

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ОПУХОЛЕВЫМИ И ПРЕМЕТАСТАТИЧЕСКИМИ НИШАМИ, В СТРОМЕ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Л.А. Таширева¹, Т.С. Геращенко¹, М.В. Завьялова^{1,2}, О.Е. Савельева¹,
Е.В. Кайгородова^{1,2}, Н.А. Тарабановская¹, Е.М. Слонимская^{1,2},
Е.В. Денисов^{2,3}, В.М. Перельмутер¹

Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск¹

ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск²

Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск³
634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, e-mail: tashireva@oncology.tomsk.ru¹

Аннотация

Введение. Существует мнение, что опухолевая ниша в микроокружении первичной опухоли может являться отражением событий, происходящих в преметастатической нише. В нашем исследовании охарактеризован вклад генов цитокинов, связанных с развитием воспаления и формированием инвазивного и метастатического фенотипа опухолевых клеток, в создание благоприятных условий для развития опухоли и метастазов на основании оценки экспрессии генов цитокинов в микроокружении первичной опухоли. **Материал и методы.** Оценивались основные клинико-патологические параметры 12 пациентов с установленным диагнозом инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа (IC NST). С помощью технологии лазерной микродиссекции PALM и метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени была оценена экспрессия 13 генов, кодирующих ключевые цитокины и хемокины, в строме IC NST. **Результаты.** В проведенном исследовании была выявлена прямая корреляция между величиной опухолевого узла и уровнем экспрессии генов провоспалительных цитокинов *IL1b* и *CXCL8*. Кроме того, показано, что пролиферативная активность опухолевых элементов имела обратную корреляцию с экспрессией гена хемокина *CCL2*, привлекающего моноциты. Экспрессия *IL6* и *IL8* предполагает дифференцировку моноцитов в M2 макрофаги, одним из эффектов которых является стимуляция инвазивных свойств опухолевых клеток. Вместе с тем отсутствовала экспрессия клетками микроокружения генов *MST1*, *FGF7*, *EGF*, белковые продукты которых обеспечивают инвазивные и метастатические потенциалы опухолевых элементов. В проведенном исследовании не было обнаружено достоверных различий в частоте встречаемости и уровне экспрессии всех изучаемых генов в группах пациентов с наличием и отсутствием лимфогенных метастазов. Тем не менее использование многофакторного метода обработки данных позволило выявить комплекс взаимоотношений между изучаемыми параметрами, который связан с высоким риском развития лимфогенных метастазов. **Заключение.** Определен цитокиновый спектр опухолевой ниши, имеющий отношение к развитию воспаления, рекрутированию моноцитов, а также секреции факторов, способствующих как росту опухоли, так и лимфогенному метастазированию. Аналогичные события в преметастатической нише могли бы способствовать развитию макрометастаза.

Ключевые слова: цитокины, опухолевая ниша, преметастатическая ниша, рак молочной железы.

Метастазирование опухоли остается одной из основных причин смертности от рака молочной железы. В настоящее время ведутся исследования, направленные на поиск механизмов, лежащих в основе этого процесса. Сформулировано несколько концепций метастазирования. Наиболее значимые из них: теория «механического ареста» [1], предложенная J. Ewing в начале XX века, и теория S. Paget – «семян и почвы» [2], выводящая на первый план роль микроокружения в образовании вторичной опухоли в органах-мишенях. В продолжение последней Д. Лайденом (2005) была

разработана концепция преметастатических ниш [3]. Показано, что в первичной опухоли параллельно с формированием преметастатической ниши происходит формирование ниши, называемой опухолевой. Биологическим смыслом ее создания является обеспечение оптимальных условий для роста первичной опухоли. Ключевым процессом образования как опухолевой, так и преметастатической ниши является рекрутирование из костного мозга клеток-предшественников, инфильтрация иммунными клетками, секретирующими цитокины [3]. Таким образом, опухолевая ниша может

являться отражением событий, происходящих в преметастатической нише. В нашем исследовании на основании оценки экспрессии генов, имеющих отношение к формированию опухолевых ниш клетками, составляющими микроокружение опухоли, мы попытались охарактеризовать вклад последних в создание благоприятных условий для преметастатических ниш.

Материал и методы

В исследование вошли 12 пациенток, проходивших лечение в НИИ онкологии Томского НИМЦ в период с 2012 по 2015 г., с верифицированным диагнозом инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа (IC NST). Всем больным было выполнено хирургическое вмешательство в объеме секторальной резекции или радикальной мастэктомии с аксиллярной лимфодиссекцией (табл. 1). Предоперационного лечения не проводилось.

В исследуемой группе оценивались основные клинично-патологические параметры: размер опухоли, принадлежность к определенному молекулярно-генетическому подтипу, выраженность воспалительной реакции в строме, выраженность фиброза и гиалиноза, вовлеченность лимфатических узлов и наличие гематогенных метастазов. Выраженность фиброза и гиалиноза оценивалась по 3-балльной шкале, где 1 балл – нет или слабо, 2 – умеренно, 3 – выражен. Исследование проводилось при информированном согласии всех включенных пациентов, разрешение

получено в локальном этическом комитете (№ 10 от 24.04.2015).

С помощью технологии лазерной микродиссекции PALM (Carl Zeiss, Германия) из образцов свежего нефиксированного материала опухоли было получено микроокружение, из которого в дальнейшем была выделена РНК согласно адаптированному протоколу RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen, USA). Обратная транскрипция и полнотранскриптомная амплификация были проведены с использованием набора QuantiTect Whole Transcriptome Kit (Qiagen, USA). С помощью метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием технологии TaqMan была оценена экспрессия генов CCL2 (MCP-1), CXCL12 (SDF-1), MSP, MIF, IL-1b, IL-6, IL-8, TNF α , FGF, EGF, VEGF, TGF β 1, IGF относительно гена рефери – ACTB. Последовательности специфических праймеров и проб представлены в табл. 2.

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения SPSS 11.0 (SPSS, Chicago, USA). Для каждой выборки вычисляли средневыворочные характеристики. Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с использованием критерия Шапиро – Уилка. Сравнение частот встречаемости проводили с помощью точного критерия Фишера. Для оценки достоверности различий независимых выборок использовали критерий Манна – Уитни. Наличие корреляций определяли с помощью критерия Спирмана. Построение математической модели осуществляли с помощью логистической

Таблица 1

Характеристика больных инвазивной карциномой неспецифического типа молочной железы

Параметр	Значения параметров	Частота встречаемости
Возраст, лет	52,8 $\pm$ 9,5	
Стадия	I	3 (25,0 %)
	II	7 (58,3 %)
	III	2 (16,7 %)
Размер опухоли	Менее 2 см	2 (16,7 %)
	2–5 см	10 (83,3 %)
Молекулярно-генетический тип	Люминальный А	2 (16,7 %)
	Люминальный В	8 (66,7 %)
	Трижды негативный	2 (16,7 %)
Рецепторы эстрогенов	Позитивно	10 (83,3 %)
	Негативно	2 (16,7 %)
Рецепторы прогестерона	Позитивно	10 (83,3 %)
	Негативно	2 (16,7 %)
HER2/neu	Позитивно	-
	Негативно	12 (100 %)
Ki67	Экспрессия <20 %	2 (16,7 %)
	Экспрессия >20 %	10 (83,3 %)
Лимфогенные метастазы	Есть	5 (41,7 %)
	Нет	7 (58,3 %)
Гематогенные метастазы	Есть	1 (8,3 %)
	Нет	11 (91,7 %)

Таблица 2

Последовательность специфических праймеров и проб

Гены	Полное название/синоним	Праймеры и проба (5'-3')
CCL2	Monocyte Chemotactic Protein 1	F GCAAGTGTCCCAAAGAAGC R GTGAGTGTTC AAGTCTTCGG PROBE CAAGGAGATCTGTGCTGACCCCAA
CXCL12	Stromal Cell-Derived Factor 1	F GCATTGACCCGAAGCTAAAG R GCCCTTCCCTAACACTGG PROBE GTCTGACCCTCTCACATCTTGAACC
MST1	Macrophage-Stimulating Protein	F CCCCTGAATGGTATGTGGT R CCTCGGTGCTTGATGTTAC PROBE TGTGGCCTTGCTGAATGTCATCTCC
MIF	Macrophage Migration Inhibitory Factor	F GCAGAACCGCTCCTACAG R CTTAGGCGAAGGTGGAGTTG PROBE TAGTTGATGTAGACCTGTCCGGGC
IL-1b	Interleukin 1 Beta	F CTCTTCAGCCAATCTTCATTGC R AGGAGCACTTCATCTGTTTAGG PROBE ACCTGAGCTCGCCAGTGAAATGAT
IL-6	Interleukin 6	F CAACCTGAACCTTCCAAAGATG R ACCTCAAACCTCCAAAAGACCAG PROBE CCAGGCAAGTCTCCTCATTGAATCC
CXCL8	Interleukin 8 / Granulocyte Chemotactic Protein 1	F CCACCCCAAATTTATCAAAGAAGTCTG R AAATTCTCCACAACCTCTG PROBE CCACACTGCGCCAACACAGAAA
TNF	Tumor Necrosis Factor	F TCTATCTGGGAGGGGTCTTC R TCCCAAAGTAGACCTGCC PROBE GCTGGAGAAGGGTGACCGACT
FGF7	Fibroblast Growth Factor 7	F GGTACCTGAGGATCGATAAAAGAG R CACTTTCACCCCTTTGATTG PROBE ACTGCCACTGTCTGATTTCATGA
EGF	Epidermal Growth Factor	F AGCAGTTGATCCAGTAGAAAGG R CAAGCACATCCAATGACACAG PROBE AGCCTTCACTCCACACCATCG
VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A	F CAGATTATGCGGATCAAACCT R GCTCTATCTTTCTTTGGTCTGC PROBE GCCAGCACATAGGAGAGATGAGC
TGFb1	Transforming Growth Factor Beta 1	F CCACCCCGCTGGAGAGG R GCCGCACGCAGCAGTTC PROBE ACCAACTATTGCTTCAGCTCCACGG
IGF1	Insulin Like Growth Factor 1	F AGGCTGGAGATGTATTGCG R TCCTGTAGTTCTTGTTTCTCTGC PROBE TTCCTTCTGGGTCTTGGGCATGT
ACTB	Beta-Actin	F GAGAAGATGACCCAGATCATGTT R ATAGCACAGCCTGGATAGC PROBE AGACCTTCAACACCCCAAGCCAT

регрессии. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Известно, что опухоль способна формировать свое микроокружение посредством секреции различных факторов, которое в дальнейшем будет опосредовать инвазивные и метастатические свойства трансформированных клеток. Формирование опухолевой ниши с высокой вероятностью происходит параллельно с преме-тастатическими

нишами. В силу отсутствия инструментов для обнаружения формирующейся преме-тастатической ниши оценить профиль экспрессии цитокинов в ней невозможно. Исследование опухолевой ниши позволяет приблизиться к пониманию событий, которые могли бы происходить в местах будущих метастазов.

Была оценена выраженность воспалительной реакции в строме в соответствии с рекомендациями международной рабочей группы [4], выраженности фиброза и гиалиноза стромы. В 36,4 % (4/11)

Таблица 3

Частота и уровень экспрессии генов, вовлеченных в формирование преметастатической ниши

Ген	Частота экспрессии	Уровень экспрессии (усл. ед.)
CCL2	5 (41,7 %)	0,024 (0,003–0,429)
CXCL12	10 (83,3 %)	0,040 (0,006–5,353)
MST1	0 (0 %)	–
MIF	11 (91,7 %)	0,137 (0,065–4,528)
IL-1b	8 (66,7 %)	0,006 (0,000–3,797)
IL-6	8 (66,7 %)	0,053 (0,005–0,868)
CXCL8	12 (100 %)	0,034 (0,001–2,007)
TNF	0 (0 %)	–
FGF7	0 (0 %)	–
EGF	0 (0 %)	–
VEGFA	2 (16,7 %)	0,004 (0,001–0,005)
TGFb1	6 (50,0 %)	0,064 (0,006–1,139)
IGF	3 (25,0 %)	0,015 (0,005–0,188)

случаев выраженность инфильтрации стромы лимфоцитами составила 1 % от площади стромы, в 9,1 % (1/11) – 5 %, в 27,3 % (3/11) – 10 % и в 27,3 % (3/11) – 20 %. Стоит отметить, что выраженность воспалительной реакции в строме увеличивалась со стадией заболевания ($r=0,619$; $p=0,042$). Фиброз стромы в 36,4 % (4/11) случаев был оценен на 1 балл, в 63,6 % – в 2 балла. Среди изученных опухолей гиалиноз стромы был выражен слабо или отсутствовал (90,9 %).

Была оценена частота экспрессии клетками микроокружения генов, ассоциированных с формированием опухолевых и преметастатических ниш (табл. 3). Микроокружение опухоли (опухолевая ниша) в зависимости от клеточного состава и цитокиновой активности может приводить к противоположным эффектам: стимулировать или ингибировать пролиферативную активность, инвазивные и метастатические потенции опухолевых клеток. Практически всегда в микроокружении IC NST обнаруживалась экспрессия генов *CXCL8*, *CXCL12*, *MIF* и примерно в половине случаев – *CCL2*, *IL-1b*, *IL-6*, *TGFb1*. Перечисленные гены кодируют цитокины, обладающие свойствами хемоаттрактантов, про- и противовоспалительными функциями [5]. Однако связанными со свойствами первичной опухоли оказались лишь некоторые. В проведенном исследовании была показана прямая корреляция между величиной опухолевого узла и уровнем экспрессии генов *IL1b* ($r=0,783$; $p=0,022$) и *CXCL8* (кодирует белок IL8) ($r=0,580$; $p=0,048$). *IL1b* является ключевым в развитии острой фазы воспаления, в частности повышает проницаемость сосудов, а *IL8* привлекает в очаг воспаления гранулоциты [5].

Можно полагать, что обнаруженная экспрессия генов цитокинов провоспалительного спектра в микроокружении опухоли через привлечение клеток-предшественников и лейкоцитов вызывает в конечном итоге промоторный или ингибиторный эффект. Интересно, что пролиферативная актив-

ность опухолевых элементов, которая, как правило, сопряжена с величиной опухоли, имела обратную корреляцию с экспрессией гена хемокина *CCL2*, привлекающего моноциты ($r=0,900$; $p=0,037$). С другой стороны, выявлена прямая корреляционная связь между экспрессией генов *IL1b* и *IL6*, *IL8* и фактором, иммобилизующим макрофаги (*MIF*) (соответственно $r=0,893$; $p=0,007$; $r=0,964$; $p=0,000$; $r=0,909$; $p=0,000$).

Таким образом, высокий уровень экспрессии генов провоспалительных цитокинов связан с большей величиной опухоли, а низкий уровень экспрессии хемоаттрактанта для моноцитов связан с повышением пролиферативной активности опухоли. Можно полагать, что описываемые цитокины и характер взаимодействия между ними свойственны промоторной опухолевой нише.

В отличие от экспрессии генов цитокинов, имеющих отношение к росту первичной опухоли, экспрессии генов цитокинов, с которыми связаны инвазивные и метастатические свойства, не обнаружено в микроокружении опухоли. Оказалось, что в клетках, формирующих микроокружение инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа, отсутствует экспрессия генов *TNF*, *MST1*, *FGF7*, *EGF*. Последние три фактора являются активными участниками опухолевого прогрессирования. Так, известно, что связывание FGF-7 с рецептором, который экспрессируется преимущественно на эпителиальных клетках, но не фибробластах [6], опосредует миграцию и инвазию опухолевых клеток. EGF, связываясь с рецептором, стимулирует метастазирование опухолевых клеток [7], а MSP промотирует развитие метастазов [8]. TNF известен своими противоопухолевыми эффектами, тем не менее существуют работы, показывающие его роль в промотировании опухолевого роста [9]. Стоит отметить, что экспрессия указанных факторов отсутствовала и в группе пациентов с наличием лимфогенных метастазов. Это позволяет предположить, что их источником,

возможно, являются не клетки микроокружения, а сами опухолевые элементы. Вместе с тем в микроокружении опухоли обнаружена экспрессия генов IL6 и IL8, которая позволяет предполагать, что привлекаемые в строму благодаря эффектам CCL2 моноциты с высокой вероятностью дифференцируются в M2 макрофаги, способствующие формированию инвазивного фенотипа опухолевых клеток.

В проведенном исследовании не было обнаружено достоверных различий в частоте встречаемости и уровне экспрессии всех изучаемых генов в группах пациентов с наличием и отсутствием лимфогенных метастазов. Тем не менее использование многофакторного метода обработки данных (метода логистической регрессии) позволило выявить комплекс взаимоотношений между изучаемыми параметрами, который связан с высоким риском развития лимфогенных метастазов у пациенток с инвазивной карциномой неспецифического типа молочной железы, не получавших неoadъювантной терапии. В математическую модель вошли такие переменные, как выраженность воспалительной

инфильтрации, фиброза стромы, наличие в строме экспрессии генов *CXCL12*, *IL-1b*, *IL-6* и *TGFb1*. Степень достоверности $\chi^2=15,1$; $p=0,01$. Чувствительность модели составляет 100 %, специфичность – 100 %. Этот результат – свидетельство наличия в опухолевой нише условий, способствующих метастазированию. Поскольку, как полагают, в лимфатических узлах преме́тастатическая ниша предуготована [10], то наличие лимфогенных метастазов является, скорее, индикатором эффективности возникновения «семян» в опухоли.

Закключение. Таким образом, судя по результатам, опухолевая ниша представляет собой набор клеток, цитокины которых имеют отношение к развитию воспаления, включая рекрутирование моноцитов, а также секреции факторов, способствующих как росту опухоли, так и лимфогенному метастазированию. Аналогичные события в преме́тастатической нише могли бы способствовать развитию макрометастаза.

В работе приводятся результаты исследований, реализованных в рамках гранта РФФИ (№ 15-34-20864).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ewing J. Neoplastic diseases. Ed 6. Philadelphia: W. B. Saunders Co. 1928.
2. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. The Lancet. 1889; 133 (3421): 571–573.
3. Barcellos-Hoff M.H., Lyden D., Wang T.C. The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. Nat Rev Cancer. 2013 Jul; 13 (7): 511–8. doi: 10.1038/nrc3536.
4. Salgado R., Denkert C., Demaria S., Sirtaine N., Klauschen F., Pruner G., Wienert S., Van den Eynden G., Baehner F.L., Penault-Llorca F., Perez E.A., Thompson E.A., Symmans W.F., Richardson A.L., Brock J., Criscitiello C., Bailey H., Ignatiadis M., Floris G., Sparano J., Kos Z., Nielsen T., Rimm D.L., Allison K.H., Reis-Filho J.S., Loibl S., Sotiriou C., Viale G., Badve S., Adams S., Willard-Gallo K., Loi S. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. Ann Oncol. 2015 Feb; 26 (2): 259–71. doi: 10.1093/annonc/mdl450.
5. Yao M., Brummer G., Acevedo D., Cheng N. Cytokine Regulation of Metastasis and Tumorigenicity. Adv Cancer Res. 2016; 132: 265–367. doi: 10.1016/bs.acr.2016.05.005.

6. Niu J., Chang Z., Peng B., Xia Q., Lu W., Huang P., Tsao M.S., Chiao P.J. Keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor-7-regulated cell migration and invasion through activation of NF-kappaB transcription factors. J Biol Chem. 2007 Mar 2; 282 (9): 6001–11. doi: 10.1074/jbc.M606878200.
7. Sasaki T., Hiroki K., Yamashita Y. The role of epidermal growth factor receptor in cancer metastasis and microenvironment. Biomed Res Int. 2013; 2013: 546318. doi: 10.1155/2013/546318.
8. Sato S., Hanibuchi M., Kuramoto T., Yamamori N., Goto H., Oga-wa H., Mitsuhashi A., Van T.T., Kakiuchi S., Akiyama S., Nishioka Y., Sone S. Macrophage stimulating protein promotes liver metastases of small cell lung cancer cells by affecting the organ microenvironment. Clin Exp Metastasis. 2013 Mar; 30 (3): 333–44. doi: 10.1007/s10585-012-9540-y.
9. Bertazza L., Mocellin S. The dual role of tumor necrosis factor (TNF) in cancer biology. Curr Med Chem. 2010; 17 (29): 3337–3352.
10. Перельмутер В.М., Манских В.Н. Прениша как отсутствующее звено концепции метастатических ниш, объясняющее избирательное метастазирование злокачественных опухолей и форму метастатической болезни. Биохимия. 2012; 77 (1): 130–139.

Поступила 14.09.16
Принята в печать 30.10.16

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Таширева Любовь Александровна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник отделения патологической анатомии и цитологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Российская Федерация). E-mail: tashireva@oncology.tomsk.ru. SPIN-код: 4371-5340.

Геращенко Татьяна Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии и иммунологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Российская Федерация). E-mail: t_gerashenko@list.ru SPIN-код: 7900-9700.

Завьялова Марина Викторовна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой патологической анатомии, Сибирский государственный медицинский университет; ведущий научный сотрудник отделения патологической анатомии и цитологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Российская Федерация). E-mail: zavyalovamv@mail.ru. SPIN-код: 1229-0323.

Савельева Ольга Евгеньевна, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник отделения патологической анатомии и цитологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Российская Федерация). E-mail: olga_chechina@mail.ru. SPIN-код: 9633-9449.

Кайгородова Евгения Викторовна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник отделения патологической анатомии и цитологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Российская Федерация). E-mail: zlobinae@mail.ru. SPIN-код: 8286-3757.

Тарабановская Наталья Анатольевна, кандидат медицинских наук, младший научный сотрудник, врач-онколог отделения общей онкологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Российская Федерация). E-mail: tarabanovskaya@inbox.ru. SPIN-код: 7481-2159.

Слонимская Елена Михайловна, доктор медицинских наук, заведующая отделением общей онкологии, научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук; профессор кафедры онкологии, Сибирский государственный медицинский университет (г. Томск, Российская Федерация). E-mail: slonimskaya@rambler.ru. SPIN-код: 7763-6417.

Денисов Евгений Владимирович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии и иммунологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Российская Федерация). E-mail: dnsv.ev@gmail.com. SPIN-код: 9498-5797.

Перельмутер Владимир Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделением патологической анатомии и цитологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Российская Федерация). E-mail: pvm@ngs.ru. SPIN-код: 6252-5319.

CYTOKINE GENE EXPRESSION ASSOCIATED WITH TUMOR AND PREMETASTATIC NICHES IN BREAST CANCER STROMA

L.A. Tashireva¹, T.S. Geraschenko¹, M.V. Zavyalova^{1,2}, O.E. Saveleva¹, E.V. Kaygorodova¹, N.A. Tarabanovskaya¹, V.M. Perelmutter¹

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia¹

Siberian State Medical University, Tomsk, Russia²

5, Kooperativny Street, 634009-Tomsk, Russia. E-mail: tashireva@oncology.tomsk.ru¹

Abstract

The tumor niche in the microenvironment of the primary tumor is believed to reflect events occurring in the premetastatic niche. In our study, based on the assessment of the expression of cytokine genes associated with inflammation and invasive and metastatic phenotype of tumor cells in the tumor microenvironment, their contribution to the creation of favorable conditions for the development of tumor and metastases was described. **Material and methods.** The main clinical and pathological parameters in 12 patients with invasive breast carcinoma of non-specific type (IC NST) were studied. The expression of 13 genes encoding key cytokines and chemokines in the stroma of IC NST was assessed using the PALM laser microdissection system and real-time polymerase chain reaction. **Results.** A direct correlation between the size of the primary tumor and the expression levels of *IL1b* and *CXCL8* genes was found. Furthermore, it was shown that the proliferative activity of tumor cells was inversely correlated with the expression *CCL2* gene that attracted monocytes. The expression of *IL6* and *IL8* genes involves the differentiation of monocytes into M2 macrophages, which can stimulate tumor cell invasiveness. However, microenvironment cells were found not to express *MST1*, *FGF7*, *EGF* genes, protein products of which provide invasive and metastatic progression of tumor cells. In our study, no significant differences in gene expression levels between patients with and without lymph node metastases were found. Nevertheless, the use of the multivariate data analysis allowed us to reveal a close relationship between the studied parameters related to a high risk of lymph node metastasis. **Conclusion.** A wide range of cytokines involved in the development of inflammation, recruitment of monocytes, as well as secretion of factors promoting both tumor growth and lymphatic metastasis was identified. Similar events in premetastatic niche might contribute to the development macrometastasis.

Key words: cytokines, tumor niche, premetastatic niche, breast cancer.

REFERENCES

1. Ewing J. Neoplastic diseases. Ed 6. Philadelphia: W. B. Saunders Co. 1928.
2. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. The Lancet. 1889; 133 (3421): 571–573.
3. Barcellos-Hoff M.H., Lyden D., Wang T.C. The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. Nat Rev Cancer. 2013 Jul; 13 (7): 511–8. doi: 10.1038/nrc3536. E
4. Salgado R., Denkert C., Demaria S., Sirtaine N., Klauschen F., Pruneri G., Wienert S., Van den Eynden G., Baehner F.L., Penault-Llorca F., Perez E.A., Thompson E.A., Symmans W.F., Richardson A.L., Brock J., Criscitiello C., Bailey H., Ignatiadis M., Floris G., Sparano J., Kos Z., Nielsen T., Rimm D.L., Allison K.H., Reis-Filho J.S., Loibl S., Sotiriou C., Viale G., Badve S., Adams S., Willard-Gallo K., Loi S. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. Ann Oncol. 2015 Feb; 26 (2): 259–71. doi: 10.1093/annonc/mdl450.
5. Yao M., Brummer G., Acevedo D., Cheng N. Cytokine Regulation of Metastasis and Tumorigenicity. Adv Cancer Res. 2016; 132: 265–367. doi: 10.1016/bs.acr.2016.05.005.
6. Niu J., Chang Z., Peng B., Xia Q., Lu W., Huang P., Tsao M.S., Chiao P.J. Keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor-7-regulated cell migration and invasion through activation of NF-kappaB transcription factors. J Biol Chem. 2007 Mar 2; 282 (9): 6001–11. doi: 10.1074/jbc.M606878200.
7. Sasaki T., Hiroki K., Yamashita Y. The role of epidermal growth factor receptor in cancer metastasis and microenvironment. Biomed Res Int. 2013; 2013: 546318. doi: 10.1155/2013/546318.
8. Sato S., Hanibuchi M., Kuramoto T., Yamamori N., Goto H., Ogawa H., Mitsuhashi A., Van T.T., Kakiuchi S., Akiyama S., Nishioka Y., Sone S. Mac-

rophage stimulating protein promotes liver metastases of small cell lung cancer cells by affecting the organ microenvironment. Clin Exp Metastasis. 2013 Mar; 30 (3): 333–44. doi: 10.1007/s10585-012-9540-y.

9. Bertazza L., Mocellin S. The dual role of tumor necrosis factor (TNF) in cancer biology. Curr Med Chem. 2010; 17 (29): 3337–52.

10. Perelmuter V.M., Manskikh V.N. Pre-niche as missing link of the metastatic niche concept explaining organ-preferential metastasis of malignant tumors and the type of metastatic disease. Biochemistry (Moscow). 2012; 77 (1): 111–118. doi: 10.1134/S0006297912010142. [in Russian]

Received 14.09.16
Accepted 30.10.16

ABOUT THE AUTHORS

Tashireva Liubov A., MD, PhD, Researcher, Department of Pathological Anatomy and Cytology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (Tomsk, Russian Federation). E-mail: tashireva@oncology.tomsk.ru. SPIN-code: 4371-5340.

Gerashchenko Tatiana S., MD, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Oncology and Immunology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, (Tomsk, Russian Federation). E-mail: t_gerashchenko@list.ru SPIN-code: 7900-9700.

Zavyalova Marina V., MD, DSc, Professor, Head of the Department of Pathological Anatomy, Siberian State Medical University; Leading Researcher, Department of Pathological Anatomy and Cytology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russian Federation). E-mail: zavyalovamv@mail.ru. SPIN-code: 1229-0323.

Savelyeva Olga E., MD, DSc, Senior Researcher, Department of Pathological Anatomy and Cytology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: olga_chechina@mail.ru. SPIN-code: 9633-9449.

Kaygorodova Evgeniya V., MD, DSc, Leading Researcher, Department of Pathological Anatomy and Cytology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russian Federation). E-mail: zlobinae@mail.ru. SPIN-code: 8286-3757.

Tarabanovskaya Nataliya A., MD, PhD, Junior Researcher, oncologist, Department of General Oncology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russian Federation). E-mail: tarabanovskaya@inbox.ru. SPIN-code: 7481-2159.

Slonimskaya Elena M., MD, DSc, Professor, Head of General Oncology Department, Tomsk Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences; Department of Oncology, Siberian State Medical University (Tomsk, Russian Federation). E-mail: slonimskaya@rambler.ru. SPIN-code: 7763-6417.

Denisov Evgeny V., PhD, Senior Researcher, Laboratory of Molecular Oncology and Immunology, Tomsk Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russian Federation). E-mail: dnsv.ev@gmail.com. SPIN-code: 9498-5797.

Perelmuter Vladimir M., MD, DSc, Professor, Head of the Department of Pathological Anatomy and Cytology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russian Federation). E-mail: pvm@ngs.ru. SPIN-code: 6252-5319.