

На правах рукописи

Студеникина Анастасия Александровна

**ВЛИЯНИЕ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АКТИВАТОРОВ И HUMAN
LEUKEMIA DIFFERENTIATION FACTOR НА ПРОДУКЦИЮ
ЦИТОКИНОВ ОБРАЗЦАМИ ТКАНИ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

03.01.04 - Биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск - 2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» и в федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Аутеншлюс Александр Исаевич

Официальные оппоненты:

Савченко Андрей Анатольевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярно-клеточной физиологии и патологии института медицинских проблем Севера, федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук»

Сорокина Ирина Васильевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории фармакологических исследований, федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Защита диссертации состоится «__» _____ 2021 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 001.048.04 на базе федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» по адресу: 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» и на сайте <https://frcftm.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета, к.б.н.

Русских Галина Сергеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень её разработанности.

Рак молочной железы является ведущей злокачественной патологией у женского населения в Российской Федерации и во всём мире. По данным за 2018 год число впервые выявленных случаев в РФ составило 70682 или 20,9% от всех злокачественных новообразований у женщин. В структуре заболеваемости лиц молодого возраста - до 29 лет на рак молочной железы приходится 7,0%, в возрастной группе женщин от 30 до 59 – 27,2%, в возрастной группе женщин пожилого возраста от 60 и более – 18,1% [Каприн А.Д. и др., 2019].

Доброкачественные заболевания молочных желез широко распространены среди женского населения. Известно, что максимальная заболеваемость ими регистрируется в возрасте от 40 до 44 лет и снижается к 65 годам [Ott B. et al., 2016; Verdial F.C. et al., 2017; Stachs A. et al., 2019]. Фиброаденомы обычно не рассматриваются как фактор риска развития карциномы [Shaik A.N. et al., 2018]. Однако примерно в половине случаев фиброаденомы сопровождаются пролиферативными изменениями (склерозирующим аденозом, кальцификатами и кистами) наличие которых увеличивает риск развития рака молочной железы в 1,58 раза по сравнению с женщинами с не пролиферативными заболеваниями [Aydin O.U. et al., 2015; Saadallah F. et al., 2019]. Также известно, что наличие в анамнезе пролиферативного заболевания с атипией увеличивает риск развития рака молочной железы до 3,5 [Salamat F. et al., 2018].

Летальность, связанная с раком молочной железы, обусловлена возникновением метастазов. Одним из центральных процессов, наделяющих опухолевые клетки способностью к миграции является эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), индукторами которого является ряд медиаторов воспаления, включая цитокины [Lambert A.W. et al., 2017].

Раковые клетки взаимодействуют с организмом главным образом посредством низкомолекулярных белков, играющих роль в межклеточной коммуникации, в том числе цитокинов и используют их для формирования микроокружения опухоли, её роста, прогрессии и метастазирования [Sarode P. et al., 2020]. Многие цитокины являются плейотропными и оказывают как про-опухолевые, так и противоопухолевые эффекты, усиливая или подавляя локальный иммунный ответ. Вариативность действия цитокинов обусловлена их концентрацией, экспрессией их рецепторов, состоянием и активностью окружающих клеток, а также стадией развития опухоли [Landskron G. et al., 2014]. Цитокины участвуют в злокачественной прогрессии, стимулируя пролиферацию клеток и уменьшая апоптоз, индуцируя эпителио-мезенхимальный переход и ангиогенез [Gatti-Mays M.E. et al., 2019]. Снижение противоопухолевого ответа связано с освобождением иммуносупрессивных цитокинов IL-4, IL-10, IL-13, IL-33 и TGF- β [Thorsson V. et al., 2018], способствующих рекрутированию клеток иммуносупрессоров: регуляторных Т-лимфоцитов и миелоидных супрессорных клеток, кроме того эти цитокины

снижают активность CD8+ Т-клеток, NK-клеток и дендритных клеток [Stanton S.E. et al., 2016].

Большинство исследований, посвящённых изучению продукции цитокинов и маркёров ЭМП потенциально связанных с риском развития рака молочной железы либо его метастазированием, проводятся на клеточных линиях рака молочной железы [Ortiz-Montero P. et al., 2017] или на образцах крови пациентов [Ma Y. et al., 2017], однако нет исчерпывающей информации и исследований цитокин-продуцирующего ресурса и его сопряжённости с маркёрами ЭМП образцов ткани молочной железы у пациентов с инвазивной карциномой неспецифического типа (ИКНТ) и с незлокачественными заболеваниями молочной железы (НЗМЖ) не получавших дооперационного лечения.

В последние годы получила развитие дифференцировочная терапия злокачественных новообразований [Ullah M. et al., 2020; Mukherjee S. et al., 2020]. В частности, в институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН под руководством члена-корреспондента РАН Липкина В.М. был выделен из культуральной среды клеток острого промиелоцитарного лейкоза человека HL-60 фактор дифференцировки – Human Leukemia Differentiation Factor (HLDF), способный индуцировать дифференцировку исходной клеточной линии по гранулоцитарному пути. Синтетический вариант этого фактора прошёл доклинические испытания, в котором были подтверждены его безвредность и его дифференцирующее влияние на клетки некоторых опухолей. Не исключено, что данный фактор, используя цитокиновую сеть, может оказывать воздействие на клетки рака молочной железы. Поэтому представляет интерес изучение его влияния на цитокиновый ресурс опухоли у пациентов с ИКНТ.

Таким образом, определение спектра цитокинов в супернатантах образцов ткани молочной железы и экспрессии маркёров эпителиально-мезенхимального перехода может помочь в оценке риска злокачественной трансформации и метастазирования при заболеваниях молочной железы, а результаты изучения влияния фактора дифференцировки на продукцию цитокинов опухолью могут явиться подтверждением **возможности** использования HLDF в качестве кандидата в дифференцировочную терапию рака молочной железы.

Цель исследования. Изучить влияние поликлональных активаторов на продукцию цитокинов в образцах молочной железы и экспрессию маркёров эпителиально-мезенхимального перехода при инвазивной карциноме неспецифического типа и при незлокачественных заболеваниях молочной железы, а также фактора дифференцировки Human leukemia differentiation factor на продукцию цитокинов инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа.

Задачи исследования:

1. Определить концентрации IL-10, TNF- α , GM-CSF в супернатанте клеток U937 под влиянием поликлональных активаторов и параллельно

экспрессию мРНК этих цитокинов в клеточной культуре U937.

2. Определить концентрации цитокинов IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A, IL-18, IL-1 β , IL-1Ra, TNF- α , IFN- γ , G-CSF, GM-CSF, VEGF и MCP-1 в супернатанте образцов ткани молочной железы при влиянии на них поликлональных активаторов у пациентов с заболеваниями молочной железы.

3. Определить экспрессию маркёров эпителиально-мезенхимального перехода – кадгерина-E, β -1-интегрина и коллагена II типа в образцах ткани при заболеваниях молочной железы.

4. Изучить взаимосвязь между показателями продукции цитокинов и экспрессией маркёров эпителиально-мезенхимального перехода в образцах ткани при заболеваниях молочной железы.

5. Определить концентрации цитокинов IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A, IL-18, IL-1 β , IL-1Ra, TNF- α , IFN- γ , G-CSF, GM-CSF, VEGF и MCP-1 в супернатанте образцов ткани молочной железы при влиянии на них фактора дифференцировки HLDF у пациентов с инвазивной карциномой неспецифического типа распределённым по патологическим прогностическим критериям 8 издания American Joint Committee on Cancer (AJCC).

Научная новизна исследования. Впервые установлено, что при НЗМЖ индекс влияния поликлональных активаторов (ИВПА) на продукцию клетками молочной железы TNF- α выше по сравнению с пациентами с ИКНТ. Впервые показано, что у больных с ИКНТ без лимфогенного метастазирования ИВПА на продукцию IL-17A выше по сравнению с пациентами с лимфогенным метастазированием. Впервые установлено, что при НЗМЖ без пролиферации ИВПА на продукцию клетками молочной железы IL-1 β выше по сравнению с аналогичным показателем образцов ткани пациентов с пролиферацией.

Впервые показано, что у пациентов при отсутствии лимфогенного метастазирования, были выявлены прямые: между ИВПА на продукцию IL-6, IL-8, IL-18 и G-CSF и экспрессией коллагена II типа (CII) и обратные корреляционные связи: между экспрессией кадгерина-E (CDH1) и ИВПА на продукцию TNF- α . При лимфогенном метастазировании отмечены прямые корреляционные связи между экспрессией β -1-интегрина (CD29) и ИВПА на продукцию IL-6, IL-1Ra, G-CSF и VEGF и между ИВПА на продукцию IL-1 β и экспрессией CII.

Впервые установлено, что при НЗМЖ без пролиферации отмечается прямая корреляционная связь между экспрессией CDH1 и ИВПА на продукцию IL-18 и G-CSF, в то время как при НЗМЖ с пролиферативными изменениями определяются прямые корреляционные связи между экспрессией CD29 и ИВПА на продукцию IL-1 β .

Впервые установлено, что у больных с ИКНТ фактор дифференцировки HLDF супрессирует продукцию цитокинов в опухолях пациентов, характеризующихся сочетанием отрицательной экспрессии рецепторов эстрогена (ER), прогестерона (PR) и эпидермального фактора роста человека (HER2) с отсутствием лимфогенного метастазирования, у таких пациентов

индекс влияния HLDF (IBHLDF) на продукцию IL-6, IL-8 и TNF- α ниже по сравнению с пациентами с положительной экспрессией рецепторов ER, PR и с редко встречающимся лимфогенным метастазированием, а IBHLDF на продукцию GM-CSF и MCP-1 ниже по сравнению с пациентами с лимфогенным метастазированием и отрицательной экспрессией рецепторов ER, PR и HER2.

Теоретическое и практическое значение. Результаты исследования, характеризующие цитокин-продуцирующий ресурс новообразований молочной железы и маркёры ЭМП у пациентов с ИКНТ и с НЗМЖ направлены на понимание роли цитокиновой сети в вероятности малигнизации новообразований при заболеваниях молочной железы. В частности, определение продукции IL-1 β у пациентов с НЗМЖ может служить маркёром пролиферации, а показатели продукции IL-17A и экспрессии CD29 сопряжённые с наличием лимфогенного метастазирования у пациентов с ИКНТ могут создать основу для разработки новых подходов в индивидуализации диагностики и лечения пациентов. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования фактора дифференцировки HLDF в лечении пациентов с отрицательной экспрессией ER, PR и HER2.

Личный вклад соискателя. Автором обоснована актуальность и необходимость проведения исследования, сформулированы его цель и задачи. Диссертантом выполнен отбор групп наблюдения и оценка клинико-лабораторных данных. Автором проведена статистическая обработка полученных в ходе работы данных, проанализированы результаты исследования и сформулированы выводы. Подготовлены данные для публикаций и выступлений на конференциях, оформлена диссертационная работа и автореферат.

Методология и методы исследования. В работе с пациентами соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинской декларацией Всемирной медицинской ассоциации. От каждого пациента получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено комитетом по этике Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики подразделения Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины (протокол № 2016-3). Методологической основой диссертационного исследования послужили работы зарубежных и отечественных учёных, посвященных проблеме поиска сигнальных молекул и маркёров для оценки риска злокачественной трансформации и метастазирования. Объект исследования - образцы постоперационного материала больных с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа и незлокачественными заболеваниями молочной железы. Предмет исследования – продукция цитокинов образцами молочной железы в присутствии поликлональных активаторов и HLDF при заболеваниях молочной железы. Методы исследования включали: полимеразную цепную реакцию с детекцией в реальном времени, твердофазный иммуноферментный анализ,

иммуногистохимическое исследование, статистический анализ.

Положения, выносимые на защиту:

1. Иммуноферментный анализ более информативен при определении концентрации цитокинов в супернатанте клеток, по сравнению с определением экспрессии их матричной РНК.
2. Пациенты с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа характеризуются сниженным индексом влияния поликлональных активаторов на продукцию TNF- α .
3. Пациенты с лимфогенным метастазированием характеризуются сниженным индексом влияния поликлональных активаторов на продукцию IL-17A по сравнению с пациентами без лимфогенного метастазирования и прямыми корреляционными связями между индексом влияния поликлональных активаторов на продукцию IL-6, IL-1Ra, G-CSF и VEGF и экспрессией CD29.
4. Пациенты с незлокачественными пролиферативными заболеваниями молочной железы характеризуются сниженным индексом влияния поликлональных активаторов на продукцию IL-1 β по сравнению с пациентами без пролиферации и прямыми корреляционными связями между индексом влияния поликлональных активаторов на продукцию этого цитокина и экспрессией CD29.
5. Сравнение индексов влияния HLDF в различных патологических прогностических группах свидетельствует о супрессирующем влиянии HLDF на продукцию цитокинов у пациентов с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа при сочетании отрицательной экспрессии ER, PR, HER2 с отсутствием лимфогенного метастазирования.

Степень достоверности и апробация результатов исследования.

Степень достоверности результатов исследований обеспечена адекватной выборкой пациентов, использованием стандартных наборов реагентов, статистической значимостью полученных результатов. Всего по теме диссертации опубликовано 5 работ в научных рецензируемых журналах, входящих в базу данных Scopus. Результаты работы представлены и обсуждены на: V Всероссийской конференции по молекулярной онкологии с международным участием (Москва, 2019), XIV Международной / XXIII Всероссийской Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых учёных (Москва, 2019) - получен диплом первой степени. На VII Молодежной Школе-Конференции по Молекулярной и Клеточной биологии Института Цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2020).

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 109 страницах машинописного текста содержит 15 таблиц, иллюстрирована 12 рисунками и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов и списка цитированной литературы (включает 5 отечественных и 231 зарубежный источник).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Материалом исследования служили образцы молочной железы объёмом 8 мм³ полученные методом трепанобиопсии из одного участка опухоли, чем обеспечивался их одинаковый клеточный состав, что исключает необходимость определения опухолевых клеток в каждом из образцов 146 пациентов, которым была проведена мастэктомия молочной железы на базе онкологического отделения ГКБ №1 г. Новосибирска. Неоадьювантная терапия пациентам не проводилась, у них не было обострения очагов хронической инфекции. Из них 111 пациентов с ИКНТ, средний возраст которых составил 56 лет (23-75 лет) и 35 больных с НЗМЖ, средний возраст которых составил 46 лет (18-67 лет). Метастазы в регионарные лимфатические узлы выявлены у 38 пациентов с ИКНТ (ЛМ+), средний возраст которых составил 54 года (23-71 года), у остальных 73 пациентов с ИКНТ (ЛМ-) в среднем возрасте 58 лет (35-75 лет) метастазы отсутствовали. Пациенты с НЗМЖ были разделены на две группы по риску малигнизации доброкачественного процесса [Visscher D.W. et al., 2016]. Первую составили 22 пациента без пролиферации (НП) - фиброаденомы или с фиброзно-кистозными изменениями, средний возраст которых составил 40 лет (18-60 лет). Вторую 13 пациентов с пролиферативными изменениями (ПР), с более высоким риском злокачественной трансформации, включающие пролиферативная форма фиброзно-кистозной болезни, фиброзно-кистозные изменения с участками склерозирующего аденоза средний возраст которых составил 54 года (38-67 лет). Для определения влияния фактора дифференцировки HLLDF пациенты с ИКНТ были распределены на группы на основе прогностического протокола 8-ого издания комитета AJCC [Gabriel N.H. et al., 2017]. Клиническая характеристика пациентов, распределённых на основе патологической прогностической классификации AJCC представлена в Таблице 1. Все пациенты имели размер опухоли T1-T2 и G2 – умеренную дифференцировку опухоли. Из-за малого количества пациентов, а также наличия лимфогенного метастазирования и большего размера опухоли, пациенты IВ стадии (5 пациентов), IIIА стадии (6 пациентов) были объединены в одну группу – III, в которую вошли 11 пациентов.

Таблица 1 - Клиническая характеристика пациентов

| 8-ed AJCC | | IA n=61 | IB n=22 | IIA n=17 | III n=11 |
|---------------|----|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Возраст, годы | | 57 (35-75) | 55 (23-75) | 57 (38-75) | 52 (39-69) |
| T | T1 | 38 (62%) | 4 (18%) | 3 (18%) | 1 (9%) |
| | T2 | 23 (38%) | 18 (82%) | 14 (82%) | 10 (91%) |
| N | N0 | 51 (84%) | 6 (27%) | 16 (94%) | - |
| | N1 | 10 (16%) | 12 (55%) | 1 (6%) | 5 (45%) |
| | N2 | - | 4 (18%) | - | 2 (18%) |
| | N3 | - | - | - | 4 (37%) |
| ER | + | 59 (97%) | 21 (95%) | 1 (6%) | 3 (27%) |
| | - | 2 (3%) | 1 (5%) | 16 (94%) | 8 (73%) |
| PR | + | 56 (92%) | 16 (73%) | - | 4 (37%) |
| | - | 5 (8%) | 6 (27%) | 17 (100%) | 7 (64%) |
| HER2 | + | 19 (31%) | 11 (50%) | 4 (23%) | 5 (45%) |
| | - | 42 (69%) | 11 (50%) | 11 (77%) | 6 (55%) |

Примечание: данные представлены в виде абсолютного числа больных (%), возраст в виде среднего значения (минимальное-максимальное), диаметр опухоли (T), лимфогенное метастазирование (N), экспрессия рецепторов: эстрогена (ER), прогестерона (PR), эпидермального фактора роста человека второго типа (HER2).

В качестве экспериментальной модели для сравнения показателей экспрессии мРНК и концентрации цитокинов, продуцируемых клетками, подвергнутых воздействию поликлональных активаторов, совместно со старшим научным сотрудником к.б.н. Ивановым И.Д., была выбрана культура клеток промиелоцитарного миелоидного лейкоза человека U937 [Liu L. et al., 2014], которую в среде RPMI, содержащей 10% фетальной сыворотки при температуре 37°C, в атмосфере 5% CO₂ до концентрации 1,5 x 10⁶ клеток на мл среды. Клетки осаждали при 800 g в течение 5 мин и ресуспендировали в свежей порции среды, содержащей форбол-12-миристат-13 ацетат (ФМА) в концентрации 60 нг/мл. Через 72 ч удаляли культуральную жидкость и вместе с ней не осевшие клетки и инкубировали полученные макрофаги в свежей порции среды без ФМА в течение 48 ч [Song M.G. et al., 2015].

Для индукции цитокинов в этих предварительно дифференцированных клетках (макрофагах) использовали комплекс поликлональных активаторов (ПА), состоящий из фитогемагглютинаина Р в концентрации 2 мкг/мл, фитогемагглютинаина М в концентрации 2 мкг/мл, конканавалина А в концентрации 4 мкг/мл и липополисахарида из *Escherichia coli* в концентрации 2 мкг/мл (стандартный набор, производства «Вектор-Бест», Россия). После 24 часов воздействия при 37°C из культуральной жидкости удаляли клеточный дебрис центрифугированием при 2000 g в течение 4 мин, затем в супернатанте определяли концентрации IL-10, TNF-α, GM-CSF с помощью иммуноферментного анализа (АО «Вектор-Бест», Россия) согласно протоколу

производителя.

Из предварительно дифференцированных клеток (макрофагов) выделяли РНК с использованием «TRI-REAGENT» (MRC, USA), согласно протоколу производителя. Затем проводили обратную транскрипцию с использованием набора «High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit» (Applied Biosystems), согласно протоколу производителя. Для определения уровня экспрессии выбранных генов проводили ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ). В качестве референсного гена использовали «ген домашнего хозяйства» *GAPDH*. Последовательности праймеров приведены в Таблице 2. ПЦР-РВ проводили с использованием «БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue» (ООО Биолабмикс, Новосибирск). Относительный уровень экспрессии генов оценивали с использованием значений пороговых циклов *Ct* по методу ΔCt (разница между пороговыми значениями циклов генов цитокинов и референсного гена). На каждую точку брали по три повтора.

Таблица 2 - Последовательности олигонуклеотидных праймеров

| Ген | Последовательности |
|--------------------------------|---|
| <i>GAPDH</i> | F: 5'- GGAGTCAACGGATTGGTC-3' R: 5'- TGGGTGGAATCATATTGGAACAT-3' |
| <i>TNF-α</i> | F: 5'- GCTGAT CCGATTCCCTGAAAC-3' R: 5'- CTCAGCTTGAGGGTTTGC-3' |
| <i>GM-CSF</i> | F: 5'-GCTGCTGAGATGAATGAAACAG-3' R: 5'-CGGAAACTTCCTGTGCAAC-3' |
| <i>IL-10</i> | F: 5'-CAAGGCGCATGTGAACTC-3' R: 5'-GCTTTGTAGATGCCTTTCTCTTG-3' |

Примечание: F - прямой праймер, R - обратный праймер.

В нашем исследовании для определения спонтанной продукции цитокинов (СП) образцы опухолей помещали во флакон, содержащий 1 мл питательной среды DMEM-F12 содержащей 2,5 ед/мл гепарина, 100 мкг/мл гентамицина, 0,6 мг/мл L-глутамина. Для определения индуцированной продукции (ИП ПА) образцы опухолей помещали во флакон, содержащий 1 мл питательной среды DMEM-F12 и комплекс поликлональных активаторов ПА. Для определения продукции цитокинов под влиянием HLDF образцы новообразований помещали во флакон, содержащий 1 мл питательной среды DMEM-F12 с добавлением HLDF в концентрации – 20 мкг/мл (предоставленного Институтом биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН). Все вышеуказанные образцы инкубировали при 37°C в течение 72 ч, после чего клетки осаждали центрифугированием при 900 g, при 25°C в течение 15 мин. В супернатантах, после осаждения клеток, используя твердофазный иммуноферментный анализ с помощью наборов реагентов АО «Вектор-Бест» (Россия), согласно

инструкции производителя, определяли концентрацию следующих цитокинов: IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A, IL-18, IL-1 β , IL-1Ra, TNF- α , IFN- γ , G-CSF, GM-CSF, VEGF, MCP-1.

Влияние поликлональных активаторов на продукцию цитокинов в образцах ткани молочной железы оценивали по индексу влияния поликлональных активаторов, выраженному в условных единицах (у.е.), который высчитывали по формуле: ИВПА = А/Б, где А – концентрация цитокина при ИП ПА, а Б – концентрация цитокина при СП. Влияние HLDF на продукцию цитокинов в образцах ткани молочной железы оценивали по индексу влияния Human Leukemia Differentiation Factor (ИВHLDF), выраженному в условных единицах (у.е.), который рассчитывали по формуле: ИВHLDF = А/Б, где А – концентрация цитокина при воздействии HLDF, а Б – концентрация цитокина без воздействия HLDF (СП). Учитывали только те цитокины, уровни которых превышали нижний предел чувствительности используемых наборов. Использование ИВПА и ИВHLDF позволяет получать объективные данные, за счёт нивелирования различий между содержанием клеток в образце опухоли.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии СП, CD29 и CDH1 проводили на парафиновых срезах опухолей с использованием антител соответствующей специфичности наборами Vectastain Universal Elite ABC Kit («Vector Laboratories», США) согласно инструкции производителя. Подсчитывали относительное количество клеток экспрессирующих, либо не экспрессирующих тот или иной маркёр. При последующей оценке результатов, использовали отношение количества клеток, экспрессирующих маркёр, к количеству клеток не экспрессирующих его.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием программы SPSS v 17.0 for Windows. Перед началом анализа определялся характер распределения данных с использованием уравнения Колмогорова-Смирнова с определением поправки Шапиро-Уилка. Поскольку большинство исследованных параметров не отвечало нормальному распределению, проводили анализ с использованием непараметрического критерия Уилкоксона-Манна-Уитни для двух независимых выборок. Для сравнения одной группы с несколькими применяли поправку на множественные сравнения – Н-критерий Краскела-Уоллиса. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для описания результатов исследования использовали медиану (Me), верхний и нижний квартили (Q1, Q3). С целью обнаружения взаимосвязи между исследуемыми показателями проводили корреляционный анализ путём вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r), значимым признавали результат $r > 0,400$ при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Сравнение показателей экспрессии мРНК цитокинов с концентрацией цитокинов в кондиционной среде клеток, после воздействия на них поликлональных активаторов

Наибольшее влияние поликлональные активаторы оказали на уровень мРНК GM-CSF-фактора роста, продуцируемого дифференцированными в макрофаги клетками U937 (Таблица 3). Что касается уровней мРНК IL-10 и TNF- α , то их изменения под влиянием ПА были менее выражены. Уровень мРНК TNF- α при воздействии ПА снижался, в то время как концентрация данного цитокина в супернатанте возрастала (Таблица 4).

Таблица 3 - Уровень мРНК цитокинов в клетках U937, определённый при помощи ПЦР-РВ

| Ген | СП | | ИП ПА | |
|--------------------------------|-------|-------------|-------|-------------|
| | Ct | Δ Ct | Ct | Δ Ct |
| <i>IL-10</i> | 27,26 | 10,76 | 29,19 | 10,34 |
| <i>GAPDH</i> | 16,50 | | 18,85 | |
| <i>TNF-α</i> | 25,44 | 9,2 | 28,65 | 10,33 |
| <i>GAPDH</i> | 16,24 | | 18,32 | |
| <i>GM-CSF</i> | 31,10 | 14,9 | 27,79 | 9,49 |
| <i>GAPDH</i> | 16,20 | | 18,30 | |

Примечание: Δ Ct - разность между циклами выхода исследуемого цитокина и *GAPDH*. Ct (СП) - пороговый цикл при спонтанной продукции цитокина, Ct (ПА) - пороговый цикл при воздействии поликлональных активаторов.

Таблица 4 - Концентрация цитокинов в супернатанте культуры клеток U937

| Цитокины | СП (пг/мл) | ИП ПА (пг/мл) | ИВПА (у.е.) |
|---------------|------------|---------------|-------------|
| IL-10 | 40,4 | 250,6 | 6,2 |
| TNF- α | 96,6 | 308,3 | 3,2 |
| GM-CSF | 9,5 | 452,5 | 47,6 |

Примечание: СП - спонтанная продукция цитокинов, ИП ПА - продукция цитокинов при воздействии поликлональных активаторов, ИВПА - индекс влияния поликлональных активаторов.

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы о том, что концентрация TNF- α в клеточной среде не отражает временные изменения в экспрессии его мРНК, так как, вероятно, происходит уменьшение количества мРНК, из-за ингибирования по механизму обратной связи [Muntau P.J. et al., 2014]. Согласно результатам исследования, ПА, являясь митогенами, оказывают существенное влияние на концентрацию секретируемых IL-10,

TNF α и GM-CSF, помимо этого ПА оказывают влияние на уровни мРНК генов этих цитокинов, что указывает на транскрипционный механизм его действия. Таким образом, определение продукции цитокинов с помощью иммуоферментного анализа является более целесообразным в связи с тем, что цитокины могут накапливаться и сохраняться в супернатанте, а мРНК многих из них нестабильна и подвергается быстрой деградации [Wang X. et al., 2018].

Влияние поликлональных активаторов на продукцию цитокинов образцами ткани молочной железы у пациентов с заболеваниями молочной железы

По результатам проведенного исследования пациенты с ИКНТ и с НЗМЖ между собой отличались только по ИВПА продукцию TNF- α (Рисунок 1), при этом индекс был более высоким у пациентов с НЗМЖ. В литературе имеются противоречивые мнения о роли этого цитокина в микроокружении новообразований. С одной стороны, TNF- α способствует инфильтрации опухолевого очага регуляторными Т-лимфоцитами и миелоидными супрессорными клетками [Mahmud S.A. et al., 2014], активирует апоптоз CD8+ Т-лимфоцитов и предотвращает инфильтрацию ими опухолевого очага [Lim S.O. et al., 2016]. С другой стороны, TNF- α активирует пролиферацию Т-лимфоцитов, В-клеток, НК-клеток и дендритных клеток и усиливает продукцию IFN- γ , что в свою очередь способствует элиминации атипичных клеток и предотвращает развитие опухолей [Mercogliano M.F. et al., 2020; Pahl J. et al., 2017].

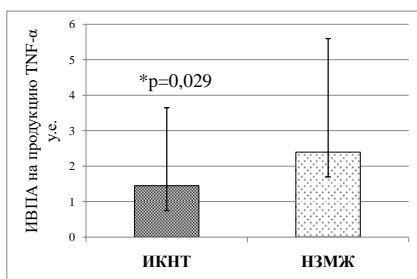


Рисунок 1 - Индекс влияния поликлональных активаторов (у.е.) на продукцию TNF- α у пациентов с заболеваниями молочной железы

Примечание: Количество пациентов с злокачественными заболеваниями молочной железы (НЗМЖ) составило - 35, а с инвазивной карциномой неспецифического типа (ИКНТ) - 111, данные представлены в виде медианы (Me) и квартилей (Q1, Q3), статистически значимые различия при $p < 0,05$, определённые с помощью критерия Уилкоксона-Манна-Уитни.

Полученные статистически значимые различия по ИВПА на продукцию TNF- α между пациентами с НЗМЖ без пролиферации и с ИКНТ при наличии лимфогенного метастазирования (Рисунок 4), вероятно могут свидетельствовать о том, что у пациентов с НЗМЖ без пролиферации TNF- α препятствует развитию опухоли, а у пациентов с ИКНТ при наличии лимфогенного метастазирования этот цитокин оказывает противоположный эффект, способствуя опухолевой прогрессии.

Пациенты с ИКНТ были разделены на две группы: с метастазами в лимфоузлы и без них, поскольку известно, что при наличии лимфогенного метастазирования, опухоли характеризуются слабым ответом на терапию и меньшей безрецидивной выживаемостью [Lambert A.W. et al., 2017]. Пациенты без лимфогенного метастазирования характеризуются более высоким ИВПА на продукцию IL-17A по сравнению с пациентами с метастазами в лимфоузлы (Рисунок 2). Известно, что этот цитокин принимает участие в ангиогенезе опухоли, стимулируя экспрессию VEGF [Yang B. et al., 2014], индуцирует экспрессию G-CSF опухолевыми клетками через сигнальные пути NF- κ B и ERK [Kuen D.S. et al., 2020], что приводит к мобилизации незрелых миелоидных клеток, их рекрутированию в микроокружение опухоли, и дальнейшей пролиферации в N2 нейтрофилы, которые подавляют противоопухолевые CD8⁺ Т-клетки, что в итоге приводит к метастазированию [Wu L. et al., 2019].

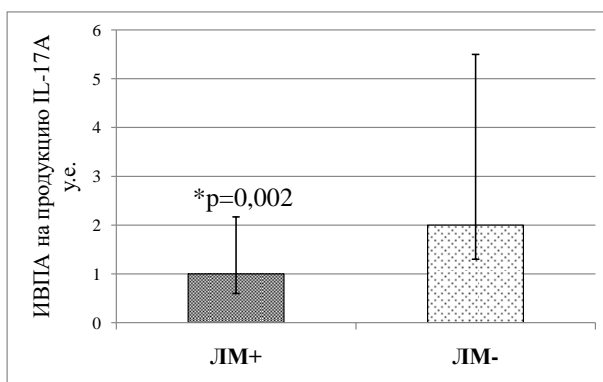


Рисунок 2 - Индекс влияния поликлональных активаторов (у.е.) на продукцию IL-17A у пациентов с инвазивной карциномой неспецифического типа при наличии (ЛМ+) и отсутствии (ЛМ-) лимфогенного метастазирования

Примечание: Количество пациентов с инвазивной карциномой неспецифического типа при наличии (ЛМ+) лимфогенного метастазирования составило - 38, а при отсутствии метастазов (ЛМ-) - 73, данные представлены в виде медианы (Me) и квартилей (Q1, Q3), статистически значимые различия при $p < 0,05$, определённые с помощью критерия Уилкоксона-Манна-Уитни.

Спор о том, являются ли незлокачественные заболевания молочной железы предикторами рака, ведётся до сих пор, но известно, что у женщин с пролиферативными заболеваниями риск развития рака молочной железы увеличивается в 1,58 раза, по сравнению с женщинами с непролиферативными заболеваниями [Salamat F. et al., 2018].

При разделении пациентов с НЗМЖ на основе пролиферативных изменений в молочной железе, обнаружилось что, у пациентов без пролиферации ИВПА на продукцию IL-1 β выше по сравнению с пациентами с НЗМЖ с пролиферацией (Рисунок 3), что свидетельствует об истощённом цитокин-продуцирующем ресурсе данного цитокина у пациентов с пролиферативными изменениями.

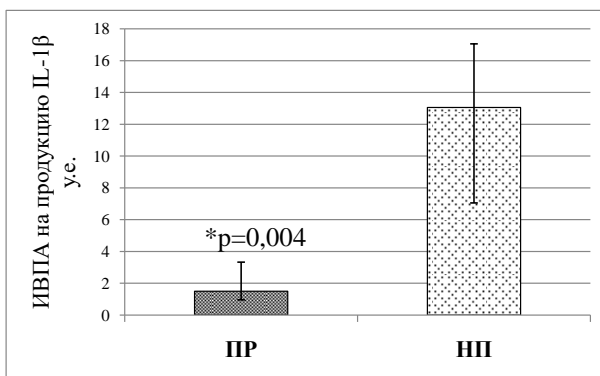


Рисунок 3 - Индекс влияния поликлональных активаторов (у.е.) на продукцию IL-1 β у пациентов с незлокачественными заболеваниями молочной железы при наличии (ПР) и отсутствии (НП) пролиферации

Примечание: Количество пациентов с незлокачественными заболеваниями молочной железы при наличии (ПР) пролиферации составило - 13, а при отсутствии (НП) пролиферативных изменений - 22, данные представлены в виде медианы (Me) и квартилей (Q1, Q3), статистически значимые различия при $p < 0,05$, определённые с помощью критерия Уилкоксона-Манна-Уитни.

Вероятно, низкий цитокин-продуцирующий ресурс IL-1 β в тканях пациентов с ПР связан с тем, что IL-1 β участвует в адаптивных реакциях, активируя антигенпрезентирующие клетки и направляя поляризацию CD4⁺ T-клеток в Th-1 и Th17 клетки [Mailer R.K. et al., 2015], способствуя дифференцировке моноцитов в дендритные клетки, а макрофагов в фенотип M1 [Schenk M. et al., 2014], кроме того IL-1 β привлекает IFN- γ -продуцирующие цитотоксические T-лимфоциты, ингибирует дифференцировку регуляторных T-клеток [Bent R. et al., 2018]. Поэтому при возникновении атипичных клеток на фоне ПР IL-1 β не может реализовывать свою противоопухолевую функцию, так как происходит его снижение.

При сравнении подгрупп пациентов с ИКНТ и с НЗМЖ между собой выявились особенности, заключающиеся в том, что пациенты с ИКНТ без лимфогенного метастазирования статистически значимо не отличались от пациентов с НЗМЖ без пролиферации, в тоже время у пациентов с ИКНТ с лимфогенным метастазированием ИВПА на продукцию IL-17A, IL-18, IL-1β и TNF-α ниже по сравнению с пациентами НЗМЖ без пролиферации (Рисунок 4).

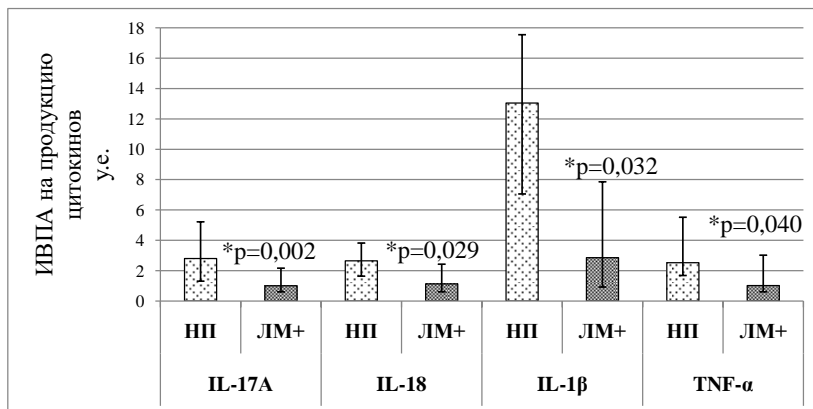


Рисунок 4 - Индекс влияния поликлональных активаторов (у.е.) на продукцию цитокинов у пациентов с ИКНТ при наличии (ЛМ+) лимфогенного метастазирования и у пациентов с НЗМЖ при отсутствии пролиферации (НП)

Примечание: Количество пациентов с незлокачественными заболеваниями молочной железы при отсутствии (НП) пролиферации составило - 22, а с инвазивной карциномой неспецифического типа при наличии (ЛМ+) лимфогенного метастазирования - 38, данные представлены в виде медианы (Me) и квартилей (Q1, Q3), статистически значимые различия при $p < 0,05$, определённые с помощью критерия Уилкоксона-Манна-Уитни.

Низкие значения ИВПА у пациентов с лимфогенным метастазированием обусловлены как более высокой спонтанной продукцией цитокинов, так и низким ответом на митогенную стимуляцию, скорее всего за счёт того, что в опухоли идёт повышенный расход этих цитокинов при формировании микроокружения способствующего дальнейшему росту и метастазированию неоплазмы.

У пациентов с НЗМЖ с пролиферативными изменениями, как и у пациентов с НЗМЖ без пролиферации, ИВПА на продукцию IL-17A выше по сравнению с пациентами с ИКНТ с лимфогенным метастазированием, но ИВПА на продукцию IL-1β ниже по сравнению с пациентами с ИКНТ без лимфогенного метастазирования (Рисунок 5). Более высокие значения ИВПА

на продукцию IL-17A у пациентов с НЗМЖ могут быть связаны с тем, что данный цитокин, обладая плеiotропностью действия может усиливать миграцию дендритных и цитотоксических CD8⁺ Т-клеток препятствуя развитию опухоли [Kuen D.S. et al., 2020]. Низкие значения ИВПА на продукцию IL-1 β у пациентов с НЗМЖ с пролиферативными изменениями, обусловлены истощением цитокин-продуцирующего ресурса, что вероятно связано с формированием иммуносупрессивного микроокружения и развитием хронического воспаления.

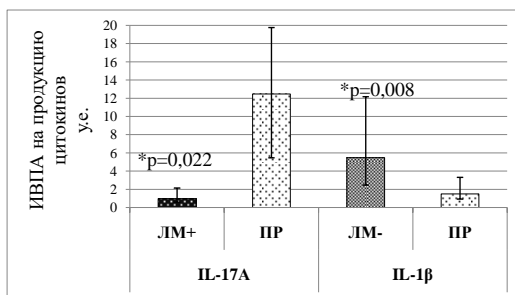


Рисунок 5 - Индекс влияния поликлональных активаторов (у.е.) на продукцию цитокинов у пациентов с ИКНТ при наличии (ЛМ+) и отсутствии лимфогенного метастазирования (ЛМ-) и у пациентов с НЗМЖ при наличии пролиферации (ПР)

Примечание: Количество пациентов с инвазивной карциномой неспецифического типа при наличии лимфогенного метастазирования (ЛМ+) составило - 38, при отсутствии метастазов (ЛМ-) - 73, с незлокачественными заболеваниями молочной железы при наличии (ПР) пролиферации - 13, данные представлены в виде медианы (Me) и квартилей (Q1, Q3), статистически значимые различия при $p < 0,05$, определённые с помощью критерия Уилкоксона-Манна-Уитни. Н-критерий Краскела-Уоллиса: IL-17A $p=0,003$; IL-1 β $p=0,016$.

Взаимосвязь между концентрацией цитокинов в супернатантах образцов ткани молочной железы при влиянии на них поликлональных активаторов и маркёрами ЭМП в образцах ткани молочной железы у пациентов с заболеваниями молочной железы

Изучение маркёров ЭМП выявило, что только экспрессия CD29 была выше у пациентов с ИКНТ по сравнению с НЗМЖ, но не было получено достоверных различий при сравнении экспрессии CDH1 и СП, что свидетельствует об общих закономерностях перехода клеток с эпителиальным фенотипом в мезенхимальный, как при злокачественной прогрессии, так и при некоторых незлокачественных заболеваниях молочной железы.

При изучении взаимосвязи между продукцией цитокинов и экспрессией маркёров ЭМП у пациентов с ИКНТ обнаружена умеренная прямая корреляционная связь между ИВПА на продукцию IL-8, IL-18 и экспрессией нехарактерного для нормальной ткани молочной железы СП ($r = 0,415$; $p = 0,004$; $r = 0,456$; $p = 0,001$ соответственно), что свидетельствует о наличии молекулярных перестроек в клетках и, вероятно, о дальнейшем отложении коллагена в микроокружении опухоли, что в конечном итоге повышает выживаемость раковых клеток [Franchi M. et al., 2013]. Обнаруженные корреляционные связи между маркёрами ЭМП и ИВПА на продукцию цитокинов у пациентов с ИКНТ в зависимости от наличия или отсутствия лимфогенного метастазирования и у пациентов с НЗМЖ при наличии и отсутствии пролиферации представлены в Таблице 5.

Таблица 5 - Сопряжённость между ИВПА на продукцию цитокинов и маркёрами ЭМП у пациентов с заболеваниями молочной железы

| ИКНТ при отсутствии метастазов | | | | ИКНТ при наличии метастазов | | | |
|--------------------------------|---------------|--------|-------|-----------------------------|--------------|--------------|-------|
| Сравниваемые показатели | | г | р | Сравниваемые показатели | | г | р |
| CDH1 | TNF- α | -0,530 | 0,004 | CD29 | IL-6 | 0,483 | 0,036 |
| СП | IL-6 | 0,463 | 0,013 | | IL-1Ra | 0,530 | 0,019 |
| | IL-8 | 0,629 | 0,001 | | G-CSF | 0,476 | 0,039 |
| | IL-18 | 0,477 | 0,010 | | VEGF | 0,480 | 0,038 |
| | G-CSF | 0,526 | 0,004 | | СП | IL-1 β | 0,522 |
| НЗМЖ без пролиферации | | | | НЗМЖ с пролиферацией | | | |
| CDH1 | IL-18 | 0,886 | 0,020 | CD29 | IL-1 β | 0,790 | 0,007 |
| | G-CSF | 0,830 | 0,040 | | | | |

Примечание: Количество пациентов с инвазивной карциномой неспецифического типа при наличии (М+) лимфогенного метастазирования составило - 38, при отсутствии метастазов (М-) - 73, с незлокачественными заболеваниями молочной железы при наличии (ПР) пролиферации - 13, а при отсутствии (НП) пролиферативных изменений - 22, статистически значимым признавали результат $r > 0,400$ при $p < 0,05$ коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

У пациентов без лимфогенного метастазирования выявлена умеренная обратная корреляционная связь между экспрессией CDH1 и ИВПА на продукцию TNF- α , который регулирует экспрессию TGF- β и ускоряет индуцированный TGF- β ЭМП, при котором отмечается снижение экспрессии CDH1 [Markopoulos G.S. et al., 2019] и прямые - между экспрессией СП и ИВПА на продукцию IL-6, IL-8, IL-18 и G-CSF. IL-6 оказывает анти-адгезивное действие на клетки рака молочной железы, снижая экспрессию CDH1, тем самым индуцируя ЭМП [Guamfi J. et al., 2018]. Таким образом, литературные данные и полученные корреляционные связи свидетельствуют о том, что эти цитокины поддерживая иммуносупрессивное про-опухолевое микроокружение неоплазмы, усиливают ЭМП в клетках опухоли, и вероятно

способствуют накоплению и отложению СII.

Для пациентов с лимфогенным метастазированием характерна прямая корреляционная связь между экспрессией CD29 и ИВПА на продукцию IL-6, IL-1Ra, G-CSF, VEGF, что, согласно литературным данным, может быть связано со способностью CD29 через NF-kB активировать фибробласты, продуцирующие эти цитокины, в опухолевом очаге [Fang T. et al., 2018]. G-CSF, активируя сигнальные пути STAT3 также стимулирует ЭМП, а, следовательно, миграцию и инвазию опухолевых клеток [Liu L. et al., 2020]. VEGF-опосредованный ангиогенез играет важную роль в развитии, прогрессировании и метастазировании злокачественных опухолей, однако помимо этого данный цитокин способен усиливать процесс ЭМП [Luo M. et al., 2016]. Прямая корреляционная связь между ИВПА на продукцию IL-1 β и экспрессией СII вероятно связана с тем, что активация сигнального пути IL-1 β /IL-1RI/ β -катенин стимулирует ЭМП, а, следовательно, способствует накоплению коллагена II типа в опухолевых очагах [Perez-Yepey E.A. et al., 2014].

У пациентов с НЗМЖ без пролиферации присутствовали сильные прямые корреляционные связи между экспрессией CDH1 и ИВПА на продукцию IL-18 и G-CSF. Вероятно, это связано с тем, что эти цитокины, как и CDH1 могут препятствовать ЭМП в ткани молочной железы. Например, G-CSF, стимулируя нейтрофилы N1, оказывает анти-пролиферативный эффект, а IL-18 может активировать цитотоксические Т-клетки и НК-клетки, что в совокупности препятствует возникновению атипических клеток и развитию опухоли [Esmailbeig M. et al., 2017].

У пациентов с НЗМЖ с пролиферативными изменениями прямая корреляционная связь установлена между экспрессией CD29 и ИВПА на продукцию IL-1 β . Отсутствие положительной корреляционной связи между ИВПА на продукцию цитокинов и экспрессией CDH1, а также наличие положительной взаимосвязи CD29 свидетельствует о ЭМП у пациентов с НЗМЖ с пролиферативными изменениями.

Влияние фактора дифференцировки HLDF на продукцию цитокинов образцами ткани молочной железы у пациентов с ИКНТ распределёнными согласно патологическим прогностическим критериям 8-го издания AJCC

Поскольку фактор дифференцировки HLDF может рассматриваться в контексте дифференцировочной терапии, то интерес представляет изучение его влияния на продукцию цитокинов образцами ткани пациентов с ИКНТ распределённым по группам, учитывающим не только сам факт наличия лимфогенного метастазирования, но и размер опухоли, гистологическую степень злокачественности, а также экспрессию рецепторов эстрогена, прогестерона и HER2/neu. Значения ИВHLDF на продукцию цитокинов в образцах ткани молочной железы у пациентов с ИКНТ распределёнными согласно критериям, AJCC представлены в Таблице 6.

Таблица 6 - Индекс влияния HLDF на продукцию цитокинов (у.е.) в супернатантах образцов ткани молочной железы пациентов с ИКНТ распределёнными согласно критериям AJCC

| Цитокины | IA | IB | IIA | III |
|----------|--|--------------|----------------------------|-----------------------------|
| | (Me; Q ₁ -Q ₃) у.е. | | | |
| IL-6 | 1,1(0,8-2,4) | 1,0(0,8-1,5) | 0,9(0,5-1,0) | 1,0(0,8-1,4) |
| | | | p _{IA-IIA} =0,036 | |
| IL-8 | 1,1(1,0-2,2) | 1,0(0,8-1,4) | 0,9(0,4-1,0) | 0,9(0,7-1,3) |
| | | | p _{IA-IIA} =0,012 | |
| TNF-α | 0,8(0,6-1,0) | 0,7(0,4-1,0) | 0,5(0,3-0,8) | 0,8(0,4-1,2) |
| | | | p _{IA-IIA} =0,009 | |
| GM-CSF | 1,0(0,6-1,0) | 0,8(0,3-1,8) | 0,6(0,4-0,8) | 1,0(0,9-3,4) |
| | | | | p _{IIA-III} =0,013 |
| MCP-1 | 0,8(0,6-1,1) | 0,8(0,4-1,2) | 0,6(0,3-0,9) | 1,0(0,9-1,5) |
| | | | | p _{IIA-III} =0,008 |

Примечание: Количество пациентов с не злокачественными заболеваниями молочной железы (НЗМЖ) составило - 35, а с инвазивной карциномой неспецифического типа IA группы - 61, IB группы - 22, IIA группы - 17 и III группы - 11, данные представлены в виде медианы (Me) и квартилей (Q₁, Q₃), статистически значимые различия при $p < 0,05$, определённые с помощью критерия Уилкоксона-Манна-Уитни. Н-критерий Краскела-Уоллиса: IL-6 $p=0,041$; IL-8 $p=0,037$; TNF-α $p=0,035$; GM-CSF $p=0,045$; MCP-1 $p=0,039$.

Согласно результатам исследования, фактор дифференцировки HLDF воздействовал в основном на пациентов с ИКНТ IIA стадии сочетающей отрицательную экспрессию ER, PR, HER2 с отсутствием лимфогенного метастазирования, у таких пациентов IBHLDF на продукцию IL-6, IL-8 и TNF-α ниже по сравнению с IA стадией сочетающей положительную экспрессию ER, PR, HER2 также с отсутствием лимфогенного метастазирования, а IBHLDF на продукцию GM-CSF и MCP-1 был ниже по сравнению с III стадией сочетающей отрицательную экспрессию ER, PR, HER2 с лимфогенным метастазированием. Можно предположить, что такой эффект HLDF происходит из-за повышения степени дифференцировки опухолевых клеток, что в свою очередь сопряжено со снижением цитокинов в опухоли, и вероятно, будет способствовать улучшению ответа на терапию и увеличению срока безрецидивной выживаемости у таких пациентов. Таким образом, HLDF может явиться кандидатом в дифференцировочную терапию.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что иммуноферментный анализ более информативен при определении концентрации цитокинов, по сравнению с определением экспрессии их матричной РНК.

2. Установлены особенности цитокин-продуцирующего ресурса у пациентов с заболеваниями молочной железы:

- у пациентов с незлокачественными заболеваниями индекс влияния поликлональных активаторов на продукцию опухолью TNF- α повышен, по сравнению с пациентами с инвазивной карциномой неспецифического типа;

- у пациентов без лимфогенного метастазирования индекс влияния поликлональных активаторов на продукцию IL-17A повышен, по сравнению с пациентами с метастазами в регионарные лимфатические узлы;

- у пациентов с незлокачественными заболеваниями молочной железы с пролиферацией индекс влияния поликлональных активаторов на продукцию IL-1 β снижен по сравнению с пациентами с незлокачественными заболеваниями молочной железы без пролиферативных изменений.

3. Особенностью пациентов при отсутствии лимфогенного метастазирования является обратная корреляционная связь между экспрессией CDH1 и индексом влияния поликлональных активаторов на продукцию TNF- α , а пациентов с метастазированием в регионарные лимфоузлы - прямые корреляционные связи между экспрессией CD29 и индексом влияния поликлональных активаторов на продукцию IL-6, IL-1Ra, G-CSF, GM-CSF и VEGF, что свидетельствует об особенностях эпителиально-мезенхимального перехода у пациентов при отсутствии и наличии метастазирования.

4. Установлено, что для пациентов с незлокачественными заболеваниями молочной железы с пролиферативными изменениями характерна прямая корреляционная связь между экспрессией CD29 и индексом влияния поликлональных активаторов на продукцию IL-1 β , что свидетельствует о наличии эпителиально-мезенхимального перехода у таких пациентов и о более высоком риске малигнизации.

5. Установлено, у пациентов с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа при сочетании отрицательной экспрессии ER, PR и HER2 с отсутствием лимфогенного метастазирования снижен индекс влияния HLDF на продукцию IL-6, IL-8, TNF- α , GM-CSF и MCP-1, что свидетельствует о супрессирующем действии HLDF на продукцию цитокинов у таких пациентов и может явиться основой использования HLDF в качестве кандидата в дифференцировочную терапию рака молочной железы.

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации

1. Autenshlyus A.I., Studenikina A.A., Arkhipov S.A., Davletova K.I., Zhurakovsky I.P., Proskura A.V., Varaksin N.A., Lyakhovich V.V. Relationship Between Supernatant Cytokines and Expression of Markers of Epithelial-Mesenchymal Transition of Invasive Breast Carcinoma of Non-Specific Lymphnode Type // *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. – 2020. – Vol. 14. – №. 3. – P. 260–265.
2. Autenshlyus A. I., Studenikina A. A., Bernado A. V., Mikhailova E. S., Proskura A. V., Sidorov S. V., Varaksin N. A., Lyakhovich V. V. Assessment of the Cytokine-Producing Resource of Tumor Biopsy Samples from Patients with Invasive Carcinoma of No Special Type and with Non-Malignant Breast Diseases // *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. – 2020. – Vol. 14. – №. 1. – P. 38–43.
3. Autenshlyus A.I., Davletova K.I., Studenikina A.A., E. S. Mikhaylova E.S., Varaksin N.A., Zhurakovsky I.P., Proskura A.V., Sidorov S.A., Lyakhovich V.V. Cytokine Production by Blood Immune Cells, Tumor and Its Microenvironment, Characteristics of Extracellular Matrix in Patients with Invasive Ductal Carcinoma of No Special Type // *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. – 2020. – Vol. 14. – №. 1. – P. 44–51.
4. Аутеншлюс А.И., Иванов И.Д., Голованова А.В., Студеникина А.А., Михайлова Е.С., Вавилин В.А., Вараксин Н.А., Ляхович В.В. Сравнение экспрессии мРНК цитокинов с их концентрацией в супернатанте клеточной культуры U937 при воздействии на неё поликлональных активаторов // *Медицинская иммунология*. – 2019. – Том. 21. – №. 4. – С. 737–742.
5. Аутеншлюс А.И., Студеникина А.А., Михайлова Е.С., Проскура А.В., Вараксин Н.А., Сидоров С.В., Богачук А.П., Липкин В.М., Ляхович В.В. Влияние фактора дифференцировки HLDF на продукцию цитокинов биоптатами ткани молочной железы при её незлокачественных заболеваниях и при инвазивной карциноме неспецифического типа // *Биомедицинская химия*. – 2020. – Том. 66. – №. 6. – С. 485–493.

Список сокращений и условных обозначений

AJCC (The American Joint Committee On Cancer) – американский объединенный комитет по злокачественным опухолям;

CD29 (Integrin Beta-1) – β -1-интегрин;

CDH1 (Cadherin E) – кадгерин-E

СII (Collagen Type II) – коллаген II типа;

ER (Estrogen Receptor) – рецептор эстрогена;

G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор;

GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor) – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор;

HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) – рецептор эпидермального фактора роста человека 2;

HLDF (Human Leukemia Differentiation Factor) – фактор дифференцировки;

IFN- γ (Interferon Gamma) – интерферон - гамма;

IL (Interleukin) – интерлейкин;

MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein 1) – моноцитарный хемоаттрактантный белок - 1;

PR (Progesterone Receptor) – рецептор прогестерона;

TNF- α (Tumor Necrosis Factor Alpha) – фактор некроза опухоли - альфа;

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) – фактор роста эндотелия сосудов;

ИВ – индекс влияния;

ИВHLDF – индекс влияния HLDF;

ИВПА – индекс влияния поликлональных активаторов;

ИКНТ – инвазивная карцинома неспецифического типа;

ИП ПА – индуцированная комплексом полиактиваторов продукция цитокинов;

ЛМ- – пациенты с инвазивной карциномой неспецифического типа без лимфогенного метастазирования;

ЛМ+ – пациенты с инвазивной карциномой неспецифического при наличии метастазов в регионарных лимфатических узлах;

НЗМЖ – незлокачественные заболевания молочной железы;

НП – непролиферативные незлокачественные заболевания молочной железы;

ПР – пролиферативные незлокачественные заболевания молочной железы;

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция с детекцией в реальном времени;

СП – спонтанная продукция цитокинов;

ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход.