

Для цитирования: Аутеншлюс А.И., Архипов С.А., Михайлова Е.С., Архипова В.В., Вараксин Н.А. Сопряженность цитокинового профиля супернатанта инвазивной карциномы молочной железы с ее молекулярными и гистопатологическими характеристиками. Сибирский онкологический журнал. 2023; 22(6): 92–102. – doi: 10.21294/1814-4861-2023-22-6-92-102

For citation: Autenshlyus A.I., Arkhipov S.A., Mikhaylova E.S., Arkhipova V.V., Varaksin N.A. Relationship between the cytokine profile of supernatants of invasive breast carcinoma and its molecular and histopathological characteristics. Siberian Journal of Oncology. 2023; 22(6): 92–102. – doi: 10.21294/1814-4861-2023-22-6-92-102

## СОПРЯЖЕННОСТЬ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ СУПЕРНАТАНТА ИНВАЗИВНОЙ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ЕЕ МОЛЕКУЛЯРНЫМИ И ГИСТОПАТОЛОГИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ

А.И. Аутеншлюс<sup>1,2</sup>, С.А. Архипов<sup>1,2</sup>, Е.С. Михайлова<sup>1,2</sup>, В.В. Архипова<sup>1</sup>,  
Н.А. Вараксин<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России  
Россия, 630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики,  
ФГБНУ ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины  
Россия, 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

<sup>3</sup>АО «Вектор-Бест»  
Россия, 630559, Новосибирская обл., пос. Кольцово

### Аннотация

**Цель исследования** – изучение сопряженности между показателями цитокинового профиля супернатантов образцов инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа (ИКНТ), ее молекулярными и гистопатологическими параметрами, экспрессией CD34 как маркера ангиогенеза и метастазированием в регионарные лимфатические узлы (РЛУ). **Материал и методы.** В биоптатах ИКНТ от 28 пациенток в возрасте 37–60 лет исследовали продукцию 14 цитокинов. Концентрацию цитокинов в супернатантах биоптатов (КЦСБ) определяли (в пг/мл) с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Экспрессию CD34 и маркеров молекулярных подтипов ИКНТ (HER2/neu, ER, PR, Ki67) в биоптатах ИКНТ оценивали иммуногистохимическим методом. Относительное содержание опухолевых клеток различной степени дифференцировки в образцах ИКНТ оценивали гистопатологическим анализом. **Результаты.** Значимые различия между пациентами I группы (с метастазами в регионарных лимфатических узлах (РЛУ)) и II группы (без метастазов в РЛУ) выявлены при оценке КЦСБ: IFN- $\gamma$ , G-CSF, IL-2, IL-10 и MCP-1. В I группе выявлены корреляционные связи между рядом гистопатологических параметров (экспрессии HER2/neu, CD34 и Ki67, % митозов и низкодифференцированных опухолевых клеток) и КЦСБ (MCP-1, IL-18). Во II группе также выявлены корреляционные связи между КЦСБ (IL-2, VEGF-A, G-CSF, IL-1Ra) и некоторыми гистопатологическими параметрами ИКНТ (экспрессии HER2/neu, CD34, PR, % митозов и высокодифференцированных опухолевых клеток). С помощью ROC-анализа установлено, что на основе показателей экспрессии CD34 и КЦСБ IL-10, G-CSF, MCP-1 в образцах ИКНТ можно прогнозировать наличие или отсутствие метастазов в РЛУ. Качество модели для разделения больных на группу без метастазов в РЛУ и на группу с метастазами, основанного на оценке КЦСБ MCP-1, достигало максимальных значений (AUC=1,000) при относительно высоких показателях экспрессии CD34. **Заключение.** Анализ полученных данных показал важность оценки экспрессии CD34 и продукции ряда цитокинов клетками биоптатов ИКНТ для прогнозирования наличия или отсутствия метастазов в РЛУ.

**Ключевые слова:** инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа, гистопатологические параметры, маркеры молекулярных подтипов, CD34, цитокины, метастазы в региональные лимфатические узлы.

## RELATIONSHIP BETWEEN THE CYTOKINE PROFILE OF SUPERNATANTS OF INVASIVE BREAST CARCINOMA AND ITS MOLECULAR AND HISTOPATHOLOGICAL CHARACTERISTICS

A.I. Autenshlyus<sup>1,2</sup>, S.A. Arkhipov<sup>1,2</sup>, E.S. Mikhaylova<sup>1,2</sup>, V.V. Arkhipova<sup>1</sup>, N.A. Varaksin<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Novosibirsk State Medical University

52, Krasny Ave., Novosibirsk, 630091, Russia

<sup>2</sup>Institute of Molecular Biology and Biophysics,

Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine

2, Timakova St., Novosibirsk, 630117, Russia

<sup>3</sup>Vector-Best

Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russia

### Abstract

**The aim of the study** was to analyze the correlation between the cytokine profile of supernatants of invasive breast carcinoma of a nonspecific type (IBC-NST) samples, histopathological and molecular genetic parameters of IBC-NST, expression of the CD34 as a marker of angiogenesis and metastasis to regional lymph nodes (RLN). **Material and Methods.** The production of 14 cytokines in IBC-NST biopsy samples from 28 patients aged 37–60 years was studied. The concentration of cytokines in the supernatants of biopsies (CCSB) was determined (in pg/ml) using enzyme immunoassay (ELISA). The expression of CD34 and markers of IBC-NST molecular subtypes (HER2/neu, ER, PR, Ki67) in IBC-NST biopsy samples was evaluated by immunohistochemical method. The relative content of tumor cells of different differentiation grade in the IBC- NST samples was evaluated by histopathological analysis. **Results.** The assessment of CCSB showed statistically significant differences in IFN- $\gamma$ , G-CSF, IL-2, IL-10 and MCP-1 between patients of group I (with metastases in RLNs) and group II (without metastases in RLNs). In group I, the correlations between histopathological parameters (Her2/neu, CD34 and Ki67 expressions, % of mitoses and poorly-differentiated cancer cells) and CCSB (MCP-1, IL-18) were revealed. In group II, the correlations between CCSB (IL-2, VEGF-A, G-CSF, IL-1Ra) and histopathological parameters, such as expression of Her2/neu, CD34, PR, % of mitoses and well-differentiated cancer cells, were revealed. The ROC analysis showed that the presence or absence of metastases in RLNs can be predicted on the basis of CD34 expression levels and concentrations of IL-10, G-CSF, and MCP-1 in supernatants of IBC-NST biopsy samples. The quality of the model for stratifying patients into groups with and without RLN metastases, based on the assessment of the concentration of MCP-1 in the supernatants of IBC-NST biopsies, reached maximum values (AUC=1.000) with relatively high CD34 expression. **Conclusion.** The analysis of the data obtained showed that the assessment of CD34 expression and production of cytokines in IBC-NST biopsies is important for predicting the presence or absence of metastases in RLNs.

**Key words:** invasive breast carcinoma of non-specific type, histopathological parameters, markers of molecular subtypes, CD34, cytokines, metastases to regional lymph nodes.

### Введение

В ряде работ показано, что различные цитокины, в зависимости от их концентрации, могут как усиливать, так и ингибировать рост злокачественной опухоли молочной железы, а также процесс ее метастазирования [1–4]. К таким цитокинам относятся IL-1, IL-6, IL-8, IL-18, IL-19, G-CSF, GM-CSF и TGF- $\beta$ , изменение концентрации которых в крови может быть сопряжено с прогрессированием рака молочной железы (РМЖ) [5–9]. Однако механизмы, лежащие в основе такой взаимосвязи, изучены недостаточно, так как большинство данных о роли цитокинов в опухолевой прогрессии основано, как правило, только на соотношении концентраций определенных цитокинов, обнаруженных в сыворотке крови, с темпами роста опухоли и метастазированием [4, 6, 10, 11].

По современным представлениям, метастазирование злокачественных опухолей, в том числе и РМЖ, рассматривается как сложный многоэтапный процесс, который зависит от множества факторов: размеров и скорости роста опухоли, ее локализации, интенсивности ангиогенеза и развития сосудистой сети, степени злокачественности опухолевых клеток, которая определяется множеством цитофизиологических характеристик, включающих пролиферативную активность, способность к инвазивному росту, миграции и др., зависящих, в свою очередь, от молекулярного подтипа [10, 11–14]. Важнейшим фактором, способствующим метастазированию злокачественной опухоли, является внутриопухолевый ангиогенез, к одному из маркеров которого относят молекулу CD34, которая экспрессируется на большинстве клеток эндотелия кровеносных сосудов [15–18].

Показано, что повышенный уровень экспрессии CD34 в опухоли молочной железы может быть ассоциирован с неблагоприятным прогнозом и снижением продолжительности жизни онкологического больного [16, 17]. Тем не менее оценка только одного уровня экспрессии CD34 в опухоли, так же как и некоторых других маркеров опухолевого роста, не может являться достаточно надежным и точным параметром, величина которого может указывать на вероятность метастазирования в РЛУ [7, 16–21]. По этой причине возникает необходимость поиска других дополнительных факторов, условий или биологических маркеров, оценка которых в совокупности могла бы повысить вероятность прогнозирования метастазирования рака молочной железы, в том числе и на основе оценки экспрессии в опухоли CD34. В связи с этим с теоретической и практической точки зрения представляет интерес исследование взаимосвязи между цитокинами, продуцируемыми клетками ИКНТ, экспрессией CD34, гистопатологическими параметрами ИКНТ и метастазированием ИКНТ в РЛУ.

**Цель исследования** – изучение сопряженности между показателями цитокинового профиля супернатантов биоптатов инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа, ее молекулярными и гистопатологическими параметрами, экспрессией CD34, как маркера ангиогенеза, и показателями метастазирования в регионарные лимфатические узлы.

### Материал и методы

Исследовали биоптаты инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа II степени злокачественности и супернатанты, полученные при их культивировании *in vitro* от 28 женщин в возрасте 37–60 лет, проходивших лечение в Новосибирском областном онкологическом диспансере. Пациентки включены в исследование по следующим критериям: впервые выявленный рак молочной железы, по поводу которого не проводилась предоперационная терапия. Критерии исключения: гематогенные метастазы, сопутствующие эндокринные заболевания, обострение хронических, воспалительных, аутоиммунных и инфекционных заболеваний. Пациентки были разделены на 2 группы. В I группу включено 13 пациенток с метастазами в РЛУ, во II группу – 15 пациенток без метастазов в РЛУ.

Биоптаты ИКНТ (объемом 8 мм<sup>3</sup>) получали методом трепанобиопсии, помещали во флакон, содержащий 1 мл среды DMEM-F12, и инкубировали при 37 °С в течение 72 ч для получения супернатантов, содержащих цитокины, продуцируемые клетками биоптатов [22]. Далее биоптаты ИКНТ извлекали из среды и фиксировали в нейтральном растворе формалина для проведения дальнейшего иммуногистохимического и патогистологического исследования. С целью получения чистого супернатанта оставшиеся во флаконах клетки опухоли

осаждали центрифугированием в режиме 900 g в течение 15 мин. Концентрацию цитокинов в супернатантах биоптатов (КЦСБ) определяли (в пг/мл) с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Оценивали КЦСБ следующих цитокинов: IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, G-CSF, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , VEGF-A и MCP-1. ИФА-анализ проводили с использованием наборов реагентов производства АО «Вектор-Бест».

Зафиксированные в формалине биоптаты ИКНТ обезвоживали и заключали в парафин. Процессы депарафинизации и регидратации образцов ИКНТ проводили по стандартной методике с использованием проводки ксилол-этанол. Процедуру демаскировки антигенов на срезах ИКНТ проводили в цитратном буфере (pH=6,0) при температуре 95 °С в течение 20 мин. Блокирование эндогенной пероксидазы проводили в 1 % водном растворе H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 5 мин. Чтобы уменьшить уровень неспецифического окрашивания срезов, их предварительно инкубировали с нормальной блокирующей неиммунной кроличьей сывороткой (VECTASTAIN Elite ABC Kit, США) в течение 10 мин.

Имуногистохимическое выявление экспрессии CD34 проводили по следующей схеме: 1) инкубация срезов в растворе (BD 559148, США) с антителами к CD34 (sc-7324, Santa Cruz, США) в разведении 2,0 мкг/мл в течение 1 ч; 2) инкубация с биотинилированными антителами (VECTASTAIN Elite ABC Kit, Vector Laboratories, PK-7200, США) – 30 мин; 3) инкубация с авидин-пероксидазным комплексом (VECTASTAIN Elite ABC Kit) – 30 мин; инкубация в хромогенном субстрате, содержащем диаминобензидин (ImmPACT DAB, Vector Laboratories, SK-4105, США) – 5 мин. Уровни экспрессии рецептора эпидермального фактора роста 2-го типа Her2/neu, рецепторов к эстрогену (ER) и прогестерону (PR), а также маркера пролиферации Ki67 оценивали в образцах ИКНТ по методикам [21], рекомендованным для определения молекулярно-генетических субтипов рака молочной железы (Gallen International Expert Consensus, 2011). Определение рецепторного статуса по ER и PR проводилось с использованием набора ER/PR pharmDx Kit (K4071, Dako). Для определения HER2/neu статуса использовали набор Ultra View Universal DAB Detection Kit (антитела 4B5). Белок Ki67 (клон MIB-1) выявляли при использовании набора диагностических антител фирмы «Dako». Все срезы, окрашенные иммуногистохимическим методом, докрашивали гематоксилином, дегидратировали и заключали в бальзам.

Экспрессию CD34 в образцах ИКНТ оценивали методом компьютерной морфометрии. Срезы образцов ИКНТ, окрашенные на CD34, фотографировали ( $\times 400$ ) на микроскопе Micros MC 300A (Австрия) при использовании цифровой CMOS-камеры «Artina MT9J003» (Китай). Компьютерную морфометрическую количественную оценку экспрессии CD34 проводили с помощью

программного обеспечения ImageJ 1.50a (Национальный институт здоровья, США). Цифровые изображения гистологических срезов, окрашенных на CD34, разделяли на три цветовых слоя с использованием опции “Colour Deconvolution” в режиме “HE & DAB”. Иммуногистохимические показатели экспрессии CD34 представляли собой площади окрашенных зон, специфичные для экспрессии CD34 (процент окрашенной площади от общей площади тестируемого изображения). Оценку экспрессии ER и PR проводили по методу «Allred» [23]. Оценку уровней экспрессии HER2/neu проводили по общепринятой балльной системе (от 0 до 3+). Оценка «2+» давалась при ярком, но не полном окрашивании более 10 % клеток опухоли. Случаи, соответствующие значению экспрессии «2+» HER2/neu, подтверждались методом гибридизации *in situ* при постановке диагноза в онкологической клинике.

Степени дифференцировки опухолевых клеток оценивали по различным цитоморфологическим критериям [24]: степени выраженности клеточного полиморфизма, величине ядерно-цитоплазматического отношения, способности к структурообразованию. Для высокодифференцированных опухолевых клеток (ВДОК) были характерны следующие признаки: форма, приближенная к нормальному фенотипу клеток, преобладание цитоплазмы над ядром, способность формировать железистые структуры. Низкодифференцированные опухолевые клетки (НДОК) отличались выраженным полиморфизмом, высоким ядерно-

цитоплазматическим отношением, отсутствием способности к формированию железистых структур, наличием большого количества митозов, включая патологические. Умереннодифференцированные опухолевые клетки (УДОК) характеризовались как тип клеток, занимающих промежуточное положение между ВДОК и НДОК по наличию и степени выраженности перечисленных признаков. Проллиферативную активность клеток определяли по доле опухолевых клеток, экспрессирующих Ki67 (%). Также подсчитывали среднее количество (%) митозов (МТ), патологических митозов (ПМТ) и внутрисосудистых опухолевых эмболов (ВСОЭ) по результатам анализа 10 полей зрения.

Корреляционный анализ (по Спирмену), вычисление медиан и 25–75 перцентилей, а также оценку значимости различий между группами (непараметрическим методом по U-критерию Манна–Уитни) проводили с помощью программного пакета «Statistica V.7». ROC-анализ полученных данных проводили с помощью пакета программ «IBM SPSS Statistics V. 22.0».

### Результаты

При корреляционном анализе полученных данных установлено, что между КЦСБ ИКНТ и гистопатологическими характеристиками ИКНТ в группах пациенток с наличием (I группа) или отсутствием метастазов в РЛУ (II группа) выявляются различные по характеру связи (табл. 1). В I группе выявлены корреляционные связи между рядом гистопатологических параметров (HER2/neu,

Таблица 1/Table 1

**Корреляционные связи между КЦСБ ИКНТ и гистопатологическими характеристиками ИКНТ при наличии и отсутствии метастазов в РЛУ**  
**Correlations between the CCSB of IBC-NST and histopathological characteristics of IBC-NST in the presence and absence of metastases in RLNs**

Группа пациенток/ Patient group	Выявленные корреляции/ Identified correlations	Коэффициент корреляции, r/ Correlation coefficient, r	p
I группа/ Group I (n=13)	IL-18 – Her2/neu	0,60	0,0294
	IL-18 – ВСОЭ/ИТЕ	0,68	0,0106
	МСП-1 – МТ/МТ	-0,69	0,0085
	МСП-1 – НДОК/PDTC	-0,77	0,0020
	МСП-1 – CD34	-0,58	0,0390
	МСП-1 – Ki67	-0,79	0,0013
II группа/ Group II (n=15)	IL-2 – Her2/neu	0,60	0,0176
	IL-2 – CD34	-0,53	0,0442
	IL-1Ra – УДОК/MDTC	-0,77	0,0007
	G-CSF – ВСОЭ/ИТЕ	-0,65	0,0089
	G-CSF – МТ/МТ	-0,58	0,0234
	G-CSF – УДОК/MDTC	-0,63	0,0120
	G-CSF – ВДОК/WDTC	0,59	0,0193
VEGF-A – PR	-0,54	0,0057	

Примечания: ВСОЭ – внутрисосудистые опухолевые эмболы; НДОК – низкодифференцированные опухолевые клетки; УДОК – умереннодифференцированные опухолевые клетки; ВДОК – высокодифференцированные опухолевые клетки; МТ – митозы; ПМТ – патологические митозы; p – значимость корреляции; таблица составлена авторами.

Notes: ITE – intravascular tumor emboli; PDTC – poorly-differentiated tumor cells; MDTC – moderately differentiated tumor cells; WDTC – well-differentiated tumor cells; MT – mitoses; PMT – pathological mitoses; p – the statistical significance of the correlation; created by the authors.

Таблица 2/Table 2

**Корреляционные связи между показателями экспрессии CD34 в образцах ИКНТ и гистопатологическими характеристиками ИКНТ при наличии и отсутствии метастазов в РЛУ у пациенток с ИКНТ**

**Correlations between expression levels of CD34 in IBC-NST specimens and histopathological characteristics of IBC-NST in the presence and absence of RLN metastases in patients with IBC-NST**

Группа пациенток/ Patient group	Выявленные корреляции/ Identified correlations	Коэффициент корреляции, r/ Correlation coefficient, r	p
I группа/ Group I (n=13)	CD34 – ВСОЭ/ITE	0,59	0,0326
	CD34 – ВДОК/WDTC	-0,96	0,0001
	CD34 – Ki67	0,66	0,0132
	CD34 – PR	-0,71	0,0066
II группа/ Group II (n=15)	Нет корреляций/No correlations	–	–

Примечания: ВСОЭ – внутрисосудистые опухолевые эмболы (среднее количество в поле зрения); ВДОК – высокодифференцированные опухолевые клетки (относительное содержание, %); ПМТ – патологические митозы (среднее количество в поле зрения); p – значимость корреляции; таблица составлена авторами.

Notes: ITE – intravascular tumor emboli (average number per field of view); WDTC – well-differentiated tumor cells (relative content, %); PMT – pathological mitoses (average number per field of view); p – is the statistical significance of the correlation; created by the authors.

Таблица 3/Table 3

**Показатели КЦСБ (пг/мл) при наличии и отсутствии метастазов в РЛУ у пациентов с ИКНТ**  
**The concentration of cytokines in the supernatants of biopsies (CCSB) (pg/ml) in the presence and absence of metastases in RLNs in patients with IBC-NST**

Цитокины/ Cytokines	I группа (n=13)/ Group I (n=13)	II группа (n=13)/ Group II (n=15)	P
IL-2	3,3 (2,0; 10,2)	2,0 (2,0; 2,1)	0,0164
IL-6	52440,0 (35480,0; 63980,0)	68980,0 (36680,0; 71040,0)	0,2591
IL-8	21300,0 (12560,0; 45460,0)	36020,0 (18940,0; 39840,0)	0,3219
IL-10	7,6 (5,4; 15,6)	16,3 (8,4; 43,3)	0,0501
IL-17	3,3 (2,1; 5,2)	2,0 (2,0; 4,0)	0,2079
IL-18	84,7 (31,9; 251,3)	108,7 (53,5; 340,6)	0,2401
IL-1β	22,8 (15,4; 86,0)	43,5 (26,7; 55,2)	0,8358
IL-1Ra	5535,0 (1659,1; 14217,0)	7770,0 (5240,0; 22740,0)	0,4202
TNF-α	9,8 (7,7; 17,0)	10,1 (7,1; 19,5)	0,7124
IFN-γ	21,3 (10,2; 39,9)	8,2 (6,0; 11,8)	0,0137
G-CSF	625,5 (606,7; 2000,0)	2850,5 (602,7; 2975,0)	0,0504
GM-CSF	33,7 (14,7; 96,6)	59,5 (32,8; 79,5)	0,2999
VEGF-A	3147,6 (2175,0; 4054,4)	2665,4 (2238,2; 3943,8)	0,7297
MCP-1	1677 (1370,0; 13481,0)	8223,0 (3840,3; 12673,0)	0,0177

Примечания: данные представлены в виде медианы (25-й; 75-й процентиль); таблица составлена авторами.

Notes: The data is presented as a median (25th; 75th percentile); created by the authors.

ВСОЭ, МТ, НДОК, CD34 и Ki67) и КЦСБ MCP-1 и IL-18 (табл. 1). Во II группе также выявлены корреляционные связи между КЦСБ (IL-2, VEGF-A, G-CSF, IL-1Ra) и гистопатологическими параметрами ИКНТ (экспрессии HER2/neu, CD34, PR, % митозов и высокодифференцированных опухолевых клеток). В I группе пациенток показатель экспрессии CD34 находился в положительной корреляционной связи с числом внутрисосудистых эмболов (ВСОЭ), формирующихся из опухолевых клеток, и с маркером клеточной пролиферации Ki67 (табл. 2, рис. 1). Кроме этого была также обнаружена выраженная обратная корреляционная связь между показателями экспрессии CD34 ( $r=-0,96$ ;  $p<0,0001$ ), количеством ВДОК и показателями

экспрессии PR (табл. 2). Статистически значимые различия между I и II группами были выявлены при оценке КЦСБ: IFN-γ, G-CSF, IL-2, IL-10 и MCP-1 (табл. 3). Это позволило предположить, что по уровню продукции IFN-γ, G-CSF, IL-2, IL-10 и MCP-1 клетками биоптатов ИКНТ можно оценить вероятность наличия или отсутствия метастазов в РЛУ. Для проверки этого предположения нами был использован ROC-анализ полученных данных всех пациенток I и II группы. Поскольку показатели экспрессии CD34 в образцах ИКНТ пациенток с метастазами в РЛУ находились в корреляционной связи с рядом гистопатологических параметров ИКНТ (табл. 3), характеризующих степень злокачественности опухоли (ВДОК, Ki67, ВСОЭ), то в

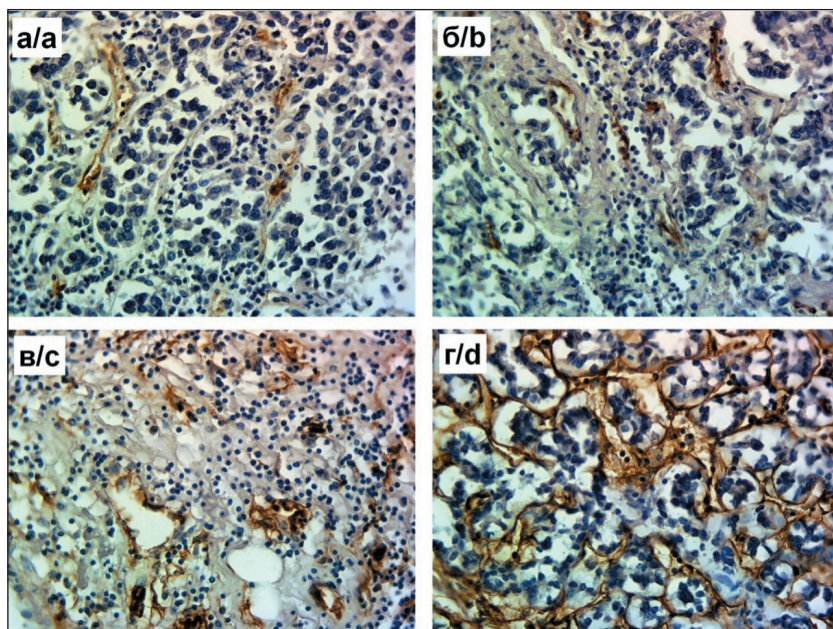


Рис. 1. Микрофото. Различные уровни экспрессии CD34 в образцах ИКНТ: а) слабая экспрессия CD34; б) умеренная экспрессия CD34; в) выраженная экспрессия CD34; г) гиперэкспрессия CD34.  $\times 400$ . Примечание: рисунок выполнен авторами

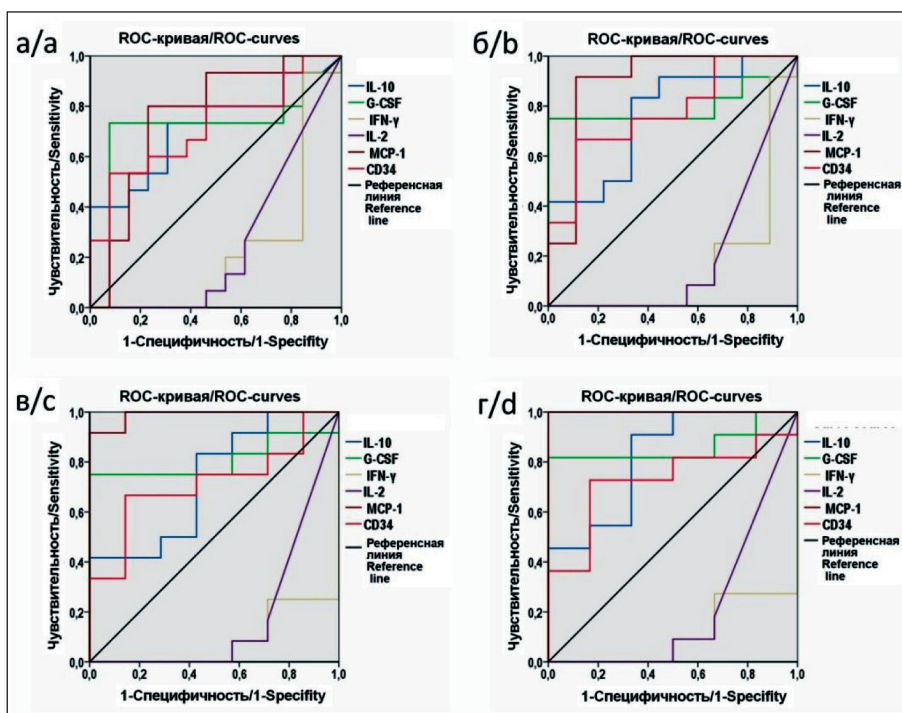


Рис. 2. ROC-кривые, характеризующие качество ROC-моделей для разделения всех пациенток с ИКНТ на две группы: с метастазами в РЛУ и без метастазов, построенные по величинам концентраций цитокинов (пг/мл) в супернатантах биоптатов ИКНТ – IL-10, G-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-2, MCP-1, а также показателей экспрессии CD34 (% CD34+ окрашенной зоны): а) при учете всех показателей экспрессии CD34 – для IL-10 AUC=0,715, для G-CSF AUC=0,713, для IFN- $\gamma$  AUC=0,226, для IL-2 AUC=0,259, для MCP-1 AUC=0,764, для CD34 AUC=0,718; б) при показателе экспрессии CD34 >1,0 – для IL-10 AUC=0,769, для G-CSF AUC=0,796, для IFN- $\gamma$  AUC=0,167, для IL-2 AUC=0,167, для MCP-1 AUC=0,898, для CD34 AUC=0,778; в) при показателе экспрессии CD34 >1,5 – для IL-10 AUC=0,726, для G-CSF AUC=0,810, для IFN- $\gamma$  AUC=0,083, для IL-2 AUC=0,179, для MCP-1 AUC=0,988, для CD34 AUC=0,714; г) при показателе экспрессии CD34 >2,0 – для IL-10 AUC=0,818, для G-CSF AUC=0,864, для IFN- $\gamma$  AUC=0,106, для IL-2 AUC=0,212, для MCP-1 AUC=1,000, для CD34 AUC=0,727. Примечание: рисунок выполнен авторами

Fig. 2. ROC-curves characterizing the quality of ROC-models for dividing all patients with IBC-NST into two subgroups – patients with RLN metastases and patients without metastases, built on the values of cytokine concentrations (pg/ml) in the supernatants of IBC-NST biopsy specimens – IL-10, G-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-2, MCP-1, as well as indicators of CD34 expression (% CD34+ staining area): a) taking into account all indicators of CD34 expression – for IL-10 AUC=0.715, for G-CSF AUC=0.713, for IFN- $\gamma$  AUC=0.226, for IL-2 AUC=0.259, for MCP-1 AUC=0.764, for CD34 AUC=0.718; b) with CD34 expression index >1.0 – for IL-10 AUC=0.769, for G-CSF AUC=0.796, for IFN- $\gamma$  AUC=0.167, for IL-2 AUC=0.167, for MCP-1 AUC=0.898, for CD34 AUC=0.778; c) with CD34 expression index >1.5 – for IL-10 AUC=0.726, for G-CSF AUC=0.810, for IFN- $\gamma$  AUC=0.083, for IL-2 AUC=0.179, for MCP-1 AUC=0.988, for CD34 AUC=0.714; d) with CD34 expression index >2.0 – for IL-10 AUC=0.818, for G-CSF AUC=0.864, for IFN- $\gamma$  AUC=0.106, for IL-2 AUC=0.212, for MCP-1 AUC=1.000, for CD34 AUC=0.727. Note: created by the authors

качестве дополнительного параметра ROC-анализа для выявления пациенток, у которых нет метастазов в РЛУ, включили показатель экспрессии CD34 в образцах ИКНТ (рис. 1). ROC-кривые позволяли оценить качество моделей по эффективности разделения всех пациенток на группы с метастазами и без метастазов в РЛУ (рис. 2).

При всех значениях показателя экспрессии CD34 оценка концентраций IL-10, G-CSF и MCP-1 в супернатантах биоптатов ИКНТ позволяет получить хорошее качество моделей: для IL-10 AUC=0,715, для G-CSF AUC=0,713 и для MCP-1 AUC=0,764 (рис. 2а). При этом величина показателя экспрессии CD34 также дала хорошее качество модели (AUC=0,718). Показатели AUC для IL-2 и IFN- $\gamma$  были ниже пороговой величины 0,5, соответствующей неудовлетворительной модели. На рис. 2б видно, что при величине показателя экспрессии CD34>1,0 качество модели для MCP-1 возросло (AUC=0,898) и приобрело статус «очень хорошее качество модели». При показателе экспрессии CD34>1,5 (рис. 2в) качество модели для MCP-1 приобрело статус «отличное качество модели» (AUC=0,988). При показателе экспрессии CD34>2,0 значение AUC модели, базирующейся на показателях MCP-1, возросло до максимально возможного значения, равного 1,000 (рис. 2г). При этом качество ROC-моделей, базирующихся на показателях продукции IL-10 (AUC=0,818) и G-CSF (AUC=0,864), стало очень хорошим, а качество ROC-моделей, базирующейся на показателях экспрессии CD34, практически не изменилось. Дополнительный анализ полученных данных показал, что у пациенток с экспрессией CD34>1,5 % и продукцией MCP-1<5000 пг/мл в 90 % случаев обнаружены метастазы в РЛУ.

### Обсуждение

Метастазы являются одной из основных причин смерти пациенток с РМЖ. Поэтому требуется углубленное понимание различных характеристик рака молочной железы на разных стадиях его развития, чтобы назначить адекватное индивидуальное лечение, улучшить его результаты и своевременно оценить вероятность метастазирования. В последние годы большое развитие получило изучение процессов метастазирования на молекулярно-генетическом уровне. Современные программы геномики рака «Cancer Genome Atlas» и «TRACERx» позволяют отслеживать эволюцию мутационного ландшафта от первичной опухоли к метастазам и строить филогенетические деревья клонов злокачественных клеток [25]. Исследования, проводимые в рамках этих программ, сосредоточены на выявлении мутационных факторов метастазирования и предоставили противоречивые отчеты об эволюции опухоли в сторону злокачественности, выделяя различные эволюционные пути, используемые клетками [26].

Однако сообщения о РМЖ, а также о ряде других видов рака показали, что мутации, приводящие к возникновению первичной опухоли, приводят и к метастазам. И хотя уникальные субклоны опухолевых клеток с высоким метастатическим потенциалом могут быть обнаружены в образцах с метастазами, мутации, которые они содержат, в основном являются попутными, а те, которые конкретно приводят к метастазированию, встречаются редко, поскольку исследования показали большие совпадения в общих факторах, мутационной нагрузке и ландшафте между первичными опухолями и метастазами [27].

Многочисленные крупномасштабные панраковые исследования солидных опухолей не смогли выявить изменения, которые являются уникальными для метастазирования [28, 29]. Факты, полученные в этих исследованиях, позволили предположить, что, скорее всего, эпигенетические изменения в популяциях опухолевых клеток являются основными факторами метастазирования. Вместе с тем, результаты этих исследований еще раз показали, что рост и метастазирование злокачественных опухолей зависят от множества факторов, которые необходимо изучать.

К одному из направлений изучения механизмов, влияющих на опухолевую прогрессию, можно отнести исследование роли цитокинов в этом процессе. Показано, что цитокины, продуцируемые клетками микроокружения опухоли, могут инициировать сигнальные пути, ведущие к активации основных факторов транскрипции (Smads, STAT3 и NF- $\kappa$ B), факторы, индуцирующие процессы эпителиально-мезенхимального перехода (Snail, Twist и Zeb), а также другие регуляторы, влияющие на пролиферативную, ангиогенную и адгезивную активности опухолевых клеток, их способность к миграции и инфильтративному росту [30, 31]. Механизмы, опосредованные цитокинами, могут играть важную роль не только в инициации и прогрессировании рака, но и в активации, дифференцировке различных иммунных клеток, ассоциированных с опухолью, способных как стимулировать, так и ингибировать рост и метастазирование злокачественной опухоли [31].

Различные цитокины могут продуцироваться как самими опухолевыми клетками, так и клетками, формирующими микроокружение опухоли (моноцитами/макрофагами, T- и B-лимфоцитами, клетками эндотелия, фибробластами и другими клетками рыхлой соединительной ткани) [2, 3, 7]. Неоднозначность влияния различных цитокинов на рост и метастазирование РМЖ может быть обусловлена разными пропорциями опухолевых клеток, экспрессирующих рецепторы, взаимодействующие с медиаторами, регулирующими рост опухоли, а также различными уровнями продукции соответствующих цитокинов [4, 5, 7]. Поэтому изучение взаимосвязи между уровнями

продукции цитокинов в опухоли, экспрессией соответствующих рецепторов на опухолевых клетках и на клетках опухолевого микроокружения и гистопатологическими параметрами опухоли имеет важное значение для оценки вероятности рецидива и метастазирования.

Достоверные различия по КЦСБ между группами пациенток с метастазами и без метастазов в РЛУ были выявлены только при изучении продукции 5 из 14 исследованных цитокинов: IL-2, IL-10, G-CSF, IFN- $\gamma$  и MCP-1. Поэтому именно эти цитокины представляли интерес для выявления их роли в оценке вероятности метастазирования в РЛУ. С помощью ROC-анализа КЦСБ IL-2, IL-10, G-CSF, IFN- $\gamma$  и MCP-1 от пациенток с наличием и отсутствием метастазов в РЛУ было показано, что цитокины MCP-1, IL-10 и G-CSF являются наиболее значимыми биологическими маркерами, позволяющими идентифицировать группу больных, у которых отсутствуют метастазы в РЛУ. Это очень важно с практической точки зрения. С помощью ROC-анализа мы также показали, что MCP-1 является биологическим маркером, позволяющим при дополнительном учете величины экспрессии CD34 с большой вероятностью идентифицировать группу больных, не имеющих метастазов в РЛУ. Качество модели для разделения больных на группу без метастазов в РЛУ и, соответственно, на группу с метастазами, основанное на оценке концентрации MCP-1 в супернатантах биоптатов ИКНТ, достигало максимальных значений ( $AUC=1,000$ ) при относительно высоких показателях экспрессии CD34 в ИКНТ.

В настоящей работе также показано, что экспрессия CD34 в образцах ИКНТ, полученных от пациенток с метастазами в РЛУ, находится в обратной корреляционной связи с продукцией MCP-1. Как известно, MCP-1 (CCL2) – это цитокин, относящийся к группе CC-хемокинов ( $\beta$ -хемокинов). Экспрессия MCP-1 выявлена в моноцитах/макрофагах, гранулоцитах, фибробластах, в клетках эндотелия кровеносных и лимфатических сосудов и многих других [32]. Важно при этом отметить, что при раке молочной железы (при протоковой и дольковой карциномах) экспрессия MCP-1 выявлена в 95,83 % случаев (23/24), причем в 58,33 % (14/24) – с высокой и средней степенью экспрессии MCP-1, значительно превышающей показатели экспрессии клеток, относящихся к клеткам микроокружения опухоли [33]. Показано, что CCL2 (MCP-1) может стимулировать процесс лимфогенного метастазирования рака языка посредством активации путей RhoA и Ras1, изменяя цитоскелет опухолевых клеток и стимулируя их пролиферативную и миграционную активность [34]. Возможно, аналогичный механизм может работать и при метастазировании ИКНТ в РЛУ. Это позволяет высказать предположение, что регуляция процесса метастазирования в РЛУ, опосредованная

MCP-1, в значительной степени может зависеть от уровня продукции этого цитокина в опухолевых клетках. Вероятно, не случайно, при изучении биоптатов ИКНТ от пациенток с метастазами в РЛУ были выявлены корреляционные связи между различными гистопатологическими параметрами и КЦСБ MCP-1, а также IL-18, экспрессия которого, согласно последним данным, представленным на международном ресурсе «The Human Protein Atlas», также экспрессируется в опухолевых клетках рака молочной железы в большинстве случаев – 75,0 % (15/20) [35].

Вероятно, MCP-1 может влиять на метастазирование прямо или опосредованно через процессы пролиферации (наличие корреляции между продукцией MCP-1, показателями МТ и экспрессией Ki67) и дифференцировки клеток (наличие корреляции между показателями продукции MCP-1 и количеством НДОК). IL-18 может прямо или опосредованно влиять на процесс метастазирования, на начальные этапы метастазирования (наличие корреляции с количеством внутрисосудистых опухолевых эмболов) и на дифференцировку клеток (наличие корреляции с НДОК, ВДОК и показателем экспрессии HER2/neu). При изучении биоптатов ИКНТ пациенток без метастазов выявлены корреляционные связи между различными гистопатологическими параметрами и КЦСБ IL-2 и G-CSF. Вероятно, такие варианты взаимосвязей обеспечивали более благоприятное течение опухолевого процесса, которое не приводило к образованию метастазов в РЛУ.

### Заключение

Показано, что уровни продукции MCP-1 и экспрессии CD34 в опухоли можно рассматривать как молекулярный прогностический комплекс, оценка параметров которого может с высокой вероятностью указывать на наличие или отсутствие метастазов в РЛУ. Оценка продукции цитокинов IL-10, G-CSF и IL-18 в ИКНТ также может иметь достаточно высокую прогностическую значимость. Поскольку концентрации некоторых цитокинов в супернатанте биоптатов ИКНТ коррелировали с теми или иными гистопатологическими параметрами ИКНТ, то их роль в прогрессии опухоли и метастазировании также несомненна. Корреляции между КЦСБ ИКНТ и различными гистопатологическими параметрами можно рассматривать как показатели возможных взаимозависимых, синхронизированных (однаправленных или реципрокных) изменений активности различных клеточных популяций опухолевого микроокружения, в результате которых одновременно происходит увеличение или уменьшение продукции определенных цитокинов, влияющих на гистопатологические параметры ИКНТ и в конечном итоге на прогрессирование и метастазирование рака молочной железы. Высказано предположение, что



регулирующая роль при метастазировании ИКНТ в РЛУ может принадлежать МСР-1, продуцируемым не только клетками микроокружения опухоли, но и непосредственно самими опухолевыми клетками.

Полученные данные еще раз доказывают, что цитокиновая сеть, формирующаяся в опухоли, очень сложна и, несомненно, заслуживает дальнейшего изучения.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Korkaya H., Orsulic S. Editorial: The tumor microenvironment: Recent advances and novel therapeutic approaches. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 8. doi: 10.3389/fcell.2020.586176.
2. Esquivel-Velazquez M.E., Ostoa-Saloma P., Palacios-Arreola M.I., Nava-Castro K.E., Castro J.I., Montor J.M. The role of cytokines in breast cancer development and progression. *J Interferon Cytokine Res.* 2015; 35(1): 1–16. doi: 10.1089/jir.2014.0026.
3. Panis C., Pavanelli W.R. Cytokines as mediators of pain-related process in breast cancer. *Mediators Inflamm.* 2015. doi: 10.1155/2015/129034.
4. Paccagnella M., Abbona A., Michelotti A., Geuna E., Ruatta F., Landucci E., Denaro N., Vanella P., Lo Nigro C., Galizia D., Merlano M., Garrone O. Circulating cytokines in metastatic breast cancer patients select different prognostic groups and patients who might benefit from treatment beyond progression. *Vaccines (Basel).* 2022; 10(1): 78. doi: 10.3390/vaccines10010078.
5. Yu-Ling L., Hua Z., Xiu-Bao R. Relationship of VEGF/VEGFR with immune and cancer cells: staggering or forward? *Cancer Biol Med.* 2016; 13(2): 206–14. doi: 20.20892/j.issn.2095-3941.2015.0070.
6. Sun Y., Ai X., Shen S., Gu L., Lu S. Detection and correlation analysis of serum cytokines in non-small-cell lung cancer patients with bone and non-bone metastases. *Patient Prefer Adherence.* 2015; 9: 1165–9. doi: 10.2147/PPA.S86605.
7. Chen W., Qin T., Liu S. Cytokines, breast cancer stem cells (BCSCs) and chemoresistance. *Clin Trans Med.* 2018; 7(1): 27. doi: 10.1186/s40169-018-0205-6.
8. Jabeen S., Espinoza J.A., Torland L.A., Zucknick M., Kumar S., Haakensen V.D., Lüders T., Engebraaten O., Børresen-Dale A., Kyte J.A., Gromov P., Naume B., Kristensen V., Gromova I., Tekpli X. Non-invasive profiling of serum cytokines in breast cancer patients and clinicopathological characteristics. *Oncol Immunology.* 2018; 8(2). doi: 10.1080/2162402X.2018.1537691.
9. Kawaguchi K., Sakurai M., Yamamoto Y., Suzuki E., Tsuda M., Kataoka T.R., Hirata M., Nishie M., Nojiri T., Kumazoe M., Saito K., Toi M. Alteration of specific cytokine expression patterns in patients with breast cancer. *Sci Rep.* 2019; 9(1): 2924. doi: 10.1038/s41598-019-39476-9.
10. Engel J., Eckel R., Halfter K., Schubert-Frutschle G., Hölzel D. Breast cancer: emerging principles of metastasis, adjuvant and neoadjuvant treatment from cancer registry data. *J Cancer Res and Clin Oncol.* 2023; 149(2): 721–35. doi:10.1007/s00432-022-04369-4.
11. Gong G., Kwon M. J., Han J., Lee H.J., Lee S.K., Lee J.E., Lee S.H., Park S., Choi J.S., Cho S.Y., Ahn S.H., Lee J.W., Cho S.R., Moon Y., Nam B.H., Nam S.J., Choi Y.L., Shin Y.K. A new molecular prognostic score for predicting the risk of distant metastasis in patients with HR+/HER2- early breast cancer. *Scientific Reports.* 2017; 7. doi:10.1038/srep45554.
12. Zhang K., Luo Z., Zhang Y., Song X., Zhang L., Wu L., Liu J. Long non-coding RNAs as novel biomarkers for breast cancer invasion and metastasis. *Oncology Lett.* 2017; 14(2): 1895–904. doi: 10.3892/ol.2017.6462.
13. Lee K.K., Chng W.J., Jha S. Prognostic biomarkers for breast cancer metastasis. *Cancer Metastasis.* 2018; 96–113. doi: 10.5772/intechopen.80576.
14. Wu X., Baig A., Kasymjanova G., Kafi K., Holcroft C., Mekouar H., Carbonneau A., Bahoric B., Sultanem K., Muanza T. Pattern of local recurrence and distant metastasis in breast cancer by molecular subtype. *Cureus.* 2016; 8(12). doi: 10.7759/cureus.924.
15. Ahmed A.A., Hassen A., Osman N., Elroufaie H. Immunohistochemical expression of angiogenic marker CD34 in invasive carcinoma of the breast. *Eur Acad Res.* 2015; 3(9): 9592–600.
16. Chen Z., Xu S., Xu W., Huang J., Zhang G.U., Lei L., Shao X., Wang X. Expression of cluster of differentiation 34 and vascular endothelial growth factor in breast cancer, and their prognostic significance. *Oncol Lett.* 2015; 10(2): 723–9. doi: 10.3892/ol.2015.3348.
17. Khan A.A., Alam K., Harris H. A Clinicopathological study of CD34 antigen expression in benign and malignant breast lesions. *J Clin Exp Pathol.* 2017; 7(4): 321. doi:10.4172/2161-0681.1000321.
18. Mehdi Hassanpour M., Salybekov A., Kobayashi S., Asahara T. CD34 positive cells as endothelial progenitor cells in biology and medicine. *Front Cell Dev Biol.* 2023; 17: 11: 1128134. doi: 10.3389/fcell.2023.1128134.
19. Chen M., Sun H., Zhao Y., Fu W., Yang L., Gao S., Li L., Jiang H., Jin W. Comparison of patterns and prognosis among distant metastatic breast cancer patients by age groups: A SEER population-based analysis. *Sci Rep.* 2017; 7(1). doi: 10.1038/s41598-017-10166-8.
20. Cai S., Zuo W., Lu X., Gou Z., Zhou Y., Liu P., Pan Y., Chen S. The prognostic impact of age at diagnosis upon breast cancer of different immunohistochemical subtypes: a surveillance, epidemiology, and end results (SEER) population-based analysis. *Front Oncol.* 2020; 10: 1729. doi: 10.3389/fonc.2020.01729.
21. Kondov B., Milenkovič Z., Kondov G., Petrushevska G., Basheska N., Bogdanovska-Todorovska M., Tolevska N., Ivkovski L. Presentation of the molecular subtypes of breast cancer detected by immunohistochemistry in surgically treated patients. *J Med Sci.* 2018; 6(6): 961–7. doi: 10.3889/oamjms.2018.231.
22. Autenshlyus A., Arkhipov S., Kunts T., Marinko I., Mikhailova E., Karpukhina X., Varaksin N. Cytokine profiles of tumor supernatants in invasive ductal cancer and fibroadenoma of the breast and its relationship with VEGF-A expression in the tumors. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2017; 30(1): 83–8. doi: 10.1177/0394632016681306.
23. Agilent [Internet]. ER/PR PharmDx Interpretation Manual. URL: [https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/28252\\_er-pr\\_pharmdx\\_interpretation\\_manual.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/28252_er-pr_pharmdx_interpretation_manual.pdf) [cited 01.12.2023].
24. National Cancer Institute [Internet]. Tumor Grade/ How tumor grade is determined. URL: <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/diagnosis/tumor-grade> [cited 02.12.2023].
25. National Cancer Institute [Internet]. Center for Cancer Genomics. The Cancer Genome Atlas Program (TCGA) <https://www.cancer.gov/ccg/research/genome-sequencing/tcga> [cited 02.12.2023].
26. Gui P., Bivona T.G. Evolution of metastasis: new tools and insights. *Trends Cancer.* 2022; 8(2): 98–109. doi: 10.1016/j.trecan.2021.11.002.
27. Reiter J., Makohon-Moore A., Gerold J., Heyde A., Attiyeh M., Kohutek Z., Tokheim C., Brown A., DeBlasio R., Niyazov J., Zucker A., Karchin R., Kinzler R., Jacobuzio-Donahue C., Vogelstein B., Nowak M. Minimal functional driver gene heterogeneity among untreated metastases. *Science.* 2018; 361(6406): 1033–7. doi: 10.1126/science.aat7171.
28. Bertucci F., Ng C., Patsouris A., Droin N., Piscuoglio S., Carbucaia N., Soria J., Dien A., Adnani Y., Kamal M., Garnier S., Maurice G., Jimenez M., Dogan S., Verret B., Chaffanot M., Bachelot T., Campone M., Lefevre C., Bonnefoi H., Dalenc F., Jacquet A., De Filippo M., Babbar N., Birnbaum D., Filleron T., Tourneau C., Andre F. Genomic characterization of metastatic breast cancers. *Nature.* 2019; 569(7757): 560–4. doi: 10.1038/s41586-019-1056-z.
29. Priestley P., Baber J., Lolkema M., Steeghs N., Bruijn E., Shale C., Duyvesteyn K., Haidari S., Hoeck A., Onstenk W., Roepman P., Voda M., Bloemendal H., Tjan-Heijnen V., Herpen C., Labots M., Witteveen P., Smit E., Sleijfer S., Voest E., Cuppen E. Pan-cancer whole-genome analyses of metastatic solid tumours. *Nature.* 2019; 575(7781): 210–6. doi: 10.1038/s41586-019-1689-y.
30. Markopoulos G., Roupakia E., Marcu K., Kolettas E. Epigenetic regulation of inflammatory cytokine-induced epithelial-to-mesenchymal cell transition and cancer stem cell generation. *Cells.* 2019; 8(10). doi:10.3390/cells8101143.
31. Dai E., Zhu Z., Wahed S., Qu Z., Storkus W.J., Guo Z.S. Epigenetic modulation of antitumor immunity for improved cancer immunotherapy. *Mol Cancer.* 2021; 20(1): 171. doi: 10.1186/s12943-021-01464-x.
32. Singh S., Anshita D., Ravichandiran V. MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. *Int Immunopharmacol.* 2021; 101(Pt B). doi: 10.1016/j.intimp.2021.107598.
33. The Human Protein Atlas [Internet]. CCL2. Breast cancer. URL: [https://www.proteinatlas.org/ENSG00000108691-CCL2/pathology/breast+cancer#imid\\_3293972](https://www.proteinatlas.org/ENSG00000108691-CCL2/pathology/breast+cancer#imid_3293972) [cited 18.11.2023].
34. Dong Y., Zhang S., Zhao S., Xuan M., Zhu G., Zhang Z., Guo W. CCL2 promotes lymphatic metastasis via activating RhoA and Rac1 pathway and predict prognosis to some extent in tongue cancer. *Cancer Biol Ther.* 2023; 24(1). doi: 10.1080/15384047.2023.2205342.
35. The Human Protein Atlas [Internet]. IL18. Breast cancer. URL: [https://www.proteinatlas.org/ENSG00000150782-IL18/pathology/breast+cancer#imid\\_2204142](https://www.proteinatlas.org/ENSG00000150782-IL18/pathology/breast+cancer#imid_2204142) [cited 18.11.2023].

Поступила/Received 13.09.2023

Одобрена после рецензирования/Revised 13.12.2023

Принята к публикации/Accepted 18.12.2023

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Аутеншлюс Александр Исаевич**, доктор биологических наук, профессор, заведующий Центральной научно-исследовательской лабораторией, ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет»; главный научный сотрудник, «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики», ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (г. Новосибирск, Россия). SPIN-код: 1742-2175. ORCID: 0000-0001-7180-010X.

**Архипов Сергей Алексеевич**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, Центральная научно-исследовательская лаборатория, ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет»; старший научный сотрудник, «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики», ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (г. Новосибирск, Россия). E-mail: arhipowsergei@yandex.ru. SPIN-код: 9184-8801. ORCID: 0000-0002-1390-4426.

**Михайлова Елена Семеновна**, научный сотрудник, Центральная научно-исследовательская лаборатория, ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; научный сотрудник, «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики», ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (г. Новосибирск, Россия). ORCID: 0000-0002-8364-819X.

**Архипова Валентина Валериевна**, младший научный сотрудник, Центральная научно-исследовательская лаборатория, ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» (г. Новосибирск, Россия). ORCID: 0009-0000-0172-0905.

**Вараксин Николай Анатольевич**, заведующий лабораторией цитокинов, АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск, Россия). ORCID: 0000-0002-0733-7787.

ВКЛАД АВТОРОВ

**Аутеншлюс Александр Исаевич**: разработка концепции научной работы, планирование научной работы, написание текста статьи, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

**Архипов Сергей Алексеевич**: разработка концепции научной работы, планирование научной работы, дизайн исследования, проведение иммуногистохимического и компьютерного морфометрического анализа, статистическая обработка, написание текста статьи, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

**Михайлова Елена Семеновна**: сбор и анализ полученных данных, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

**Архипова Валентина Валериевна**: сбор и анализ полученных данных, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

**Вараксин Николай Анатольевич**: сбор и анализ полученных данных, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Все авторы одобрили финальную версию статьи перед публикацией, выразили согласие нести ответственность за все аспекты работы, подразумевающую надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой части работы.

**Финансирование**

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

**Конфликт интересов**

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

**Соответствие принципам этики**

*Проведенное исследование соответствует стандартам Хельсинкской декларации, одобрено независимым этическим комитетом Института молекулярной биологии и биофизики (Россия, 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2), протокол № 2016-3 от 15.03.2016 г.*

**Информированное согласие**

*От пациенток получено письменное информированное добровольное согласие на публикацию данных и фотоматериалов в медицинском журнале, включая его электронную версию.*

ABOUT THE AUTHORS

**Alexander I. Autenshlyus**, Professor, Head of Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University; Chief Researcher, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine (Novosibirsk, Russia). ORCID: 0000-0001-7180-010X.

**Sergey A. Arkhipov**, DSc, Leading Researcher, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University; Senior Researcher, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine (Novosibirsk, Russia). E-mail: arhipowsergei@yandex.ru. ORCID: 0000-0002-1390-4426.

**Elena S. Mikhailova**, Researcher, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University; Researcher, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine (Novosibirsk, Russia). ORCID: 0000-0002-8364-819X.

**Valentina V. Arkhipova**, Junior Researcher, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University (Novosibirsk, Russia). ORCID: 0009-0000-0172-0905.

**Nikolay A. Varaksin**, Head of Cytokine Laboratory, Vector-Best (Novosibirsk, Russia). ORCID: 0000-0002-0733-7787.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

**Alexander I. Autenshlyus**: study conception and design, writing of the article, critical revision of the manuscript for important intellectual content.

**Sergey A. Arkhipov**: study conception and design, immunohistochemical and computer morphometric analysis, statistical processing, writing of the article, critical revision with the introduction of valuable intellectual content.

**Elena S. Mikhailova**: data collection and analysis, critical revision with the introduction of valuable intellectual content.

**Valentina V. Arkhipova**: data collection and analysis, critical revision with the introduction of valuable intellectual content.

**Nikolay A. Varaksin**: data collection and analysis, critical revision with the introduction of valuable intellectual content.

All authors approved the final version of the manuscript prior to publication and agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work were appropriately investigated and resolved.

#### **Funding**

*The study was funded within the framework of the state task (no. AAAAA-A18-118030790008-7) of the Ministry of Health of the Russian Federation.*

#### **Conflict of interests**

*The authors declare that they have no conflict of interest.*

#### **Compliance with Ethical Standards**

*The study was conducted in accordance with ethical principles outlined in the Declaration of Helsinki approved by Ethics Committee of Institute of Molecular Biology and Biophysics (2, Timakova St., Novosibirsk, 630117, Russia), protocol No. 2016-3 dated March 15, 2016.*

#### **Voluntary informed consent**

*Written informed voluntaries consents were obtained from the patients for the publication of data and photographs in medical journal.*