

УДК 618.19-006.6-091.8:576.5:576.385

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2026-1-6-14>

Дифференцировочный статус клеток рака молочной железы, его сопряженность с метастазированием и с продукцией опухолью цитокинов при различных молекулярных подтипах

Архипов С.А.^{1,2}, Михайлова Е.С.^{1,2}, Архипова В.В.¹, Дружинина Ю.Г.³, Яковлева К.И.³, Аутеншлюс А.И.^{1,2}

¹Новосибирский государственный медицинский университет (НГМУ)
Россия, 630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52

²Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики (НИИМББ),
Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины (ФИЦ ФТМ)
Россия, 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

³АО «Вектор-Бест»
Россия, 630559, Новосибирская область, пгт Кольцово

РЕЗЮМЕ

Цель. Исследовать взаимосвязь между дифференцировочным статусом опухолевых клеток (далее КО) рака молочной железы (РМЖ) различных молекулярных подтипов, способностью к метастазированию и модуляции в образцах РМЖ продукции различных цитокинов *in vitro*.

Материалы и методы. Исследовали биоптаты РМЖ (инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа) 50 женщин при наличии (Met+) и отсутствии (Met-) метастазов в регионарных лимфатических узлах, разделенных на четыре группы по молекулярным подтипам РМЖ: люминальный А (Люм А), люминальный В (Люм В), HER2/neu позитивный (HER2+) и тройной негативный (ТН). С помощью иммуноферментного анализа в супернатанте культивируемых образцов РМЖ определяли спонтанную и стимулированную комплексом митогенов (КМ) продукцию 14 цитокинов (интерлейкин (IL) 2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1 β , IL-1Ra, фактор некроза опухоли альфа, интерферон-гамма (IFN γ), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), фактор роста эндотелия сосудов и моноцитарный хемоаттрактантный белок-1 (MCP-1)), на основе которой рассчитывали индекс влияния КМ на продукцию цитокинов (ИВКМ). Эффект стимуляции дифференцировки КО *in vitro* оценивали на основе цитоморфологических критериев по снижению относительного содержания низкодифференцированных клеток (НДКО) в образцах РМЖ.

Результаты. Статистически значимое снижение НДКО под воздействием КМ выявлено в группах Met+ и Met-. Комплекс митогенов оказывал дифференцировочный эффект при люминальных и HER2-позитивном подтипах, в образцах ТН наблюдалась тенденция к снижению НДКО. Для оценки роли цитокинов в механизме дифференцирующего действия КМ проведен нейросетевой анализ ИВКМ в отношении различных цитокинов. Согласно полученным результатам, при Люм А ведущая роль в проявлении дифференцировочного эффекта была связана с IL-1Ra и IL-6, при Люм В – с MCP-1 и GM-CSF, при HER2+ – с IFN γ и MCP-1, а при ТН – с IL-1 β и IL-6.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о том, что иммунные механизмы, опосредующие дифференцировочное воздействие КМ на КО РМЖ, могут отличаться при различных молекулярных подтипах РМЖ.

Ключевые слова: рак молочной железы, цитокины, молекулярные подтипы, клеточная дифференцировка

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

✉ Архипов Сергей Алексеевич, arhipowsergei@yandex.ru

Источники финансирования. Финансирование тем государственных заданий: № госрегистрации 115060410035, 125031203556-7.

Соответствие принципам этики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено этическим комитетом НИИМББ ФИЦ ФТМ (протокол № 28 от 27.09.2023).

Для цитирования: Архипов С.А., Михайлова Е.С., Архипова В.В., Дружинина Ю.Г., Яковлева К.И., Аутеншлюс А.И. Дифференцировочный статус клеток рака молочной железы, его сопряженность с метастазированием и с продукцией опухолью цитокинов при различных молекулярных подтипах. *Бюллетень сибирской медицины*. 2026;26(1):6–14. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2026-1-6-14>.

The differentiation status of breast cancer cells, its association with metastasis and the production of cytokines by the tumor in various molecular subtypes

Arkhipov S.A.^{1,2}, Mikhaylova E.S.^{1,2}, Arkhipova V.V.¹, Druzhinina Y.G.³, Yakovleva K.I.³, Autenshlyus A.I.^{1,2}

¹ *Novosibirsk State Medical University
52 Krasny Ave., 630091 Novosibirsk, Russian Federation*

² *Research Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine (FRC FTM)
2 Timakova St., 630117 Novosibirsk, Russian Federation*

³ *Vector-Best JSC
Koltsovo, 630559 Novosibirsk, Russian Federation*

ABSTRACT

Aim. To investigate the relationship between the differentiation status of breast cancer (BC) tumor cells (TC) of various molecular subtypes, the ability to metastasize, and the modulation of various cytokines in BC samples *in vitro*.

Materials and methods. Biopsies from invasive breast carcinoma of a non-specific type in 50 women, classified by the presence (Met+) and absence (Met-) of metastases in regional lymph nodes, were examined and categorized into 4 groups based on their molecular subtypes: luminal A (Lum A), luminal B (Lum B), HER2/neu positive (HER2+), and triple negative (TN). Using enzyme-linked immunosorbent assay, spontaneous and mitogen complex-stimulated (MC) production of 14 cytokines was determined in the supernatant of cultured BC samples (IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1 β , IL-1Ra, TNF- α , IFN- γ , G-CSF, GM-CSF, VEGF, and MCP-1), on the basis of which the index of the MC effect (IMCE) on cytokine production was calculated. The effect of stimulating the differentiation of TC was evaluated on the basis of cytomorphological criteria for reducing the relative content of low-grade cells (LGC) in BC samples.

Results. A statistically significant decrease in the relative content of LGC under the influence of MC was detected in the Met+ and Met- groups. MC had a differentiating effect in luminal and HER2-positive subtypes, while in TN breast cancer samples there was only a downward trend in the proportion of LGC. To assess the role of cytokines in the mechanism of the differentiating effect of MC on LGC, a neural network analysis of IMCE in the relationship of various cytokines was carried out. According to the results obtained, in Lum A, the leading role in the manifestation of the differentiation effect was associated with IL-1Ra and IL-6; in Lum B, with MCP-1 and GM-CSF; in HER2+, with IFN- γ and MCP-1, and in TN – with IL-1 β and IL-6.

Conclusion. The data obtained indicate that the immune mechanisms mediating the differentiating MC effect on BC may vary in different molecular subtypes of BC.

Keywords: breast cancer, cytokines, molecular subtypes, cellular differentiation

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. Financing of government assignment topics: state registration number 115060410035, state registration number 125031203556-7.

Conformity with the principles of ethics. All patients signed an informed consent to participate in the study. The study was approved by the Ethics Committee of the Research Institute of Molecular Biology and Biophysics of the Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine (Minutes No. 28 dated September 27, 2023).

For citation: Arkhipov S.A., Mikhaylova E.S., Arkhipova V.V., Druzhinina Y.G., Yakovleva K.I., Autenshlyus A.I. The differentiation status of breast cancer cells, its association with metastasis and the production of cytokines by the tumor in various molecular subtypes. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2026;26(1):6–14. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2026-1-6-14>.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на значительные успехи в разработке новых методов лечения рака молочной железы (РМЖ), включая таргетную терапию и иммунотерапию, проблема резистентности опухолевых клеток (далее КО) РМЖ к противоопухолевой терапии остается актуальной [1]. Традиционные подходы к лечению РМЖ, такие как химиотерапия и лучевая терапия, нацелены на уничтожение быстро делящихся клеток, однако они не всегда эффективны против КО, находящихся на момент лечения в состоянии покоя, но обладающих потенциальной активностью к опухолевой прогрессии. В связи с этим все большее внимание привлекают альтернативные стратегии, направленные на изменение биологических свойств КО, а не только на их уничтожение. Одной из таких стратегий является дифференцировочная терапия [2, 3].

Дифференцировочная терапия представляет собой подход, направленный на стимуляцию дифференцировки КО, что приводит к снижению их пролиферативной активности и злокачественного потенциала. Этот подход основан на идее, что опухолевые клетки сохраняют способность к дифференцировке и что воздействие на определенные сигнальные пути может восстановить нормальный фенотип клеток [3]. Дифференцировочная терапия уже применяется в лечении некоторых видов рака, например острого промиелоцитарного лейкоза, где использование ретиноевой кислоты приводит к дифференцировке бластных клеток и ремиссии заболевания [4]. Однако применение дифференцировочной терапии в отношении солидных опухолей, таких как РМЖ, представляет собой более сложную задачу.

РМЖ – гетерогенное заболевание, которое подразделяется на различные молекулярные подтипы, характеризующиеся разным прогнозом и чувствительностью к терапии [5, 6]. Эти подтипы различаются по экспрессии рецепторов эстрогена (ER), прогестерона (PR) и эпидермального фактора роста человека 2 типа (HER2), а также по уровням экспрессии маркера пролиферации Ki-67. Каждый подтип

РМЖ имеет уникальный профиль экспрессии генов и, следовательно, может по-разному реагировать на дифференцировочную терапию [7].

Одним из факторов, регулирующих дифференцировку клеток РМЖ, является клеточное микроокружение опухоли, продуцирующее цитокины [8]. Цитокины могут оказывать прямое влияние на дифференцировку КО, как стимулируя, так и подавляя этот процесс. Например, интерлейкин-6 (IL-6) может способствовать пролиферации КО и метастазированию РМЖ, в то время как интерферон-гамма (IFN γ) может оказывать противоопухолевое действие, индуцируя дифференцировку или апоптоз КО РМЖ [9, 10].

Нами были получены данные о том, что комплекс митогенов (КМ), состоящий из лектинов (фитогемагглютинаина М, фитогемагглютинаина Р, конконавалина А) и липополисахарида (LPS), обладает способностью снижать содержание низкодифференцированных КО (НДКО) и, соответственно, повышать содержание более дифференцированных форм КО в образцах инвазивной карциномы молочной железы *in vitro* [11]. В настоящей работе мы исследовали влияние КМ на дифференцировочный статус КО в образцах РМЖ различных молекулярных подтипов, а также на продукцию биоптатами РМЖ различных цитокинов. Известно, что подсчет КО РМЖ с различной степенью дифференцировки имеет критическое значение как для диагностики, так и для прогноза злокачественных новообразований [12].

НДКО обуславливают более высокий уровень злокачественности и агрессивности РМЖ по сравнению с более дифференцированными клетками [13]. Клинические исследования показывают, что наличие НДКО в опухоли коррелирует с плохим прогнозом. Их уровень ассоциируется с более низким уровнем выживаемости пациентов и повышенным риском рецидива [14]. Поэтому при анализе полученных результатов мы, в первую очередь, делали акцент на оценке изменений относительного содержания НДКО, точность подсчета которых в силу их морфо-

логических особенностей более высока по сравнению с дифференцированными КО.

Цель – исследовать взаимосвязь между дифференцировочным статусом КО различным молекулярным подтипам РМЖ, способностью РМЖ к метастазированию и модуляции в образцах РМЖ продукции различных цитокинов *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования служили биоптаты РМЖ (инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа II и III степени злокачественности) 50 женщин в возрасте 35–76 лет с наличием (Met+) и отсутствием (Met-) метастазов в регионарных лимфатических узлах, а также супернатанты, полученные при культивировании биоптатов *in vitro* в среде без КМ и в среде, содержащей КМ, проходивших лечение в Новосибирском областном онкологическом диспансере. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено этическим комитетом НИИМББ ФИЦ ФТМ (протокол № 28 от 27.09.2023).

Критерием включения в исследование являлся впервые выявленный РМЖ. Критериями исключения – наличие отдаленных метастазов, обострение хронических заболеваний, проведение неоадьювантной терапии. Пациенты были разделены на четыре группы в соответствии с принадлежностью к тому или иному молекулярному подтипу опухоли: люминальный А (Люм А), люминальный В (Люм В), HER2/peu позитивный (HER2+) и тройной негативный (ТН).

Для стимуляции дифференцировки КО РМЖ и модуляции продукции цитокинов *in vitro* применяли композицию из четырех митогенов – КМ: фитогемагглютинина М в концентрации 2,0 мкг/мл, фитогемагглютинина Р в концентрации 2,0 мкг/мл, конканавалина А в концентрации 4,0 мкг/мл и липополисахарида (LPS) в концентрации 2,0 мкг/мл [11]. Биоптаты опухолей, полученные методом трепанобиопсии, объемом 8 мм³ помещали в два стеклянных флакона, в одном из которых находилась только питательная среда DMEM-F12, а в другом – КМ в таком же объеме среды, и культивировали 72 ч при температуре 37 °С. Далее биоптаты извлекали из культуральной среды и фиксировали в нейтральном растворе формалина для проведения дальнейшего морфологического исследования, а в полученных супернатантах с помощью твердофазного иммуноферментного анализа определяли концентрации цитокинов: интерлейкина (IL) 2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1β, IL-1Ra, фактора некроза опухоли альфа (TNF-α), интерферона-гамма (IFNγ), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 (MCP-1).

Индекс влияния КМ на продукцию цитокинов образцами опухоли вычисляли по формуле: ИВКМ = А/Б, где А – концентрация цитокина в супернатанте биоптата РМЖ после стимуляции опухоли КМ (КМ+), Б – концентрация цитокина в супернатанте биоптата РМЖ без стимуляции КМ (КМ-). Для проведения морфологического исследования фиксированные в формалине биоптаты РМЖ обезвоживали и заключали в парафин с последующим приготовлением срезов толщиной 4–5 мкм. Процессы депарафинизации и регидратации образцов РМЖ проводили по стандартной методике с использованием проводки ксилол–этанол. Полученные срезы окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике. Исследование проводили с помощью световой микроскопии при ×400.

Степень дифференцировки КО в образцах РМЖ оценивали по цитоморфологическим критериям, описанным нами ранее [11], с учетом Ноттингемской градирующей системы [15]. Подсчитывали относительное содержание (%) низкодифференцированных КО (НДКО), а также умеренно- (УДКО) и высокодифференцированных КО (ВДКО). Наличие эффекта стимуляции дифференцировки КО РМЖ под воздействием КМ определяли по снижению относительного содержания НДКО в образцах РМЖ и выражали в виде индекса влияния КМ на дифференцировку НДКО (ИВ НДКО), равного величине отношения количества НДКО в образцах РМЖ без воздействия КМ к количеству НДКО после воздействия КМ [11].

Уровень статистической значимости различий между группами определяли с помощью непараметрического парного критерия Вилкоксона. Показатели выражали в виде медианы и нижнего и верхнего квартилей $Me (Q_1; Q_3)$. Вычисления медиан и нижнего и верхнего квартилей выполняли с помощью пакета программ Statistica v. 7.0. Нейросетевой анализ проводили с помощью пакета программ IBM SPSS Statistics v. 22.0.

В исследовании была использована нейросетевая модель (НСМ), сгенерированная на основе модуля «Многослойный перцептрон». Входной слой включал 15 нейронов, один скрытый – три нейрона, выходной – один нейрон. Функция активации скрытого слоя – «гиперболический тангенс», функция активации выходного слоя – «сигмоид». Использование «гиперболического тангенса» в скрытом слое позволяло НСМ учиться на нелинейных зависимостях между входными и выходными данными. Функция активации выходного слоя «сигмоид» позволяла интерпретировать выходное значение как вероятность

принадлежности к классу «стимуляция дифференцировки» (значение 0 или 1).

Выбор архитектуры «Многослойный перцептрон» (один скрытый слой с тремя нейронами) был обусловлен относительно небольшим объемом данных, чтобы снизить вероятность переобучения НСМ. Входными параметрами для перцептрона служили величины ИВКМ. Целевая переменная в НСМ – наличие или отсутствие эффекта стимуляции дифференцировки КО в соответствующих образцах РМЖ (значения 0 и 1). Поскольку взаимосвязи между цитокинами и эффектом дифференцировки КО могли отличаться при разных подтипах РМЖ, для каждого подтипа формировалась отдельная НСМ. Данные каждой группы пациентов были разделены на обучающую и тестовую выборки в приблизительном соотношении 80/20 (%) или 70/30 (%). Разделение проводилось случайным образом, но с сохранением пропорций классов (0 и 1) в обеих выборках (стратифицированное разделение).

Обучение нейросети проводилось на обучающей выборке, а оценка точности НСМ – на тестовой. При Люм А данные были случайным образом разделены на обучающую и тестовую выборки в соотношении 14/4, при Люм В, HER2+ и ТН подтипах – в соотношениях 9/3, 5/2 и 9/3 соответственно. Применяли метод пакетного обучения (Batch) и алгоритм градиентного спуска (Gradient Descent).

Обучение НСМ проводили при сходных для разных подтипов РМЖ параметрах обучения: стандартизация входных предикторов с помощью нормализации: $(x - \min)/(\max - \min)$; начальная скорость

обучения: 0,4; момент: 0,9; центр интервала: 0; смещение интервала: $\pm 0,5$. Точность нейросетевой модели для определения класса 1 – «наличие эффекта дифференцировки» (Positive Predictive Value) рассчитывали по формуле: $\text{точность НСМ} = \text{TP}/(\text{TP} + \text{FP})$, где TP (True Positive) – количество образцов с «эффектом дифференцировки», которые правильно классифицированы моделью как имеющие «эффект дифференцировки», FP (False Positive) – количество образцов без «эффекта дифференцировки», которые ошибочно классифицированы моделью как имеющие «эффект дифференцировки». Точность нейросетевой модели на обучающей и тестовой выборках составила: для НСМ ЛюмА – 92,31 и 100%, для НСМ ЛюмВ – 87,5 и 100%, для HER2+ – 80 и 100%, для НСМ ТН – 75 и 66,7% соответственно. После обучения НСМ вычисляли «нормализованную важность» (НВ) каждого входного предиктора, которая представляет собой оценку относительной силы влияния входной переменной на прогнозирование целевой переменной – наличие или отсутствие эффекта стимуляции дифференцировки КО в образцах РМЖ после воздействия КМ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В таблице 1 представлены данные, демонстрирующие влияние КМ на относительное содержание НДКО, УДКО и ВДКО в образцах РМЖ у пациентов с наличием (Met+) и отсутствием (Met-) метастазов в регионарных лимфатических узлах, а также у пациентов без разделения на наличие или отсутствие лимфогенного метастазирования.

Таблица 1

Влияние КМ на относительное содержание НДКО, УДКО и ВДКО в образцах РМЖ, Me (Q_1 ; Q_3), %			
Пациенты с РМЖ	Образец	Относительное содержание НДКО	Относительное содержание ВДКО + УДКО
Без разделения на наличие или отсутствие метастазирования	КМ-, n = 50	22,32 (16,67; 27,06)	77,68 (72,94; 83,33)
	КМ+, n = 50	16,36*** (12,07; 21,55)	83,64*** (78,45; 87,93)
С отсутствием метастазов (Met-)	КМ-, n = 29	18,57 (15,00; 24,59)	81,43 (75,41; 85,00)
	КМ+, n = 29	14,89*** (12,07; 18,22)	85,11*** (81,78; 87,93)
С наличием метастазов (Met+)	КМ-, n = 21	23,45 (21,11; 30,38)	76,55 (69,62; 78,89)
	КМ+, n = 21	17,64*** (15,12; 23,61)	82,36*** (76,39; 84,88)

Примечание. Здесь и в табл. 2 различия статистически значимы при сравнении образцов КМ+ с образцами КМ-. *** $p < 0,0001$ (парный критерий Вилкоксона)

Во всех подгруппах пациентов (с наличием или отсутствием метастазов) наблюдалось статистически значимое снижение относительного содержания НДКО в образцах РМЖ в ответ на воздействие КМ (КМ+). Это указывает на то, что КМ может оказывать влияние на дифференцировку КО РМЖ, смещая их в сторону более зрелых форм. Анализ полученных

данных, в зависимости от метастатического статуса (Met- и Met+), показал, что эффект КМ на дифференцировку КО сохраняется независимо от наличия или отсутствия метастазов в лимфатических узлах. Различия между группами образцов КМ+ и КМ- статистически значимы как для пациентов с метастазами (Met+), так и для пациентов без метастазов (Met-).

Сравнивая медианы для каждой группы образцов, можно оценить степень снижения содержания НДКО под воздействием КМ.

В общей группе пациентов, без ее разделения на наличие или отсутствие метастазов, медиана снижалась с 22,32% (КМ-) до 16,36% (КМ+). В группе пациентов без метастазов (Мет-) медиана относительного содержания НДКО снижалась с 18,57%

(КМ-) до 14,89% (КМ+), а в группе пациентов с метастазами (Мет+) – с 23,45% (КМ-) до 17,64% (КМ+). Разброс значений (представленный квартилями) в группах КМ- несколько шире, чем в группах КМ+, что может указывать на большую гетерогенность образцов в группах, не подвергшихся воздействию КМ, а более узкий диапазон в группах КМ+ может отражать более однородный ответ КО на КМ.

Таблица 2

Влияние КМ на относительное содержание НДКО, ВДКО и УДКО в образцах РМЖ различных молекулярных подтипов <i>Me (Q₁; Q₃), %</i>			
Молекулярный подтип РМЖ	Образец	Относительное содержание НДКО	Относительное содержание ВДКО + УДКО
Люм А	КМ-, <i>n</i> = 18	18,52 (15,61; 25,32)	81,48 (74,62; 84,39)
	КМ+, <i>n</i> = 18	15,77** (11,01; 20,08)	84,23** (79,92; 88,99)
Люм В	КМ-, <i>n</i> = 12	22,18 (18,37; 27,06)	77,82 (72,94; 81,63)
	КМ+ <i>n</i> = 12	17,26** (13,19; 22,5)	82,74** (77,5; 86,81)
HER2+	КМ-, <i>n</i> = 7	17,38 (12,71; 24,57)	82,62 (75,43; 87,30)
	КМ+, <i>n</i> = 7	15,67* (9,68; 24,55)	84,33* (75,45; 90,32)
ТН	КМ-, <i>n</i> = 12	23,26 (21,87; 29,98)	76,74 (70,03; 77,69)
	КМ+, <i>n</i> = 12	15,79 (14,23; 18,76)	84,21 (77,84; 85,48)

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (парный критерий Вилкоксона)

В таблице 2 представлены результаты исследования влияния КМ на относительное содержание клеток с различной степенью дифференцировки в образцах РМЖ разных молекулярных подтипов: Люм А, Люм В, HER2+ и ТН. Установлено, что в образцах Люм А наблюдается статистически значимое снижение относительного содержания НДКО в образцах КМ+ по сравнению с КМ- ($p = 0,00159$). Это говорит о том, что КМ может способствовать дифференцировке КО в этом подтипе РМЖ. Аналогично при подтипе Люм В также наблюдается статистически значимое снижение содержания НДКО в образцах КМ+ ($p = 0,00963$). Медиана снижается с 22,18 до 17,26%. Этот результат также указывает на способность КМ индуцировать дифференцировку в клетках Люм В. В подтипе HER2 также наблюдается статистически значимое снижение относительного содержания НДКО в образцах КМ+ по сравнению с КМ- ($p = 0,03125$). В группе ТН хотя и наблюдается тенденция к снижению содержания НДКО в образцах КМ+ по сравнению с КМ-, однако это снижение не достигает статистической значимости ($p = 0,05974$).

С целью оценки вероятной роли цитокинов в эффекте стимуляции дифференцировки клеток РМЖ под воздействием КМ было проведено исследование влияния КМ на продукцию цитокинов образцами РМЖ, при их культивировании в среде, содержащей КМ. Рассчитывали индексы влияния на продукцию цитокинов (ИВКМ) равные отношению концентрации исследуемых цитокинов в супернатантах с КМ

к концентрациям цитокинов в супернатантах образцов РМЖ, культивируемых в среде без КМ. При этом одновременно рассчитывали ИВ НДКО, равный отношению количества НДКО в образцах, культивированных в среде без КМ, к количеству НДКО в образцах, культивированных в среде, содержащей КМ.

На основе методов нейросетевого анализа были сформированы и обучены НСМ отдельно для каждого подтипа РМЖ, на основе которых были рассчитана ИВ каждого входного предиктора независимой переменной – ИВКМ цитокина, в прогнозировании целевой зависимой переменной, к которой были отнесены только два значения – наличие стимуляции дифференцировки (1) или ее отсутствие (0). При величине ИВ НДКО, превышающей 1,1, отмечали наличие эффекта дифференцировки, а при величине менее и равной 1,1, – ее отсутствие. Правомочность такого выбора оценки обосновывалась тем, что при групповом сравнении показателей относительного содержания НДКО в образцах РМЖ после культивирования в среде с КМ и без КМ, при условии, что их соотношение превышает 1,1, различия (оцениваемые методом парного критерия Вилкоксона) были значимыми (табл. 3).

Результаты нейросетевого анализа показателей ИВКМ на продукцию различных цитокинов образцами РМЖ и ИВ НДКО в зависимости от молекулярно-генетического подтипа РМЖ представлены в табл. 3. Показано, что при РМЖ Люм А ИВКМ IL-1Ra имеет максимальную величину ИВ (100%), что

свидетельствует о ведущей роли IL-1Ra в проявлении эффекта дифференцировки КО под действием КМ в образцах опухоли этого подтипа. При этом высокие величины НВ ИВКМ были установлены и для ряда других цитокинов: IFN γ (НВ = 80,9%), IL-6 (НВ = 87,3%), TNF α (НВ = 69,7%) и VEGF (НВ = 69,6%). При Люм В наибольшую величину НВ показал MCP-1 (100%). Относительно высокий уровень НВ был также выявлен для цитокинов: GM-CSF (НВ = 76,5%), IL-8 (НВ = 70,9%) и IL-18 (НВ = 68,7%).

Таблица 3

Результаты нейросетевого анализа роли ИВКМ различных цитокинов в развитии эффекта дифференцировки НДКО РМЖ под действием КМ при РМЖ различных молекулярных подтипов

ИВКМ	Молекулярный подтип РМЖ			
	Люм А	Люм В	Her2+	ТН
	Нормализованная важность показателя, %			
IL-2	30,0	48,7	44,0	47,4
IL-4	44,3	18,7	36,5	56,7
IL-6	87,3	14,1	67,9	81,9
IL-8	74,3	70,9	52,3	32,5
IL-10	34,2	45,0	45,6	41,8
IL-17	51,0	32,1	91,9	67,6
IL-18	36,3	68,7	43,2	45,8
IL-1 β	28,0	13,2	84,0	100,0
IL1-Ra	100,0	28,7	54,8	41,0
TNF- α	69,7	17,7	21,5	47,0
IFN γ	80,9	12,2	100,0	63,9
G-CSF	40,8	30,9	58,2	45,7
GM-CSF	29,1	76,5	73,2	44,9
VEGF	69,6	21,9	42,4	42,7
MCP-1	57,8	100,0	96,4	35,7

Для РМЖ HER2+ были выявлены другие сочетания цитокинов с большими величинами НВ: IFN γ (НВ = 100%), MCP-1 (НВ = 96,4%), IL-17 (НВ = 91,9%) и IL-1 β (НВ = 84,0%). При ТН РМЖ наибольшую НВ показал IL-1 β (НВ = 100%). При этом к высокозначимым цитокинам в развитии эффекта дифференцировки КО под действием КМ по показателям НВ ИВКМ отнесены: IL-6 (НВ = 81,9%), IL-17 (НВ = 67,6%) и IFN γ (НВ = 63,9%). Таким образом, нейросетевой анализ важности величин ИВКМ различных цитокинов в развитии эффекта дифференцировки НДКО РМЖ под действием КМ показал значительные различия между молекулярными подтипами РМЖ.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время перспективность дифференцировочной терапии как эффективного метода лечения и ее применение остаются пока ограниченными из-за недостатка понимания возможных путей диф-

ференцировки КО при солидных злокачественных новообразованиях, в том числе из-за отсутствия достаточного количества информации об иммунологических механизмах, которые могут регулировать эти процессы [1–3]. Настоящее исследование было направлено на изучение вероятных иммунных механизмов влияния композиции, представляющей собой комплекс митогенов, на дифференцировку клеток РМЖ и, в частности, на формирование цитокиновой сети, лежащей в основе этого процесса.

Влияние КМ на дифференцировку клеток РМЖ оказалось зависимым от молекулярного подтипа опухоли. Наиболее выраженный эффект наблюдался при Люм А и Люм В, где КМ вызывал статистически значимое снижение относительного содержания НДКО. Схожие тенденции наблюдались и при HER2-позитивном подтипе, хотя этот эффект был менее выраженным. Примечательно, что при тройном негативном РМЖ (ТН РМЖ) наблюдалась лишь тенденция к снижению НДКО, которая не достигла статистической значимости. Эти данные согласуются с представлениями о молекулярной гетерогенности РМЖ и различиях в механизмах регуляции дифференцировки в разных подтипах. Вероятно, КМ воздействует на специфические сигнальные пути, которые играют более важную роль в дифференцировке люминальных и HER2-позитивных опухолей, чем в ТН РМЖ. Данный факт может быть также обусловлен гетерогенностью ТН РМЖ и его известной резистентностью к различным видам терапии [16].

Результаты нейросетевого анализа показали существенную разницу в НВ различных цитокинов в зависимости от молекулярного подтипа РМЖ. Различия в «нормализованной важности» цитокинов между подтипами РМЖ отражают разнообразие иммунного микроокружения опухоли. Так, для РМЖ Люм А ключевую роль в эффекте стимуляции дифференцировки клеток РМЖ показали IL-1Ra, а также IFN γ , IL-6, TNF α и VEGF. Роль IL-1Ra может быть связана с его способностью блокировать провоспалительный эффект IL-1 β , тем самым смещая регуляторный баланс в сторону дифференцировки КО Люм А [17, 18]. IFN γ , вероятно, может напрямую индуцировать экспрессию генов, участвующих в дифференцировке клеток РМЖ [19], а IL-6 и TNF α могут оказывать как провоспалительное, так и дифференцировочное действие в зависимости от исходного уровня их продукции [9, 20]. VEGF как фактор ангиогенеза может влиять на сосудистое микроокружение опухоли и косвенно – на дифференцировку КО РМЖ.

При РМЖ Люм В наибольшую НВ ИВКМ имел MCP-1, хемокин, участвующий в рекрутировании и активации макрофагальных клеток [21]. Также ока-

зались значимы GM-CSF, IL-8 и IL-18. Как известно, GM-CSF стимулирует дифференцировку миелоидных клеток [6], а IL-8 и IL-18 участвуют в регуляции воспаления и иммунного ответа [22, 23]. При HER2+ наиболее высокий показатель НВ ИВКМ был у IFN γ , что может быть связано с его способностью активировать комплексный противоопухолевый иммунный ответ и индуцировать дифференцировку. При этом MCP-1, IL-17 и IL-1 β могут также играть важную роль в этом процессе [24]. Следует, однако, отметить, что из-за малой выборки группы HER2+ результаты, полученные для этой группы HER2+ методом нейросетевого анализа, следует рассматривать как предварительные и требующие подтверждения на большей выборке.

При ТН РМЖ наиболее высокие величины НВ выявлены для ИВКМ IL-1 β , IL-6, IL-17 и IFN γ , что может отражать особенности иммунного микроокружения этого подтипа. Тот факт, что ИВКМ IL-1 β показал решающее значение для стимуляции дифференцировки в трижды негативном РМЖ, предполагает, что воздействие на сигнальный путь IL-1 β может быть перспективным терапевтическим подходом для этого агрессивного подтипа РМЖ.

НВ предикторов в нейросетевом анализе – это инструмент для оценки относительной силы влияния переменных на ожидаемый эффект, а не их доли в общем эффекте. Поэтому не существует универсальной, жестко установленной границы для разделения предикторов на «значимые» и «незначимые» на основе НВ. Исходя из того, что в нашем исследовании НВ оценивает прогностическую силу каждого отдельного предиктора (ИВКМ) в развитии эффекта дифференцировки КО, то можно только условно выделить (например, при НВ > 65%) наиболее значимые цитокины, влияющие на развитие этого эффекта при различных подтипах РМЖ: при Люм А – IL1-Ra, IL-6, IFN γ , IL-8, TNF α и VEGF; при Люм В – MCP-1, GM-CSF, IL-8; при HER2+ – IFN γ , MCP-1, IL-17, IL-1 β , при ТН подтипе – IL-1 β , IL-6.

Таким образом, различия в выявленных нами взаимосвязях между ИВКМ и развитием эффекта дифференцировки под действием КМ могут отражать сложные взаимодействия между различными клетками иммунной системы, формирующими микроокружение опухоли и внутриопухолевую цитокиновую сеть, которая контролирует процессы, регулирующие дифференцировку клеток РМЖ. Некоторые цитокины могут оказывать прямое влияние на дифференцировку, в то время как другие могут модулировать этот процесс опосредованно, через взаимодействие с другими компонентами микроокружения опухоли.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты имеют важное значение для понимания механизмов, лежащих в основе влияния КМ на дифференцировку клеток РМЖ. Выявление ключевых цитокинов, участвующих в этом процессе, может послужить основой для разработки новых терапевтических стратегий, направленных на индукцию дифференцировки опухолевых клеток и повышение эффективности лечения РМЖ. Результаты исследования подчеркивают важность персонализированного подхода к лечению РМЖ в рамках дифференцировочной терапии, учитывающего молекулярный подтип опухоли.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Терпинская Т.И. Механизмы лекарственной резистентности опухолей: краткий обзор современных данных. *Новости медико-биологических наук*. 2022;22(2):160–174.
2. Yan M., Liu Q. Differentiation therapy: a promising strategy for cancer treatment. *Chin. J. Cancer*. 2016;35(3). DOI: 10.1186/s40880-015-0059-x.
3. Bar-Hai N., Ishay-Ronen D. Engaging plasticity: differentiation therapy in solid tumors. *Front. Pharmacol.* 2022;13:944773. DOI: 10.3389/fphar.2022.944773.
4. Madan V., Koeffler H.P. Differentiation therapy of myeloid leukemia: four decades of development. *Haematologica*. 2021;106(1). DOI: 10.3324/haematol.2020.262121.
5. 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;321(2):343–C354. DOI: 10.1152/ajpcell.00109.2021.
6. Carvalho E., Canberk S., Schmitt F., Vale N. Molecular subtypes and mechanisms of breast cancer: precision medicine approaches for targeted therapies. *Cancers*. 2025;17(7):1102. DOI: 10.3390/cancers17071102.
7. Li X., Zhou J., Xiao M., Zhao L., Zhao Y., Wang S. et al. Uncovering the subtype-specific molecular characteristics of breast cancer by multiomics analysis of prognosis-associated genes, driver genes, signaling pathways, and immune activity. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021;9:689028. DOI: 10.3389/fcell.2021.689028.
8. Akinsipe T., Mohamedelhassan R., Akinpelu A., Pondugula S.R., Mistriotis P., Avila L.A. et al. Cellular interactions in tumor microenvironment during breast cancer progression: new frontiers and implications for novel therapeutics. *Front. Immunol.* 2024;15:1302587. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1302587.
9. Chen J., Wei Y., Yang W., Huang Q., Chen Y., Zeng K. et al. IL-6: The link between inflammation, immunity and breast cancer. *Front. Oncol.* 2022;12:903800. DOI: 10.3389/fonc.2022.903800.
10. Jorgovanovic D., Song M., Wang L., Zhang Y. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. *Biomarker Research*. 2020;8:49. DOI: 10.1186/s40364-020-00228-x.
11. Патент РФ на изобретение № 2697199 / 13.08.2019. Бюл. № 23. Аутеншлюс А.И., Архипов С.А., Михайлова Е.С., Маринкин И.О., Варакин Н.А. Композиция для повы-

- шения содержания высокодифференцированных клеток в аденокарциноме молочной железы. <https://patents.google.com/patent/RU2697199C1/ru>. Ссылка активна на 03.05.2025.
12. Nascimento R.G., Otoni K.M. Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know? *Mastology*. 2020;30:e20200024. DOI: 10.29289/25945394202020200024.
 13. Zhen H., Yang L., Li L., Yu J., Zhao L., Li Y. et al. Correlation analysis between molecular subtypes and Nottingham Prognostic Index in breast cancer. *Oncotarget*. 2017;8(43):74096–74105. DOI: 10.18632/oncotarget.18242.
 14. Ali S., Hamam D., Liu X., Lebrun J.J. Terminal differentiation and anti-tumorigenic effects of prolactin in breast cancer. *Front. Endocrinol.* 2022;13:993570. DOI: 10.3389/fendo.2022.993570.
 15. Rakha E.A., Reis-Filho J.S., Baehner F., Dabbs D.J., Decker T., Eusebi V. et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res.* 2010;12(4):207. DOI: 10.1186/bcr2607.
 16. Asleh K., Riaz N., Nielsen T.O. Heterogeneity of triple negative breast cancer: Current advances in subtyping and treatment implications. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2022;41:265. DOI: 10.1186/s13046-022-02473-z.
 17. Tan C., Hu W., He Y., Zhang Y., Zhang G., Xu Y. et al. Cytokine-mediated therapeutic resistance in breast cancer. *Cytokine*. 2018;108:151–159. DOI: 10.1016/j.cyto.2018.03.020.
 18. Baker K.J., Houston A., Brint E. IL-1 family members in cancer, two sides to every story. *Front. Immunol.* 2019;10:1197. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01197.
 19. Garcia-Tunon I., Ricote M., Ruiz A., Fraile B., Paniagua R., Royuela M. Influence of IFN-gamma and its receptors in human breast cancer. *BMC Cancer*. 2007;7:158. DOI: 10.1186/1471-2407-7-158.
 20. Cruceriu D., Baldasici O., Balacescu O., Berindan-Neagoie I. The dual role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in breast cancer: molecular insights and therapeutic approaches. *Cell Oncol.* 2020;43:1–18. DOI: 10.1007/s13402-019-00489-1.
 21. Singh S., Anshita D., Ravichandiran V. MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. *Int. Immunopharmacol.* 2021;101:107598. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.107598.
 22. Long X., Ye Y., Zhang L., Liu P., Yu W., Wei F. et al. IL-8, a novel messenger to cross-link inflammation and tumor EMT via autocrine and paracrine pathways. *Int. J. Oncol.* 2016;48(1):5–12. DOI: 10.3892/ijo.2015.3234.
 23. Cirella A., Olivera I., Luri-Rey C., Bolaños E., Berraondo P., Melero I. Interleukin-18 in cancer immunology and immunotherapy. *Expert Opin. Ther. Targets*. 2023;27(11):1035–1042. DOI: 10.1080/14728222.2023.2287574.
 24. Akinsipe T., Mohamedelhassan R., Akinpelu A., Pondugula S.R., Mistriotis P., Avila L.A. et al. Cellular interactions in tumor microenvironment during breast cancer progression: new frontiers and implications for novel therapeutics. *Front. Immunol.* 2024;15:1302587. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1302587.

Вклад авторов

Аутеншлюс А.И., Архипов С.А. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных; обоснование рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания; окончательное утверждение для публикации рукописи. Михайлова Е.С., Архипова В.В., Дружинина Ю.Г., Яковлева К.И. – анализ и интерпретация данных; окончательное утверждение для публикации рукописи.

Информация об авторах

Архипов Сергей Алексеевич – д-р биол. наук, вед. науч. сотрудник, Центральная научно-исследовательская лаборатория, НГМУ; ст. науч. сотрудник, НИИМББ, ФИЦ ФТМ, г. Новосибирск, arhipowsergei@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1390-4426>

Михайлова Елена Семёновна – науч. сотрудник, Центральная научно-исследовательская лаборатория, НГМУ; науч. сотрудник, НИИМББ, ФИЦ ФТМ, г. Новосибирск, elena.michajlova.58@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8364-819X>

Архипова Валентина Валериевна – мл. науч. сотрудник, Центральная научно-исследовательская лаборатория, НГМУ, г. Новосибирск, valia.arkhipova@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0000-0172-0905>

Дружинина Юлия Геннадьевна – ст. науч. сотрудник, АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, druzhinina@vector-best.ru, <https://orcid.org/0009-0000-9279-8395>

Яковлева Ксения Игоревна – ст. науч. сотрудник, АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, yakovlevak@vector-best.ru, <https://orcid.org/0009-0003-7802-5486>

Аутеншлюс Александр Исаевич – д-р биол. наук, профессор, зав. Центральной научно-исследовательской лабораторией, НГМУ, г. Новосибирск; гл. науч. сотрудник, НИИМББ, ФИЦ ФТМ, г. Новосибирск, lrciip@211.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7180-010X>

✉ **Архипов Сергей Алексеевич**, arhipowsergei@yandex.ru

Поступила в редакцию 15.05.2025;
одобрена после рецензирования 01.07.2025;
принята к публикации 04.09.2025