

УДК 618.19-006-091.8:576.5:576.385
https://doi.org/10.20538/1682-0363-2023-4-6-14



Маркеры эпителиально-мезенхимального перехода, пролиферации и продукция цитокинов в ткани молочной железы при злокачественных и незлокачественных заболеваниях молочной железы

Аутеншлюс А.И.^{1,2}, Архипов С.А.^{1,2}, Михайлова Е.С.^{1,2}, Архипова В.В.¹, Проскура А.В.², Вараксин Н.А.³, Ляхович В.В.²

¹ Новосибирский государственный медицинский университет (НГМУ)
Россия, 630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52

² Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики (НИИМББ),
Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины (ФИЦ ФТМ)
Россия, 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

³ АО «Вектор-Бест»
Россия, 630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово

РЕЗЮМЕ

Цель. На основе изучения экспрессии маркеров пролиферации, эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) и цитокинового профиля суперглантов образцов ткани молочной железы (МЖ) при раке МЖ и незлокачественных заболеваниях (НЗМЖ) разработать методологические основы оценки вероятности малигнизации МЖ при НЗМЖ.

Материалы и методы. В образцах МЖ больных с инвазивной карциномой неспецифического типа (ИКНТ) и пациентов с НЗМЖ иммуногистохимическим методом определяли экспрессию Е-кадгерина (CDH1), интегрина $\beta 1$ (CD29), коллагена II типа (СII) и маркера пролиферации Ki-67. С помощью иммуноферментного анализа в супернатанте культивируемых образцов МЖ определяли концентрацию интерлейкина (IL) 2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1 β , IL-1Ra, фактора некроза опухоли-альфа (TNF α), гамма-интерферона (IFN γ), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-A) и моноцитарного хемотаксического белка 1 (MCP-1).

Результаты. Показано, что ИКНТ и ДЗМЖ отличаются по экспрессии Е-кадгерина, CD29, Ki-67 и продукции IL-2, IL-4, IL-6, IL-17, IL-18, IL-1Ra, TNF α , IFN γ , MCP-1. При помощи ROC-анализа установлено, что модели, характеризующие различия между образцами ИКНТ и ДЗМЖ, формируются по параметрам экспрессии CD29, Ki-67 и продукции IL-17, IL-18, TNF α , VEGF-A и MCP-1. При помощи нейросетевого анализа выявлено, что наибольшую «нормализованную важность» для оценки различий образцов ИКНТ и ДЗМЖ имеют параметры CD29, IL-1Ra, TNF α и VEGF-A. При кластеризации объединенной базы данных пациентов с ДЗМЖ и ИКНТ по экспрессии Е-кадгерина, CD29, Ki-67 и по показателям продукции IL-17, IL-18, TNF α , MCP-1 и VEGF-A формируется кластер, в который входят показатели 94,1% пациентов с ДЗМЖ. Параметры менее 10% пациентов с ДЗМЖ, попавших в другие кластеры, практически совпадали с исследованными параметрами ИКНТ. Это дает основание предположить, что эти пациенты могут составить группу риска с вероятностной малигнизацией более 90%.

Заключение. Полученные данные позволили сформировать методологическую основу для оценки вероятности малигнизации МЖ у пациентов с ДЗМЖ.

✉ Архипов Сергей Алексеевич, arhipowsergei@yandex.ru

Ключевые слова: незлокачественные заболевания молочной железы, инвазивная карцинома неспецифического типа, маркер пролиферации, маркеры эпителиально-мезенхимального перехода, цитокины

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Исследование профинансировано в рамках государственного задания (№ АААА-А18-118030790008-7) Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Соответствие принципам этики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено этическим комитетом Института молекулярной биологии и биофизики Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины (протокол № 2016-3 от 15.03.2016).

Для цитирования: Аутеншлюс А.И., Архипов С.А., Михайлова Е.С., Архипова В.В., Проскура А.В., Вараксин Н.А., Ляхович В.В. Маркеры эпителиально-мезенхимального перехода, пролиферации и продукция цитокинов в ткани молочной железы при злокачественных и незлокачественных заболеваниях молочной железы. *Бюллетень сибирской медицины*. 2023;22(4):6–14. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2023-4-6-14>.

Epithelial – mesenchymal transition markers, proliferation markers, and cytokine secretion in breast tissue in malignant and benign breast diseases

Autenshlyus A.I.^{1,2}, Arkhipov S.A.^{1,2}, Mikhaylova E.S.^{1,2}, Arkhipova V.V.¹, Proskura A.V.², Varaksin N.A.³, Lyahovich V.V.²

¹ *Novosibirsk State Medical University
52, Krasny Av., Novosibirsk, 630091, Russian Federation*

² *Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine
2, Timakova Str., 630117, Novosibirsk, Russian Federation*

³ *Vector-Best JSC
Koltsovo, Novosibirsk, 630559, Russian Federation*

ABSTRACT

Aim. To develop methodological grounds for assessing the probability of breast malignancy in patients with non-cancerous breast diseases (NCBD) by the following parameters: expression of markers of epithelial – mesenchymal transition (EMT) and proliferation and production of cytokines by samples of the breast tissue.

Materials and methods. In breast samples (BS) of patients with invasive carcinoma of no special type (ICNT) and patients with NCBD, immunohistochemistry was used to determine the expression of E-cadherin (CDH1), integrin β 1 (CD29), type II collagen (CII), and proliferation of Ki-67. Using the enzyme-linked immunosorbent assay, concentrations of interleukin (IL)-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1 β , IL-1Ra, tumor necrosis factor (TNF) α , interferon (IFN) γ , granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), granulocyte – macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, and monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 were determined in the supernatant of the cultured breast tissue samples.

Results. It was shown that ICNT and NCBD differ in the expression of E-cadherin, CD29, Ki-67, and the production of IL-2, IL-4, IL-6, IL-17, IL-18, IL-1Ra, TNF α , IFN γ , and MCP-1.

The ROC analysis found that the models characterizing the differences between the ICNT and NCBD samples were formed by the parameters of CD29 and Ki-67 expression and IL-17, IL-18, TNF α , VEGF-A, and MCP-1 production. The neural network analysis revealed that CD29, IL-1Ra, TNF α , and VEGF-A had the greatest normalized importance for assessing the differences between the ICNT and NCBD samples. Clustering of the combined database of patients with NCBD and ICNT by the expression of E-cadherin, CD29, Ki-67 and by the production of IL-17, IL-18, TNF α , MCP-1, and VEGF-A resulted in a cluster which includes the parameters of

94.1% of patients with NCBD. The parameters of less than 10% of patients with NCBD who fell into other clusters practically coincided with the studied parameters of the ICNT group, which suggests that these patients may form a risk group with the malignancy probability of more than 90%.

Conclusion. The data obtained made it possible to develop methodological grounds for assessing the likelihood of breast malignancy in patients with NCBD.

Keywords: non-cancerous breast diseases, invasive carcinoma of no special type, proliferation marker, markers of epithelial – mesenchymal transition, cytokines

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was funded within the state assignment (No. ААААА-А18-118030790008-7) of the Ministry of Health of the Russian Federation.

Conformity with the principles of ethics. All patients signed an informed consent to participate in the study. The study was approved by the Ethics Committee at the Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine (Protocol No. 2016-3 of 15.03.2016).

For citation: Autenshlyus A.I., Arkhipov S.A., Mikhaylova E.S., Arkhipova V.V., Proskura A.V., Varaksin N.A., Lyahovich V.V. Epithelial – mesenchymal transition markers, proliferation markers, and cytokine secretion in breast tissue in malignant and benign breast diseases. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2023;22(4):6–14. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2023-4-6-14>.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что патогенетическим фоном для развития рака могут быть незлокачественные заболевания молочной железы (НЗМЖ) [1, 2]. Согласно классификации Международного агентства по изучению рака (International Agency for Research on Cancer), в группу предраковых поражений молочной железы (МЖ) включена протоковая карцинома *in situ* [3]. Тем не менее, по данным литературы, к предраковым состояниям относят склерозирующий аденоз [4, 5], радиальный рубец [6] и внутрипротоковые пролифераты, повышающие риск развития рака МЖ с 1,27 до 10,35 раз в зависимости от формы их патологии [7–10]. Эти данные обуславливают актуальность исследований, направленных на поиск новых маркеров, позволяющих выявлять предраковые изменения в ткани МЖ, которые могут отражать механизмы малигнизации ткани МЖ при НЗМЖ.

Одним из процессов, характеризующих начало злокачественной трансформации, является эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) [11, 12]. Известно, что ЭМП характеризуется активацией экспрессии мезенхимальных маркеров, таких как интегрин бета-1 (CD29) и коллагена II типа (СII), а также снижением уровня экспрессии эпителиального маркера Е-кадгерина (CDH1) [13–17]. Наиболее широко используемым маркером пролиферации клеток при раке МЖ является Ki-67 благодаря надежной корреляции с пролиферативной активностью раковых клеток [18].

Выявление ЭМП в тканях МЖ можно рассматривать как первый признак развития клеточной атипии, а экспрессию ряда молекул, ассоциированных с комплексом ЭМП, как «маркер», свидетельствующий о начале процесса малигнизации при НЗМЖ, индукторами которого является ряд медиаторов воспаления, включая цитокины [12, 13]. В свою очередь, продукция цитокинов, стимулирующая ЭМП, может быть вызвана активацией некоторых сигнальных путей в клетках. Так, индукция ЭМП под влиянием интерлейкина (IL) 1 β , как и фактора некроза опухоли-альфа (TNF α), обусловлена активацией сигнального пути NF-kB [14]. Эти данные указывают на то, что малигнизация ткани МЖ может зависеть не только от процесса ЭМП, но и от конкретных изменений в цитокиновом профиле опухоли, определяющих микроокружение опухоли, в которое входят различные иммунокомпетентные клетки, фибробласты, фиброциты, эпителиоциты и другие клетки, которые продуцируют различные цитокины. Некоторые из цитокинов, являющиеся продуктом клеток микроокружения опухоли, активно поддерживают прогрессирование рака МЖ [19, 20]. Однако роль цитокинов в процессе формирования клеточной атипии и малигнизации ткани МЖ еще недостаточно изучена, чтобы рассматривать их как маркеры, указывающие на высокий риск малигнизации.

Цель исследования: на основе изучения экспрессии маркеров пролиферации, эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) и цитокинового профиля супернатантов образцов ткани молочной железы

(МЖ) при раке МЖ и незлокачественных заболеваниях (НЗМЖ) разработать методологические основы оценки вероятности малигнизации МЖ при НЗМЖ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования служили образцы опухолей МЖ 79 женщин, находившихся на лечении в онкологическом отделении № 1 Новосибирской городской больницы № 1. Из них 62 человека с гистологическим типом рака МЖ – инвазивная карцинома неспецифического типа (ИКНТ) II степени, 17 человек – с доброкачественными заболеваниями МЖ (ДЗМЖ), из них: с фибroadеномой – 8, с фибрознокистозной болезнью, в том числе с фибroadеноматозом, – 6, с протоковой гиперплазией с участками склерозирующего аденоза – 2, с очаговым фиброзом с микрокальцинатами – 1. Средний возраст пациентов с ИКНТ $53,9 \pm 1,8$ (23 года – 76 лет), с ДЗМЖ – $45,4 \pm 5,1$ (19–67 лет). Критериями исключения из исследования были признаки метастазирования в отдаленные органы и наличие сопутствующих гормональных, хронических, воспалительных и инфекционных заболеваний.

Исследование и все протоколы исследования одобрены этическим комитетом Института молекулярной биологии и биофизики (протокол № 2016-3) Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины (Новосибирск, Россия). Все процедуры, выполненные в этом исследовании, проведены в соответствии с Хельсинкской декларацией 1964 г. и ее последующими поправками (Brazil, Fortaleza, 2013). Каждый пациент был проинформирован о проведенном исследовании, его целях и методах. Письменное информированное согласие на участие в исследовании и на использование образцов опухоли подписывалось каждым пациентом и заверялось лечащим врачом.

Образцы опухоли (8 мм³), полученные с помощью трепанобиопсии, промывали культуральной средой DMEM-F12 трижды, затем помещали в стеклянный флакон с 1 мл среды DMEM-F12 и инкубировали в течение 72 ч при 37 °C [15]. После инкубации исследуемые образцы извлекали из среды и фиксировали в 10%-м нейтральном растворе формалина для дальнейших иммуногистохимических и гистопатологических исследований. В супернатанте образца МЖ с помощью иммуноферментного анализа определяли концентрации IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1 β , IL-1Ra, TNF α , гамма-интерферона (IFN γ), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-A) и моноцитарный

хемотаксический белок 1 (MCP-1), используя наборы реагентов «АО Вектор-Бест» (Россия).

Фиксированные в нейтральном формалине образцы ткани обезвоживали и заливали в парафин. Депарафинизацию и регидратацию парафиновых срезов проводили по стандартному протоколу – ксилол/этанол.

Уровни экспрессии Ki-67, E-кадгерина (DH1), CD29 и CII в образцах ИКНТ и ткани НЗМЖ определяли с использованием моноклональных антител: анти-Ki-67 (Leica Biosystems, Inc.), анти-E-кадгерин (BD Biosciences, США), анти-CD29 (BD Transduction Laboratories, США), анти-CII (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) и системы визуализации VECTASTAIN ABC Kit (Vector Laboratories, PK-7200, США) в соответствии с рекомендациями производителей. Срезы дополнительно окрашивали гематоксилином и эозином, заключали в балзам. Анализ экспрессии исследуемых маркеров проводили с помощью морфометрического комплекса на базе микроскопа MICROMED-6, цифровой камеры DSM 510 и программного обеспечения ImageJ 1.42g (NIH, США). Для каждого пациента оценивали по 10 микрофотографий (полученных при $\times 40$). Данные экспрессии Ki-67, DH1, CD29 и CII представлены в процентах (% клеток, экспрессирующих маркер).

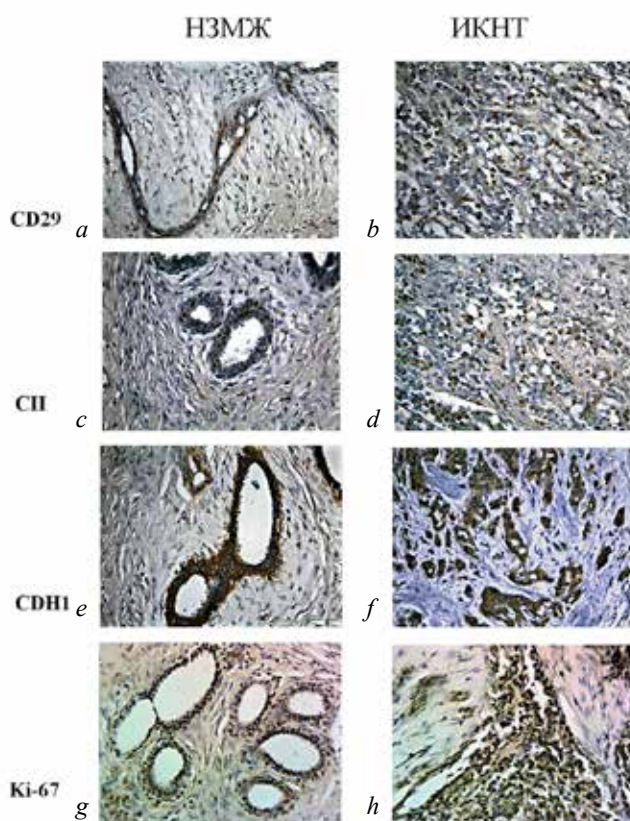
Уровень статистической значимости различий между группами определялся с помощью непараметрического критерия Вилкоксона – Манна – Уитни. Показатели выражали в виде медианы интерквартильного размаха $Me (Q_{25}; Q_{75})$. Вычисления проводились с использованием программного обеспечения Statistica v. 7.

Нейросетевой анализ и ROC-анализ полученных данных проводились с использованием программного обеспечения IBM SPSS, v. 22. Оценку «нормализованной важности» различных характеристик образцов опухоли для выявления различий между образцами ИКНТ и ДЗМЖ осуществляли при помощи нейросетевого анализа всей базы данных, включающих параметры ИКНТ и ткани МЖ при ДЗМЖ. В исследовании была использована нейросетевая модель, сгенерированная на основе модуля «Много-слойный перцептрон», одним скрытым слоем и тремя нейронами. Функция активации скрытого слоя – «гиперболический тангенс», функция активации выходного слоя – «тождество». Для проверки точности анализа нейросетевой модели нормализованную важность всех параметров модели определяли при использовании двух методов обучения: пакетного (алгоритм оптимизации метод градиентного спуска) и интерактивного (алгоритм оптимизации метод градиентного спуска). Кластерный анализ прово-

дили с использованием программного обеспечения Statistica v. 7.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В таблице 1 представлена оценка различий между образцами ткани МЖ при ИКНТ и незлокачественных заболеваниях МЖ по экспрессии маркеров пролиферации, ЭМП и концентрации цитокинов в супернатанте. На рис. 1 приведены образцы ИКНТ и ткани МЖ от пациентов с НЗМЖ, иммуногистохимически окрашенные на Ki-67, E-кадгерин, СП и CD29.



Показатели экспрессии Ki-67 были выше в группе образцов ИКНТ по сравнению с таковыми в группе образцов при ДЗМЖ в 2,7 раза. Показано, что образцы ИКНТ и образцы ДЗМЖ достоверно отличаются по экспрессии E-кадгерина и CD29: показатели экспрессии E-кадгерина были выше в образцах ткани МЖ при ДЗМЖ по сравнению с образцами ИКНТ, а показатели экспрессии CD29 были выше в образцах ткани при ИКНТ по сравнению с образцами при ДЗМЖ. По экспрессии СП между указанными группами различий не выявлено.

Рис. 1. Результаты иммуногистохимического анализа опухолевой ткани: НЗМЖ – доброкачественные заболевания молочной железы (a, c, e и g – фибroadенома); ИКНТ – инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа (b, d, f и h). Коричнево-желтая окраска указывает на экспрессию маркеров ЭМП (CDH1 – E-кадгерин; CD29 – интегрин β 1; СП – коллаген II типа) и маркера пролиферации Ki-67. Дополнительное окрашивание гематоксилином и эозином, $\times 400$

Установлено, что образцы ИКНТ и ДЗМЖ достоверно отличаются по продукции цитокинов IL-2, IL-6, IL-17, IL-18, IL-1Ra, TNF α , IFN γ , VEGF-A и MCP-1. Концентрация цитокинов IL-6 и MCP-1 в супернатанте ткани была выше при ДЗМЖ по сравнению с образцами ИКНТ, а концентрация цитокинов IL-2, IL-17, IL-18, IL-1Ra, TNF α , IFN γ и VEGF-A была выше в образцах ИКНТ по сравнению с образцами при ДЗМЖ.

В таблице 2 представлены результаты ROC-анализа и нейросетевого исследования по выявлению различий между образцами ткани МЖ при ИКНТ и НЗМЖ по экспрессии маркеров пролиферации, ЭМП и концентрации цитокинов в супернатанте образцов опухоли. При помощи ROC-анализа,

показывающего качество моделей, установлено, что наиболее качественные модели, характеризующие различия образцов ИКНТ и ДЗМЖ, формируются при использовании в качестве параметров сравнения следующие показатели: экспрессию CD29 и Ki-67, продукцию образцами опухоли IL-17, IL-18, TNF α , VEGF-A и MCP-1. По данным ROC-анализа, качество моделей для выявления различий между опухолями при ИКНТ и ткани МЖ ДЗМЖ, основанное на этих показателях, было хорошим (AUC > 0,7) или очень хорошим (AUC > 0,8). Величины AUC для CD29 и Ki-67, IL-17, IL-18, TNF α , VEGF-A и MCP-1 составили 0,750; 0,863; 0,732; 0,784; 0,722; 0,873 и 0,742 соответственно (табл. 2).

Согласно данным, полученным при помощи нейросетевого анализа, самые высокие показатели нормализованной важности (более 80%) в нейросетевой модели для выявления различий между ИКНТ и ДЗМЖ были обнаружены для экспрессии CD29 (100%), продукции IL-1Ra (>90%), TNF α (>90%) и VEGF-A (>80%). Достаточно высокие показатели нормализованной важности (более

70%) в использованной нейросетевой модели для выявления различий между образцами опухолей при ИКНТ и ДЗМЖ были выявлены для E-кадгерина и Ki-TNF α 67 (табл. 2). Как видно из табл. 2, метод обучения нейросетевой модели (пакетный или интерактивный) не оказывал существенного влияния на результаты анализа всех переменных.

Таблица 1

Экспрессия маркеров, ассоциированных с ЭМП, Ki-67, и концентрация цитокинов в супернатанте образцов ИКНТ и ДЗМЖ, Me (Q_{25} ; Q_{75})			
Параметр	Образцы тканей МЖ		p
	ИКНТ	ДЗМЖ	
E-кадгерин	64,2 (60,9; 91,7)	82,7 (79,7; 97,6)	0,020
CD29	19,6 (8,4; 19,7)	8,9 (1,3; 15,3)	0,001
СП	12,1 (6,5; 15,7)	10,5 (5,3; 14,9)	0,542
Ki-67	21,0 (12,0; 43,0)	8,3 (3,2; 19,8)	0,001
IL-2	2,8 (2,1; 5,4)	2,2 (2,1; 2,5)	0,005
IL-4	2,7 (1,7; 4,1)	3,2 (2,6; 4,4)	0,286
IL-6	297,8 (87,2; 482,7)	502,4 (279,6; 654,5)	0,027
IL-8	366,6 (203,1; 672,8)	378,7 (295,5; 1360,0)	0,467
IL-10	6,1 (1,3; 11,8)	9,5 (1,7; 19,5)	0,404
IL-17	2,3 (1,0; 5,1)	6,0 (2,2; 7,4)	0,003
IL-18	42,4 (15,2; 180,6)	5,0 (3,3; 26,5)	0,001
IL-1 β	32,3 (14,7; 70,2)	17,0 (11,2; 38,8)	0,148
IL-1Ra	3273,5 (2172,6; 4195,0)	2070,6 (689,6; 3003,2)	0,034
TNF α	2,9 (1,5; 5,2)	2,0 (1,1; 3,2)	0,046
IFN γ	11,5 (5,2; 26,0)	5,9 (2,0; 17,4)	0,027
G-CSF	61,1 (8,7; 424,6)	80,3 (41,1; 468,1)	0,745
GM-CSF	8,6 (3,1; 22,2)	3,2 (2,0; 13,4)	0,099
VEGF-A	1359,2 (161,0; 2144,0)	55,8 (18,4; 377,2)	0,001
MCP-1	560,9 (196,9; 1556,0)	660,8 (259,6; 1133,2)	0,046

Примечание. Величина экспрессии E-кадгерина, CD29 и СП представлена в процентах (% экспрессирующих клеток); значения цитокинов – в пкг/мл.

Таблица 2

Оценка различий между образцами ткани МЖ при ИКНТ и ДЗМЖ по экспрессии маркеров ЭМП, пролиферации и концентрации цитокинов в супернатанте при помощи ROC-анализа и нейросетевого метода исследования			
Параметр	Нормализованная важность параметра в НС-модели; метод обучения – пакетный, %	Нормализованная важность параметра в НС-модели; метод обучения – интерактивный, %	Площадь под кривой (AUC) в ROC-анализе
E-кадгерин	79,4	78,6	0,549
CD29	100,0	100,0	0,750
СП	36,3	38,0	0,162
Ki-67	78,0	77,7	0,863
IL-2	53,9	53,5	0,642
IL-4	22,5	34,4	0,415
IL-6	47,5	49,7	0,280
IL-8	45,5	50,4	0,441
IL-10	33,6	40,4	0,433
IL-17	68,3	68,5	0,732
IL-18	34,3	23,1	0,784
IL-1 β	53,8	40,6	0,616
IL-1Ra	90,7	95,7	0,668
TNF α	91,3	95,2	0,722
IFN γ	12,3	12,0	0,676
G-CSF	9,7	9,7	0,473
GM-CSF	76,7	71,7	0,459
VEGF-A	81,6	82,8	0,873
MCP-1	72,1	69,0	0,742

Примечание. НС-модель – нейросетевая модель. Результаты НС-анализа представлены в показателях «нормализованной важности» каждого параметра. Результаты ROC-анализа – в значениях AUC.

Методом кластерного анализа была проведена оценка вероятности формирования кластера из показателей пациентов с ДЗМЖ при учете только тех показателей, которые дали наибольшие значения показателя «нормализованной важности» при НС-анализе и «AUC» при ROC-анализе: CD29, Ki-67, IL-17, IL-18, TNF α , MCP-1 и VEGF-A. Показано, что при кластеризации объединенной базы данных пациентов с ИКНТ (№ образцов 1–62) и ДЗМЖ (№ 63–79) по указанным параметрам образцов ткани МЖ при значении евклидова расстояния равным 15 формируются четыре кластера, в один из которых – «кластер III», входят показатели более 90% (94,12%) пациентов с ДЗМЖ (рис. 2).

Подкластер «кластера III», расположенного на евклидовом расстоянии 2,0, содержал параметры трех образцов ДЗМЖ (№ 64, 67, 72) и двух образцов ИКНТ (№ 5, 6). В указанный подкластер вошли образцы от пациентов с ДЗМЖ, имеющих в анамнезе следующие диагнозы: «фиброзно-кистозные изменения пролиферативного типа с атипичной протоковой гиперплазией» (образцы № 64 и 72) и «фиброаденома с выраженной протоковой гиперплазией» (образец № 67). Параметры одного образца ДЗМЖ (отнесенного к другим кластерам) почти совпадали с параметрами ИКНТ. Этот образец был получен от пациента с диагнозом «фиброаденоматоз с выраженной пролиферацией» (кластер I, № 63).

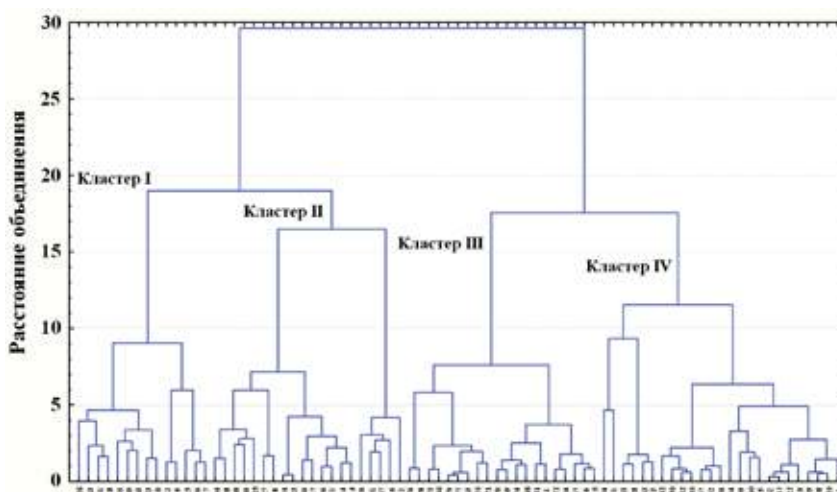


Рис. 2. Результаты многомерного кластерного анализа объединенных данных от пациентов с ИКНТ (№ образцов 1–62) и ДЗМЖ (№ 63–79). Дендрограмма построена по методу Уорда. Горизонтальная ось – зашифрованные номера образцов от разных пациентов с ИКНТ (от 1 до 62) и ДЗМЖ (от 63 до 79), вертикальная ось – расстояние объединения (евклидовы расстояния). Кластеризация проведена на основе одновременного анализа параметров: экспрессии Е-кадгерина, CD29 и Ki-67 в образцах опухоли и уровней секреции IL-17, IL-18, TNF α , MCP-1 и VEGF-A образцами опухоли

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследованные нами параметры образцов ткани МЖ при ИКНТ и ДЗМЖ от разных пациентов варьировали по величине экспрессии иммуногистохимических маркеров ЭМП, пролиферации и по продукции цитокинов. В связи с этим одной из основных задач была разработка нейросетевой модели, которая позволила бы прогнозировать и оценивать вероятность малигнизации доброкачественных образований на основе оценки экспрессии маркеров ЭМП, пролиферации, а также спектра цитокинов, продуцируемых образцами опухоли. Известно, что если выходные параметры модели нейронной сети изменяются, то меняется и важность отдельного параметра опухоли. Выходные данные нейросетевой модели также могут зависеть от способа «обучения»

модели. Поэтому при проведении нейросетевого анализа данных нами было использовано два варианта обучения модели.

При помощи ROC-анализа и нейросетевого анализа нами установлено, что показатели продукции образцами ткани МЖ ряда цитокинов могут обладать даже большей прогностической значимостью для оценки различий между злокачественными опухолями и доброкачественными заболеваниями, чем Е-кадгерин, СП, CD29 и Ki-67. К таким цитокинам отнесены IL-17, IL-18, TNF α , MCP-1 и VEGF-A, а также ряд других с меньшей прогностической значимостью. Показано, что при кластеризации объединенной базы данных пациентов с ДЗМЖ и ИКНТ по широкому спектру параметров образцов ткани МЖ, по показателям экспрессии Е-кадгерина, CD29 и Ki-67, а также по показателям продукции цитоки-

нов IL-17, IL-18, TNF α , MCP-1 и VEGF-A, формируется кластер, в который входят показатели более 90% пациентов с ДЗМЖ. При этом параметры менее 10% образцов ДЗМЖ, попавших в другие кластеры, практически совпадали с исследованными параметрами ИКНТ.

Эти данные указывают, с одной стороны, на то, что IL-18, TNF α и VEGF-A, вероятно, играют важную роль в формировании микроокружения, способствующего малигнизации ткани МЖ при ДЗМЖ. С другой стороны, при определенном уровне их продукции в качестве маркеров, они могут указывать на вероятность малигнизации ДЗМЖ. Согласно полученным результатам исследования, при ДЗМЖ к вероятному риску малигнизации отнесены пациенты со следующими диагнозами: «фиброаденоматоз с выраженной пролиферацией», «пролиферативная форма фиброкистозной болезни с атипичной протоковой гиперплазией» и «фиброаденома с выраженной протоковой гиперплазией» с наличием межпротоковых пролифератов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные позволяют сформировать группу риска пациентов с ДЗМЖ, ткань МЖ которых может малигнизироваться с вероятностью более 90%. Таким образом, более точный прогноз о вероятностной малигнизации ДЗМЖ можно получить, учитывая не только экспрессию в ней Е-кадгерина, СП, CD29 и маркера пролиферации Ki-67, но и уровень продукции цитокинов IL-17, IL-18, TNF α , MCP-1 и VEGF-A.

Полученные данные могут послужить методологической основой для дальнейшего исследования цитокинов, формирующих микроокружение в ткани МЖ при ее доброкачественных заболеваниях, которое, не исключено, может способствовать малигнизации ткани МЖ, а уровень продукции цитокинов может служить маркером для оценки вероятности этого процесса.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Roman M., Louro J., Posso M., Vidal C., Bargallo X., Vazquez I. et al. Castells X Long-term risk of breast cancer after diagnosis of benign breast disease by screening mammography. *Int. J. Environ. Res. Publ. Health.* 2022;19(5):2625. DOI: 10.3390/ijerph19052625.
- Kim S., Mai Tran T.X., Song H., Ryu S., Chang Y., Park B. Mammographic breast density, benign breast disease, and subsequent breast cancer risk in 3.9 million Korean women. *Radiology.* 2022;304(3):534–541. DOI: 10.1148/radiol.212727.
- Zeinomar N., Phillips K.A., Daly M.B., Milne N., Dite J., McClinnis R. et al. Benign breast disease increases breast cancer risk independent of underlying Familial risk profile: Findings from a Prospective Family Study Cohort. *Int. J. Cancer.* 2019;145(2):370–379. DOI: 10.1002/ijc.32112.
- Degnim A.C., Nassar A., Stallings-Mann M., Keith Anderson S., Oberg A.L., Vierkant R.A. et al. Gene signature model for breast cancer risk prediction for women with sclerosing adenosis. *Breast Cancer Res. Treat.* 2015;152(3):687–694. DOI: 10.1007/s10549-015-3513-1.
- Visscher D.W., Nassar A., Degnim A.C., Frost M.H., Vierkant R.A., Frank R.D. et al. Sclerosing adenosis and risk of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2014;144(1):205–212. DOI: 10.1007/s10549-014-2862-5.
- Aroner S.A., Collins L.C., Connolly J.L., Colditz G.A., Schnitt S.J., Rosner B.A. et al. Radial scars and subsequent breast cancer risk: results from the Nurses' Health Studies. *Breast Cancer Res. Treat.* 2013;139(1):277–285. DOI: 10.1007/s10549-013-2535-9.
- Arthur R., Wang Y., Ye K., Glass A., Ginsberg M., Loudig O. et al. Association between lifestyle, menstrual/reproductive history, and histological factors and risk of breast cancer in women biopsied for benign breast disease. *Breast Cancer Res. Treat.* 2017;165(3):623–631. DOI: 10.1007/s10549-017-4347-9.
- Salamat F., Niakan B., Keshtkar A., Rafiei E., Zendehtdel M. Subtypes of benign breast disease as a risk factor of breast cancer: a systematic review and meta analyses. *Iran. J. Med. Sci.* 2018;43(4):355–364.
- Degnim A.C., Visscher D.W., Berman H.K., Frost M.H., Sellers T.A., Vierkant R.A. et al. Stratification of breast cancer risk in women with atypia: a Mayo cohort study. *J. Clin. Oncol.* 2007;25(19):2671–2677. DOI: 10.1200/JCO.2006.09.0217.
- Hartmann L.C., Sellers T.A., Frost M.H., Lingle W.L., Degnim A.C., Ghosh K. et al. Benign breast disease and the risk of breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2005;353(3):229–237. DOI: 10.1056/NEJMoa044383.
- Kalluri R., Weinberg R. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 2009;119(6):1420–1428. DOI: 10.1172/JCI39104.
- Lambert A.W., Pattabiraman D.R., Weinberg R.A. Emerging biological principles of metastasis. *Cell.* 2017;168(4):670–691. DOI: 10.1016/j.cell.2016.11.037.
- Long X., Ye Y., Zhang L., Liu P., Yu W., Wei F. et al. IL-8, a novel messenger to cross-link inflammation and tumor EMT via autocrine and paracrine pathways. *Int. J. Oncol.* 2016;48(1):5–12. DOI: 10.3892/ijo.2015.3234.
- Markopoulos G.S., Roupakia E., Marcu K.B., Kolettas E. Epigenetic regulation of inflammatory cytokine-induced epithelial-to-mesenchymal cell transition and cancer stem cell generation. *Cells.* 2019;8(10):1143. DOI: 10.3390/cells8101143.
- Mendez M.J., Hoffman M.J., Cherry E.M., Lemmon C.A., Weinberg S.H. Cell fate forecasting: a data-assimilation approach to predict epithelial-mesenchymal transition. *Biophys. J.* 2020;118(7):1749–1768. DOI: 10.1016/j.bpj.2020.02.011.
- Prieto-Garcia E., Díaz-García C.V., García-Ruiz I., Agullo-Ortuno M.T. Epithelial-to-mesenchymal transition in tumor progression. *Med. Oncol.* 2017;34(7):122. DOI: 10.1007/s12032-017-0980-8.
- Sung J.Y., Cheong J.H. Pan-cancer analysis reveals distinct metabolic reprogramming in different epithelial-mesenchymal

- transition activity states. *Cancers (Basel)*. 2021;13(8):1778. DOI: 10.3390/CANCERS13081778.
18. Miller I., Min M., Yang C., Tian C., Gookin S., Carter D. et al. Ki67 is a graded rather than a binary marker of proliferation versus quiescence. *Cell Rep*. 2018;24(5):1105–1112. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.06.110.
19. Levina V., Su Y., Nolen B., Liu X., Gordin Y., Lee M. et al. Chemotherapeutic drugs and human tumor cells cytokine Network. *Int. J. Cancer*. 2008;123(9):2031–2040. DOI: 10.1002/ijc.23732.
20. Velazquez M.E., Ostoa-Saloma P., Palacios-Arreola M.I., Nava-Castro K.E., Ivonne Castro J., Morales-Montor J. The role of cytokines in brea cancer development and progression. *Interferon Cytokine Res*. 2015; 35(1):1–16. DOI: 10.1089/jir.2014.0026.

Вклад авторов

Аутеншлюс А.И., Архипов С.А., Ляхович В.В. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных; обоснование рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания; окончательное утверждение для публикации рукописи. Михайлова Е.С., Архипова В.В., Проскура А.В., Вараксин Н.А. – анализ и интерпретация данных; окончательное утверждение для публикации рукописи.

Информация об авторах

Аутеншлюс Александр Исаевич – д-р биол. наук, профессор, зав. Центральной научно-исследовательской лабораторией, НГМУ; гл. науч. сотрудник, НИИМББ, ФНЦ ФТМ, г. Новосибирск, lrciir@211.ru, <http://orcid.org/0000-0001-7180-010X>

Архипов Сергей Алексеевич – д-р биол. наук, вед. науч. сотрудник, Центральная научно-исследовательская лаборатория, НГМУ; ст. науч. сотрудник, НИИМББ, ФНЦ ФТМ, г. Новосибирск, arhipowsergei@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-1390-4426>

Михайлова Елена Семёновна – науч. сотрудник, Центральная научно-исследовательская лаборатория, НГМУ, г. Новосибирск, elena.michajlova.58@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-8364-819X>

Архипова Валентина Валериевна – мл. науч. сотрудник, Центральная научно-исследовательская лаборатория, НГМУ, г. Новосибирск, valia.arkhipova@yandex.ru, <http://orcid.org/0009-0000-0172-0905>

Проскура Андрей Викторович – канд. мед. наук, науч. сотрудник, НИИМББ, г. Новосибирск, avpdok@ngs.ru, <http://orcid.org/0000-0003-2313-1591>

Вараксин Николай Анатольевич – зав. лабораторией цитокинов, АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, р.п. Кольцово, varaksin@vector-best.ru, <http://orcid.org/0000-0002-0733-7787>

Ляхович Вячеслав Валентинович – д-р биол. наук, профессор, академик РАН, науч. руководитель, НИИМББ, ФИЦ ФТМ, г. Новосибирск, lyakh@niimbb.ru, <http://orcid.org/0000-0001-9619-3422>

✉ **Архипов Сергей Алексеевич**, arhipowsergei@yandex.ru

Поступила в редакцию 13.04.2023;
одобрена после рецензирования 11.05.2023;
принята к публикации 25.05.2023.