

©Коллектив авторов

**ВЛИЯНИЕ ФАКТОРА ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ HLDF НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ
БИОПТАТАМИ ТКАНИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ЕЁ НЕЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ
ЗАБОЛЕВАНИЯХ И ПРИ ИНВАЗИВНОЙ КАРЦИНОМЕ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ТИПА**

А.И. Аутенилюс^{1,2}, А.А. Студеникина¹, Е.С. Михайлова^{1,2}, А.В. Проскура²,
Н.А. Вараксин³, С.В. Сидоров⁴, А.П. Богачук⁵, В.М. Липкин⁵, В.В. Ляхович²*

¹Новосибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ,
630091, Новосибирск, Красный просп., 52; *эл. почта: lrciir@211.ru

²Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики
Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины,
630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2/12

³АО “Вектор-Бест”, 630559, Новосибирская область, р. п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп. 36

⁴Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

⁵Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук,
117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Исследовали влияние фактора дифференцировки HLDF на продукцию цитокинов биоптатами при незлокачественных заболеваниях молочной железы (НЗ) и при инвазивной карциноме молочной железы неспецифического типа (ИКНТ) при отсутствии и наличии лимфогенного метастазирования, а также у пациентов с ИКНТ, распределённых по подтипам на основе прогностического протокола 8 издания комитета AJCC. Группу IA составили пациенты с размерами опухоли T1-T2 и преимущественно с положительной экспрессией рецепторов эстрогена и прогестерона (ER+/PR+/HER2-) и один пациент с HER2+ (ER-/PR-/HER2+) молекулярным подтипом. В группу IB были включены пациенты с размерами опухоли T2, преимущественно с наличием лимфогенного метастазирования (8 из 10) и с положительной экспрессией рецепторов эстрогена и прогестерона (ER+/PR+/HER2-), а также три пациента с молекулярным подтипом HER2+ (ER-/PR-/HER2+). Группу IIA составили пациенты с размерами опухоли T1-T2, преимущественно с отсутствием метастазов в лимфоузлах (11 из 12 больных) и с тройным негативным молекулярным подтипом. Группу IIB составили пациенты с размерами опухоли T2, наличием лимфогенного метастазирования и экспрессией маркёров: ER-/PR-/HER2- и ER-/PR-/HER2+. Группу IIIA составили пациенты с размерами опухоли T1-T3, наличием лимфогенного метастазирования и экспрессией маркёров: ER-/PR+/HER2+ и ER-/PR-/HER2+. Группу IIIC составили пациенты с размерами опухоли T3, с наличием лимфогенного метастазирования и с экспрессией маркёров ER-/PR-/HER2- (тройной негативный молекулярный подтип). Ввиду малого количества пациентов в группах IIB, IIIA и IIIC, а также в связи с более тяжёлыми клинико-патологическими стадиями, согласно прогностическому протоколу 8 издания комитета AJCC, они были объединены в одну группу III. Концентрации IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1β, IL-1Ra, TNF-α, IFN-γ, GM-CSF, VEGF и MCP-1 определяли в супернатантах биоптатов ткани молочной железы. Исследования показали, что при ИКНТ отмечался статистически значимо более высокий уровень спонтанной продукции (СП) IL-17, IL-18, IFN-γ и VEGF и более низкий уровень СП IL-6 по сравнению с НЗ молочной железы. У пациентов всех клинико-патологических групп ИКНТ отмечена высокая СП VEGF по сравнению с НЗ, тогда как статистически значимые различия от пациентов с НЗ по СП IL-17 отсутствовали у пациентов группы IB, а по СП IL-18 отсутствовали у пациентов IA. Только у пациентов групп IA и IB СП IL-6 была ниже по сравнению с НЗ, а СП IL-8 была ниже у пациентов группы IA. СП IFN-γ была выше у пациентов с ИКНТ группы IIA по сравнению с НЗ. При воздействии фактора дифференцировки HLDF установлено, что показатели пациентов с ИКНТ были статистически значимо более высокими по продукции IL-1Ra, IL-17, IL-18 и VEGF и статистически значимо более низкими по продукции IL-6 по сравнению с НЗ молочной железы. При воздействии HLDF на продукцию IL-18 его содержание оказалось выше у пациентов всех клинико-патологических групп по сравнению с пациентами с НЗ. По сравнению с НЗ только у пациентов групп IA и IB показатели IL-6 при воздействии HLDF были ниже, а индуцированная HLDF продукция IL-17 была выше только у пациентов группы IA. Статистически значимые различия по индексу влияния HLDF (IBHLDF), представляющим собой отношение концентрации цитокинов в супернатанте биоптата, при воздействии HLDF к спонтанной продукции цитокинов были установлены между НЗ и ИКНТ по IBHLDF на продукцию IFN-γ, а также по IBHLDF на продукцию IL-4 между пациентами при отсутствии и наличии лимфогенного метастазирования. IBHLDF на продукцию IL-6, IL-8 и TNF-α был ниже у пациентов группы IIA по сравнению с группой IA, а IBHLDF на продукцию GM-CSF и MCP-1 был ниже у группы IIA по сравнению с показателями группы III, кроме того, IBHLDF на продукцию MCP-1 был ниже у группы IIA по сравнению с НЗ. Влияние фактора дифференцировки HLDF на продукцию цитокинов опухолью и её микроокружением различно для пациентов с НЗ и ИКНТ. Фактор дифференцировки оказывал супрессирующее влияние на продукцию IFN-γ у пациентов с ИКНТ и на продукцию IL-4 только у пациентов с лимфогенным метастазированием и на продукцию IL-6, IL-8, TNF-α, GM-CSF и MCP-1 у пациентов с ИКНТ группы IIA.

Ключевые слова: цитокины; HLDF; метастазы; заболевания молочной железы

DOI: 10.18097/PBMC20206606485

ВВЕДЕНИЕ

Женщины с незлокачественными заболеваниями (НЗ) молочной железы имеют повышенный риск развития рака молочной железы. В исследовании 13485 женщин обнаружено, что 30% всех случаев рака молочной железы развиваются у женщин с предшествующими НЗ [1]. Процесс перехода от НЗ к злокачественному заболеванию сопровождается нарушением клеточной дифференцировки, возрастающей пролиферацией и увеличением количества атипичных клеток. Классическая модель прогрессирования рака молочной железы протокового типа предполагает, что неопластическая эволюция начинается в нормальном эпителии, прогрессирует до атипичии плоского эпителия, переходит в атипичную гиперплазию протоков, развивается в протоковую карциному *in situ* и достигает кульминации в виде инвазивной протоковой карциномы [2]. По сравнению с достаточно изученным инвазивным раком молочной железы, значительно меньше известно о молекулярно-клеточных изменениях, лежащих в основе развития и прогрессирования НЗ молочной железы [3].

Поскольку процесс перехода от НЗ к злокачественному заболеванию сопровождается, в том числе, нарушением клеточной дифференцировки, то представляет интерес изучение факторов, способных индуцировать дифференцировку клеток, в частности Human Leukemia Differentiation Factor (HLDF). Этот фактор выделен из культуральной среды клеток линии HL-60 (линия клеток промиелоцитарного лейкоза человека) и представляет собой гликозилированный белок с молекулярной массой 8,2 кДа, содержащий 54 аминокислотных остатка; он образуется при гликозилировании и протеолитическом процессинге, в результате которого от N-конца экспрессированного белка отщепляется 43 аминокислотных остатка при расщеплении связи Q43–A44. HLDF способен индуцировать дифференцировку клеток HL-60 в фенотипически зрелые гранулоциты [4]. Результаты исследования пациентов с аденокарциномой желудка показали, что при злокачественных опухолях с большим содержанием низкодифференцированных клеток и меньшим высокодифференцированных уровни аутоантител к HLDF были снижены [5]. Взаимодействие HLDF с липидными компонентами клеточной мембраны приводит к изменению связывания цитокинов с мембраной и, следовательно, оказывает влияние и на цитокин-продуцирующую функцию клетки [6]. При изучении влияния фактора дифференцировки HLDF на продукцию цитокинов IL-1 β , IL-1Ra и IL-8 иммунокомпетентными клетками периферической крови больных хроническим атрофическим гастритом, аденомами и аденокарциномами желудка было установлено, что в тех случаях, когда в слизистой оболочке желудка начинают появляться атипичные клетки, влияние фактора дифференцировки на способность иммунокомпетентных клеток продуцировать указанные цитокины достигает максимального

уровня [7]. Но наибольший интерес представляют исследования влияния фактора дифференцировки HLDF непосредственно на опухоль.

Поэтому целью работы было изучение влияния фактора дифференцировки HLDF на продукцию цитокинов биоптатами ткани при незлокачественных заболеваниях и инвазивной карциноме молочной железы неспецифического типа (ИКНТ).

МЕТОДИКА

Материалом служили биоптаты ткани молочной железы 17 пациентов с НЗ, средний возраст которых составил 46 лет (от 18 до 67), и 60 пациентов с ИКНТ, средний возраст которых составил 53 года (от 23 до 71). На момент проведения исследования метастазы в регионарные лимфатические узлы присутствовали у 23 пациентов, средний возраст которых составил 52 года (от 23 до 71), в то время как у остальных 37 пациентов со средним возрастом 54 года (от 35 до 71) метастазы отсутствовали. На основе прогностического протокола 8 издания комитета AJCC, интегрирующего в систему традиционных анатомических стадий злокачественных новообразований TNM, включающей оценку первичной опухоли (T), степени вовлеченности регионарных лимфатических узлов (N), наличия отдаленных метастазов (M), статусы рецепторов эстрогена (ER), прогестерона (PR) и статус рецептора эпидермального фактора роста человека 2 (HER2), а также гистологическую степень злокачественности опухоли (G) [8], у 28 пациентов с ИКНТ была диагностирована стадия IA, средний возраст пациентов составил 55 лет (от 35 до 71), из них у 15 пациентов — T1, N0, M0, у 8 пациентов — T2, N0, M0, у 3 пациентов — T1, N1, M0, у 1 пациента — T2, N1, M0, у 24 пациентов этой группы гистологическая степень злокачественности относилась к G2, а у 4 — к G1. Для пациентов этой группы характерна преимущественно положительная экспрессия рецепторов эстрогена и прогестерона (ER+/PR+/HER2-), был только один пациент с HER2+ (ER-/PR-/HER2+) молекулярным подтипом.

Из 10 пациентов со стадией IB у 1 пациента — T1, N2, M0, у 2 пациентов — T2, N0, M0, у 6 пациентов — T2, N1, M0, у 1 пациента — T2, N2, M0; у 9 пациентов этой группы гистологическая степень злокачественности характеризовалась G2, у 1 — G1. У 7 пациентов со стадией IB отмечалась положительная экспрессия рецепторов эстрогена и прогестерона (ER+/PR+/HER2-), а у 3 пациентов HER2+ (ER-/PR-/HER2+) молекулярный подтип, средний возраст пациентов со стадией IB составил 49 лет (от 23 до 62).

Из 12 пациентов со стадией IIA 2 пациента характеризовались — T1, N0, M0; 1 — T1, N1, M0; 9 пациентов — T2, N0, M0. У всех пациентов этой группы гистологическая степень злокачественности была G2. У 9 пациентов со стадией IIA отмечался тройной негативный (ER-/PR-/HER2-) и у 3 HER2+ молекулярные подтипы, средний возраст пациентов в стадии IIA составил 54 года (от 38 до 71). Вследствие малого числа пациентов группы IIB, IIA и IIC были

объединены в одну группу III, в которую вошли 10 пациентов, их средний возраст составил 52 года (от 39 до 69) у 1 пациента была анатомическая стадия T1, N3, M0, у 5 пациентов — T2, N1, M0, у 1 пациента — T2, N2, M0, у 2 пациентов — T2, N3, M0, у 1 пациента — T3, N2, M0. У всех пациентов гистологическая степень злокачественности была G2. 2 пациента группы III характеризовались ER+/PR+/HER2- молекулярным подтипом, 4 — HER2+ и 4 пациента были с тройным негативным молекулярным подтипом, то есть в этой группе не было ни одного пациента без лимфогенного метастазирования.

В течение 30 дней от начала обследования всем больным было проведено операционное вмешательство, окончательный диагноз устанавливался врачом-онкологом и врачом-патологоанатомом. Ни у кого из пациентов не было обострения очагов хронической инфекции. Неоадьювантная (дооперационная) терапия ни одному из пациентов не проводилась.

Образцы опухолей объёмом 8 мм³ получали методом трепанобиопсии и помещали в два флакона: в первом флаконе для определения спонтанной продукции (СП) часть биоптата инкубировали в питательной среде DMEM-F12 в объёме 1 мл, во втором для определения стимулированной HLDF продукции использовали ту же питательную среду в объёме 1 мл, содержащую HLDF в концентрации 20 мкг/мл [9]. Образцы инкубировали при 37°C в течение 72 ч, после чего клетки осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 900 g и 25°C. В полученных после осаждения клетках супернатантах при помощи наборов для твердофазного иммуноферментного анализа определяли концентрацию следующих цитокинов (чувствительность набора): TNF- α (1,0 пг/мл), IFN- γ (2,0 пг/мл), VEGF (10,0 пг/мл), G-CSF (2,0 пг/мл), GM-CSF (2,0 пг/мл), MCP-1 (15,0 пг/мл), IL-4 (1,0 пг/мл), IL-6 (0,5 пг/мл), IL-8 (2,0 пг/мл), IL-10 (1,0 пг/мл), IL-17 (2,0 пг/мл), IL-18 (2,0 пг/мл), IL-1 β (1,0 пг/мл) и IL-1Ra (10,0 пг/мл). Все наборы были производства “Вектор-Бест” (Россия). Влияние HLDF на продукцию цитокинов биоптатами опухоли оценивали по индексу влияния — IBHLDF, выраженному в условных единицах (у.е.), который высчитывали по формуле: IBHLDF = A/B, где A — концентрация цитокина в супернатанте биоптата при воздействии HLDF, а B — концентрация цитокина в супернатанте биоптата без воздействия HLDF (СП) [7].

Для статистической обработки результатов использовали программный пакет SPSS v17.0 for Windows. При определении характера распределения данных применяли уравнение Колмогорова-Смирнова с определением поправки Лиллифорса. Поскольку распределение отличалось от нормального, проводили анализ с использованием непараметрического критерия Уилкоксона-Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Полученные в ходе исследования данные представлены как медиана (Me), верхний и нижний квартили (Q₁, Q₃).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ значений СП цитокинов клетками опухоли и её микроокружения у пациентов с заболеваниями молочной железы показал, что концентрации СП IL-17, IL-18 и VEGF были статистически значимо выше в супернатанте образцов ткани молочной железы у пациентов с ИКНТ, а IL-6 — ниже по сравнению с аналогичным при НЗ (табл. 1). При сравнении СП цитокинов пациентов с метастазами и без них, только концентрация IL-18 была выше у пациентов при лимфогенном метастазировании, чем у пациентов без него. Следует отметить, что более высокая СП VEGF была у пациентов всех клинико-патологических групп по сравнению с пациентами с НЗ (табл. 2), тогда как статистически значимые отличия по спонтанной продукции IL-17 между пациентами с НЗ и группы IB отсутствовали. Также не было обнаружено статистически значимых различий по СП IL-18 между пациентами с НЗ и группы IA. По сравнению с НЗ только у пациентов групп IA и IB показатели СП IL-6 были ниже. СП IL-8 была ниже только у пациентов группы IA по сравнению с НЗ. Показатели СП IFN- γ были выше в супернатанте образцов ткани молочной железы только у пациентов с ИКНТ группы IIA по сравнению с аналогичными при НЗ.

Можно предположить, что более высокая СП IL-6 у пациентов с НЗ по сравнению с показателями пациентов с ИКНТ, а также по сравнению с группами IA и IB, свидетельствует о противоопухолевой роли этого цитокина у пациентов с НЗ, поскольку этот цитокин обладает способностью рекрутировать эффекторные CD8+ Т-клетки в микроокружение новообразования, что приводит к уничтожению атипичных клеток [10]. Однако статистически значимо более высокая спонтанная продукция IL-6 у пациентов группы IIA по сравнению с группами IA и IB свидетельствует об участии этого цитокина в опухолевой прогрессии при более тяжёлой клинико-патологической стадии, поскольку этот цитокин способствует дифференцировке и пролиферации T-reg и Th17, участвующих в формировании иммуносупрессивного микроокружения опухоли [11], но в то же время IL-6, вероятно, не задействован в лимфогенном метастазировании, поскольку у пациентов группы III (с метастазами) показатели СП этого цитокина оказались более низкими.

Спонтанная продукция IL-8, IL-18 и IL-1 β у пациентов групп IIA и III была статистически значимо выше по сравнению с группой IA. При высоких концентрациях в опухолевой ткани IL-1 β индуцирует продукцию IL-8, что ведёт к повышению ангиогенеза и про-метастатической активности опухолевых клеток [12]. Высокая концентрация IL-18, сопряжённая с большим опухолевым очагом согласно TNM, свидетельствует о его про-онкогенной роли. Этот цитокин индуцирует экспрессию проангиогенного фактора, фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), увеличивает популяцию миелоидных клеток-супрессоров и может стимулировать экспрессию PD-1 на зрелых

ФАКТОР ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ HLDF, ЦИТОКИНЫ, МОЛОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА

Таблица 1. СП цитокинов (пг/мл) в супернатантах образцов ткани молочной железы пациентов с ИКНТ при наличии и отсутствии лимфогенного метастазирования и с НЗ

Цитокины	I. НЗ n = 17 (Ме; Q ₁ -Q ₃) пг/мл	II. ИКНТ n = 60 (Ме; Q ₁ -Q ₃) пг/мл	III. Без метастазов n = 37 (Ме; Q ₁ -Q ₃) пг/мл	IV. Метастазирующие n = 23 (Ме; Q ₁ -Q ₃) пг/мл
IL-2	2,0 (2,0-2,0)	2,7 (2,0-5,6)	2,0 (2,0-4,7)	4,0 (2,0-6,6)
IL-4	3,2 (2,3-5,0)	2,7 (1,6-4,2)	2,4 (1,5-3,9)	2,7 (1,9-6,5)
IL-6	502,4 (201,6-658,7)	297,5 (64,2-491,0)* p _{I-II} =0,032	286,1 (68,6-489,8)	303,0 (59,0-493,5)
IL-8	378,7 (263,3-1520,0)	327,2 (191,0-541,1)	316,7 (146,9-447,2)	395,3 (292,0-568,1)
IL-10	9,5 (1,4-19,6)	5,8 (1,0-13,0)	5,8 (1,0-12,7)	5,8 (1,0-13,8)
IL-17	1,0 (1,0-1,4)	1,7 (1,0-3,8)* p _{I-II} =0,006	1,5 (1,0-3,5)* p _{I-III} =0,011	1,7 (1,0-4,6)* p _{I-IV} =0,014
IL-18	5,0 (2,7-28,5)	30,8 (12,0-155,2)* p _{I-II} =0,001	25,2 (10,0-87,3)* p _{I-III} =0,023	57,4 (29,5-221,1)* p _{I-IV} =0,0001 p _{III-IV} =0,019
IL-1β	17,0 (10,6-43,1)	24,6 (11,9-70,3)	20,7 (10,6-70,3)	34,8 (18,8-76,7)
IL-1Ra	2070,6 (646,2-4340,4)	3074,2 (1415,2-4189,7)	2810,6 (1275,1-3924,6)	3266,2 (2760,0-4264,6)* p _{I-IV} =0,034
TNF-α	2,0 (1,1-3,5)	2,6 (1,5-5,2)	2,3 (1,5-5,0)	2,9 (1,2-5,7)
IFN-γ	5,0 (2,0-20,0)	10,5 (5,1-24,6)	9,0 (5,0-28,0)	12,1 (5,2-20,4)
G-CSF	80,3 (21,6-518,4)	37,4 (8,0-436,8)	28,4 (8,0-441,1)	68,5 (15,4-424,6)
GM-CSF	3,2 (2,0-15,0)	8,3 (2,2-15,4)	5,1 (2,2-15,9)	9,3 (2,1-13,4)
VEGF	55,8 (17,1-1012,6)	1043,5 (121,7-2200,2)* p _{I-II} =0,001	1895,1 (125,0-2318,1)* p _{I-III} =0,001	575,5 (115,2-2207,5)* p _{I-IV} =0,005
MCP-1	660,8 (246,1-1719,9)	393,1 (183,6-1635,3)	579,7 (192,9-1788,3)	373,6 (170,7-709,5)

Примечание. Здесь и в таблицах 2-6 * — статистически значимые различия при $p < 0,05$ определённые при помощи непараметрического критерия Уилкоксона-Манна-Уитни.

Таблица 2. СП цитокинов (пг/мл) в супернатантах образцов ткани молочной железы пациентов с ИКНТ разделёнными по подгруппам согласно критериям 8 издания AJCC и с НЗ

Цитокины	НЗ n = 17 (Ме; Q ₁ -Q ₃) пг/мл	IA n = 28 (Ме; Q ₁ -Q ₃) пг/мл	IB n = 10 (Ме; Q ₁ -Q ₃) пг/мл	IIA n = 12 (Ме; Q ₁ -Q ₃) пг/мл	III n = 10 (Ме; Q ₁ -Q ₃) пг/мл
IL-2	2,0 (2,0-2,0)	2,0 (2,0-4,0)	4,6 (2,0-9,8)	3,4 (2,0-5,0)	3,9 (2,5-6,5)
IL-4	3,2 (2,3-5,0)	3,2 (1,6-4,6)	3,0 (1,4-7,0)	1,9 (1,7-3,1)	2,2 (1,5-6,6)
IL-6	502,4 (201,6-658,7)	260,1 (56,8-334,9)* p _{I-IA} =0,006	182,0 (8,7-505,8)* p _{I-IB} =0,049 p _{IB-IIA} =0,035	516,4 (120,6-675,3)* p _{IA-IIA} =0,012	300,3 (103,7-567,7)
IL-8	378,7 (263,3-1520,0)	278,0 (129,8-382,3)* p _{I-IA} =0,022	354,6 (256,9-468,4)	444,9 (263,6-1994,5)* p _{IA-IIA} =0,007	540,8 (315,7-1150,6)* p _{IA-III} =0,005
IL-10	9,5 (1,4-19,6)	3,9 (1,0-11,5)	3,7 (1,0-15,6)	6,9 (3,5-12,3)	10,2 (3,3-15,0)
IL-17	1,0 (1,0-1,4)	1,6 (1,0-4,2)* p _{I-IA} =0,023	1,4 (1,0-3,8)	1,9 (1,1-3,5)* p _{I-IIA} =0,016	2,1 (1,2-15,7)* p _{I-III} =0,006
IL-18	5,0 (2,7-28,5)	23,8 (6,0-31,1)	50,7 (10,7-123,0)* p _{I-IB} =0,021	140,2 (16,9-399,2)* p _{I-IIA} =0,002 p _{IA-IIA} =0,014	155,1 (43,3-542,6)* p _{I-III} =0,0001 p _{IA-III} =0,001
IL-1β	17,0 (10,6-43,1)	18,1 (9,9-31,8)	35,3 (13,8-96,4)	45,7 (14,5-103,7)* p _{IA-IIA} =0,036	53,1 (27,2-98,8)* p _{IA-III} =0,011
IL-1Ra	2070,6 (646,2-4340,4)	3126,6 (1281,1-5347,3)	3124,4 (1994,0-3837,4)	2546,7 (1304,8-3614,5)	3886,8 (2797,1-4541,9)
TNF-α	2,0 (1,1-3,5)	1,8 (1,1-4,0)	3,4 (1,7-5,2)	3,7 (1,8-6,7)	3,7 (1,9-6,7)
IFN-γ	5,0 (2,0-20,0)	7,3 (4,8-11,7)	13,1 (2,2-24,4)	14,9 (7,7-41,1)* p _{I-IIA} =0,045	12,0 (7,7-28,2)
G-CSF	80,3 (21,6-518,4)	24,7 (8,0-581,0)	54,7 (5,1-320,0)	71,6 (9,7-352,2)	141,3 (15,5-445,2)
GM-CSF	3,2 (2,0-15,0)	3,6 (2,0-9,9)	9,0 (6,4-14,2)	12,9 (4,2-30,3)* p _{IA-IIA} =0,025	9,8 (7,0-22,8)
VEGF	55,8 (17,1-1012,6)	232,5 (68,4-2049,9)* p _{I-IA} =0,029	811,8 (363,4-3360,3)* p _{I-IB} =0,006	2138,3 (895,1-2946,8)* p _{I-IIA} =0,001 p _{IA-IIA} =0,013	1648,2 (506,2-2286,7)* p _{I-III} =0,006
MCP-1	660,8 (246,1-1719,9)	279,1 (172,0-1726,3)	388,5 (177,7-1335,5)	1217,9 (481,7-1774,5)	374,5 (166,2-1208,5)

НК-клетках, что в дальнейшем ведет к апоптозу последних [13]. Концентрации СП GM-CSF и VEGF у пациентов группы ПА были выше по сравнению с группой IA, это связано с тем, что при более тяжёлом опухолевом процессе гиперпродукция GM-CSF, посредством активации сигнального каскада JAK2/STAT5 стимулирует продукцию опухолевыми и стромальными клетками VEGF, способствующую прогрессии опухоли путём усиления ангиогенеза неоплазмы [14, 15].

При воздействии HLDF на образцы ткани молочной железы концентрации IL-18, IL-1Ra и VEGF были выше у пациентов всей группы с ИКНТ, а концентрация IL-6 была ниже по сравнению с аналогичными при НЗ (табл. 3). У пациентов без лимфогенного метастазирования при воздействии HLDF, кроме выше перечисленных, концентрация IL-17 была выше по сравнению с НЗ, а статистически значимые различия по сравнению с пациентами с НЗ по концентрации IL-1Ra отсутствовали. Кроме того, при воздействии HLDF на биоптаты исчезали статистически значимые различия между пациентами с метастазами и без них, вероятно, это связано с тем, что HLDF оказывал супрессирующее влияние на продукцию IL-18 в большей степени у пациентов с метастазами в регионарные лимфатические узлы, чем у пациентов без них. Статистически значимо более высокое содержание IL-18 при воздействии HLDF отмечалось у пациентов всех клиничко-патологических групп по сравнению с пациентами с НЗ (табл. 4), тогда как статистически значимые отличия при влиянии HLDF на продукцию VEGF отсутствовали у пациентов группы IA, а отличия по индуцированной HLDF продукции IL-1Ra пациентов с незлокачественными

заболеваниями не обнаруживались по сравнению с пациентами групп IA и ПА. По сравнению с НЗ только у пациентов групп IA и IB показатели IL-6 при воздействии HLDF были ниже, а индуцированная HLDF продукция IL-17 была выше только у пациентов группы IA.

HLDF оказывает то или иное воздействие на продукцию ряда цитокинов. Так, концентрация IL-17 в супернатанте ткани молочной железы у пациентов группы IB была ниже по сравнению с группой IA, что, возможно, связано с тем, что группу IB составляют пациенты, для которых характерно преимущественно наличие метастазов в лимфоузлах (8 из 10 пациентов), а в группе IA метастазы в лимфоузлы отмечались только у одного пациента. IL-17 способствует ангиогенезу опухоли, индуцируя экспрессию VEGF. Помимо этого, IL-17 ингибирует апоптоз через активацию воспалительных сигнальных путей, что также способствует злокачественной прогрессии и метастазированию [16]. Хотя у пациентов группы III влияние HLDF приводило к повышению концентрации IL-18 в супернатанте образцов пациентов по сравнению с группой IA, тем не менее, по сравнению со спонтанной продукцией этого цитокина влияние HLDF заключалось в его супрессирующем действии во всех клиничко-патологических группах. При изучении воздействия HLDF на продукцию GM-CSF было установлено, что концентрация этого цитокина в супернатанте образцов ИКНТ была выше у пациентов группы III по сравнению с группами IA и IB. У пациентов группы IA действие HLDF на продукцию VEGF привело к снижению его концентрации по сравнению с показателями образцов ИКНТ пациентов групп IB и ПА. HLDF оказывал

Таблица 3. Продукция цитокинов (пг/мл) в супернатантах образцов ткани молочной железы при воздействии на них HLDF у пациентов с ИКНТ при наличии и отсутствии лимфогенного метастазирования и с НЗ

Цитокины	I. НЗ n = 17 (Me; Q ₁ -Q ₃) пг/мл	II. ИКНТ n = 60 (Me; Q ₁ -Q ₃) пг/мл	III. Без метастазов n = 37 (Me; Q ₁ -Q ₃) пг/мл	IV. Метастазирующие n = 23 (Me; Q ₁ -Q ₃) пг/мл
IL-2	2,0 (2,0-2,0)	2,0 (2,0-3,2)	2,0 (2,0-3,2)	2,0 (2,0-3,2)
IL-4	4,1 (2,7-4,7)	2,7 (1,7-4,1)	2,7 (1,8-4,1)	2,8 (1,6-4,1)
IL-6	492,2 (415,3-693,9)	300,5 (80,0-495,5)* p _{I-II} =0,004	279,6 (90,3-442,1)* p _{I-III} =0,004	319,0 (51,5-497,3)* p _{I-IV} =0,026
IL-8	389,2 (354,6-928,7)	365,1 (213,2-709,8)	337,8 (217,7-738,3)	368,9 (161,0-660,0)
IL-10	3,9 (1,0-19,1)	6,0 (1,0-12,9)	8,4 (1,0-13,5)	5,1 (1,0-10,1)
IL-17	1,0 (1,0-1,4)	1,5 (1,0-2,4)	1,5 (1,0-2,6)* p _{I-III} =0,039	1,1 (1,0-1,9)
IL-18	3,9 (2,0-7,5)	20,3 (2,8-54,3)* p _{I-II} =0,002	19,2 (2,0-46,5)* p _{I-III} =0,013	39,1 (7,8-75,2)* p _{I-IV} =0,0009
IL-1β	14,0 (5,4-31,0)	17,8 (5,1-43,4)	13,7 (3,5-38,0)	21,0 (7,0-47,3)
IL-1Ra	1255,0 (667,8-2263,1)	2615,9 (1287,3-3602,1)* p _{I-II} =0,017	2214,0 (1231,2-3143,0)	3197,6 (1814,0-3641,3)* p _{I-IV} =0,003
TNF-α	1,0 (1,0-1,8)	1,3 (1,0-2,9)	1,3 (1,0-2,8)	1,1 (1,0-3,0)
IFN-γ	5,8 (2,8-11,6)	5,0 (2,4-11,6)	5,0 (2,0-16,7)	5,8 (2,8-10,4)
G-CSF	116,7 (7,2-624,3)	31,9 (6,7-607,4)	13,7 (4,8-606,3)	42,7 (8,0-610,6)
GM-CSF	5,2 (2,0-13,2)	6,0 (2,0-18,2)	4,4 (2,0-13,8)	8,0 (2,0-27,4)
VEGF	59,8 (10,0-1020,8)	763,8 (121,9-2115,0)* p _{I-II} =0,004	703,4 (117,9-2101,1)* p _{I-III} =0,006	869,7 (121,4-2141,5)* p _{I-IV} =0,014
MCP-1	1177,0 (214,3-2339,0)	470,2 (124,2-1537,8)	569,3 (127,8-1722,1)	343,7 (113,9-1301,0)

ФАКТОР ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ HLDF, ЦИТОКИНЫ, МОЛОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА

Таблица 4. Продукция цитокинов (пг/мл) в супернатантах образцов ткани молочной железы при воздействии на них HLDF у пациентов с ИКНТ разделёнными по подгруппам согласно критериям 8 издания AJCC и с НЗ

Цитокины	НЗ n = 17 (Me; Q ₁ -Q ₃) пг/мл	IA n = 28 (Me; Q ₁ -Q ₃) пг/мл	IB n = 10 (Me; Q ₁ -Q ₃) пг/мл	IIA n = 12 (Me; Q ₁ -Q ₃) пг/мл	III n = 10 (Me; Q ₁ -Q ₃) пг/мл
IL-2	2,0 (2,0-2,0)	2,0 (2,0-3,1)	2,0 (2,0-2,6)	2,3 (2,0-3,3)	3,0 (2,0-3,8)
IL-4	4,1 (2,7-4,7)	2,7 (1,7-4,8)	3,1 (1,7-4,7)	2,7 (2,0-3,3)	2,2 (1,3-4,0)
IL-6	492,2 (415,3-693,9)	279,1 (80,0-342,1)* p _{I-IA} =0,001	236,0 (11,6-496,0)* p _{I-IB} =0,022	392,7 (104,1-575,1)	366,9 (94,8-569,5)
IL-8	389,2 (354,6-928,7)	322,8 (179,2-460,6)	365,3 (270,0-679,0)	519,4 (220,8-1733,5)	412,8 (279,0-2859,4)
IL-10	3,9 (1,0-19,1)	6,1 (1,0-13,4)	5,0 (1,0-11,1)	7,0 (1,0-10,8)	7,3 (4,3-22,0)
IL-17	1,0 (1,0-1,4)	1,7 (1,0-3,7)* p _{I-IA} =0,028	1,0 (1,0-1,4)* p _{IA-IB} =0,027	1,3 (1,0-2,7)	1,7 (1,0-2,2)
IL-18	3,9 (2,0-7,5)	14,1 (2,0-38,8)* p _{I-IA} =0,037	17,6 (3,4-60,3)* p _{I-IB} =0,026	46,5 (7,9-269,4)* p _{I-IIA} =0,016	44,0 (13,9-292,8)* p _{I-III} =0,0008 p _{IA-III} =0,042
IL-1β	14,0 (5,4-31,0)	12,4 (3,7-27,9)	37,2 (3,7-56,3)	20,3 (7,7-44,6)	22,3 (6,5-56,7)
IL-1Ra	1255,0 (667,8-2263,1)	2389,5 (1278,4-3151,9)	3400,1 (2328,0-4100,0)* p _{I-IB} =0,031	1693,0 (1195,6-3073,0)	3290,1 (2185,2-4228,9)* p _{I-III} =0,010
TNF-α	1,0 (1,0-1,8)	1,2 (1,0-2,8)	1,1 (1,0-3,6)	1,2 (1,0-2,6)	1,7 (1,1-4,8)
IFN-γ	5,8 (2,8-11,6)	5,0 (2,0-8,2)	6,2 (2,0-9,3)	9,7 (2,2-24,9)	8,5 (5,0-22,8)* p _{IA-III} =0,039
G-CSF	116,7 (7,2-624,3)	21,0 (3,3-527,9)	25,4 (5,6-836,4)	24,5 (2,9-543,8)	298,6 (21,8-623,3)
GM-CSF	5,2 (2,0-13,2)	2,9 (2,0-10,2)	5,6 (2,0-20,4)* p _{IB-III} =0,044	9,0 (2,6-22,4)	8,8 (7,8-73,6)* p _{IA-III} =0,013
VEGF	59,8 (10,0-1020,8)	191,8 (48,3-951,0)	1123,3 (337,1-2620,8)* p _{I-IB} =0,009 p _{IA-IB} =0,019	1611,4 (577,7-2486,4)* p _{I-IIA} =0,004 p _{IA-IIA} =0,018	1004,0 (113,2-2218,5)* p _{I-III} =0,029
MCP-1	1177,0 (214,3-2339,0)	214,4 (104,4-2090,8)	424,7 (117,8-2335,0)	571,3 (276,8-880,4)	679,7 (203,2-1345,5)

супрессирующее действие на продукцию IFN-γ у всех пациентов с ИКНТ, но в большей степени у пациентов группы III, что приводило к появлению статистически значимых различий по сравнению с пациентами группы IA.

Пациенты с ИКНТ и с НЗ статистически значимо отличались по ИВНЛДФ на продукцию биоптатами IFN-γ (табл. 5). Показатель ИВНЛДФ на продукцию этого цитокина в группе пациентов с НЗ был выше, чем у пациентов с ИКНТ, что связано с более низкой СП IFN-γ у пациентов с НЗ. IFN-γ считается одним из организаторов противоопухолевого иммунного ответа и в то же время играет значительную роль в опухолевой прогрессии, способствуя отбору наиболее злокачественных клонов опухолевых клеток [17]. У пациентов при отсутствии лимфогенного метастазирования ИВНЛДФ на продукцию IL-4 был статистически значимо выше по сравнению с пациентами с метастазами в регионарные лимфатические узлы. Отсутствие влияния HLDF на продукцию IL-4 у пациентов с лимфогенным метастазированием может быть связано с более высокой СП этого цитокина биоптатами ИКНТ. IL-4 является плеiotропным цитокином, секретируемым фибробластами, иммунными, жировыми и широким спектром эпителиальных клеток, включая клетки рака молочной железы [18]. В литературе IL-4 описан как фактор, который участвует в патогенезе рака и развитии локальных метастазов [19]. Активация

сигнала IL-4/STAT6 повышает как опухолевую, так и метастатическую активность клеток рака молочной железы, в то время как его потеря оказывает противоопухолевую активность через активацию CD8+ Т-клеток. В работе Gaggianesi и соавт. показано, что IL-4 ускоряет прогрессирование рака молочной железы, а его уровни были выше в злокачественных опухолях по сравнению с незлокачественными [18].

Кроме того, у пациентов ИКНТ группы IIA ИВНЛДФ на продукцию MCP-1 был ниже по сравнению с аналогичными при НЗ (табл. 6). У пациентов группы IIA HLDF супрессировал продукцию цитокинов, ИВНЛДФ на продукцию IL-6, IL-8 и TNF-α был ниже по сравнению с аналогичными показателями группы IA, а ИВНЛДФ на продукцию GM-CSF и MCP-1 был ниже по сравнению с показателями группы III. Однако фактор дифференцировки HLDF не оказывал подобного влияния на пациентов группы III, для которых характерны: лимфогенное метастазирование и преимущественно тройной негативный и HER2+ молекулярные подтипы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В ходе проведённого нами исследования было установлено, что влияние фактора дифференцировки HLDF на продукцию цитокинов неоднозначно у пациентов с НЗ и ИКНТ. Фактор дифференцировки HLDF оказывал супрессирующее влияние

Таблица 5. Индексы влияния фактора дифференцировки на продукцию цитокинов клетками опухоли и её микроокружения у пациентов с НЗ и с ИКНТ при наличии и отсутствии лимфогенного метастазирования

Цитокины	I. НЗ n = 17 (Ме; Q ₁ -Q ₃) у.е.	II. ИКНТ n = 60 (Ме; Q ₁ -Q ₃) у.е.	III. Без метастазов n = 37 (Ме; Q ₁ -Q ₃) у.е.	IV. Метастазирующие n = 23 (Ме; Q ₁ -Q ₃) у.е.
IL-2	1,0 (1,0-1,0)	0,9 (0,5-1,0)	1,0 (0,7-1,0)	0,7 (0,5-1,0)
IL-4	1,0 (0,8-1,1)	1,0 (0,7-1,5)	1,1 (0,8-1,8)* P _{III-IV} =0,024	0,7 (0,5-1,2)
IL-6	1,0 (0,8-1,5)	1,0 (0,7-1,5)	1,0 (0,7-1,5)	1,0 (0,8-1,5)
IL-8	1,0 (0,7-1,2)	1,0 (0,8-1,4)	1,0 (0,9-1,5)	0,9 (0,7-1,1)
IL-10	1,0 (0,6-1,1)	1,0 (0,6-1,8)	1,0 (0,7-1,6)	1,0 (0,6-2,3)
IL-17	1,0 (0,8-1,1)	1,0 (0,5-1,1)	1,0 (0,5-1,6)	0,8 (0,4-1,0)
IL-18	0,6 (0,3-1,0)	0,6 (0,2-1,2)	0,6 (0,2-1,5)	0,4 (0,2-0,9)
IL-1β	0,7 (0,5-1,2)	0,5 (0,3-1,3)	0,5 (0,3-1,3)	0,4 (0,3-1,3)
IL-1Ra	1,0 (0,4-1,3)	0,9 (0,6-1,0)	1,0 (0,5-1,0)	0,8 (0,6-1,0)
TNF-α	0,8 (0,5-1,0)	0,7 (0,4-1,0)	0,7 (0,5-1,0)	0,8 (0,4-1,0)
IFN-γ	1,0 (0,5-1,3)	0,7 (0,4-1,0)* P _{I-II} =0,028	0,8 (0,4-1,0)	0,6 (0,4-1,0)* P _{I-IV} =0,043
G-CSF	1,1 (0,5-3,4)	1,0 (0,3-1,4)	1,0 (0,4-1,3)	1,0 (0,3-1,9)
GM-CSF	1,0 (0,6-2,4)	1,0 (0,6-1,3)	0,8 (0,6-1,0)	1,0 (0,6-1,5)
VEGF	1,0 (0,6-1,4)	0,9 (0,4-1,1)	0,8 (0,4-1,1)	1,0 (0,4-1,8)
MCP-1	1,1 (0,6-2,0)	0,9 (0,5-1,1)	0,8 (0,5-1,0)	1,0 (0,6-1,3)

Таблица 6. Индексы влияния фактора дифференцировки на продукцию цитокинов (у.е.) клетками опухоли и её микроокружения у пациентов с НЗ и с ИКНТ разделёнными по подгруппам согласно критериям 8 издания AJCC

Цитокины	НЗ n = 17 (Ме; Q ₁ -Q ₃) у.е.	IA n = 28 (Ме; Q ₁ -Q ₃) пг/мл	IB n = 10 (Ме; Q ₁ -Q ₃) пг/мл	IIA n = 12 (Ме; Q ₁ -Q ₃) пг/мл	III n = 10 (Ме; Q ₁ -Q ₃) пг/мл
IL-2	1,0 (1,0-1,0)	1,0 (0,7-1,0)	0,7 (0,3-1,0)	0,9 (0,5-1,0)	0,7 (0,6-1,1)
IL-4	1,0 (0,8-1,1)	1,1 (0,7-1,3)	0,8 (0,5-1,6)	1,2 (1,0-2,0)	0,8 (0,5-2,0)
IL-6	1,0 (0,8-1,5)	1,1 (0,8-2,4)	1,0 (0,8-1,5)	0,9 (0,5-1,0)* P _{IA-IIA} =0,036	1,0 (0,8-1,4)
IL-8	1,0 (0,7-1,2)	1,1 (1,0-2,2)	1,0 (0,8-1,4)	0,9 (0,4-1,0)* P _{IA-IIA} =0,012	0,9 (0,7-1,3)
IL-10	1,0 (0,6-1,1)	1,0 (0,7-1,9)	1,0 (0,7-1,2)	1,0 (0,3-1,6)	0,7 (0,4-2,6)
IL-17	1,0 (0,8-1,1)	1,0 (0,7-1,5)	0,9 (0,4-1,0)	1,0 (0,4-1,7)	0,7 (0,3-1,1)
IL-18	0,6 (0,3-1,0)	0,6 (0,2-1,6)	0,5 (0,3-1,1)	0,6 (0,1-0,9)	0,5 (0,2-0,8)
IL-1β	0,7 (0,5-1,2)	0,9 (0,3-1,3)	0,4 (0,2-2,1)	0,5 (0,2-0,9)	0,4 (0,2-0,9)
IL-1Ra	1,0 (0,4-1,3)	0,9 (0,4-1,0)	0,9 (0,6-1,1)	0,9 (0,6-1,1)	0,9 (0,7-1,0)
TNF-α	0,8 (0,5-1,0)	0,8 (0,6-1,0)	0,7 (0,4-1,0)	0,5 (0,3-0,8)* P _{IA-IIA} =0,009	0,8 (0,4-1,2)
IFN-γ	1,0 (0,5-1,3)	0,8 (0,5-1,0)	0,5 (0,4-1,0)	0,7 (0,4-1,0)	0,6 (0,5-1,2)
G-CSF	1,1 (0,5-3,4)	1,0 (0,3-1,2)	1,0 (0,9-3,0)	0,8 (0,3-1,4)	1,2 (0,3-8,6)
GM-CSF	1,0 (0,6-2,4)	1,0 (0,6-1,0)	0,8 (0,3-1,8)	0,6 (0,4-0,8)* P _{IIA-III} =0,013	1,0 (0,9-3,4)
VEGF	1,0 (0,6-1,4)	0,9 (0,4-1,1)	1,1 (0,7-2,4)	0,9 (0,6-1,1)	0,9 (0,3-1,2)
MCP-1	1,1 (0,6-2,0)	0,8 (0,6-1,1)	0,8 (0,4-1,2)	0,6 (0,3-0,9)* P _{I-IIA} =0,029 P _{IIA-III} =0,008	1,0 (0,9-1,5)

на продукцию злокачественным новообразованием IFN-γ по сравнению с НЗ и на продукцию IL-4 у пациентов с лимфогенным метастазированием молочной железы по сравнению с пациентами без него. При изучении влияния HLDF на продукцию цитокинов у пациентов разных клинико-патологических групп обнаружилось, что фактор дифференцировки

преимущественно оказывает влияние на пациентов с ИКНТ группы IIA, которую составляют больные без лимфогенного метастазирования в сочетании с тройным негативным молекулярным подтипом. У таких пациентов HLDF суппрессирует продукцию TNF-α и GM-CSF, что, в свою очередь, приводило к снижению продукции IL-6, IL-8 и MCP-1 [12].

ФИНАНСИРОВАНИЕ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования были проведены в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации. От каждого пациента получено информированное согласие на проведение исследования и получения образцов опухолей, подписанное самим пациентом и заверенное врачом. Исследование одобрено комитетом по этике Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики подразделения Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины (протокол № 2016-3).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Visscher D.W., Frost M.H., Hartmann L.C., Frank R.D., Vierkant R.A., McCullough A.E., Winham S.J., Vachon C.M., Ghosh K., Brandt K.R., Farrell A.M., Tarabishy Y., Hieken T.J., Haddad T.C., Kraft R.A., Radisky D.C., Degnim A.C. (2016) *Cancer*, **122**(3), 378-385.
2. Bombonati A., Sgroi D.C. (2011) *J. Pathology*, **223**(2), 307-317.
3. Cichon M.A., Degnim A.C., Visscher D.W., Radisky D.C. (2010) *J. Mammary Gland Biology Neoplasia*, **15**(4), 389-397.
4. Костянян И.А., Астапова М.В., Старовойтова Е.В., Драницына С.М., Липкин В.М. (1995) *Биоорг. химия*, **21**, 243-248. [Kostanyan I.A., Astapova M.V., Starovoytova Ye.V., Dranitsyna S.M., Lipkin V.M. (1995) *Bioorgan. Chemistry*, **21**, 243-248.]
5. Соснина А.В., Морозов Д.В., Вараксин Н.А., Вонаршенко А.В., Байдакова Л.К., Аутеншлыус А.И., Липкин В.М. (2014) *Доклады академии наук*, **454**(5), 603-605. [Sosnina A.V., Morozov D.V., Varaksin N.A., Vonarshenko A.V., Baydakova L.K., Autenshlyus A.I., Lipkin V.M. (2014) *Doklady Biological Sciences*, **454**(1), 72-74.]
6. Костянян И.А., Астапова М.В., Наволоцкая Е.В., Лепихова Т.Н., Драницына С.М., Телегин Г.Б., Родионов И.Л., Байдакова Л.К., Золотарев Ю.А., Молотковская И.М., Липкин В.М. (2000) *Биоорг. химия*, **26**(7), 505-511. [Kostanyan I.A., Astapova M.V., Dranitsyna S.M., Molotkovskaya I.M., Lipkin V.M., Navolotskaya E.V., Lepikhova T.N., Telegin G.B., Rodionov I.L., Baidakova L.K., Zolotarev Yu.A. (2000) *Bioorgan. Chemistry*, **26**(7), 505-511.]
7. Соснина А.В., Михайлова Е.С., Морозов Д.В., Аутеншлыус А.И., Вараксин Н.А., Шпагина Л.А., Воробьева Е.Е., Ракитина Т.В., Липкин В.М. (2015) *Медицинская иммунология*, **17**(2), 135-140. [Sosnina A.V., Mikhailova E.S., Morozov D.V., Autenshlyus A.I., Varaksin N.A., Shpagina L.A., Vorobyeva E.E., Rakitina T.V., Lipkin V.M. (2015) *Medical Immunology (Russia)*, **17**(2), 135-140.]
8. Gabriel N.H., James L.C., Carl J.D., Stephen B.E., Elizabeth A.M., Hope S.R., Lawrence J.S., Donald L.W., David J.W., Armando G. (2017) *AJCC Cancer Staging Manual*, **8**, 589-628.
9. Freeman A.E., Hoffman R.M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**(8), 2694-2698.
10. Fisher D.T., Appenheimer M.M., Evans S.S. (2014) *Semin. Immunol.*, **26**, 38-47.
11. Chonov D.C., Ignatova M.M.K., Ananiev J.R., Gulubova M.V. (2019) *Open Access Maced. J. Med. Sci.*, **7**(14), 2391-2398.
12. Liubomirski Y., Lerrer S., Meshel T., Rubinstein-Achiasaf L., Morein D., Wiemann S., Kurner C., Ben-Baruch A. (2019) *Front. Immunol.*, **10**, 757. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00757.
13. Baker K.J., Houston A., Brint E. (2019) *Front. Immunol.*, **12**(10), 1197. DOI:10.3389/fimmu.2019.01197.
14. Bhattacharya P., Thirupathi M., Elshabrawy H.A., Alharshawi K., Kumar P., Prabhakar B.S. (2015) *Cytokine*, **75**(2), 261-71.
15. Kiso M., Tanaka S., Saji S., Toi M., Sato F. (2018) *Int. J. Cancer*, **143**(11), 2905-2918.
16. Yang B., Kang H., Fung A., Zhao H., Wang T., Ma D. (2014) *Mediators Inflamm.*, **2014**, 623759. DOI: 10.1155/2014/623759.
17. Соснина А.В., Великая Н.В., Вараксин Н.А., Гришаев М.П., Аутеншлыус А.И. (2014) *Роль цитокинов в патогенезе злокачественных новообразований*. Новосибирск: Офсет, 128 с. [Sosnina A.V., Velikaya N.V., Varaksin N.A., Grishaev M.P., Autenshlyus A.I. (2014) *The role of cytokines in the pathogenesis of malignant neoplasms*. Novosibirsk: Ofset, 128 p.]
18. Gaggiani M., Turdo A., Chinnici A., Lipari E., Apuzzo T., Benfante A., Sperduti I., di Franco S., Meraviglia S., Lo Presti E., Dieli F., Caputo V., Militello G., Vieni S., Stassi G., Todaro M. (2017) *Cancer Res.*, **77**(12), 3268-3279.
19. Sun L., Xia W.Y., Zhao S.H., Liu N., Liu S.S., Xiu P., Li L.F., Cao X.L., Gao J.X. (2016) *Int. J. Oncol.*, **48**(6), 2461-2471.

Поступила в редакцию: 10. 02. 2020.
После доработки: 12. 10. 2020.
Принята к печати: 20. 10. 2020.

INFLUENCE OF THE HLDF DIFFERENTIATION FACTOR ON THE PRODUCTION OF CYTOKINES BY BIO-TISSUES OF BREAST TISSUE IN ITS NON-MALIGNANT DISEASES AND IN INVASIVE CARCINOMA OF A NON-SPECIFIC TYPE

A.I. Autenshlyus^{1,2}, A.A. Studenikina¹, Ye.S. Mikhaylova^{1,2}, A.V. Proskura²,
N.A. Varaksin³, S.V. Sidorov⁴, A.P. Bogachuk⁵, V.M. Lipkin⁵, V.V. Lyakhovich²*

¹Novosibirsk State Medical University,

52 Krasny ave., Novosibirsk, 630091 Russia; *e-mail: lpciip@211.ru

²Institute of Molecular Biology and Biophysics of Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, 2/12 Timakova str., Novosibirsk, 630117 Russia

³"Vector-Best", Nauchno-proizvodstvennaya zona, 36, Koltsovo, Novosibirsk region, 630559 Russia

⁴Novosibirsk State University, 2 Pirogova str., Novosibirsk, 630090 Russia

⁵Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, 16/10 Miklukho-Maklaya str., 117997 Russia

We studied the effect of the HLDF differentiation factor on production of cytokines by biopsy samples of nonmalignant breast diseases (ND) and invasive breast carcinoma of no special type (IBC-NST), in the absence and presence of lymphogenic metastasis: IBC-NST patients were subdivided into groups on the prognostic protocol of the 8th edition of the AJCC committee. Group IA consisted of patients with T1-T2 tumor sizes, and predominantly with positive expression of estrogen and progesterone receptors (ER+/PR+/HER2-); it also included one patient with the HER2+ (ER-/PR-/HER2+) molecular subtype. The IB group was mainly composed of patients with T2 tumor size, with the presence of lymphogenic metastasis (in 8 out of 10) patients and with positive expression of estrogen and progesterone receptors (ER+/PR+/HER2-) and it also included three patients with the HER2+ (ER-/PR-/HER2+) molecular subtype. Group IIA consisted of patients with T1-T2 tumor sizes, mainly with no metastases in the lymph nodes (in 11 out of 12 patients) and with a triple negative molecular subtype. Group IIB included patients with T2 tumor size, the presence of nodal metastasis and the expression of markers of ER-/PR-/HER2 - and ER-/PR-/HER2+. Group IIIA consisted of patients with tumor size T1-T3, with the presence of nodal metastasis and the expression of markers of ER-/PR+/HER2+ and ER-/PR-/HER2+. Group IIIC consisted of patients with T3 tumor size, lymphogenic metastasis, and expression of ER-/PR-/HER2-markers (triple negative molecular subtype). Due to a limited number of patients in the groups IIB, IIIA and IIIC, as well as due to more severe clinical and pathological stages, according to the prognostic Protocol of the 8th edition of the AJCC Committee, they were pooled into group III. Concentrations of IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1 β , IL-1Ra, TNF- α , IFN- γ , G-CSF, GM-CSF, VEGF and MCP-1 were assayed in supernatants of biopsy specimens of breast tissue. Results have shown that with IBC-NST, a statistically significantly higher level of spontaneous production (SP) by biopsy specimens of IL-17, IL-18, IFN- γ and VEGF, and a lower level of SP IL-6 as compared with ND. Patients of all clinical and pathological groups showed a high VEGF spontaneous production as compared with ND, while statistically significant differences from patients with ND were not found in IL-17 spontaneous production in group IB patients, and IL-18 spontaneous production were absent in group IA. Only in patients with IA and IB, the IL-6 spontaneous production was lower as compared to ND, and the IL-8 spontaneous production was lower in the IA group. IFN- γ spontaneous production was higher in patients with IBC-NST group IIA as compared with ND. Under the influence of the HLDF differentiation factor, it was found that the parameters of IBC-NST patients were statistically significantly higher in the production of IL-1Ra, IL-17, IL-18 and VEGF, and statistically significantly lower in the production of IL-6 as compared to ND. HLDF had a higher impact on the content of IL-18 in IBC-NST patients than in ND. After HDLF sublimation IL-6 values were lower in patients of groups IA and IB, and HLDF-induced IL-17 production was higher only in patients of group IA. Statistically significant differences in the index of influence of HLDF (IVHLDF), representing ratio of the cytokine concentration in the supernatants of a biopsy specimen stimulated by HLDF to spontaneous cytokine production, were found between ND and IBC-NST in the case of on IFN- γ production, and also in the case of IL-4 production (between patients in the absence and presence of lymphogenic metastasis). IVHLDF for production of IL-6, IL-8 and TNF- α was lower in group IIA patients compared to group IA, and IVHLDF for production of GM-CSF and MCP-1 was lower in group IIA as compared to group III, in addition IVHLDF for MCP-1 products was lower in group IIA as compared to ND. The HLDF effect on the cytokine production by the tumor and its microenvironment was different in ND patients and IBC-NST patients. HDLF suppressed IFN- γ production in the pooled group of IBC-NST patients; HLDF mainly had a suppressive effect on the production of IL-6, IL-8, TNF- α , GM-CSF and MCP-1 in IBC-NST patients of group IIA.

Key words: cytokines; HLDF; metastases; breast diseases

Funding. Research funding at the expense of the state task of the Ministry of Health of the Russian Federation No. AAAA-A18-118030790008-7.

Received: 10.02.2020, revised: 12.10.2020, accepted: 20.10.2020.