, pp. 1482-1489.
18. Sarode P., Schaefer M.B., Grimminger F., Seeger W., Savai R. Macrophage and tumor cell cross-talk is fundamental for lung tumor progression: we need to talk. *Front. Oncol.*, 2020, Vol. 10, 324. doi: 10.3389/fonc.2020.00324.
19. Savci-Heijink C.D., Halfwerk H., Hooijer G.K.J., Koster J., Horlings H.M., Meijer S.L., van de Vijver M.J. Epithelial-to-mesenchymal transition status of primary breast carcinomas and its correlation with metastatic behavior. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2019, Vol. 174, pp. 649-659.
20. Siersbæk R., Scabia V., Nagarajan S., Chernukhin I., Papachristou E.K., Broome R., Johnston S.J., Joosten S.E.P., Green A.R., Kumar S., Jones J., Omarjee S., Alvarez-Fernandez R., Glont S., Aitken S.J., Kishore K., Cheeseman D., Rakha E.A., D'Santos C., Zwart W., Russell A., Brisken C., Carroll J.S. IL6/STAT3 signaling hijacks estrogen receptor  $\alpha$  enhancers to drive breast cancer metastasis. *Cancer Cell.*, 2020, Vol. 38, no. 3, pp. 412-423.
21. Sommariva M., Gagliano N. E-Cadherin in pancreatic ductal adenocarcinoma: a multifaceted actor during EMT. *Cells*, 2020, Vol. 9, no. 4, 1040. doi: 10.3390/cells9041040.
22. Völker H.U., Weigel M., Strehl A., Frey L. Levels of uPA and PAI-1 in breast cancer and its correlation to Ki67-index and results of a 21-multigene-array. *Diagn. Pathol.*, 2018, Vol. 13, no. 1, 67. doi: 10.1186/s13000-018-0737-5.

23. Yu P.F., Huang Y., Han Y.Y., Lin L.Y., Sun W.H., Rabson A.B., Wang Y., Shi Y.F. TNF alpha-activated mesenchymal stromal cells promote breast cancer metastasis by recruiting CXCR2 (+) neutrophils. *Oncogene*, 2017, Vol. 36, pp. 482-490.

24. Zhang S., Zhang D., Yi S., Gong M., Lu C., Cai Y., Tang X., Zou L. The relationship of lymphatic vessel density, lymphovascular invasion, and lymph node metastasis in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, no. 2, pp. 2863-2873.

---

**Авторы:**

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

**Михайлова Е.С.** — научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет»; старший научный сотрудник «Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики» ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

**Архипов С.А.** — д.б.н., заведующий лабораторией иммуногистохимии, биохимии и фармакологии, центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет»; старший научный сотрудник «Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики» ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

**Вараксин Н.А.** — заведующий лабораторией АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия

**Проскура А.В.** — к.м.н., научный сотрудник «Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики» ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

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

**Authors:**

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

**Mikhaylova E.S.**, Research Associate, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University; Senior Research Associate, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

**Arkipov S.A.**, PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Immunohistochemistry, Biochemistry and Pharmacology, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University; Senior Research Associate, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

**Varaksin N.A.**, Head of Laboratory, JSC "Vector-Best", Novosibirsk, Russian Federation

**Proskura A.V.**, PhD (Medicine), Research Associate, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

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

---

Поступила 23.08.2022  
Отправлена на доработку 29.08.2022  
Принята к печати 08.11.2022

Received 23.08.2022  
Revision received 29.08.2022  
Accepted 08.11.2022