



Маркеры опухолевого микроокружения при спонтанной и индуцированной инкубации биоптатов рака молочной железы

Ю.С. Гергенретер¹, Н.Б. Захарова², О.Л. Морозова^{3,✉}

¹ГУЗ «Областной клинический онкологический диспансер»
Смирновское ущелье, д. 1а, г. Саратов, 410053, Россия

²ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет
им. В.И. Разумовского» Минздрава России
ул. Большая Садовая, д. 137, г. Саратов, 410000, Россия

³ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет
им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет)
ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, г. Москва, 119991, Россия

Аннотация

Цель. Изучить спонтанную и стимулированную продукцию цитокинов в биоптатах рака молочной железы (РМЖ) в зависимости от степени распространенности опухолевого роста.

Материалы и методы. Проведено экспериментальное исследование с клеточными культурами биоптатов РМЖ I–II стадии (группа 1, $n = 15$) и III–IV стадии (группа 2, $n = 15$). Контроль составили 6 здоровых женщин, которым выполнена мастопексия. Методом иммуноферментного анализа определяли спонтанную и индуцированную комплексом поликлональных активаторов (ПА: фитогемагглютинин 4 мкг/мл, конканавалин А 4 мкг/мл, липополисахарид 2 мкг/мл) концентрацию TNF- α , IFN- γ , G-CSF, GM-CSF, VEGF, MCP-1, TGF- β 1. Вычисляли индекс влияния поликлональных активаторов (ИВПА) на продукцию цитокинов (индуцированная продукция / спонтанная продукция). Для сравнения групп применяли критерий Манна – Уитни и медианный критерий, критерий хи-квадрат и точный критерий Фишера.

Результаты. Группы 1 и 2 не различались по возрасту, гистологическому варианту и иммуногистохимическому типу опухоли, преобладал преимущественно инвазивный рак без признаков специфичности. В группе 2 чаще отмечалась выраженная степень васкуляризации: у 6 (40%) пациенток против 1 (7%) в группе 1 ($p < 0,05$). В обеих группах по сравнению с контролем отмечено статистически значимое ($p < 0,05$) повышение спонтанной продукции: TNF- α – в 4,2 и 4,8 раза, MCP-1 – в 6,7 и 6,3 раза, TGF- β 1 – в 2,2 и 2,5 раза, VEGF – в 11,9 и 14,6 раза, GM-CSF – в 15,6 и 13,4 раза, G-CSF – в 96,8 и 79,5 раза соответственно. Концентрация MCP-1 и IFN- γ была выше в группе 1 ($p < 0,05$), VEGF и TGF- β 1 – в группе 2 ($p < 0,05$). ИВПА в группе 2 превышал аналогичные значения в группе 1 для G-CSF, VEGF, TGF- β 1 ($p < 0,05$).

Заключение. Продукция цитокинов (TNF- α , MCP-1, GM-CSF, G-CSF, VEGF, TGF- β 1) в биоптатах РМЖ значительно выше, чем в биоптатах неизменной молочной железы, и зависит от стадии опухолевого процесса.

Ключевые слова: иммуноонкологические биомаркеры; цитокины микроокружения опухоли; факторы роста; колониестимулирующие факторы; спонтанная и индуцированная продукция цитокинов; защитные механизмы иммунного ответа; рак молочной железы; индекс влияния поликлональных активаторов

Рубрики MeSH:

МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НОВООБРАЗОВАНИЯ – ДИАГНОСТИКА

МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НОВООБРАЗОВАНИЯ – ИММУНОЛОГИЯ

МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НОВООБРАЗОВАНИЯ – ПАТОЛОГИЯ

БИОПСИЯ – МЕТОДЫ

МОЛОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА – ПАТОЛОГИЯ

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЕ МЕТОДЫ

БИОМАРКЕРЫ НОВООБРАЗОВАНИЙ – ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА

Для цитирования: Гергенретер Ю.С., Захарова Н.Б., Морозова О.Л., Маркеры опухолевого микроокружения при спонтанной и индуцированной инкубации биоптатов рака молочной железы. Сеченовский вестник. 2021; 12(1): 50–59. <https://doi.org/10.47093/2218-7332.2021.12.1.50-59>

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ:

Морозова Ольга Леонидовна, д-р мед. наук, профессор кафедры патофизиологии ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет)

Адрес: ул. Трубевская, д. 8, стр. 2, г. Москва, 119991, Россия

Тел.: +7 (916) 532-54-81

E-mail: morozova_ol@list.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки (собственные ресурсы).

Статья поступила в редакцию: 12.01.2021

Статья принята к печати: 10.03.2021

Дата публикации: 29.04.2021

Tumour microenvironment markers in spontaneous and induced incubation of breast cancer biopsies

Yulia S. Gergenreter¹, Natalya B. Zakharova², Olga L. Morozova^{3,✉}

¹Regional Clinical Oncology Dispensary

1A, Smirnovsky gorge, Saratov, 410053, Russia

²Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky

137, Bolshaya Sadovaya str., Saratov, 410000, Russia

³Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University)

8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

Abstract

Aim. To study the spontaneous and stimulated production of cytokines in biopsies of breast cancer (BC) depending on the cancer stage.

Materials and methods. An experimental study was carried out with cell cultures of breast cancer biopsies of stages I–II (group 1, $n = 15$) and III–IV stages (group 2, $n = 15$). The control consisted of 6 healthy women who underwent mastopexy. We used enzyme immunoassay method to assess spontaneous and induced by a complex of polyclonal activators (PA: phytohemagglutinin 4 $\mu\text{g} / \text{ml}$, concanavalin A 4 $\mu\text{g} / \text{ml}$, lipopolysaccharide 2 $\mu\text{g} / \text{ml}$) concentration of TNF- α , IFN- γ , G-CSF, GM-CSF, VEGF, MCP-1, TGF- β 1. The index of the effect of polyclonal activators (IVPA) on cytokine production (induced production / spontaneous production) was calculated. To compare groups, the Mann-Whitney test and the median test, the chi-square test and the Fisher's exact test were used.

Results. Groups 1 and 2 did not differ in age, histological variant and immunohistochemical type of tumour, predominantly invasive cancer without signs of specificity prevailed. In group 2, a pronounced vascularization was more often observed: in 6 (40%) patients versus 1 (7%) in group 1 ($p < 0.05$). In both groups, compared with the control, there was a statistically significant ($p < 0.05$) increase in spontaneous production of TNF- α by 4.2 and 4.8 times, MCP-1 by 6.7 and 6.3 times, TGF- β 1 – 2.2 and 2.5 times, VEGF 11.9 and 14.6 times; GM-CSF 15.6 and 13.4 times, G-CSF 96.8 and 79.5 times, respectively. The concentration of MCP-1 and IFN- γ was higher in group 1 ($p < 0.05$), VEGF and TGF- β 1 – in group 2 ($p < 0.05$). IVPA in group 2 exceeded similar values in group 1 for G-CSF, VEGF, TGF- β 1 ($p < 0.05$).

Conclusion. The production of cytokines (TNF- α , MCP-1, GM-CSF, G-CSF, VEGF, TGF- β 1) in breast cancer biopsies is significantly higher than in biopsies of the unchanged mammary gland and depends on the stage of the tumour process.

Keywords: immuno-oncological biomarkers; cytokines of the tumour microenvironment; growth factors; colony-stimulating factors; spontaneous and induced cytokine production; protective mechanisms of the immune response; breast cancer; index of the effect of polyclonal activators

MeSH terms:

BREAST NEOPLASMS – DIAGNOSIS

BREAST NEOPLASMS – IMMUNOLOGY

BREAST NEOPLASMS – PATHOLOGY

BIOPSY – METHODS

BREAST – PATHOLOGY

IMMUNOENZYME TECHNIQUES

BIOMARKERS, TUMOR – ISOLATION & PURIFICATION

For citation: Gergenreter Yu.S., Zakharova N.B., Morozova O.L. Tumour microenvironment markers in spontaneous and induced incubation of breast cancer biopsies. *Sechenov Medical Journal*. 2021; 12(1): 50–59. <https://doi.org/10.47093/2218-7332.2021.12.1.50-59>

CONTACT INFORMATION:

Olga L. Morozova, Dr. of Sci. (Medicine), Professor, Department of Pathological Physiology, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University)

Address: 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

Tel.: +7 (916) 532-54-81

E-mail: morozova_ol@list.ru

Conflict of interests. The authors declare that there is no conflict of interests.

Financial support. The study was not sponsored (own resources).

The article received: 12.01.2021

The article approved for publication: 10.03.2021

Date of publication: 29.04.2021

Список сокращений:

G-CSF – granulocyte colony-stimulating factor, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

GM-CSF – granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

IFN- γ – interferon gamma, интерферон гамма

IL – interleukin, интерлейкин

MCP-1 – monocyte chemoattractant protein 1, моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1

TGF- β 1 – transforming growth factor beta1, трансформирующий фактор роста бета1

TNF- α – tumor necrosis factor alpha, фактор некроза опухоли-альфа

VEGF – vascular endothelial growth factor, фактор роста эндотелия сосудов

ИВПА – индекс влияния поликлональных активаторов

МкО – микроокружение опухоли

ПА – поликлональные активаторы

РМЖ – рак молочной железы

Рак молочной железы (РМЖ) занимает лидирующие позиции среди злокачественных опухолей женского населения в мире. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), к концу 2020 г. в мире насчитывалось 7,8 млн женщин с РМЖ, диагностированным за последние 5 лет, что ставит эту форму рака на первое место по распространенности среди злокачественных новообразований¹. В силу широкой распространенности и неуклонного роста, социально-экономической значимости РМЖ остается важной проблемой современной онкологии.

В последние годы было установлено, что при РМЖ инфильтрирующие и ассоциированные с опухолью иммунные клетки обладают как противоопухолевой активностью, так и опухолевым эффектом [1–3]. Установлено, что происходящее в микроокружении опухоли (МкО) взаимодействие опухолевых и иммунных клеток сопровождается экспрессией целого ряда онкоассоциированных белков группы цитокинов. Данные иммуноонкологические маркеры влияют

на дифференцировку, апоптоз, прогрессию опухоли, и их уровень изменяется при взаимодействии опухолевых и иммунных клеток в канцерогенезе [4–6]. Исследования цитокинового профиля проводятся в России и в мире. Так, Т.А. Кунц и соавт. [7] изучали цитокины: IL-2 (interleukin, интерлейкин), IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1 β , IL-1Ra, IFN- γ (interferon gamma, интерферон-гамма), TNF- α (tumor necrosis factor alpha, фактор некроза опухоли-альфа), MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1, моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1), G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор), GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), VEGF (vascular endothelial growth factor, фактор роста эндотелия сосудов) в иммунокомпетентных клетках периферической крови и в опухоли при инвазивном протоковом РМЖ. Авторами выявлено статистически значимое повышение продукции изученных цитокинов

¹ <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>

(за исключением IL-18) под влиянием поликлональных активаторов только в клетках периферической крови.

Важны исследования факторов роста, в первую очередь VEGF и его рецепторов, для возможности применения в клинической практике. Продолжаются исследования совместного применения антиангиогенных препаратов с блокаторами контрольных точек при иммунотерапии рака. Эффективность комбинированной антиангиогенной и анти-PD-1 терапии была дополнительно оценена у пациентов с прогрессирующим тройным негативным РМЖ [8]. Изучение МкО в настоящее время позволило внедрить и использовать в клинике рецепторы PDL (programmed cell death 1; CD279) в качестве маркера для назначения иммунотерапии. Такие показатели, как p53, p63, цитокератины 5 и 6, гладкомышечный актин, PNH3 (phosphohistone H3, фосфогистон H3), E-кадгерин, EGFR (epidermal growth factor receptor, рецептор эпидермального фактора роста), HNF-3A (hepatocyte nuclear factor 3-alpha, ядерный фактор гепатоцитов 3 альфа), рецепторы андрогенов, опухоль-ассоциированные лимфоциты, в исследованиях также демонстрируют прогностическую значимость [9–11]. Актуальность изучения медиаторов МкО не вызывает сомнений, поскольку полученные результаты важны не только для мониторинга и прогнозирования, но и для контроля за эффективностью лечения РМЖ [12, 13].

Цель исследования: изучить спонтанную и стимулированную продукцию цитокинов в биоптатах РМЖ в зависимости от степени распространенности опухолевого роста.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальное исследование проведено с клеточными культурами биоптатов пациенток с РМЖ, проходивших лечение в ГУЗ «Областной клинический онкодиспансер» Саратовской области с 15.05.2017 по 12.10.2018.

Исследование одобрено локальным комитетом по Этике Саратовского медицинского университета «Реавиз» (протокол № 7 от 21.07.2017).

Диагноз РМЖ у всех пациенток установлен на основании клинического и инструментального обследования, включавшего: маммографию, ультразвуковое исследование молочных желез, органов брюшной полости и малого таза, а также рентгенографию органов грудной клетки, морфологическую и иммуногистохимическую верификацию типа опухоли.

Критерии включения в исследование:

- возраст 18 лет и старше;
- РМЖ: стадия заболевания T1-4N0-2M0-1;
- подписанное информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии невключения:

- злокачественные образования других локализаций;

- сопутствующая соматическая патология в стадии декомпенсации.

Критериям включения соответствовали 30 пациенток с РМЖ (медиана возраста 57 лет, интерквартильный размах: 46; 62 года), которые были разделены на две группы: в первую включены 15 женщин с локальным РМЖ (I–II стадий), во вторую группу 15 пациенток с местно-распространенным опухолевым ростом и метастатическим РМЖ (III–IV стадий) (рис.).

В контрольную группу вошли 6 практически здоровых женщин (медиана возраста 56,5 года; интерквартильный размах: 47; 62 года), поступивших в частную клинику пластической хирургии г. Саратова с целью выполнения эстетической операции – мастопексии (у 2 в сочетании с редукционной маммопластикой) и подписавших информированное согласие на участие в исследовании. У всех в анамнезе отсутствовали злокачественные новообразования и на момент оперативного вмешательства не отмечалось декомпенсации сопутствующей соматической патологии (рис.).

Забор биологического материала

У пациенток группы 1 образцы опухоли получали во время оперативного вмешательства, у пациенток группы 2 выполнялась трепанобиопсия опухоли с использованием полуавтоматических игл GBL 14/10 (Bloodline S.p.A., Италия). Взятие биоптатов проводилось до назначения системной терапии. У женщин контрольной группы образцы ткани молочной железы взяты во время выполнения пластической операции. Объем образцов опухоли/биоптатов для последующей инкубации и оценки цитокинпродуцирующего потенциала опухоли и МкО составлял в среднем 8 мм³.

Гистологическое исследование материала проведено по стандартной методике с окрашиванием гематоксилин-эозином. Схема описания включала гистологический вариант опухоли, степень дифференцировки (градация, G), наличие структур карциномы *in situ*, васкулярной инвазии, интраневральной инвазии, статуса лимфатических узлов, краев резекции. Для определения гистологической формы опухоли использовалась классификация ВОЗ 2012 года. Всем пациенткам проведено иммуногистохимическое исследование опухолевой ткани с определением экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона, белка HER-2-neo, фактора пролиферации Ki 67 с использованием коммерческих моноклональных антител (Dako, Дания). Исследование выполнялось согласно инструкции фирмы-производителя с постановкой реакций на контрольных срезах.

Степень васкуляризации оценивалась полуколичественно в десяти полях зрения: слабая васкуляризация – 1 балл (сосуды занимают 1/3 поля зрения), умеренная – 2 балла (сосуды занимают 1/2 поля

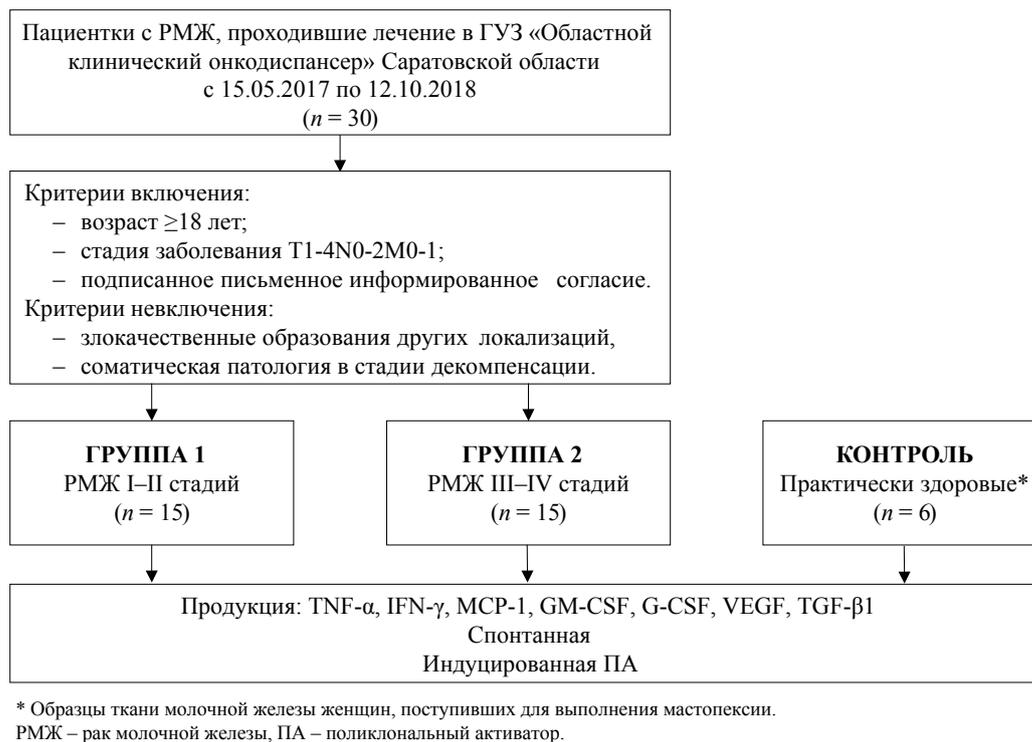


РИС. Поточковая диаграмма включения пациентов в исследование.
FIG. Patient enrollment flowchart.

зрения), выраженная – 3 балла (сосуды занимают не менее 2/3 поля зрения).

Для стимуляции продукции цитокинов применяли комплекс поликлональных активаторов (ПА), состоящий из фитогемагглютинаина в концентрации 4 мкг/мл, конканавалина А в концентрации 4 мкг/мл и липополисахарида в концентрации 2 мкг/мл. В исследовании использовали стандартизованный набор реагентов «Цитокин-стимул-бест» производства ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирская область, р. п. Кольцово, Россия).

Исследование медиаторов

Образцы / биоптаты опухоли помещали в 2 флакона, в одном из которых находилась только питательная среда DMEM-F12 (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., США) – для определения спонтанной продукции, а в другом – раствор ПА в таком же объеме среды (продукция, индуцированная ПА). Инкубирование производили при 37 °С в течение 72 ч. Для получения очищенного супернатанта оставшиеся клетки опухоли осаждали центрифугированием со скоростью 2000 об/мин. в течение 15 мин.

В супернатантах после осаждения клеток крови и опухоли с помощью иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов производства ЗАО «Вектор-Бест» определяли концентрацию TNF-α, IFN-γ, G-CSF, GM-CSF, VEGF, MCP-1, TGF-β1 (transforming growth factor beta1, трансформирующий фактор роста beta1).

Набор приведенных медиаторов был выбран с целью исследования их продукции и роли в онкогенезе. Данная группа цитокинов включает колониестимулирующие факторы, факторы роста, интерферон, хемокин, фактор некроза опухоли, выполняющие различные функции в иммунном ответе. Это позволило изучить особенности МкО на разных стадиях опухоли.

Определялся индекс влияния поликлональных активаторов (ИВПА) на продукцию иммуноонкологических маркеров МкО. Для расчета ИВПА применяли формулу: А/Б, где А – концентрация стимулированной ПА продукции маркера, пг/мл; Б – концентрация спонтанной продукции маркера, пг/мл.

Статистический анализ

Для проверки гипотез на нормальность при изучении непрерывных переменных применялись критерии Колмогорова – Смирнова и Шапиро – Уилка. Изученные параметры не соответствовали нормальному распределению. Данные представлены как медиана и 25–75-й процентиля. Для сравнения групп применяли методы непараметрического анализа: критерий Манна – Уитни и медианный критерий для независимых выборок с попарным сравнением. Качественные признаки представлены в виде абсолютного числа пациенток с данным признаком и доли от общего числа, выраженной в процентах. Для сравнения частот качественных признаков в группах использовали критерий хи-квадрат и точный критерий

Фишера. Для множественных сравнений применяли поправку Данна. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Данные обрабатывались с помощью программы IBM SPSS v.23.0 (SPSS: An IBM Company, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исходные характеристики групп

Результаты морфологического исследования биоптатов опухолевой ткани представлены в таблице 1.

Группы не различались по возрасту, гистологическому варианту и иммуногистохимическому типу опухоли. Преобладал преимущественно инвазивный рак без признаков специфичности.

У пациенток группы 2 статистически значимо чаще отмечалась выраженная степень васкуляризации: у 6 (40%) пациенток против 1 (7%) в группе 1. У всех пациенток в группе 2 выявлена лимфоваскулярная инвазия, в группе 1 – только у 2 (13%), $p < 0,05$. Метастазы в регионарных лимфатических узлах (N1-2) обнаружены только в группе 2: у 10 (67%) пациенток.

Цитокинпродуцирующий потенциал опухоли

Исследование цитокинпродуцирующего потенциала клеток опухоли (спонтанной и при воздействии ПА) позволило установить, что в процессе

инкубации происходит значимое изменение концентрации определяемых медиаторов в опухолевой ткани по сравнению с неизменной тканью молочной железы, за исключением уровня IFN- γ .

Результаты исследования спонтанной продукции цитокинов представлены в таблице 2.

Установлено, что спонтанная продукция определяемых цитокинов биоптатами РМЖ в обеих группах отличается высокой активностью по сравнению с группой контроля, за исключением IFN- γ , спонтанная продукция которого статистически значимо увеличивалась только в группе 1 по сравнению с контрольной. При этом биоптаты каждой из выделенных двух групп отличала разная степень нарастания уровня исследуемых показателей.

В образцах опухоли из группы 1 по сравнению с группой контроля отмечено статистически значимое повышение спонтанной продукции: TNF- α в 4,2, IFN- γ в 3,6, MCP-1 в 6,7 раза, факторов роста: TGF- β 1 – в 2,2 раза, VEGF – в 11,9 раза; максимальное увеличение отмечено для колониестимулирующих факторов: GM-CSF – в 15,6 раза, G-CSF – в 96,8 раза.

В трепанобиоптатах опухолевой ткани в группе 2 по сравнению с контрольной группой концентрация спонтанной продукции цитокинов была статистически значимо выше: TNF- α – в 4,8 раза, MCP-1 – в 6,3 раза,

Таблица 1. Патогистологические особенности образцов рака молочной железы в группах 1 и 2
Table 1. Pathomorphological features of breast cancer samples in groups 1 and 2

| Патоморфологическая характеристика / Pathomorphological characteristic | Группа 1 / Group 1 (n = 15) | Группа 2 / Group 2 (n = 15) | Значение p / p value |
|--|-----------------------------|-----------------------------|----------------------|
| Возраст, лет / Age, years | 57,5 [47,9; 64,7] | 56,5 [45,6; 60,3] | n.s. |
| Степень злокачественности / Grade of malignancy | | | |
| G1 | 2 (13) | 2 (13) | n.s. |
| G2 | 11 (73) | 6 (40) | n.s. |
| G3 | 2 (13) | 7 (47) | n.s. |
| Морфологический вариант / Morphological variant | | | |
| инвазивный дольковый рак / invasive lobular carcinoma | - | 1 (7) | n.s. |
| инвазивный рак без признаков специфичности / invasive nonspecific cancer | 15 (100) | 14 (93) | n.s. |
| Иммуногистохимический тип / Immunohistochemical type | | | |
| люминальный A / luminal A | 6 (40) | 3 (20) | n.s. |
| люминальный B, Her2/neu – негативный / luminal B, Her2/neu – negative | 5 (33) | 4 (27) | n.s. |
| люминальный B, Her2/neu – позитивный / luminal B, Her2/neu – positive | - | 1 (7) | n.s. |
| тройной негативный / triple negative | 4 (27) | 7 (47) | n.s. |
| Степень васкуляризации / Grade of vascularization | | | |
| слабая / low | 5 (33) | 1 (7) | n.s. |
| умеренная / medium | 9 (60) | 8 (53) | n.s. |
| выраженная / moderate | 1 (7) | 6 (40) | <0,05 |
| Лимфоваскулярная инвазия / Lymphovascular invasion | 2 (13) | 15 (100) | <0,05 |
| Поражение регионарных лимфоузлов / Lymph node staging | | | |
| N0 | 15 (100) | 5 (33) | <0,05 |
| N1 | - | 9 (60) | <0,05 |
| N2 | - | 1 (7) | n.s. |

Примечание: данные представлены в виде абсолютного числа и доли, n (%), если не указано иначе; n.s. – non significant (не значимо).
Note: data presented as n (%) unless otherwise indicated; n.s. – non significant.

Таблица 2. Спонтанная продукция цитокинов клетками опухоли в группах 1, 2 и в группе контроля
Table 2. Spontaneous production of cytokines by tumour cells in groups 1, 2 and controls

| Цитокин / Cytokine | Группа контроля / Controls (n = 6) | Группа 1 / Group 1 (n = 15) | Группа 2 / Group 2 (n = 15) |
|---------------------------------|--|--------------------------------------|-----------------------------------|
| TNF- α | 3 [1,9; 4,5] | 12,5 [2,95; 16,1] ^a | 14,4 [13,8; 18,9] ^a |
| IFN- γ | 2,8 [2,3; 3,7] | 10,2 [4,6; 26,7] ^a | 3,5 [2,3; 4,9] ^b |
| MCP-1 | 212,3 [147,7; 204,5] | 1426,2 [1337,3; 1730,8] ^a | 1340 [1038; 1925] ^{a, b} |
| GM-CSF | 1,3 [1,2; 1,7] | 20,3 [12,5; 25,4] ^a | 17,4 [12,2; 26,4] ^a |
| G-CSF | 10,2 [4,7; 26,7] | 987 [562,5; 1138] ^a | 811 [668,1; 1162] ^a |
| VEGF | 141,4 [64,9; 204,5] | 1680 [1038; 2450] ^a | 2060 [1765; 3190] ^{a, b} |
| TGF- β 1 *10 ³ | 25,7 [21,2; 289,9] | 57,2 [47,9; 77,7] ^a | 65 [45; 118] ^{a, b} |

Примечание: данные представлены как медиана и 25–75-й процентиля, концентрация маркеров представлена в пкг/мл; ^a – $p < 0,05$ при сравнении с группой контроля; ^b – $p < 0,05$ при сравнении групп 1 и 2.

Note: the data are presented as median and 25th to the 75th percentile, the concentration of markers is presented in pg/ml; ^a – $p < 0.05$ when comparing with control; ^b – $p < 0.05$ when comparing 1st with 2nd group.

Таблица 3. Индекс влияния поликлональных активаторов на продукцию цитокинов в группах 1, 2 и в группе контроля
Table 3. Index of the effect of polyclonal activators on the production of cytokines in groups 1, 2 and controls

| Цитокин / Cytokine | Группа контроля / Controls (n = 6) | Группа 1 / Group 1 (n = 15) | Группа 2 / Group 2 (n = 15) |
|-----------------------|--|-----------------------------------|-----------------------------------|
| TNF- α | 1,3 [1; 1,6] | 34,9 [28,7; 41,8] ^a | 39,8 [33,7; 44,9] ^a |
| IFN- γ | 2,4 [1,9; 2,2] | 3,2 [2,5; 4,6] | 1,7 [1,5; 2,3] ^b |
| MCP-1 | 1,7 [1,5; 2,2] | 2,0 [1,6; 2,4] | 1,9 [1,7; 2,0] |
| GM-CSF | 3,1 [2,6; 4] | 2,4 [2,2; 2,6] | 2,1 [1,9; 2,6] |
| G-CSF | 1,1 [0,3; 1,7] | 2,5 [2,2; 2,7] ^a | 3,7 [3,8; 6,1] ^{a, b} |
| VEGF | 1,4 [1,0; 1,8] | 1,6 [1,3; 1,8] | 2,9 [2,5; 3,1] ^{a, b} |
| TGF- β 1 | 1,2 [0,6; 1,6] | 2,8 [0,87; 5,8] ^a | 4,5 [4,2; 5,7] ^{a, b} |

Примечание: данные представлены как медиана и 25–75-й процентиля; ^a – $p < 0,05$ при сравнении с группой контроля; ^b – $p < 0,05$ при сравнении групп 1 и 2.

Note: the data are presented as median and 25th to the 75th percentile, the concentration of markers is presented in pg/ml; ^a – $p < 0.05$ when comparing with control; ^b – $p < 0.05$ when comparing 1st with 2nd group.

TGF- β 1 – в 2,5 раза, VEGF – в 14,6 раза, GM-CSF – в 13,4 раза, G-CSF – в 79,5 раза.

При проведении сравнений между группами 1 и 2 статистически значимые отличия выявлены для следующих цитокинов: концентрация MCP-1 и IFN- γ была выше в группе 1, VEGF и TGF- β 1 – в группе 2.

В супернатанте клеток молочной железы из группы контроля добавление ПА приводило к повышению уровня медиаторов в диапазоне от 1,1 до 3,1 раза по сравнению с исходными величинами. При добавлении ПА в среду культивирования опухолевых клеток продукция TNF- α , G-CSF, VEGF и TGF- β 1 изменялась более выражено по сравнению со здоровой тканью молочной железы; для этих цитокинов определены более высокие значения ИВПА (табл. 3).

Между группами 1 и 2 установлены статистически значимые различия по ИВПА для G-CSF, VEGF, TGF- β 1: в группе 2 отмечались более высокие значения этих цитокинов. Уровень IFN- γ в группе 2 повышался менее значительно, чем в группе контроля.

ОБСУЖДЕНИЕ

Процессы, приводящие к перепрограммированию иммунного МкО при РМЖ, в настоящее время приобретают большое значение для разработки новой терапевтической стратегии, направленной на «нормализацию» окружающей опухоль стромы, а также на модуляцию иммунной системы с целью усиления противоопухолевой активности.

Высокая цитокин-продуцирующая активность при спонтанной и индуцированной ПА продукции у пациенток с изученными стадиями РМЖ в сравнении с неизменными клетками молочной железы может характеризовать структурно-функциональные изменения МкО и подтверждают значение иммунной системы в контроле за пролиферацией опухолевых клеток.

Биоптаты пациенток группы 1 (при локальном опухолевом росте) характеризовались увеличением спонтанной продукции TNF- α , IFN- γ , MCP-1, GM-CSF, G-CSF, что является следствием контроля иммунной системы над ростом опухоли с усилением

противоопухолевой активности. TNF- α – это плейотропный цитокин, играющий противоречивую роль. На начальных стадиях опухолевого роста индуцирует активацию иммунного ответа за счет влияния на макрофаги, дендритные клетки, естественные киллеры (NK-клетки) и В- и Т-лимфоциты, в МкО является одним из основных медиаторов воспаления. TNF- α участвует в дифференцировке иммуносупрессорных клеток, что приводит к уклонению от опухолевого иммунного надзора. Повышение уровня TNF- α , с одной стороны, сопровождается индукцией апоптоза, с другой – стимулирует неопластический ангиогенез, вызывает усиление гибели лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль. В итоге происходит усиление пролиферации и распространения опухолевых клеток. Такой двойственный механизм действия характерен для ряда компонентов МкО [14]. По мнению Madhusudan S. и соавт.: «Воспаление, способствующее инвазивности и индуцирующее иммуносупрессию, является одним из признаков МкО прогрессирующих опухолей» [15].

Усиление спонтанной продукции MCP-1 супернатантов можно считать результатом процессов, приводящих к поляризации макрофагов с образованием опухоли-опосредованных макрофагов (M1 и M2). По данным ряда исследований, M1 препятствует пролиферации опухолевой ткани, а M2 на фоне иммуносупрессии стимулируют ангиогенез, что способствует миграции и инвазии опухолевых клеток. Индуцированная ПА экспрессия MCP-1 также является подтверждением нарушенной функциональной активности макрофагов и образования макрофагов M2 [16]. Обнаруженное повышение в группе 1 уровня факторов роста по сравнению с контрольной группой свидетельствует о пролиферации опухоли и стимуляции ангиогенеза на начальных стадиях злокачественного процесса.

Цитокинпродуцирующая активность биоптатов в группе 2 (при распространенном опухолевом росте) по сравнению с группой 1 характеризуется более высоким уровнем факторов роста (VEGF и TGF- β 1), ИВПА этих факторов и G-CSF. При этом различий как по спонтанной, так и индуцированной продукции TNF- α , MCP-1 и GM-CSF в зависимости от стадии не установлено. Уровень IFN- γ при распространенном росте при спонтанной инкубации статистически значимо ниже уровня локального роста, а при индуцированной продукции ниже ИВПА нормальной ткани, что, возможно, свидетельствует о нарушении иммунной защиты организма на фоне опухолевой прогрессии.

Полученные результаты дают основание считать, что нарастание способности опухолевой ткани к миграции и инвазии сопровождается дисрегуляцией цитокиновой сети. Медиаторы МкО представляют собой сложную сеть клеточной передачи сигналов и свойств опухолевых клеток. Цитокины,

подавляющие иммунные клетки, на начальных этапах опухолевого роста препятствуют эффективному противоопухолевому иммунитету [17]. Первоначальное, характерное для воспалительного процесса, повышение цитокинпродуцирующей активности TNF- α , IFN- γ , MCP-1, GM-CSF, G-CSF становится одним из условий развития метастатического процесса при РМЖ [18].

Высокий уровень спонтанной продукции колоние-стимулирующих факторов, прежде всего G-CSF, активизирует выработку факторов роста. Повышение содержания TGF- β 1 подтверждает развитие иммунной супрессии, эпителиально-мезенхимального перехода, индукцию экспрессии VEGF. Рост продукции VEGF, как при спонтанной, так и при индуцированной ПА инкубации на распространенных стадиях подтверждает значение факторов роста в опухолевой прогрессии и развитии неопластического ангиогенеза. Усиление продукции факторов роста свидетельствует, что основой метастатического процесса у больных РМЖ становится развитие эпителиально-мезенхимального перехода и активация ангиогенеза. Эпителиально-мезенхимальный переход при РМЖ связан с присутствием ассоциированных с раком фибробластов, экспрессирующих активированную передачу сигналов TGF- β 1 [18]. Цитокин TGF- β 1 является основным медиатором подавления иммунитета в МкО и играет центральную роль в ингибировании как адаптивных, так и врожденных иммунных ответов во время опухолевой прогрессии. Компоненты измененного МкО действуют совместно, препятствуя эффективному противоопухолевому иммунитету, способствуя прогрессированию и метастазированию злокачественных клеток [15]. МкО при РМЖ можно считать критическим элементом развития и прогрессирования опухоли.

Следует отметить, что изученные группы представляли наиболее типичный возраст для пациенток с РМЖ, группы не различались по гистологическому варианту и иммуногистохимическому типу опухоли, что позволило провести сравнение между ними. Однако необходимо учитывать, что среди пациенток преобладал инвазивный рак без признаков специфичности и результаты исследования могут быть интерпретированы с учетом этих особенностей. К ограничениям исследования также относится небольшое количество пациенток в группах, различия между группами в выраженности васкуляризации и частоте лимфоваскулярной инвазии, что может влиять на цитокиновый профиль супернатантов. Для определения прогностической ценности иммуноонкологических маркеров требуются дальнейшие клинические исследования

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Производство цитокинов (TNF- α , MCP-1, GM-CSF, G-CSF, VEGF, TGF- β 1) в биоптатах РМЖ

значительно выше, чем в биоптатах неизменной молочной железы. Уровень спонтанной и индуцированной продукции зависит от стадии: для прогрес-

сирования и диссеминации опухолевого процесса характерна наибольшая продукция факторов роста, VEGF и TGF- β 1.

ВКЛАД АВТОРОВ

Ю.С. Гергенретер осуществляла набор пациентов, сбор клинических, лабораторных и анкетных данных, разработала концепцию, дизайн исследования и статистическую обработку, написала основную часть финальной версии статьи. Н.Б. Захарова разработала дизайн исследования и написала основную часть финальной версии статьи. О.Л. Морозова участвовала в разработке дизайна исследования, осуществляла анализ полученных результатов и написала часть финальной версии статьи. Все авторы утвердили окончательную версию публикации.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Yulia S. Gergenreter carried out the recruitment of patients, the collection of clinical, laboratory and questionnaire data, developed the concept, design of the study and statistical processing, wrote the main part of the final version of the article. Natalya B. Zakharova developed the design of the study and wrote the main part of the final version of the article. Olga L. Morozova participated in the development of the design of the study, analyzed the results and wrote part of the final version of the article. All authors approved the final version of the publication.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- 1 Vafaizadeh V, Barekati Z. Immuno-oncology biomarkers for personalized immunotherapy in breast cancer. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 8: 162. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00162> PMID: 32258038
- 2 Wen W.X., Leong C.O. Association of BRCA1- and BRCA2-deficiency with mutation burden, expression of PD-L1/PD-1, immune infiltrates, and T cell-inflamed signature in breast cancer. *PLoS One.* 2019; 14(4): e0215381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215381> PMID: 31022191
- 3 Gajewski T.F., Schreiber H., Fu Y.X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol.* 2013; 14(10): 1014–1022. <https://doi.org/10.1038/ni.2703> PMID: 24048123
- 4 Gnjatic S., Bronte V., Brunet L.R., et al. Identifying baseline immune-related biomarkers to predict clinical outcome of immunotherapy. *J Immunother Cancer.* 2017; 5: 44. <https://doi.org/10.1186/s40425-017-0243-4> PMID: 28515944
- 5 Bianchini G., Gianni L. The immune system and response to HER2-targeted treatment in breast cancer. *Lancet Oncol.* 2014; 15(2): e58–68. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70477-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70477-7) PMID: 24480556
- 6 Spencer K.R., Wang J., Silk A.W., et al. Biomarkers for immunotherapy: current developments and challenges. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2016; 35: e493–503. https://doi.org/10.1200/EDBK_160766 PMID: 27249758
- 7 Кунц Т.А., Карпукхина К.В., Михайлова Е.С. и др. Цитокиновый профиль супернатантов иммунокомпетентных клеток периферической крови и опухоли при инвазивном протоковом раке молочной железы. *Современные проблемы науки и образования.* (Электронный журнал) 2016; 5. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=25296> (дата обращения: 02.01.2021).
- 8 Li Q., Wang Y., Jia W., et al. Low-dose anti-angiogenic therapy sensitizes breast cancer to pd-1 blockade. *Clin Cancer Res.* 2020; 26(7): 1712–1724. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-2179> PMID: 31848190
- 9 Lee S.K., Bae S.Y., Lee J.H., et al. Distinguishing low-risk luminal a breast cancer subtypes with ki-67 and p53 is more predictive of long-term survival. *PLoS ONE.* 2015; 10(8): e0124658. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124658> PMID: 26241661
- 10 Ribas A., Wolchok J.D. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science.* 2018; 359(6382): 1350–1355. <https://doi.org/10.1126/science.aar4060> PMID: 29567705
- 1 Vafaizadeh V, Barekati Z. Immuno-oncology biomarkers for personalized immunotherapy in breast cancer. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 8: 162. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00162> PMID: 32258038
- 2 Wen W.X., Leong C.O. Association of BRCA1- and BRCA2-deficiency with mutation burden, expression of PD-L1/PD-1, immune infiltrates, and T cell-inflamed signature in breast cancer. *PLoS One.* 2019; 14(4): e0215381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215381> PMID: 31022191
- 3 Gajewski T.F., Schreiber H., Fu Y.X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol.* 2013; 14(10): 1014–1022. <https://doi.org/10.1038/ni.2703> PMID: 24048123
- 4 Gnjatic S., Bronte V., Brunet L.R., et al. Identifying baseline immune-related biomarkers to predict clinical outcome of immunotherapy. *J Immunother Cancer.* 2017; 5: 44. <https://doi.org/10.1186/s40425-017-0243-4> PMID: 28515944
- 5 Bianchini G., Gianni L. The immune system and response to HER2-targeted treatment in breast cancer. *Lancet Oncol.* 2014; 15(2): e58–68. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70477-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70477-7) PMID: 24480556
- 6 Spencer K.R., Wang J., Silk A.W., et al. Biomarkers for immunotherapy: current developments and challenges. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2016; 35: e493–503. https://doi.org/10.1200/EDBK_160766 PMID: 27249758
- 7 Kunts T.A., Karpukhina K.V., Mikhaylova E.S., et al. Tsitokinovyi profil' supernatantov immunokompetentnykh kletok perifericheskoi krovi i opukholi pri invazivnom protokovom rake molochnoi zhelezy [Cytokine pattern of supernatant of blood immunocompetent cells and tumor at invasive ductal carcinoma of the breast.] *Modern problems of science and education.* 2016; 5 (In Russian). URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=25296> (accessed: 02.01.2021).
- 8 Li Q., Wang Y., Jia W., et al. Low-dose anti-angiogenic therapy sensitizes breast cancer to pd-1 blockade. *Clin Cancer Res.* 2020; 26(7): 1712–1724. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-2179> PMID: 31848190
- 9 Lee S.K., Bae S.Y., Lee J.H., et al. Distinguishing low-risk luminal a breast cancer subtypes with ki-67 and p53 is more predictive of long-term survival. *PLoS ONE.* 2015; 10(8): e0124658. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124658> PMID: 26241661
- 10 Ribas A., Wolchok J.D. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science.* 2018; 359(6382): 1350–1355. <https://doi.org/10.1126/science.aar4060> PMID: 29567705

- 11 *Li W., Ma H., Zhang J., et al.* Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 13856. Erratum in: *Sci Rep.* 2018; 8(1): 4276. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14364-2> PMID: 29062075
- 12 *Yang X., Zhang K., Zhang C., et al.* Accuracy of analysis of cfDNA for detection of single nucleotide variants and copy number variants in breast cancer. *BMC Cancer.* 2019; 19(1): 465. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5698-x> PMID: 31101027
- 13 *Chakravarthy A., Khan L., Bensler N.P., et al.* TGF- β -associated extracellular matrix genes link cancer-associated fibroblasts to immune evasion and immunotherapy failure. *Nat Commun.* 2018; 9(1): 4692. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06654-8> PMID: 30410077
- 14 *Mercogliano M.F., Bruni S., Mauro F., et al.* Harnessing tumor necrosis factor alpha to achieve effective cancer immunotherapy. *Cancers (Basel).* 2021; 13(3): 564. <https://doi.org/10.3390/cancers13030564> PMID: 33540543
- 15 *Madhusudan S., Foster M., Muthuramalingam S.R., et al.* A phase II study of etanercept (Enbrel), a tumor necrosis factor alpha inhibitor in patients with metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(19): 6528–6534. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0730> PMID: 15475440
- 16 *Samarendra H., Jones K., Petrinic T., et al.* A meta-analysis of CXCL12 expression for cancer prognosis. *Br J Cancer.* 2017; 117(1): 124–135. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.134> PMID: 28535157
- 17 *Carey L.A., Berry D.A., Cirincione C.T., et al.* Molecular heterogeneity and response to neoadjuvant human epidermal growth factor receptor 2 targeting in CALGB 40601, a randomized phase III trial of paclitaxel plus trastuzumab with or without lapatinib. *J Clin Oncol.* 2016; 34(6): 542–549. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.62.1268> PMID: 26527775
- 18 *Hagemann T., Lawrence T., McNeish I., et al.* “Re-educating” tumor-associated macrophages by targeting NF- κ B. *J Exp Med.* 2008; 205(6): 1261–1268. <https://doi.org/10.1084/jem.20080108> PMID: 18490490
- 11 *Li W., Ma H., Zhang J., et al.* Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 13856. Erratum in: *Sci Rep.* 2018; 8(1): 4276. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14364-2> PMID: 29062075
- 12 *Yang X., Zhang K., Zhang C., et al.* Accuracy of analysis of cfDNA for detection of single nucleotide variants and copy number variants in breast cancer. *BMC Cancer.* 2019; 19(1): 465. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5698-x> PMID: 31101027
- 13 *Chakravarthy A., Khan L., Bensler N.P., et al.* TGF- β -associated extracellular matrix genes link cancer-associated fibroblasts to immune evasion and immunotherapy failure. *Nat Commun.* 2018; 9(1): 4692. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06654-8> PMID: 30410077
- 14 *Mercogliano M.F., Bruni S., Mauro F., et al.* Harnessing tumor necrosis factor alpha to achieve effective cancer immunotherapy. *Cancers (Basel).* 2021; 13(3): 564. <https://doi.org/10.3390/cancers13030564> PMID: 33540543
- 15 *Madhusudan S., Foster M., Muthuramalingam S.R., et al.* A phase II study of etanercept (Enbrel), a tumor necrosis factor alpha inhibitor in patients with metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(19): 6528–6534. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0730> PMID: 15475440
- 16 *Samarendra H., Jones K., Petrinic T., et al.* A meta-analysis of CXCL12 expression for cancer prognosis. *Br J Cancer.* 2017; 117(1): 124–135. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.134> PMID: 28535157
- 17 *Carey L.A., Berry D.A., Cirincione C.T., et al.* Molecular heterogeneity and response to neoadjuvant human epidermal growth factor receptor 2 targeting in CALGB 40601, a randomized phase III trial of paclitaxel plus trastuzumab with or without lapatinib. *J Clin Oncol.* 2016; 34(6): 542–549. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.62.1268> PMID: 26527775
- 18 *Hagemann T., Lawrence T., McNeish I., et al.* “Re-educating” tumor-associated macrophages by targeting NF- κ B. *J Exp Med.* 2008; 205(6): 1261–1268. <https://doi.org/10.1084/jem.20080108> PMID: 18490490

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Гергенретер Юлия Сергеевна, врач-онколог ГУЗ «Областной клинический онкологический диспансер», Саратов; соискатель кафедры патологической физиологии ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4483-6163>

Захарова Наталия Борисовна, д-р мед. наук, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9410-2240>

Морозова Ольга Леонидовна✉, д-р. мед. наук, профессор кафедры патофизиологии ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2453-1319>

Yulia S. Gergentreter, oncologist of the Regional Clinical Oncology Dispensary, Saratov; Applicant at the Department of Pathological Physiology, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4483-6163>

Natalya B. Zakharova, Dr. of Sci. (Medicine), Professor, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Saratov State Medical University n. a. V.I. Razumovsky.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9410-2240>

Olga L. Morozova✉, Dr. of Sci. (Medicine), Professor, Department of Pathological Physiology, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2453-1319>

✉ Автор, ответственный за переписку / Corresponding author