

Для цитирования: Литвяков Н.В., Цыганов М.М., Ибрагимова М.К., Дерюшева И.В., Казанцева П.В., Митрофанова И.В., Фролова И.Г., Булдаков М.А., Слонимская Е.М., Чойнзонов Е.Л., Кжышковска Ю.Г., Чердынцева Н.В. Экспрессия макрофаг-ассоциированных генов в опухоли молочной железы: связь с опухолевой прогрессией. Сибирский онкологический журнал. 2017; 16 (6): 47–56. – DOI: 10.21294/1814-4861-2017-16-6-47-56.

For citation: Litviakov N.V., Tsyganov M.M., Ibragimova M.K., Deryusheva I.V., Kazantseva P.V., Mitrofanova I.V., Frolova I.G., Buldakov M.A., Slonimskaya E.M., Choinzonov E.L., Kzhyskowska Yu.G., Cherdynseva N.V. Expression of macrophage-associated genes in breast tumors: relation to tumor progression. Siberian Journal of Oncology. 2017; 16 (6): 47–56. – DOI: 10.21294/1814-4861-2017-16-6-47-56.

ЭКСПРЕССИЯ МАКРОФАГ-АССОЦИИРОВАННЫХ ГЕНОВ В ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: СВЯЗЬ С ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИЕЙ

Н.В. Литвяков^{1,2}, М.М. Цыганов¹, М.К. Ибрагимова^{1,2}, И.В. Дерюшева¹,
П.В. Казанцева¹, И.В. Митрофанова^{1,2}, И.Г.Фролова¹, М.А. Булдаков^{1,2},
Е.М. Слонимская¹, Е.Л. Чойнзонов¹, Ю.Г. Кжышковска^{2,3}, Н.В. Чердынцева^{1,2}

Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия¹

634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5. E-mail: nvlitv72@yandex.ru¹

ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», г. Томск, Россия²

634050, г. Томск, ул. Ленина, 36. E-mail: nvlitv72@yandex.ru²

Институт трансфузионной медицины и иммунологии, медицинский факультет, Университет Гейдельберга, г. Гейдельберг, Германия³

68167, Германия, г. Гейдельберг, Theodor-Kutzer-Ufer, 1–3. E-mail: Julia.Kzhyskowska@gmail.com³

Аннотация

Введение. Опухолеассоциированные макрофаги (ОАМ) являются основными клетками врожденного иммунитета, которые регулируют взаимоотношения инфильтрирующих иммунокомпетентных клеток с опухолевыми клетками и с другими компонентами микроокружения, пролиферацию опухолевых клеток, ангиогенез, а также могут вовлекаться в реализацию ответа на химиотерапию. **Целью исследования** является оценка прогностической значимости экспрессии маркеров опухолеассоциированных макрофагов YKL39 и CCL18 в опухоли молочной железы до лечения. **Методы.** Было обследовано 96 больных с морфологически верифицированной инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа IIa–IIIb стадии (T1–4N0–3M0), которые в неoadъювантном режиме получали 2–4 курса химиотерапии. У больных оценивали 5-летнюю безметастатическую выживаемость. Уровень экспрессии генов YKL39 и CCL18 оценивали при помощи количественной ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени (qPCR) по технологии TaqMan в опухоли до лечения. При уровне экспрессии гена более 1 (больше, чем в нормальной ткани) говорили о гиперэкспрессии гена. **Результаты.** Уровень экспрессии изучаемых генов не зависел от основных клинико-патологических показателей заболевания. Выявлен существенно более высокий уровень экспрессии исследуемых генов у пациентов с отсутствием отдаленных метастазов в течение 5-летнего наблюдения после лечения. По методу Каплана – Майера было проведено сравнение безметастатической выживаемости у пациентов с гиперэкспрессией указанных генов в опухоли (группа YKL39⁺CCL18⁺) и с разным сочетанием низкого и высокого уровня экспрессии (YKL39-CCL18⁻, YKL39-CCL18⁺, YKL39⁺CCL18⁻). Без признаков прогрессирования были живы 100 % (10 из 10) больных, имеющих YKL39⁺CCL18⁺ макрофагальный фенотип в опухоли, при YKL39⁺CCL18⁻ фенотипе уровень 5-летней безметастатической выживаемости составил 85 %. Два макрофагальных фенотипа связаны с более низкой 5-летней безметастатической выживаемостью: при YKL39-CCL18⁺ фенотипе – 71 %, при YKL39-CCL18⁻ фенотипе – 69 %. Полученные данные показали ассоциацию экспрессии маркеров ОАМ в опухоли с показателями безметастатической выживаемости у больных раком молочной железы, получавших предоперационное лечение.

Ключевые слова: рак молочной железы, опухолеассоциированные макрофаги, экспрессия генов, опухолевая прогрессия.

Системная химиотерапия прочно вошла в арсенал противоопухолевых методов, однако при ее применении у 20–40 % онкологических больных наблюдается прогрессирование злокачественного процесса [1–3], основной причиной которого считается клональная эволюция новообразования, которая происходит в условиях терапевтических воздействий и приводит к отбору резистентных клонов опухолевых клеток [4, 5]. Установлено, что принципиальное значение имеют особенности взаимоотношений опухоли и микроокружения в контексте формирования опухолевой экосистемы [6]. Риск метастазирования определяется как биологическими характеристиками опухоли, так и свойствами микроокружения в первичном очаге, а также локальными и системными факторами, влияющими на формирование метастатических ниш [7, 8].

Опухолеассоциированные макрофаги (ОАМ) являются основными клетками врожденного иммунитета, которые регулируют взаимоотношения инфильтрирующих иммунокомпетентных клеток с опухолевыми клетками и с другими компонентами микроокружения, пролиферацию опухолевых клеток, ангиогенез, а также могут вовлекаться в реализацию ответа на химиотерапию [8–10]. Показано, что ОАМ часто аккумулируются в опухолях после химио- либо радиотерапии и вносят вклад в неэффективность лечения и рецидивирования опухоли [6, 11]. С одной стороны, иммунная система может способствовать противоопухолевой эффективности ряда химиопрепараторов (циклофосфан, доксорубицин, эпирюбацин, митоксантрон, оксалиплатин, бортезамиб), а также радиотерапии [12]. С другой стороны, химиотерапия может индуцировать активированный ОАМ механизм восстановления поврежденной ткани опухоли, что способствует стимуляции роста опухоли и снижению противоопухолевого действия лекарственных средств [13, 14] за счет продукции колониестимулирующего фактора КСФ-1, увеличения протеазной активности, индукции ферментов, участвующих в инактивации препаратов, защиты стволовых клеток от влияния химиотерапии [11, 15, 16]. Это указывает на то, что макрофаги могут вносить вклад в процессы опухолевой прогрессии, либо способствуя диссеминации злокачественного процесса, либо, наоборот, снижая риск метастазирования.

Важными маркерами функциональной активности макрофагов рассматриваются хитиназоподобные белки (ХПБ), которые продуцируются воспалительными клетками, сочетают в себе свойства цитокинов и факторов роста, их уровень возрастает при воспалительных процессах и различных видах опухолей [17–19]. Авторы настоящей статьи показали, что ключевой регуляторный фактор прогрессирования опухоли, TGF β , активно стимулирует экспрессию ХПБ YKL39 в макрофагах *in vitro* [20]. Это указывает на то, что YKL39

может быть биомаркером субпопуляций проопухолевых макрофагов, прошедших программирование с помощью TGF β в опухолевом микроокружении. Созревание макрофагов в присутствии цитокинов Т-хелперов 2-го типа – IL4 и TGF β – приводит к выраженному повышению экспрессии YKL39, т.е. YKL39 может служить в качестве информативного биомаркера для выявления макрофагального ответа при злокачественных новообразованиях [18].

Хемокин CCL18 промотирует опухолевый рост, способствует инвазии, метастазированию и эпителиально-мезенхимальному переходу при РМЖ [21, 22]. CCL18 обладает иммуносупрессорными свойствами и может ингибировать макрофаги, дендритные клетки, индуцировать дифференцировку Treg лимфоцитов. Хемокин CCL18 способствует созреванию из моноцитов проопухолевых M2 макрофагов в опухоли молочной железы и активно продуцируется опухолеассоциированными макрофагами 2-го типа, но не опухолевыми клетками, что свидетельствует о его ценности для оценки M2 популяции ОАМ [23].

В этой связи актуальным является исследование возможного вклада фенотипа макрофагов в прогрессирование рака молочной железы для понимания механизмов взаимодействия опухоли и микроокружения с целью поиска мишней для терапевтического воздействия. С другой стороны, на основе патогенетически значимых молекул опухолеассоциированных макрофагов могут быть разработаны новые эффективные маркеры прогноза риска метастазирования и предикторы ответа опухоли на химиотерапию.

Мы проанализировали экспрессию M2 макрофагальных маркеров YKL39 и CCL18 в опухоли до лечения у больных РМЖ, получавших стандартные схемы предоперационной химиотерапии и ретроспективно разделенных на группы с признаками прогрессирования в виде отдаленных метастазов и без них в пятилетний период наблюдения после лечения.

Целью исследования явилась оценка диагностической значимости экспрессии маркеров опухолеассоциированных макрофагов YKL39 и CCL18 в опухоли молочной железы до лечения.

Материал и методы

Было обследовано 96 больных с морфологически верифицированной инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа IIa–IIIb (T1–4N0–3M0) стадии (табл. 1), в возрасте 26–68 лет (средний возраст – 48,21 ± 0,68 года), получавших лечение в клиниках НИИ онкологии Томского НИМЦ (г. Томск, Россия). Исследование проведено в соответствии с Хельсинской Декларацией 1964 г. (исправленной в 1975 г. и 1983 г.) и с разрешения локального этического комитета института. Все пациенты подписали информированное согласие на исследование.

Больные в соответствии с «Consensus Conference on Neoadjuvant Chemotherapy in Carcinoma of the Breast, April 26–28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania» [24] в неоадьювантном режиме получали 2–4 курса химиотерапии по схемам: FAC (5-фторурацил – 600 мг/м², адриамицин – 50 мг/м², циклофосфан – 600 мг/м², 1 раз в 3 нед), CAХ (циклофосфан – 100 мг/м², внутримышечно, адриамицин – 30 мг/м², внутривенно, капецитабин – 1200 мг/м², перорально), монотерапию таксoterом (100 мг/м², часовая инфузия в 1-й день), CMX (циклофосфан – 100 мг/м², внутримышечно, метотрексат – 30 мг/м², внутривенно, капецитабин – 1200 мг/м², перорально), CP (циклофосфан – 750 мг/м², цисплатин – 75 мг/м², внутривенно 1 раз в 3 нед). Через 3–5 нед после неоадьювантной химиотерапии (NAXT) проводилась операция в объеме радикальной или подкожной мастэктомии, радикальной резекции, секторальной резекции с аксилярной лимфаденэктомией или другого вида органосохраняющей операции. Адьювантную химиотерапию, гормональную терапию и лучевую терапию проводили по показаниям.

Эффективность предоперационной химиотерапии оценивали по критериям ВОЗ и Международного противоракового союза (International Union Against Cancer) с помощью УЗИ и/или маммографии, которые проводили до лечения, после 2 курсов NAXT и перед операцией. Регистрировали полную регрессию (100 % уменьшение опухоли), частичную регрессию (уменьшение объема опухоли более чем на 50 %), стабилизацию (снижение объема менее чем на 50 % или увеличение не более чем на 25 %) и прогрессирование (увеличение объема опухоли более чем на 25 %). Согласно международным рекомендациям, при проведении предоперационной химиотерапии больные РМЖ со стабилизацией или прогрессированием составляют группу с отсутствием ответа на NAXT, а больные с полной или частичной регрессией – группу с объективным ответом [1].

Для оценки 5-летней безметастатической выживаемости проводилось наблюдение за больными после окончания лечения путем контрольного обследования на первом году через 3 мес, в дальнейшем – 1 раз в 6 мес. При контролльном обследовании выполнялось общеклиническое обследование с ЭКГ, рентгенография органов грудной клетки, спиральная компьютерная томография с внутривенным контрастированием (по показаниям), УЗИ органов брюшной полости, сцинтиграфия.

Для молекулярных исследований были использованы биопсийные опухолевые образцы (~10 мм³), взятые под контролем УЗИ до лечения. Образцы опухоли помещали в раствор RNAlater (Ambion, USA) и сохраняли при температуре –80°C (после 24-часовой инкубации при +4°C) для дальнейшего выделения РНК.

Таблица 1
Клинико-патологические параметры обследованных больных РМЖ

	Клинико-патологические параметры	Кол-во больных
Возраст, лет	≤45 ≥45	34 (35 %) 62 (65 %)
Менструальный статус	Пременопауза Постменопауза	55 (57 %) 41 (43 %)
Размер опухоли	T1 T2 T3 T4	11 (12 %) 72 (75 %) 5 (5 %) 8 (8 %)
Лимфогенное метастазирование	N0 N1 N2 N3	42 (44 %) 41 (43 %) 5 (5 %) 8 (8 %)
ER статус	+	64 (67 %)
PR статус	- + -	32 (33 %) 62 (64 %) 34 (36 %)
HER2 статус	0/+ ++ +++	80 (83 %) 10 (11 %) 6 (6 %)
Гистологическая форма	Униполлярная Мультиполлярная Люминальный В	62 (64 %) 34 (36 %) 68 (71 %)
Молекулярный тип	Трижды негативный HER2-позитивный Полная регрессия	17 (18 %) 11 (11 %) 9 (10 %)
Ответ на NAXT	Частичная регрессия Стабилизация Прогрессирование	57 (59 %) 23 (24 %) 7 (7 %)
Схема NAXT	CAX FAC CMX Таксотер CP	20 (21 %) 48 (50 %) 10 (10 %) 14 (15 %) 4 (4 %)

Тотальная РНК была выделена из 96 биопсийных образцов опухоли до лечения. РНК выделяли с помощью набора RNeasy Plus mini Kit, содержащего ДНК-азу I (Qiagen, Germany, #74134) в соответствии с инструкцией производителя. Для предотвращения деградации РНК в пробирку добавляли ингибитор РНК-аз Ribolock (Thermo Scientific, USA). На спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, USA) оценивали концентрацию и чистоту выделения РНК. Концентрация РНК составила от 80 до 250 нг/мкл, $A_{260}/A_{280} = 1,95-2,05$; $A_{260}/A_{230} = 1,90-2,31$. Целостность выделенной РНК оценивалась при помощи капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, USA) и набора R6K ScreenTape (Agilent Technologies, USA #5067–5367). RIN составил 6,6–8,8. Выделенная РНК хранилась при –80°C в низкотемпературном морозильнике (Sanyo,

Таблица 2

Последовательность праймеров и проб исследованных генов

Ген	Ампликон	Последовательность
<i>ACTB</i> NM_001101.3	73 bp	F 5'- gagaagaatgaccaggatcatgtt -3' R 5'- atagcacagcctggatagcaa -3' Probe FAM 5'- agacattcaacaccccgccat -3'BHQ1 F 5'- gccagccggagccacate-3' R 5'- ggcacaataatccacttaccaga-3'
<i>GAPDH</i> NM_002046.3	124 bp	Probe FAM 5'- cggcaatacggccaaatccg-3'BHQ1 F 5'- aacaacaaggatcatcaaggac -3' R 5'- ttgggattcttggttttag -3'
<i>YKL39</i> (CHI3L2- Chitinase 3 Like 2 NM_001025197	81 bp	Probe FAM 5'- agtaagtgtatccaccagacat -3'BHQ1 F 5'- ccaagccagggtgtcatcct-3' R 5'- ctccagggtcgctgtatgtatct -3'
<i>CCL18</i> NM_002988	95 bp	Probe FAM 5'- tctgtgcgtgccccataagaagt -3'BHQ1

Примечание: все пробы – FAM →BHQ1; NM – номер последовательности РНК в NCBI Nucleotide Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>); %); bp – base pair; F – прямой праймер; R – обратный праймер. Все праймеры имеют оригинальный дизайн.

Japan) и использовалась для количественной ПЦР и микроматричных исследований.

Уровень экспрессии генов *YKL39* и *CCL18* оценивали при помощи количественной ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени (qPCR) по технологии TaqMan на амплификаторе RotorGene-6000 (Corbett Research, Australia), как это описано в [26, 27]. Для получения цДНК на матрице РНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора RevertAid™ (Thermo Scientific, USA) со случайными гексануклеотидными праймерами в соответствии с инструкцией к набору. Праймеры и зонды (FAM-BHQ1) были подобраны с использованием программы Vector NTI Advance 11.5 и базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>) (табл. 2). В качестве генарефери использовали ген «домашнего хозяйства» фермента *GAPDH* (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase) и *ACTB* (Actin B) и уровень экспрессии каждого целевого гена нормализовали по отношению к экспрессии *GAPDH* и *ACTB* по методу Pfaffl [28]. В качестве калибратора использовалась пулированная от 10 пациентов РНК, выделенная из нормальной ткани молочной железы, полученной во время операции от больных, которым не проводилась НАХТ. В качестве результата использовалось различие в экспрессии генов интереса *YKL39* и *CCL18* относительно *GAPDH*, *ACTB* и нормальной ткани молочной железы. При превышении уровня 1 (более, чем в нормальной ткани) говорили о гиперэкспрессии гена.

Анализ данных осуществляли при помощи прикладного пакета STATISTICA 8.0 for Windows (StatSoft Inc., USA). Для выборок вычисляли среднее значение (M) и ошибку средней (SE). Уровень статистической значимости различий оценивали при помощи непараметрического критерия Вилкоксона – Манна – Уитни. Анализ безметастатической выживаемости проведен с использованием метода Каплана – Майера.

Результаты и обсуждение

Мы проанализировали экспрессию M2 макрофагальных маркеров *YKL39* и *CCL18* в опухоли до лечения у больных РМЖ, получавших неoadьювантную химиотерапию, в зависимости от клинического течения злокачественного процесса, который оценивали по наличию или отсутствию удаленных метастазов в пятилетний период наблюдения.

Рядом авторов показано, что *CCL18* не продуцируется опухолевыми клетками молочной железы, а экспрессируется только в ОАМ, по результатам тестирования белкового продукта *in situ* с использованием имmunогистохимического исследования [22, 29, 30]. Установлено, что макрофаги также служат основным источником хитиназо-подобных белков, в том числе и *YKL39* [31]. Это дает возможность считать, что измеряемая при помощи qPCR экспрессия генов *YKL39* и *CCL18* осуществляется ОАМ и отражает их функционирование. Таким образом, гиперэкспрессия (более 1, за 1 принимается уровень экспрессии в нормальной ткани молочной железы) генов *YKL39* и/или *CCL18*, определяемая qPCR, показывает наличие высокой M2⁺ макрофагальной инфильтрации опухоли молочной железы. По результатам экспрессии можно было выделить 3 фенотипа M2 макрофагов: *YKL39*⁺*CCL18*⁺ (гиперэкспрессия в опухоли генов и *YKL39* и *CCL18*), *YKL39*⁺*CCL18*⁻ и *YKL39*⁻*CCL18*⁺ M2⁺ макрофагальный фенотип опухоли молочной железы. В случае гипозэкспрессии обоих генов *YKL39*⁻*CCL18*⁻ можно говорить о M2 отрицательном макрофагальном фенотипе опухоли.

На первом этапе мы оценили связь экспрессии *YKL39* и *CCL18* с клинико-патологическими характеристиками заболевания, патогенетически значимыми для определения характера клинического течения заболевания и прогноза. Они включают возраст и менструальный статус пациенток, а также ряд показателей первичной опухоли (размер, гормо-

Таблица 3

Влияние клинико-морфологических параметров на экспрессию макрофаг-ассоциированных генов YKL39 и CCL18 в опухоли молочной железы до лечения

Клинико-патологические параметры		YKL39	P level	CCL18	P level
Возраст, лет	≤45	1,1 ± 0,6	0,103	7,3 ± 5,5	0,629
	>45	3,2 ± 1,0		10,7 ± 5,3	
Менструальный статус	Пременопауза	2,2 ± 0,6	0,546	5,5 ± 3,4	0,274
	Постменопауза	2,9 ± 1,3		14,8 ± 8,0	
Размер опухоли	T1–2	2,8 ± 0,8	0,359	8,5 ± 4,0	0,957
	T3–4	0,5 ± 0,2		15,8 ± 14,2	
Состояние регионарных лимфоузлов	N0	2,8 ± 1,0	0,173	14,2 ± 8,2	0,712
	N1–3	2,2 ± 0,9		5,9 ± 3,2	
ER статус	+	2,0 ± 0,6	0,832	14,0 ± 6,3	0,356
	-	2,1 ± 0,9		2,5 ± 0,8	
PR статус	+	1,9 ± 0,7	0,863	13,3 ± 6,6	0,191
	-	2,3 ± 0,8		4,4 ± 1,4	
HER2 статус	0/+	2,6 ± 0,8	0,249	10,2 ± 5,3	0,216
	++ или +++	2,4 ± 2,2		8,7 ± 6,4	
Гистологическая форма	Униполярная	2,5 ± 0,9	0,154	8,5 ± 4,0	0,878
	Мультиполярная	2,4 ± 1,0		11,1 ± 8,4	
Молекулярный тип	1. Люминальный В	2,5 ± 0,9	1–2=0,709	12,3 ± 5,6	1–2=0,933
	2. Трижды-негативный	2,9 ± 1,4	1–3=0,807	3,2 ± 1,3	1–3=0,318
	3. HER2-позитивный	1,7 ± 1,2	2–3=0,654	2,7 ± 1,2	2–3=0,437
	ПР + ЧР	2,0 ± 0,8	0,886	12,6 ± 5,7	0,800
Ответ на НАХТ	Стабилизация + прогрессирование	3,5 ± 1,3		2,5 ± 0,9	
Гематогенные метастазы	Нет	3,0 ± 0,9	0,041	12,1 ± 5,2	0,536
	Есть	1,0 ± 0,4		1,6 ± 0,6	

Примечание: p level – уровень статистической значимости различий по критерию Вилкоксона – Манна – Уитни.

нальный статус, наличие рецепторов к эстрогенам и прогестерону, эпидермальному фактору роста). При этом важное значение имеет молекулярный подтип новообразования, который в существенной степени определяет ответ опухоли на химиотерапию, ее биологическую агрессивность и статус лимфогенного метастазирования. Уровень экспрессии изучаемых генов не зависел от указанных особенностей заболевания (табл. 3). Однако мы выявили существенно более высокий уровень экспрессии исследуемых генов у пациентов без отдаленных метастазов в течение 5-летнего наблюдения после лечения. Это дает основания считать, что макрофаги, экспрессирующие YKL39 и CCL18, могут вносить вклад в опухолевую прогрессию.

Для оценки прогностической значимости экспрессии макрофагальных маркеров в опухоли молочной железы до лечения были построены кривые безметастатической выживаемости по методу Каплана – Майера в зависимости от фенотипа внутриопухолевых макрофагов, определяемого по генной экспрессии макрофаг-ассоциированных молекул YKL39 и CCL18. Проведено сравнение безметастатической выживаемости у пациенток с высокой экспрессией указанных генов в опухоли (группа YKL39⁺CCL18⁺) и с разным сочетанием низкого и высокого уровня экспрессии (YKL39⁻CCL18⁻, YKL39⁻CCL18⁺, YKL39⁺CCL18⁻).

Независимо от того, какой непосредственный ответ опухоли на предоперационную химиотерапию был зарегистрирован у той или иной пациентки, 100 % (10 из 10) больных, имеющих YKL39⁺CCL18⁺ фенотип в опухоли, были живы без признаков прогрессирования (отдаленного метастазирования) в течение 5-летнего наблюдения (рис. 1). При YKL39⁺CCL18⁻ фенотипе гематогенные метастазы в течение 5 лет после лечения возникли у 3/20 больных (безметастатическая выживаемость – 85 %). При двух макрофагальных фенотипах отмечены наиболее низкие показатели 5-летней безметастатической выживаемости. Гематогенные метастазы при YKL39⁻CCL18⁺ фенотипе развивались у 7/24 больных (безметастатическая выживаемость составила 71 %), при YKL39⁻CCL18⁻ фенотипе метастазы отмечались у 13/42 больных (безметастатическая выживаемость – 69 %).

Статистическая значимость различий в показателях безметастатической выживаемости наблюдается между больными с YKL39⁺CCL18⁺ фенотипом и YKL39⁻CCL18⁺ или YKL39⁻CCL18⁻ фенотипом. Таким образом, наиболее благоприятным в прогностическом плане является YKL39⁺CCL18⁺ макрофагальный фенотип опухоли, при котором отмечена 100 % выживаемость, неблагоприятными являются YKL39⁻CCL18⁺ и YKL39⁻CCL18⁻ макрофагальные фенотипы опухоли.

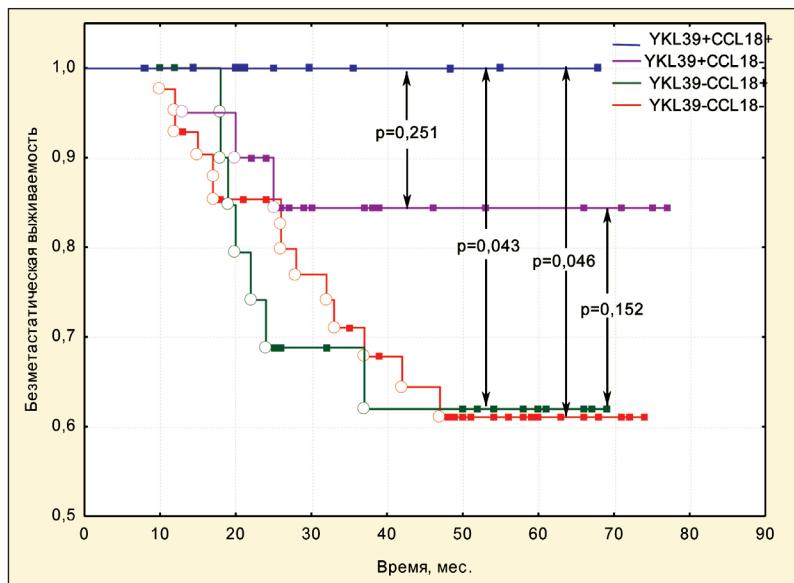


Рис. 1. Безметастатическая выживаемость больных раком молочной железы в зависимости от макрофагального фенотипа опухоли до лечения

Эти результаты согласуются с данными других авторов, которыми было показано, что гиперэкспрессия CCL18 в опухоли желудка связана с высокой безрецидивной выживаемостью [32]. С другой стороны, есть сведения, что CCL18 способствует инвазии, метастазированию и эпителиально-мезенхимальному переходу при раке молочной железы [21, 22]. Кроме этого, CCL18 может ингибировать макрофаги, дендритные клетки, индуцировать дифференцировку Treg лимфоцитов [23]. Возможно, иммуносупрессивная активность CCL18, направленная, например, на ОАМ, препятствует метастазированию при РМЖ. Несмотря на то, что CCL18 продуцируется M2 макрофагами, у больных с YKL39⁺CCL18⁺ макрофагальным фенотипом в нашем исследовании наблюдались лучшие показатели безметастатической выживаемости. Можно предположить, что YKL39⁺CCL18⁺ M2-макрофагальный фенотип определяет противоопухолевые M2 макрофаги, а YKL39-CCL18⁺ и YKL39⁺CCL18⁻ M2-фенотипы являются проопухолевыми.

В этом отношении особо следует отметить, что деление макрофагов на 2 субпопуляции, разные по функциям (M1 и M2 макрофаги), как оказалось, не отражает действительной сложности процессов, происходящих в опухоли. Экспрессионное профилирование субпопуляций макрофагов в разных контекстах опухолевого микроокружения показало наличие целого ряда функционально различных типов макрофагов. Опухолеассоциированные макрофаги являются высокопластичными клетками и способны переключаться между подтипами в зависимости от специфических сигналов и стимулов внутри опухоли, приводящих к транскрипционной перестройке генного профиля ОАМ. В частности, выявлены функционально специфические, раз-

личающиеся по спектру цитокинов субпопуляции макрофагов, стимулирующих ангиогенез, промоторящих метастазирование, осуществляющих иммуносупрессивную функцию либо поддерживающих стволовые раковые клетки [33]. Следует особо отметить, что большая часть макрофагального белка YKL39 локализуется не в цитоплазматических везикулах, а в ядерных гранулах, что позволяет предположить не только внеклеточную роль YKL39 как белка, секретируемого макрофагами, но и его регуляторную функцию для «программирования» самих макрофагов.

Заключение

Полученные данные показали ассоциацию экспрессии маркеров ОАМ в опухоли с показателями безметастатической выживаемости больных РМЖ, получавших предоперационное лечение. Актуальным на данный момент является поиск дополнительных маркеров, позволяющих оценить риск развития отдаленных метастазов опухоли, для уточнения тактики лечения. Независимость выявленной связи от других факторов, которые бы могли модифицировать характер клинического течения заболевания, и представительные данные последних лет о существенной роли макрофагов опухолевого микроокружения в определении биологического поведения опухоли и ее судьбы в условиях химиотерапии, указывают на ценность полученных результатов для разработки маркеров прогноза и дальнейших исследований в направлении поиска терапевтических мишеней.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ «ERA.Net RUS plus», Соглашение № 16-54-76015 (Доставка генов хитиназо-подобных белков в опухоль с помощью альфавирусных векторов с целью противоопухолевого программирования макрофагов).

ЛИТЕРАТУРА

1. Kaufmann M., von Minckwitz G., Mamounas E.P., Cameron D., Carey L.A., Cristofanilli M., Denkert C., Eiermann W., Gnant M., Harris J.R., Karn T., Liedtke C., Mauri D., Rouzier R., Ruckhaeberle E., Semiglazov V., Symmans W.F., Tutt A., Pusztai L. Recommendations from an international consensus conference on the current status and future of neoadjuvant systemic therapy in primary breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 2012; 19 (5): 1508–16. doi: 10.1245/s10434-011-2108-2.
2. Liu B., Ezeogu L., Zellmer L., Yu B., Xu N., Joshua Liao D. Protecting the normal in order to better kill the cancer. *Cancer Med.* 2015; 4 (9): 1394–403. doi: 10.1002/cam4.488.
3. Kim E.S. Chemotherapy Resistance in Lung Cancer. *Lung Cancer and Personalized Medicine*: Springer. 2016: 189–209. doi: 10.1007/978-3-319-24223-1_10.
4. Findlay J.M., Castro-Giner F., Makino S., Rayner E., Kartsonaki C., Cross W., Kovac M., Ulahannan D., Palles C., Gillies R.S., MacGregor T.P., Church D., Maynard N.D., Buffa F., Cazier J.B., Graham T.A., Wang L.M., Sharma R.A., Middleton M., Tomlinson I. Differential clonal evolution in oesophageal cancers in response to neo-adjuvant chemotherapy. *Nat Commun.* 2016 Apr 5; 7: 11111. doi: 10.1038/ncomms11111.
5. Ibragimova M., Tsyganov M., Litviakov N. Natural and chemotherapay-induced clonal evolution of tumors. *Biochemistry (Mosc.)*. 2017 Apr; 82 (4): 413–425. doi: 10.1134/S0006297917040022.
6. De Palma M., Lewis C.E. Cancer: Macrophages limit chemotherapy. *Nature*. 2011 Apr 21; 472 (7343): 303–4. doi: 10.1038/472303a.
7. Hughes R., Qian B.Z., Rowan C., Muthana M., Keklikoglou I., Olson O.C., Tazzyman S., Danson S., Addison C., Clemons M., Gonzalez-Angulo A.M., Joyce J.A., De Palma M., Pollard J.W., Lewis C.E. Perivascular M2 macrophages stimulate tumor relapse after chemotherapy. *Cancer Res.* 2015 Sep 1; 75 (17): 3479–91. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3587.
8. Yang J., Li X., Liu X., Liu Y. The role of tumor-associated macrophages in breast carcinoma invasion and metastasis. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015 Jun 1; 8 (6): 6656–64.
9. Noy R., Pollard J.W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*. 2014; 41: 49–61. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.010.
10. Riabov V., Gudima A., Wang N., Mickley A., Orekhov A., Kzhyshkowska J. Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Front Physiol.* 2014; 5: 75. doi: 10.3389/fphys.2014.00075.
11. Mitchell J.B., Brennan D.J., Knolhoff B.L., Belt B.A., Zhu Y., Sanford D.E., Belaygorod L., Carpenter D., Collins L., Piwnica-Worms D., Hewitt S., Udupi G.M., Gallagher W.M., Wegner C., West B.L., Wang-Gillam A., Goedeggemeier P., Linehan D.C., DeNardo D.G. Targeting tumor-infiltrating macrophages decreases tumor-initiating cells, relieves immunosuppression, and improves chemotherapeutic responses. *Cancer Res.* 2013; 73: 1128–1141. doi: 10.1158/0008-5472.
12. Zitvogel L., Galluzzi L., Smyth M.J., Kroemer G. Mechanism of action of conventional and targeted anticancer therapies: reinstating immunosurveillance. *Immunity*. 2013; 39: 74–88. doi: 10.1016/j.immuni.2013.06.014.
13. Mantovani A., Biswas S.K., Galdiero M.R., Sica A., Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol.* 2013 Jan; 229 (2): 176–85. doi: 10.1002/path.4133.
14. Mantovani A., Locati M. Tumor-Associated Macrophages as a Paradigm of Macrophage Plasticity, Diversity, and Polarization Lessons and Open Questions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013; 33: 1478–1483. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.300168.
15. DeNardo D.G., Brennan D.J., Rexhepaj E., Ruffell B., Shiao S.L., Madden S.F., Gallagher W.M., Wadhwania N., Keil S.D., Junaid S.A., Rugo H.S., Hwang E.S., Jirström K., West B.L., Coussens L.M. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Disc.* 2011; 1: 54–67. doi: 10.1158/2159-8274.CD-10-0028.
16. Dijkgraaf E.M., Heusinkveld M., Tummers B., Vogelpoel L.T., Goedemans R., Jha V., Nortier J.W., Welters M.J., Kroep J.R., van der Burg S.H. Chemotherapy alters monocyte differentiation to favor generation of cancer-supporting M2 macrophages in the tumor microenvironment. *Cancer Res.* 2013; 73: 2480–92. doi: 10.1158/0008-5472.
17. Kzhyshkowska J., Gratchev A., Goerdt S. Human chitinases and chitinase-like proteins as indicators for inflammation and cancer. *Biomarker Insights*. 2007; 2: 128–46.
18. Kzhyshkowska J., Yin S., Liu T., Riabov V., Mitrofanova I. Role of chitinase-like proteins in cancer. *Biol Chem.* 2016; 397: 231–47. doi: 10.1515/hsz-2015-0269.
19. Shao R., Hamel K., Petersen L., Cao J.Q., Arenas R.B., Bigelow C., Bentley B., Yan W. YKL-40, a secreted glycoprotein, promotes tumor angiogenesis. *Oncogene*. 2009; 28: 4456. doi: 10.1038/onc.2009.292.
20. Gratchev A., Kzhyshkowska J., Kannokadan S., Ochsenreiter M., Popova A., Yu X., Mamidi S., Stonehouse-Usselmann E., Muller-Molinet I., Gooi L., Goerdt S. Activation of a TGF- β -specific multistep gene expression program in mature macrophages requires glucocorticoid-mediated surface expression of TGF- β receptor II. *J Immunol.* 2008; 180: 6553–65.
21. Lin L., Chen Y.S., Yao Y.D., Chen J.Q., Chen J.N., Huang S.Y., Zeng Y.J., Yao H.R., Zeng S.H., Fu Y.S., Song E.W. CCL18 from tumor-associated macrophages promotes angiogenesis in breast cancer. *Oncotarget*. 2015; 6: 34758–34773. doi: 10.18632/oncotarget.5325.
22. Chen J., Yao Y., Gong C., Yu F., Su S., Chen J., Liu B., Deng H., Wang F., Lin L., Yao H., Su F., Anderson K.S., Liu Q., Ewen M.E., Yao X., Song E. CCL18 from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via PTPNM3. *Cancer Cell*. 2011; 19: 541–555. doi: 10.1016/j.ccr.2011.02.006.
23. Nagarsheth N., Wicha M.S., Zou W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2017 Sep 30; 17 (9): 559–572. doi: 10.1038/nri.2017.49.
24. Schwartz G.F., Hortobagyi G.N. Proceedings of the consensus conference on neoadjuvant chemotherapy in carcinoma of the breast, April 26–28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania. *Cancer*. 2004; 100 (12): 2512–32.
25. Wolff A.C., Hammond M.E., Hicks D.G., Dowsett M., McShane L.M., Allison K.H., Allred D.C., Bartlett J.M., Bilous M., Fitzgibbons P., Hanna W., Jenkins R.B., Mangu P.B., Paik S., Perez E.A., Press M.F., Spears P.A., Vance G.H., Viale G., Hayes D.F.; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Medicine*. 2007; 131: 18–43. doi: 10.1043/1543-2165(2007)131[18:ASOCCO]2.0.CO;2.
26. Litviakov N.V., Cherdynseva N.V., Tsyganov M.M., Denisov E.V., Garbukov E.Y., Merzliakova M.K., Volkomarov V.Y., Vtorushin S.V., Zavyalova M.V., Slonimskaya E.M., Perelmuter V.M. Changing the expression vector of multidrug resistance genes is related to neoadjuvant chemotherapy response. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013; 71 (1): 153–63. doi: 10.1007/s00280-012-1992-x.
27. Litviakov N.V., Cherdynseva N.V., Tsyganov M.M., Slonimskaya E.M., Ibragimova M.K., Kazantseva P.V., Kzhyshkowska J., Choinzonov E.L. Deletions of multidrug resistance gene loci in breast cancer leads to the down-regulation of its expression and predict tumor response to neoadjuvant chemotherapy. *Oncotarget*. 2016 Feb 16; 7 (7): 7829–41. doi: 10.18632/oncotarget.6953.
28. Pfaffl M.W., Lange I.G., Daxenberger A., Meyer H.H. Tissue-specific expression pattern of estrogen receptors (ER): quantification of ER alpha and ER beta mRNA with real-time RT-PCR. *APMIS*. 2001 May; 109 (5): 345–55.
29. Martinez F.O., Helming L., Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27: 451–83. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132532.
30. Schuttyser E., Richmond A., Van Damme J. Involvement of CC chemokine ligand 18 (CCL18) in normal and pathological processes. *J Leukoc Biol.* 2005; 78: 14–26.
31. Kzhyshkowska J., Yin S., Liu T., Riabov V., Mitrofanova I. Role of chitinase-like proteins in cancer. *Biol Chem.* 2016 Mar; 397 (3): 231–47. doi: 10.1515/hsz-2015-0269.
32. Leung S.Y., Yuen S.T., Chu K.M., Mathy J.A., Li R., Chan A.S., Law S., Wong J., Chen X., So S. Expression profiling identifies chemokine (C-C motif) ligand 18 as an independent prognostic indicator in gastric cancer. *Gastroenterol.* 2004; 127: 457–469.
33. Sainz Jr. B., Martin B., Tatari M., Heeschen C., Guerra S. ISG15 is a critical microenvironmental factor for pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 2014 Dec 15; 74 (24): 7309–20. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1354.

Поступила 20.10.17
Принята в печать 21.11.17

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Литвяков Николай Васильевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией онкогенетики, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: nvlitv72@yandex.ru. SPIN-код: 2546-0181. AuthorID: 183820. ResearchID: C-3263-2012. ORCID: 0000-0002-0714-8927. SCOPUS: 6506850698.

Цыганов Матвей Михайлович, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории онковирусологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: TsyganovMM@yandex.ru. SPIN-код: 1253-0240. AuthorID: 730156. ResearchID: A-7212-2014. ORCID: 0000-0001-7419-4512. SCOPUS: 55366377400.

Ибрагимова Марина Константиновна, младший научный сотрудник, лаборатории онковирусологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: imk1805@yandex.ru. SPIN-код: 2340-1628. AuthorID: 637822. ResearchID: C-8609-2012. ORCID: 0000-0001-8815-2786. SCOPUS: 57130579200

Дерюшева Ирина Валерьевна, младший научный сотрудник лаборатории онковирусологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: Irkin_097@mail.ru. SPIN-код: 5560-6131. AuthorID: 881749. ResearchID: Q-5607-2017. ORCID: 0000-0002-9568-3371.

Казанцева Полина Вадимовна, кандидат медицинских наук, младший научный сотрудник отделения общей онкологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: polydoctor@yandex.ru. SPIN-код: 7881-6259. AuthorID: 857960.

Митрофанова Ирина Валерьевна, младший научный сотрудник лаборатории трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины, Национальный исследовательский Томский государственный университет (г. Томск, Россия). E-mail: mitrof_@mail.ru. SPIN-код: 6272-8422. AuthorID: 818171. ResearchID: 56862097400.

Фролова Ирина Георгиевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая отделением лучевой диагностики, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: FrolovaIG@oncology.tomsk.ru. SPIN-код: 9800-9777. AuthorID: 463121. ResearchID. ORCID: 0000-0001-5227-006X. SCOPUS: 7006413170.

Булдаков Михаил Александрович, 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, Россия). E-mail: buldakov@oncology.tomsk.ru. SPIN-код: 7558-4726. AuthorID: 135429. ResearchID: C-7922-2012.

Слонимская Елена Михайловна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая отделением общей онкологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: slonimskaya@rambler.ru. SPIN-код: 7763-6417. AuthorID: 183823.

Чойнзонов Евгений Лхамацыренович, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: info@oncology.tomsk.ru. SPIN-код: 2240-8730. AuthorID: 550195.

Кжышковска Юлия Георгиевна, доктор биологических наук, профессор, заведующая отделом врожденного иммунитета и иммунологической толерантности Института иммунологии и трансфузионной медицины, медицинский факультет Маннгейма, Университет Гейдельберга (г. Гейдельберг, Германия); заведующая лабораторией трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины, Национальный исследовательский Томский государственный университет (г. Томск, Россия). E-mail: Julia.Kzhyshkowska@gmail.com.

Чердынцева Надежда Викторовна, член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией молекулярной онкологии и иммунологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: nvch@oncology.tomsk.ru. SPIN-код: 5344-0990. AuthorID: 81344. ResearchID: C-7943-2012.

EXPRESSION OF MACROPHAGE-ASSOCIATED GENES IN BREAST TUMORS: RELATION TO TUMOR PROGRESSION

**N.V. Litviakov^{1,2}, M.M. Tsyganov¹, M.K. Ibragimova^{1,2}, I.V. Deryusheva¹,
P.V. Kazantseva¹, I.V. Mitrofanova^{1,2}, I.G. Frolova¹, M.A. Buldakov^{1,2},
E.M. Slonimskaya¹, E.L. Choinzonov¹, Yu.G. Kzhyshkowska^{2,3}, N.V. Cherdynseva^{1,2}**

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

5, Kooperativnaya Street, 634009-Tomsk, Russia. E-mail: nvlitv72@yandex.ru¹

National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia²

36, Lenin Ave., 634050-Tomsk, Russia. E-mail: nvlitv72@yandex.ru²

Institute of Transfusion Medicine and Immunology, Medical Faculty, Mannheim, University of Heidelberg, Mannheim, Germany³

133, Hauptstrasse, 69117-Heidelberg, Germany. E-mail: Julia.Kzhyshkowska@gmail.com³

Abstract

Background. Tumor-associated macrophages (TAM) are the main innate immunity cells that regulate the relationship between the infiltrating immunocompetent cells, tumor cells and other components of the

microenvironment. TAMs can promote tumor cell proliferation and angiogenesis and can also contribute to tumor response to chemotherapy. **The purpose of the study** was to assess the prognostic significance of YKL39 and CCL18 gene expression in breast TAMs prior to treatment. **Material and methods.** A total of 96 patients with histologically verified invasive breast carcinoma of no special type (T1–4N0–3M0) were included into the study. The patients received 2–4 cycles of neoadjuvant chemotherapy. The 5-year metastasis-free survival was analyzed. The YKL39 and CCL18 expression levels were assessed using TaqMan real-time RT-PCR. The expression level of >1 (higher than that in the normal tissue) indicated the gene overexpression. **Results.** There was no association between the YKL39 and CCL18 gene expression levels and the clinical and pathologic features. However, the levels of YKL39 and CCL18 gene expressions were significantly higher in patients having no distant metastases within a 5-year follow-up. Metastasis-free survival was estimated in patients with overexpression of YKL39 and CCL18 genes (YKL39⁺CCL18⁺) and in patients with low and high expression levels (YKL39-CCL18⁻, YKL39-CCL18⁺, YKL39⁺CCL18⁻) using the Kaplan-Meier method. All 100 % of patients (10 out of 10) with YKL39⁺CCL18⁺ macrophage phenotype in a tumor were alive and had no evidence of tumor progression during 5 years of follow-up. In patients with YKL39⁺CCL18⁻ phenotype, the metastasis-free survival rate was 85 %. In patients with YKL39-CCL18⁺ and YKL39-CCL18⁻ phenotypes, the 5-year survival rates were 71 % and 69 %, respectively. A statistically significant difference in metastasis-free survival between patients with YKL39⁺CCL18⁺ phenotype and YKL39-CCL18⁺ or YKL39-CCL18⁻ phenotypes was found. Data obtained showed the association between TAM marker gene expression and metastasis free survival of breast cancer patients treated with NACT.

Key words: breast cancer, tumor-associated macrophages, gene expression, tumor progression.

REFERENCE

1. Kaufmann M., von Minckwitz G., Mamounas E.P., Cameron D., Carney L.A., Cristofanilli M., Denkert C., Eiermann W., Gnant M., Harris J.R., Karn T., Liedtke C., Mauri D., Rouzier R., Ruckhaeberle E., Semiglavov V., Symmans W.F., Tutt A., Pusztai L. Recommendations from an international consensus conference on the current status and future of neoadjuvant systemic therapy in primary breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 2012; 19 (5): 1508–16. doi: 10.1245/s10434-011-2108-2.
2. Liu B., Ezeogu L., Zellmer L., Yu B., Xu N., Joshua Liao D. Protecting the normal in order to better kill the cancer. *Cancer Med.* 2015; 4 (9): 1394–403. doi: 10.1002/cam4.488.
3. Kim E.S. Chemotherapy Resistance in Lung Cancer. *Lung Cancer and Personalized Medicine*: Springer. 2016: 189–209. doi: 10.1007/978-3-319-24223-1_10.
4. Findlay J.M., Castro-Giner F., Makino S., Rayner E., Kartsonaki C., Cross W., Kovac M., Ulahannan D., Palles C., Gillies R.S., MacGregor T.P., Church D., Maynard N.D., Buffa F., Cazier J.B., Graham T.A., Wang L.M., Sharma R.A., Middleton M., Tomlinson I. Differential clonal evolution in oesophageal cancers in response to neo-adjuvant chemotherapy. *Nat Commun.* 2016 Apr 5; 7: 11111. doi: 10.1038/ncomms11111.
5. Ibragimova M., Tsyanov M., Litviakov N. Natural and chemotherapy-induced clonal evolution of tumors. *Biochemistry (Mosc.)*. 2017 Apr; 82 (4): 413–425. doi: 10.1134/S0006297917040022.
6. De Palma M., Lewis C.E. Cancer: Macrophages limit chemotherapy. *Nature*. 2011 Apr 21; 472 (7343): 303–4. doi: 10.1038/472303a.
7. Hughes R., Qian B.Z., Rowan C., Muthana M., Keklikoglou I., Olson O.C., Tazzyman S., Danson S., Addison C., Clemons M., Gonzalez-Angulo A.M., Joyce J.A., De Palma M., Pollard J.W., Lewis C.E. Perivascular M2 macrophages stimulate tumor relapse after chemotherapy. *Cancer Res.* 2015 Sep 1; 75 (17): 3479–91. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3587.
8. Yang J., Li X., Liu X., Liu Y. The role of tumor-associated macrophages in breast carcinoma invasion and metastasis. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015 Jun 1; 8 (6): 6656–64.
9. Noy R., Pollard J.W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*. 2014; 41: 49–61. doi: 10.1016/j.jimmuni.2014.06.010.
10. Riabov V., Gudima A., Wang N., Mickley A., Orekhov A., Kzhyshkowska J. Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Front Physiol.* 2014; 5: 75. doi: 10.3389/fphys.2014.00075.
11. Mitchem J.B., Brennan D.J., Knolhoff B.L., Belt B.A., Zhu Y., Sanford D.E., Belavgorod L., Carpenter D., Collins L., Piwnica-Worms D., Hewitt S., Udupi G.M., Gallagher W.M., Wegner C., West B.L., Wang-Gillam A., Goedegebuure P., Linehan D.C., DeNardo D.G. Targeting tumor-infiltrating macrophages decreases tumor-initiating cells, relieves immunosuppression, and improves chemotherapeutic responses. *Cancer Res.* 2013; 73: 1128–1141. doi: 10.1158/0008-5472.
12. Zitvogel L., Galluzzi L., Smyth M.J., Kroemer G. Mechanism of action of conventional and targeted anticancer therapies: reinstating immunosurveillance. *Immunity*. 2013; 39: 74–88. doi: 10.1016/j.jimmuni.2013.06.014.
13. Mantovani A., Biswas S.K., Galdiero M.R., Sica A., Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol.* 2013 Jan; 229 (2): 176–85. doi: 10.1002/path.4133.
14. Mantovani A., Locati M. Tumor-Associated Macrophages as a Paradigm of Macrophage Plasticity, Diversity, and Polarization Lessons and Open Questions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013; 33: 1478–1483. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.300168.
15. DeNardo D.G., Brennan D.J., Rexhepaj E., Ruffell B., Shiao S.L., Madden S.F., Gallagher W.M., Wadhwania N., Keil S.D., Junaid S.A., Rugo H.S., Hwang E.S., Jirström K., West B.L., Coussens L.M. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Disc.* 2011; 1: 54–67. doi: 10.1158/2159-8274.CD-10-0028.
16. Dijkgraaf E.M., Heusinkveld M., Tummers B., Vogelpoel L.T., Goedemans R., Jha V., Nortier J.W., Welters M.J., Kroep J.R., van der Burg S.H. Chemotherapy alters monocyte differentiation to favor generation of cancer-supporting M2 macrophages in the tumor microenvironment. *Cancer Res.* 2013; 73: 2480–92. doi: 10.1158/0008-5472.
17. Kzhyshkowska J., Gratchev A., Goerdt S. Human chitinases and chitinase-like proteins as indicators for inflammation and cancer. *Biomarker Insights*. 2007; 2: 128–46.
18. Kzhyshkowska J., Yin S., Liu T., Riabov V., Mitrofanova I. Role of chitinase-like proteins in cancer. *Biol Chem.* 2016; 397: 231–47. doi: 10.1515/hzs-2015-0269.
19. Shao R., Hamel K., Petersen L., Cao J.Q., Arenas R.B., Bigelow C., Bentley B., Yan W. YKL-40, a secreted glycoprotein, promotes tumor angiogenesis. *Oncogene*. 2009; 28: 4456. doi: 10.1038/onc.2009.292.
20. Gratchev A., Kzhyshkowska J., Kannokadan S., Ochsenreiter M., Popova A., Yu X., Mamidi S., Stonehouse-Usselmann E., Muller-Molinet I., Gooi L., Goerdt S. Activation of a TGF-β-specific multistep gene expression program in mature macrophages requires glucocorticoid-mediated surface expression of TGF-β receptor II. *J Immunol.* 2008; 180: 6553–65.
21. Lin L., Chen Y.S., Yao Y.D., Chen J.Q., Chen J.N., Huang S.Y., Zeng Y.J., Yao H.R., Zeng S.H., Fu Y.S., Song E.W. CCL18 from tumor-associated macrophages promotes angiogenesis in breast cancer. *Oncotarget*. 2015; 6: 34758–34773. doi: 10.18632/oncotarget.5325.
22. Chen J., Yao Y., Gong C., Yu F., Su S., Chen J., Liu B., Deng H., Wang F., Lin L., Yao H., Su F., Anderson K.S., Liu Q., Ewen M.E., Yao X., Song E. CCL18 from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via PITPNM3. *Cancer Cell*. 2011; 19: 541–555. doi: 10.1016/j.ccr.2011.02.006.
23. Nagarsheth N., Wicha M.S., Zou W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2017 Sep 30; 17 (9): 559–572. doi: 10.1038/nri.2017.49.
24. Schwartz G.F., Hortobagyi G.N. Proceedings of the consensus conference on neoadjuvant chemotherapy in carcinoma of the breast, April 26–28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania. *Cancer*. 2004; 100 (12): 2512–32.
25. Wolff A.C., Hammond M.E., Hicks D.G., Dowsett M., McShane L.M., Allison K.H., Allred D.C., Bartlett J.M., Bilous M., Fitzgibbons P., Hanna W., Jenkins R.B., Mangi P.B., Paik S., Perez E.A., Press M.F., Spears P.A., Vance G.H., Viale G., Hayes D.F.; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Medicine*. 2007; 131: 18–43. doi: 10.1043/1543-2165(2007)131[18:ASOCCO]2.0.CO;2.

26. Litviakov N.V., Cherdynseva N.V., Tyganov M.M., Denisov E.V., Garbukov E.Y., Merzliakova M.K., Volkomorov V.V., Vtorushin S.V., Zavyalova M.V., Slonimskaya E.M., Perelmuter V.M. Changing the expression vector of multidrug resistance genes is related to neoadjuvant chemotherapy response. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013; 71 (1): 153–63. doi: 10.1007/s00280-012-1992-x.
27. Litviakov N.V., Cherdynseva N.V., Tyganov M.M., Slonimskaya E.M., Ibragimova M.K., Kazantseva P.V., Kzhyshkowska J., Choinzonov E.L. Deletions of multidrug resistance gene loci in breast cancer leads to the down-regulation of its expression and predict tumor response to neoadjuvant chemotherapy. *Oncotarget.* 2016 Feb 16; 7 (7): 7829–41. doi: 10.18632/oncotarget.6953.
28. Pfaffl M.W., Lange I.G., Daxenberger A., Meyer H.H. Tissue-specific expression pattern of estrogen receptors (ER): quantification of ER alpha and ER beta mRNA with real-time RT-PCR. *APMIS.* 2001 May; 109 (5): 345–55.
29. Martinez F.O., Helming L., Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27: 451–83. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132532.
30. Schutyser E., Richmond A., Van Damme J. Involvement of CC chemokine ligand 18 (CCL18) in normal and pathological processes. *J Leukoc Biol.* 2005; 78: 14–26.
31. Kzhyshkowska J., Yin S., Liu T., Riabov V., Mitrofanova I. Role of chitinase-like proteins in cancer. *Biol Chem.* 2016 Mar; 397 (3): 231–47. doi: 10.1515/hsz-2015-0269.
32. Leung S.Y., Yuen S.T., Chu K.M., Mathy J.A., Li R., Chan A.S., Law S., Wong J., Chen X., So S. Expression profiling identifies chemokine (C-C motif) ligand 18 as an independent prognostic indicator in gastric cancer. *Gastroenterol.* 2004; 127: 457–469.
33. Sainz Jr B., Martin B., Tatari M., Heeschen C., Guerra S. ISG15 is a critical microenvironmental factor for pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 2014 Dec 15; 74 (24): 7309–20. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1354.

Received 20.10.17
Accepted 21.11.17

ABOUT THE AUTHORS

- Nikolai V. Litviakov**, PhD, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: nvlitv72@yandex.ru. SPIN-code: 2546-0181. AuthorID: 183820.
- Matvey M. Tyganov**, PhD, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: TyganovMM@yandex.ru. SPIN-code: 1253-0240. AuthorID: 730156.
- Marina K. Ibragimova**, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: imk1805@yandex.ru. SPIN-code: 2340-1628. AuthorID: 637822. ResearchID: C-8609-2012. ORCID: 0000-0001-8815-2786. SCOPUS: 57130579200.
- Irina V. Deriusheva**, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: Irkin_097@mail.ru. SPIN-code: 5560-6131. AuthorID: 881749.
- Polina V. Kazantseva**, MD, PhD, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: polydoctor@yandex.ru. SPIN-code: 7881-6259. AuthorID: 857960.
- Irina V. Mitrofanova**, MD, Tomsk State University (Tomsk, Russia). E-mail: mitrof_@mail.ru. SPIN-code: 6272-8422. AuthorID: 56862097400.
- Irina G. Frolova**, MD, DSc, Professor, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: FrolovaIG@oncology.tomsk.ru. SPIN-code: 9800-9777. AuthorID: 463121. ORCID: 0000-0001-5227-006X. SCOPUS: 7006413170.
- Michail A. Buldakov**, PhD, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: buldakov@oncology.tomsk.ru. SPIN-code: 7558-4726. AuthorID: 7922-2012.
- Elena M. Slonimskaya**, MD, DSc, Professor, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: slonimskaya@rambler.ru. SPIN-code: 7763-6417. AuthorID: 183823.
- Evgeny L. Choinzonov**, MD, DSc, Professor, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: info@oncology.tomsk.ru. SPIN-code: 2240-8730. AuthorID: 550195.
- Julia Kzhyshkowska**, Professor, Tomsk State University (Tomsk, Russia); Institute of Transfusion Medicine and Immunology, Medical Faculty, Mannheim, University of Heidelberg (Mannheim, Germany). E-mail: Julia.Kzhyshkowska@gmail.com.
- Nadejda V. Cherdynseva**, PhD, Professor, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: nvch@tnimc.tomsk.ru. SPIN-code: 5344-0990. AuthorID: 81344.