

# ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ БИОПТАТАМИ ИНВАЗИВНОЙ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ТИПА КАК КРИТЕРИЙ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АЦЕТИЛ-АМИДНОЙ ФОРМЫ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА HLDF-6 ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩЕЙ ТЕРАПИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Мангазеева Е.Д.<sup>1,2</sup>, Студеникина А.А.<sup>1,2</sup>, Михайлова Е.С.<sup>1,2</sup>,  
Морозов Д.В.<sup>3</sup>, Рыжикова С.Л.<sup>4</sup>, Дружинина Ю.Г.<sup>4</sup>, Проскура А.В.<sup>2</sup>,  
Богачук А.П.<sup>5</sup>, Липкин В.М.<sup>5</sup>, Аутеншлюс А.И.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> ГБУЗ Новосибирской области «Городская клиническая больница № 1», г. Новосибирск, Россия

<sup>4</sup> АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия

<sup>5</sup> ФГБУН «Государственный научный центр «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук», Москва, Россия

**Резюме.** Одним из перспективных направлений в терапии онкологических заболеваний является дифференцирующая терапия, направленная на использование агентов, повышающих степень дифференцировки опухолевых клеток и снижающих тем самым злокачественный потенциал неоплазмы. Одним из таких веществ является ацетил-амидная форма синтетического пептида HLDF-6. Ранее было установлено, что пептид способствует снижению относительного содержания низкодифференцированных клеток в биоптатах рака молочной железы. Однако механизмы влияния пептида на клет-

## Адрес для переписки:

Мангазеева Екатерина Дмитриевна  
ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный  
медицинский университет» Министерства  
здравоохранения РФ  
630091, Россия, г. Новосибирск, Красный пр., 52.  
Тел.: 8 (383) 226-35-60.  
E-mail: lpciip@211.ru

## Address for correspondence:

Ekaterina D. Mangazeeva  
Novosibirsk State Medical University  
52 Krasny Ave  
Novosibirsk  
630091 Russian Federation  
Phone: +7 (383) 226-35-60.  
E-mail: lpciip@211.ru

## Образец цитирования:

Е.Д. Мангазеева, А.А. Студеникина, Е.С. Михайлова,  
Д.В. Морозов, С.Л. Рыжикова, Ю.Г. Дружинина,  
А.В. Проскура, А.П. Богачук, В.М. Липкин,  
А.И. Аутеншлюс «Продукция цитокинов биоптатами  
инвазивной карциномы молочной железы  
неспецифического типа как критерий использования  
ацетил-амидной формы синтетического пептида  
HLDF-6 для дифференцирующей терапии рака  
молочной железы» // Медицинская иммунология, 2025.  
Т. 27, № 4. С. 739-748.  
doi: 10.15789/1563-0625-CPB-3147

© Мангазеева Е.Д. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

## For citation:

E.D. Mangazeeva, A.A. Studenikina, E.S. Mikhailova,  
D.V. Morozov, S.L. Ryzhikova, Yu.G. Druzhinina,  
A.V. Proskura, A.P. Bogachuk, V.M. Lipkin, A.I. Autenshlyus  
“Cytokine production by the bioplates of invasive non-  
specific breast carcinoma as a criterion for the use of acetyl-  
amide form of synthetic HLDF-6 peptide for differentiation  
therapy of breast cancer”, Medical Immunology (Russia)/  
Meditsinskaya Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 4,  
pp. 739-748.  
doi: 10.15789/1563-0625-CPB-3147

© Mangazeeva E.D. et al., 2025

The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-CPB-3147

ки опухоли и ее микроокружения остаются неизвестными. Не исключено, что вектором приложения действия пептида является его воздействие на функциональную активность опухоли. Целью исследования явилось изучение влияния ацетил-амидной формы синтетического пептида HLDF-6 на продукцию цитокинов биоптатами инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа. Проведен морфометрический анализ биоптатов, полученных у 40 женщин, больных инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа, до и после воздействия ацетил-амидной формы синтетического пептида HLDF-6. Для оценки эффекта от изучаемого пептида предложена оценка индекса влияния HLDF-6, выраженная в условных единицах (у. е.). Показатель ИВ-HLDF-6 0,9 у. е. и менее принят за значимый эффект. В зависимости от величины индекса, пациентки были разделены на две группы. Первую группу составили 27 человек со значимым эффектом от воздействия изучаемого пептида, вторую – 13 пациенток без значимого эффекта. Параллельно в супернатантах биоптатов до и после инкубации с изучаемым пептидом определяли концентрации TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , VEGF, G-CSF, GM-CSF, MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18 и IL-1 $\beta$  с помощью иммуноферментного метода. Индекс влияния ИВ-HLDF-6-cytokine, выраженный в условных единицах (у. е.), отражал влияние ацетил-амидной формы синтетического пептида HLDF-6 на продукцию цитокинов биоптатами опухоли. Исследование показало, что спонтанная продукция GM-CSF в первой группе достоверно ниже, чем во второй. Однако при воздействии исследуемого пептида концентрация этого цитокина значительно нарастает именно группе I по сравнению с группой II, о чем говорит статистически значимое различие в ИВ-HLDF-6-GM-CSF. По результатам ROC-анализа получено хорошее качество модели при изучении ИВ-HLDF-6-GM-CSF и относительного содержания низкодифференцированных клеток, что может послужить основой для использования этого показателя в качестве точки отсечки, используемой для отбора пациенток, которые могут являться кандидатами для дифференцирующей терапии ацетил-амидной формой синтетического пептида HLDF-6.

*Ключевые слова:* рак молочной железы, биоптаты, цитокины, молекулярно-биологические подтипы, клеточная дифференцировка, синтетический пептид HLDF-6

## CYTOKINE PRODUCTION BY THE BIOPTATES OF INVASIVE NON-SPECIFIC BREAST CARCINOMA AS A CRITERION FOR THE USE OF ACETYL-AMIDE FORM OF SYNTHETIC HLDF-6 PEPTIDE FOR DIFFERENTIATION THERAPY OF BREAST CANCER

Mangazeeva E.D.<sup>a, b</sup>, Studenikina A.A.<sup>a, b</sup>, Mikhailova E.S.<sup>a, b</sup>,  
Morozov D.V.<sup>c</sup>, Ryzhikova S.L.<sup>d</sup>, Druzhinina Yu.G.<sup>d</sup>, Proskura A.V.<sup>b</sup>,  
Bogachuk A.P.<sup>e</sup>, Lipkin V.M.<sup>e</sup>, Autenshlyus A.I.<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Institute of Molecular Biology and Biophysics of Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>c</sup> City Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>d</sup> JSC Vector-Best, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>e</sup> Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** Differentiation therapy is a promising direction in treatment of oncological diseases. It is based on usage of agents that increase the degree of tumour cell differentiation, and thereby reduce the malignant potential of the neoplasm. Such effects are shown for the acetyl-amide form of the synthetic peptide HLDF-6. The peptide was previously found to reduce the relative content of low-differentiated cells in breast cancer biopsy specimens. However, the mechanisms of the peptide's effect on tumour cells and its microenvironment remain

unknown. The effect of this peptide may be associated with altered functional activity of the tumour. The aim of our study was to investigate the effect of acetyl-amide form of synthetic HLDF-6 peptide on cytokine production by bioplates of invasive non-specific breast carcinoma. Morphometric analysis of bioplates obtained from 40 women with invasive breast carcinoma of nonspecific type before and after exposure to acetyl-amide form of synthetic peptide HLDF-6 was performed. To evaluate the effect of this peptide, we proposed an estimated index for HLDF-6 effect being expressed in conventional units (c. u.). The index of HLDF-6 influence of 0.9 c. u. and less is accepted as a significant effect. Depending on the index value, the patients were divided into two groups. The first group consisted of 27 patients with a significant effect of the studied peptide, the second group consisted of 13 patients without a significant effect. Concentrations of TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , VEGF, G-CSF, GM-CSF, MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18 and IL-1 $\beta$  were determined in parallel in supernatants of bioplates before and after incubation with the studied peptide using the enzyme immunoassay technique. The influence (effect) index, IE-HLDF-6-cytokine, expressed in conventional units (c. u.), reflected the effect of the acetyl-amide form of the synthetic HLDF-6 peptide on cytokine production by tumour bioplates. The study showed that spontaneous production of GM-CSF in the first group was significantly lower than in the second group. However, the concentration of this cytokine under the influence of HLDF-6 peptide significantly increases in group I in comparison with group II, as evidenced by statistically significant difference in IE-HLDF-6-cytokine. According to the results of ROC-analysis, a good model quality was obtained in the study of IE-HLDF-6-GM-CSF and relative content of low-differentiated cells, which may serve as a basis for using this index as a cut-off point used for selection of patients who may be candidates for differentiation therapy with acetyl-amide form of synthetic peptide HLDF-6.

*Keywords: breast cancer, tumor biopsies, cytokines, molecular subtypes, cell differentiation, synthetic peptide HLDF-6*

## Введение

Стадирование по TNM и гистологическая классификация являются хорошо известными и широко используемыми маркерами при выборе тактики лечения и определении прогноза у пациентов с онкологическими заболеваниями, в том числе и при раке молочной железы (РМЖ) [12]. Известно также, что степень дифференцировки клеток опухоли является важным показателем опухолевой прогрессии. Чем больше в опухоли низкодифференцированных клеток, тем большим злокачественным потенциалом она обладает [2, 7]. Поэтому одним из направлений в современной терапии злокачественных новообразований является поиск агентов, влияющих на дифференцировку опухолевых клеток [8]. Одним из таких веществ является ацетил-амидная форма синтетического пептида HLDF-6, представляющая собой химически синтезированный шестичленный фрагмент фактора дифференцировки клеток линии HL-60 промиелоцитарного лейкоза человека HLDF. Ранее в нашей лаборатории было показано влияние пептида на степень дифференцировки клеток инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа (ИКНТ). Установлено, что ацетил-амидная форма синтетического пептида HLDF-6 способствует снижению относительного содержания низкодифференцированных клеток в биоптатах ИКНТ [1]. Однако остаются неизвестными механизмы влияния пептида на РМЖ.

Одним из векторов приложения действия дифференцирующего агента может стать его влияние на функциональную активность клеток опухоли и ее микроокружения. По данным литературы известна неоднозначная роль иммунной системы в противоопухолевом ответе организма [4]. Иммунный ответ с точки зрения прогрессирования опухолевого процесса может как ослаблять, так и усиливать инвазивность неоплазмы [9]. Клетки микроокружения и опухолевые клетки используют различные цитокины в качестве химических мессенджеров для обеспечения межклеточной коммуникации. Цитокины, действуя аутокринно или паракринно, участвуют в иммунном ответе в качестве провоспалительных либо противовоспалительных, а также про- и противоонкогенных эффекторов в зависимости от микроокружения. Различные типы цитокинов могут действовать по отдельности, потенцировать либо ослаблять действие друг друга, формировать цитокиновые сети, регулируя тем самым иммунные реакции, а следовательно, и злокачественную прогрессию [16].

**Цель исследования** — изучение продукции цитокинов биоптатами ИКНТ под влиянием ацетил-амидной формы синтетического пептида HLDF-6.

## Материалы и методы

Материалом исследования служили образцы ИКНТ II степени злокачественности 40 женщин в возрасте 33-87 лет, средний возраст 62 года, ко-

торым было проведено хирургическое лечение на базе маммологического отделения ГКБ № 1 г. Новосибирска. В исследование включали пациенток, не имеющих отдаленных метастазов, обострений хронических заболеваний, а также без проведения неоадьювантной терапии. Сведения о стадировании по TNM и гистологической градации предоставлены патологоанатомом. Все пациентки имели размер опухоли T1-T2 и G2-дифференцировку опухоли.

Образцы опухолей объемом 8 мм<sup>3</sup>, полученные от каждой пациентки методом трепанобиопсии помещали в два флакона и инкубировали при температуре 37 °С в течение 72 ч. При этом первый флакон содержал только 1 мл питательной среды DMEM-F12. А во втором флаконе помимо 1 мл питательной среды DMEM-F12 содержалось 20 мкг ацетил-амидной формы синтетического пептида HLDF-6. После инкубирования образцы опухолей извлекали из среды и фиксировали в 10%-ном растворе формалина для проведения дальнейшего патогистологического исследования. Из зафиксированных в парафин образцов готовили серийные срезы толщиной 4-5 мкм, которые затем окрашивали гематоксилином-эозином. Исследование проводили с помощью световой микроскопии на базе микроскопа Micros MC 300A с использованием объектива ×40. Для проведения морфометрического анализа с использованием цифровой камеры CX 13c (Baumer Electric GmbH, Германия) и программного обеспечения ImageJ 1.42g (Национальный институт здоровья, США) получали 5 микрофотографий каждого образца (2 образца от каждой пациентки). Каждая микрофотография оценивалась с учетом Ноттингемской градирующей системы [14]. При этом такой показатель как относительное содержание низкодифференцированных клеток является самым значимым, поскольку он наиболее четко отражает степень злокачественности опухоли [2]. Низкодифференцированные клетки отличались выраженным ядерным полиморфизмом, высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, наличием большого количества патологических митозов. Для оценки эффекта ацетил-амидной формы синтетического пептида HLDF-6 в каждой паре образцов рассчитывался индекс влияния изучаемого пептида равный отношению процента низкодифференцированных клеток после инкубации образцов с пептидом к проценту низкодифференцированных клеток без инкубации (ИБ-HLDF-6). ИБ-HLDF-6 выражен в условных единицах (у. е.). Значение ИБ-HLDF-6 0,9 у. е. и менее принято как выраженный эффект.

В соответствии с величиной ИБ-HLDF-6 пациентки были разделены на две группы. Первую группу составили 27 человек, у которых ИБ-

HLDF-6 ≤ 0,9 у. е., во вторую группу вошли 13 пациенток с ИБ-HLDF-6 > 0,9 у. е.

Для определения функциональной активности клеток опухоли и микроокружения в биоптатах обеих групп были определены спонтанная и индуцированная ацетил-амидной формой синтетического пептида HLDF-6 продукция цитокинов. Для этого после инкубирования и извлечения биоптатов (см. выше) клетки осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 900 g и 25 °С. В полученных после осаждения клеток супернатантах при помощи наборов для твердофазного иммуноферментного анализа производства АО «Вектор-Бест» (Россия) определяли концентрацию следующих цитокинов: TNFα, IFNγ, VEGF, G-CSF, GM-CSF, MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18 и IL-1β. Индекс влияния ИБ-HLDF-6-cytokine, выраженный в условных единицах (у. е.), отражал влияние ацетил-амидной формы синтетического пептида HLDF-6 на продукцию цитокинов биоптатами опухоли. Показатель высчитывали по формуле: ИБ-HLDF-6-cytokine = А/Б, где А – концентрация цитокина в супернатанте биоптата при воздействии синтетического пептида HLDF-6, а Б – концентрация цитокина в супернатанте биоптата без его воздействия – спонтанная продукция цитокина (СП). Для статистической обработки результатов использовали программный пакет SPSS v22.0 for Windows. Анализ проведен с использованием непараметрического критерия U Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при p < 0,05. Показатели выражали в виде медианы (Me), нижнего и верхнего квартилей (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>). Кроме того, проведен корреляционный анализ по Спирмену. Для определения точки отсчета концентрации цитокинов и оценки качества моделей использован ROC-анализ.

## Результаты

Корреляционные связи, полученные при изучении сопряженности относительного содержания низкодифференцированных клеток в изучаемых образцах со спонтанной и индуцированной ацетил-амидной формой синтетического пептида HLDF-6 продукцией цитокинов представлены в таблице 1. Так, в частности, установлено, что процент низкодифференцированных клеток после воздействия ацетил-амидной формы синтетического пептида находится в прямой корреляционной связи со спонтанной и стимулированной пептидом продукцией IL-6. Из данных литературы известно проонкогенное действие этого цитокина при РМЖ. Описана его способность потенцировать пролиферацию и миграцию опухолевых клеток, а следовательно, прогрессию и метастазирование опухоли [6]. Обратная корреля-

**ТАБЛИЦА 1. КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ СВЯЗИ МЕЖДУ СПОНТАННОЙ, СТИМУЛИРОВАННОЙ АЦЕТИЛ-АМИДНОЙ ФОРМОЙ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА HUMAN LEUKEMIA DIFFERENTIATION FACTOR (HLDF-6) ПРОДУКЦИЕЙ ЦИТОКИНОВ И ОТНОСИТЕЛЬНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ НИЗКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ ИНВАЗИВНОЙ КАРЦИНОМОЙ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ТИПА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

TABLE 1. CORRELATIONS BETWEEN SPONTANEOUS, STIMULATED BY ACETYL-AMIDE FORM OF A SYNTHETIC PEPTIDE HUMAN LEUKEMIA DIFFERENTIATION FACTOR (HLDF-6) CYTOKINE PRODUCTION AND THE RELATIVE CONTENT OF LOW-GRADE CELLS IN PATIENTS WITH INVASIVE CARCINOMA OF A NON-SPECIFIC TYPE OF BREAST

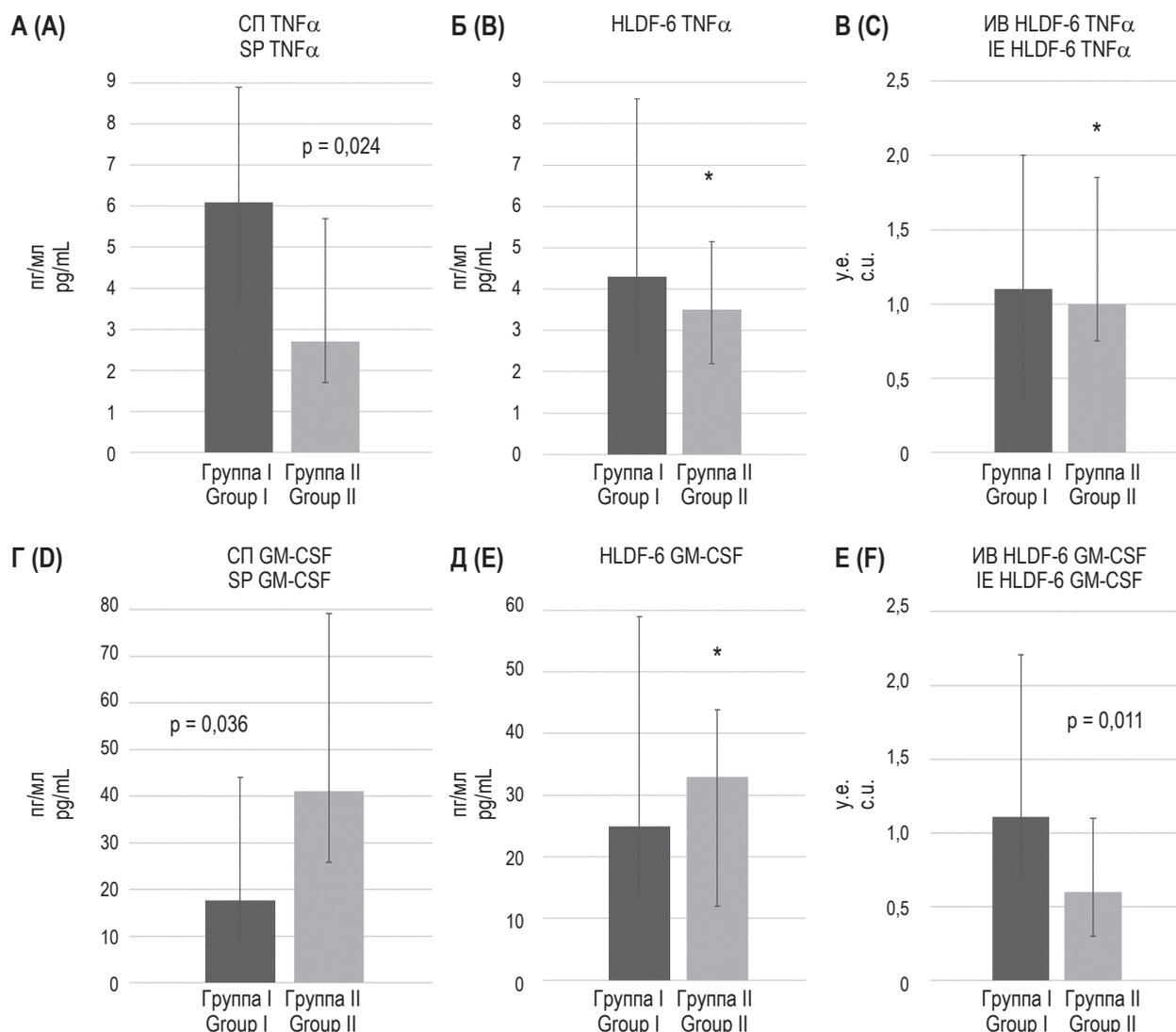
	<b>Исследуемые параметры</b> Investigated parameters	<b>Коэффициент корреляции r (p)</b> Correlation coefficient r (p)
<b>СП IL-17</b> Sp IL-17	<b>Относительное содержание низкодифференцированных клеток</b> Relative content of low-grade cells	0,477 (0,002)
<b>СП G-CSF</b> Sp-G-CSF		-0,627 (0,00001)
<b>СП IL-6</b> Sp-IL-6	<b>Относительное содержание низкодифференцированных клеток после инкубации с HLDF-6</b> Relative content of low-grade cells after incubation with HLDF-6	0,458 (0,003)
<b>СП IL-17</b> Sp-IL-17		0,453 (0,003)
<b>СП TNF<math>\alpha</math></b> Sp-TNF $\alpha$		-0,403 (0,009)
<b>HLDF-6 IL-6</b>		0,417 (0,007)
<b>HLDF-6 IL-8</b>		-0,411 (0,008)
<b>HLDF-6 TNF<math>\alpha</math></b>		-0,448 (0,003)

Примечание. Коэффициент ранговой корреляции рассчитывался по Спирмену.

Note. The rank correlation coefficient was calculated by Spearman.

ляционная связь наблюдается между относительным содержанием низкодифференцированных клеток после воздействия изучаемого пептида и спонтанной, а также индуцированной продукцией TNF $\alpha$ . Следует отметить, что анализ значений спонтанной продукции TNF $\alpha$  клетками опухоли и ее микроокружения у пациенток в исследуемых группах статистически значимо различался (рис. 1). Полученные данные свидетельствуют об исходно более высокой концентрации данного цитокина в супернатанте опухоли у пациенток, которые положительно отвечали на воздействие дифференцирующего агента. Также исследование выявило статистически значимую разницу между спонтанной и стимулированной ацетил-амидной формой синтетического пептида HLDF-6 концентрацией GM-CSF. Так, спонтанная продукция гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора в первой группе была достоверно ниже, чем во второй. Однако при воздействии исследуемого пептида концентрация GM-CSF значительно возросла именно в группе I по сравнению с группой II, о чем говорит статистически значимое различие

в ИВ-HLDF-6-cytokine на продукцию этого цитокина. Такие результаты скорее всего отражают потенциал клеток опухоли и ее микроокружения к синтезу данного цитокина при воздействии дифференцирующего агента. Для выявления когорты пациенток, которым показано использование ацетил-амидной формы синтетического пептида HLDF-6 в качестве дифференцирующей терапии, изучаемые группы были проанализированы более детально. В частности, произведена оценка каждой группы по принадлежности к тому или иному молекулярному подтипу РМЖ. В соответствии с действующими клиническими рекомендациями выбор терапевтической стратегии невозможен без определения молекулярного подтипа РМЖ. Выделяют 5 основных молекулярных подтипов РМЖ: люминальный А; люминальный В HER2-отрицательный; люминальный В HER2-положительный; HER2-положительный не люминальный и тройной негативный РМЖ [3]. Более того, известна интратуморальная неоднородность даже внутри одного молекулярного подтипа [15]. Эта черта наиболее характерна для нелюминальных, в частности для тройного



**Рисунок 1.** Спонтанная и стимулированная ацетил-амидной формой синтетического пептида Human Leukemia Differentiation Factor (HLDF-6) продукция цитокинов, а также индекс влияния (ИБ-HLDF-6) на продукцию цитокинов биоптатами инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа (ИКНТ) при различной реакции клеток опухоли на дифференцирующую активность HLDF-6

Примечание. \* – недостоверные различия ( $p \geq 0,05$ ); группа I – с реакцией на HLDF-6, группа II – без реакции на HLDF-6.

Figure 1. Spontaneous and stimulated by acetyl-amide form of synthetic peptide Human Leukemia Differentiation Factor (HLDF-6) production of cytokines, as well as Indices of effect of the HLDF (IEHLDF-6) on the production of cytokines in biopates of invasive breast carcinoma of a nonspecific type (IBC NST) with different reactions of tumor cells to the differentiating activity of HLDF-6.

Note. \*, unreliable differences ( $p \geq 0.05$ ); group I, with reaction to HLDF-6; group II, without reaction to HLDF-6.

негативного РМЖ, что обуславливает его наибольшую злокачественность по сравнению с люминальными подтипами [10]. При анализе исследуемых групп по точному критерию Фишера обнаружено, что в группе I встречаемость люминальных форм РМЖ достоверно выше ( $p = 0,046$ ). Так, среди пациенток с эффектом от воздействия ацетил-амидной формы синтетического пептида HLDF-6 в основном преобладали люминальные формы РМЖ: 24 из 27 пациенток в группе относились к люминальным подтипам, что составило 89%. В частности, 14 имели люминальный А,

9 – люминальный В HER2-отрицательный и 1 – люминальный В HER2-положительный подтип. Оставшиеся три пациентки отнесены к нелюминальным подтипам (2 – тройной негативный подтип и 1 HER2-положительный не люминальный подтип). Тогда как в группе пациенток, у которых ацетил-амидная форма синтетического пептида HLDF-6 не оказывала эффекта (13 пациенток), была более гетерогенной по составу молекулярных подтипов. Из 13 пациенток в группе I, 5 имели нелюминальный, а именно тройной негативный подтип, что составило 39%.

Оставшиеся 8 пациенток отнесены к люминальным подтипам: 4 с люминальным А и 4 с люминальным В HER2-отрицательным подтипом. Кроме того, были проанализированы группы по наличию метастатических очагов в регионарных лимфатических узлах. Оказалось, что по точному критерию Фишера ( $p = 0,047$ ) в группе с эффектом от влияния изучаемого пептида встречаемость пациенток без лимфогенного метастазирования была выше. Среди них преобладали пациентки без метастатических очагов в регионарных лимфатических узлах (21 из 27 пациенток, что составило 78%). Еще у 4 пациенток обнаруживалось поражение 1 регионарного лимфатического узла, и у 2 – поражение двух регионарных лимфатических узлов. Тогда как группа пациенток, у которых ацетил-амидная форма синтетического пептида HLDF-6 не оказывала эффекта, включала 6 из 13 пациенток с лимфогенным метастазированием, что составило 46%. Из них одиночный метастаз обнаружен у двух человек, 2 метастаза – у двух и более 4 метастазов – у двух человек. Еще у 7 пациенток не обнаруживалось поражения регионарных лимфатических узлов.

## Обсуждение

В ходе проведенного нами исследования было установлено, что влияние ацетил-амидной формы синтетического пептида HLDF-6 на ИКНТ неоднородно. В соответствии с полученными результатами эффект от воздействия пептида обусловлен принадлежностью РМЖ к тому или иному молекулярному подтипу, выраженностью лимфогенного метастазирования, а также функциональной активностью клеток опухоли и ее микроокружения. При изучении влияния ацетил-амидной формы синтетического пептида HLDF-6 на продукцию цитокинов у пациенток из группы с эффектом от воздействия изучаемого пептида по сравнению с группой без эффекта обнаружен потенциал к синтезу гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора GM-CSF при воздействии дифференцирующего агента, о чем свидетельствует статистически значимое изменение ИВ-HLDF-6-cytokine на продукцию этого цитокина. Роль GM-CSF в туморогенезе неоднозначна. Как следует из названия, этот цитокин способствует образованию нейтрофилов, макрофагов, моноцитов и дендритных клеток из гемопоэтических клеток предшественников. В то же время GM-CSF регулирует активность эпителиальных и эндотелиальных клеток. В свою очередь, этот цитокин продуцируется различными клетками в ответ на иммунные стимулы. Так, например, IL-10 подавляет выработку GM-CSF, тогда как IL-6, напротив, способствует синтезу

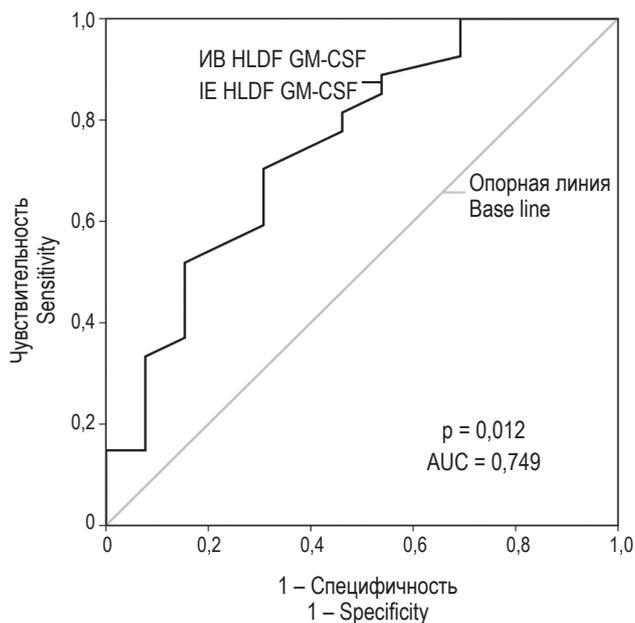


Рисунок 2. ROC-кривая, характеризующая качество ROC-модели при изучении индекса влияния ацетил-амидной формы синтетического пептида HLDF-6 на продукцию GM-CSF (ИВ-HLDF-6-GM-CSF) и относительного содержания низкодифференцированных клеток в группе I (с эффектом от воздействия пептида)

Примечание. \* – значения площади под кривой (AUC): 0,9-1 – отличное качество модели; 0,8-0,9 – очень хорошее качество модели; 0,7-0,8 – хорошее качество модели; 0,6-0,7 – среднее качество модели; 0,5-0,6 – неудовлетворительное качество модели.

Figure 2. ROC curve characterizing the quality of the ROC model when studying the index of the influence of the acetyl-amide form of the synthetic peptide HLDF-6 on the production of GM-CSF (IE-HLDF-6-GM-CSF) and the relative content of low differentiated cells in group I (with the effect of influence of the peptide)

Note. \*, area under the curve (AUC) values: 0.9-1, excellent model quality; 0.8-0.9, very good quality of the model; 0.7-0.8, good quality model; 0.6-0.7, average quality of the model; 0.5-0.6, unsatisfactory quality of the model.

фактора [11]. Таким образом, в зависимости от формирующихся цитокиновых цепей GM-CSF может как усиливать, так и подавлять иммунный ответ при раке. В литературе описано прямое ингибирующее действие цитокина на стволовые раковые клетки, а также способность препятствовать ангиогенезу через воздействие на VEGF [4]. Имеются сведения об использовании данного цитокина в качестве вспомогательного средства в иммунотерапии РМЖ [13]. С целью определения точки отсчета ИВ-HLDF-6-GM-CSF как критерия для использования ацетил-амидной формы синтетического пептида HLDF-6 в качестве дифференцирующего агента при терапии РМЖ

был проведен ROC-анализ. При анализе ROC-кривых (AUC 0,749 – хорошее качество модели,  $p = 0,012$ ) обнаружено, что превышение установленных пороговых значений соответствовало наличию эффекта от воздействия изучаемого пептида, т. е. снижению относительного содержания низкодифференцированных клеток в образцах РМЖ, тогда как значения ниже пороговой отсечки – отсутствию эффекта пептида на процент низкодифференцированных клеток (рис. 2). Чувствительность показателя составила 70%, специфичность – 70%. На основании проведенных расчетов было предложено использование ИВ-HLDF-6-GM-CSF более 0,75 как показателя, применяемого для отбора когорты пациенток в качестве кандидаток для дифференцирующей терапии ацетил-амидной формой синтетического пептида HLDF-6.

## Заключение

Результаты настоящего исследования показали, что ацетил-амидная форма синтетиче-

ского пептида HLDF-6 оказывает выраженное дифференцирующее действие на клетки ИКНТ, что проявляется снижением относительного содержания низкодифференцированных клеток и изменением цитокинового спектра опухоли. Эффект пептида ассоциирован с принадлежностью опухоли к люминальным молекулярным подтипам, с отсутствием или минимальной выраженностью лимфогенного метастазирования, а также с потенциалом клеток опухоли и ее микроокружения к продукции GM-CSF. Проведенный ROC-анализ позволяет рассматривать индекс влияния HLDF-6 на продукцию GM-CSF (ИВ-HLDF-6-GM-CSF > 0,75) как потенциальный прогностический критерий эффективности применения пептида. Таким образом, полученные *in vitro* данные открывают перспективы для дальнейших *in vivo* исследований, направленных на оценку терапевтического эффекта HLDF-6 и обоснование его клинического применения в составе персонализированных схем лечения РМЖ.

## Список литературы / References

1. Аутеншлюс А.И., Жураковский И.П., Маринкин И.О., Богачук А.П., Липкин В.М. Средство, снижающее относительное содержание низкодифференцированных и повышающее относительное содержание высокодифференцированных клеток в инвазивной карциноме молочной железы неспецифического типа. Патент № 2786528 С1, 21.12.2022. [Autenshlus A.I., Zhurakovskiy I.P., Marinkin I.O., Bogachuk A.P., Lipkin V.M. A remedy that reduces the relative content of low-differentiated and increases the relative content of highly differentiated cells in invasive breast carcinoma of a non-specific type. Patent No. 2786528 C1, 21.12.2022].
2. Пауков В.С. Клиническая патология. М.: Литтерра, 2018. 768 с. [Paukov V.S. Clinical pathology]. Moscow: Litterra, 2018. 768 p.
3. Поспехова Н.И., Головина Д.А., Филиппова М.Г., Семьянихина А.В., Дранко С.Л., Данишевич А.М., Строганова А.М. Молекулярно-биологические подтипы рака молочной железы у носителей мутаций в гене BRCA1 // Успехи молекулярной онкологии, 2020. Т. 7, № 4. С. 29-36. [Pospekhova N.I., Golovina D.A., Filippova M.G., Semyanikhina A.V., Dranko S.L., Danishevich A.M., Stroganova A.M. Molecular biological subtypes of breast cancer in brca1 mutation carriers. *Uspekhi sovremennoy biologii = Biology Bulletin Reviews*, 2020, Vol. 7, no. 4, pp. 29-36. (In Russ.)]
4. Becher B., Tugues S., Greter M. GM-CSF: From growth factor to central mediator of tissue inflammation. *Immunity*, 2016, Vol. 4, no. 5, pp. 963-973.
5. Cruceriu D., Baldasici O., Balacescu O., Berindan-Neagoe I. The dual role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in breast cancer: molecular insights and therapeutic approaches. *Cell. Oncol. (Dordr.)*, 2020, Vol. 43, no. 1, pp. 1-18.
6. Erez N., Glanz S., Raz Y., Avivi C., Barshack I. Cancer Associated Fibroblasts express pro-inflammatory factors in human breast and ovarian tumors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2013, Vol. 437, no. 3, pp. 397-402.
7. Erić I., Petek Erić A., Kristek J., Koprivčić I., Babić M. Breast cancer in young women: pathologic and immunohistochemical features. *Acta Clin. Croat.*, 2018, Vol. 57, no. 3, pp. 497-502.
8. Fotinós J., Barberis L., Condat C.A. Effects of a differentiating therapy on cancer-stem-cell-driven tumors. *J. Theor. Biol.*, 2023, Vol. 572, 111563. doi: 10.1016/j.jtbi.2023.111563.
9. Habanjar O., Bingula R., Decombat C., Diab-Assaf M., Caldefie-Chezet F., Delort L. Crosstalk of inflammatory cytokines within the breast tumor microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 4, 4002. doi: 10.3390/ijms24044002.
10. Howard F.M., Olopade O.I. Epidemiology of triple-negative breast cancer: a review. *Cancer J.*, 2021, Vol. 27, no. 1, pp. 8-16.
11. Kumar A., Taghi Khani A., Sanchez Ortiz A., Swaminathan S. GM-CSF: A double-edged sword in cancer immunotherapy. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 901277. doi: 10.3389/fimmu.2022.901277.
12. Li J., Chen Z., Su K., Zeng J. Clinicopathological classification and traditional prognostic indicators of breast cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2015, Vol. 8, no. 7, pp. 8500-8505.

13. Mihalik N.E., Steinberger K.J., Stevens A.M., Bobko A.A., Hoblitzell E.H., Tseytlin O., Akhter H., Dziadowicz S.A., Wang L., O'Connell R.C., Monaghan K.L., Hu G., Mo X., Khramtsov V.V., Tseytlin M., Driesschaert B., Wan E.C.K., Eubank T.D. Dose-specific intratumoral GM-CSF modulates breast tumor oxygenation and antitumor immunity. *J. Immunol.*, 2023, Vol. 211, no. 10, pp. 1589-1604.
14. Rakha E.A., Reis-Filho J.S., Baehner F., Dabbs D.J., Decker T., Eusebi V., Fox S.B., Ichihara S., Jacquemier J., Lakhani S.R., Palacios J., Richardson A.L., Schnitt S.J., Schmitt F.C., Tan P.H., Tse G.M., Badve S., Ellis I.O. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res.*, 2010, Vol. 12, no. 4, 207. doi: 10.1186/bcr2607.
15. Turner K.M., Yeo S.K., Holm T.M., Shaughnessy E., Guan J.L. Heterogeneity within molecular subtypes of breast cancer. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2021, Vol. 321, no. 2, pp. 343-354.
16. Yang Z., Zeng H., Li J., Zeng N., Zhang Q., Hou K., Li J., Yu J., Wu Y. Dissecting the emerging role of cancer-associated adipocyte-derived cytokines in remodeling breast cancer progression. *Heliyon*, 2024, Vol. 10, no.15, e35200. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e35200.

---

**Авторы:**

**Мангазеева Е.Д.** — младший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; младший научный сотрудник Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

**Студеникина А.А.** — к.м.н., старший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; научный сотрудник Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

**Михайлова Е.С.** — научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; старший научный сотрудник Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

**Морозов Д.В.** — к.м.н., заведующий патологоанатомическим отделением ГБУЗ Новосибирской области «Городская клиническая больница № 1», г. Новосибирск, Россия

**Рыжикова С.Л.** — начальник лаборатории цитокинов АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия

**Дружинина Ю.Г.** — ведущий биотехнолог лаборатории цитокинов АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия

**Проскура А.В.** — научный сотрудник Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

**Authors:**

**Mangazeeva E.D.**, Junior Researcher, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University; Junior Researcher, Institute of Molecular Biology and Biophysics of Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

**Studenikina A.A.**, PhD (Medicine), Senior Researcher, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University; Researcher, Institute of Molecular Biology and Biophysics of Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

**Mikhailova E.S.**, Researcher, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University; Senior Researcher, Institute of Molecular Biology and Biophysics of Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

**Morozov D.V.**, PhD (Medicine), Head, Pathoanatomical Department, City Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk, Russian Federation

**Ryzhikova S.L.**, Head, Cytokine Laboratory, JSC Vector-Best, Novosibirsk, Russian Federation

**Druzhinina Yu.G.**, Leading Biotechnologist, Cytokine Laboratory, JSC Vector-Best, Novosibirsk, Russian Federation

**Proskura A.V.**, Researcher, Institute of Molecular Biology and Biophysics of Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

**Богачук А.П.** — к.х.н., инженер-исследователь лаборатории белков гормональной регуляции ФГБУН «Государственный научный центр “Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” Российской академии наук», Москва, Россия

**Липкин В.М.** — д.х.н., профессор, член-корр. РАН, главный научный сотрудник лаборатории белков гормональной регуляции ФГБУН «Государственный научный центр “Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” Российской академии наук», Москва, Россия

**Аутеншлюс А.И.** — д.б.н., профессор, заведующий центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; главный научный сотрудник Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

**Bogachuk A.P.**, PhD (Chemistry), Research Engineer, Laboratory of Hormonal Regulation Proteins, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Lipkin V.M.**, PhD, MD (Chemistry), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Chief Researcher, Laboratory of Hormonal Regulation Proteins, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Autenshlyus A.I.**, PhD, MD (Biology), Professor, Head, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University; Chief Researcher, Institute of Molecular Biology and Biophysics of Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

---

Поступила 20.11.2024  
Отправлена на доработку 21.11.2024  
Принята к печати 23.03.2025

Received 20.11.2024  
Revision received 21.11.2024  
Accepted 23.03.2025