

Т.Ф. Маливанова, Т.А. Астрелина, И.В. Кобзева, В.А. Никитина, Ю.Б. Сучкова,  
А.И. Головкова, А.С. Осташкин, Д.Ю. Усупжанова, В.А. Брунчуков, А.А. Расторгуева,  
Е.И. Добровольская, А.П. Кирильчев, М.Ю. Сухова, Н.В. Соколова, О.Г. Михадаркина, А.С. Самойлов

## ОСОБЕННОСТИ СИСТЕМНОГО ОТВЕТА НА АДЬЮВАНТНУЮ ЛУЧЕВУЮ ТЕРАПИЮ У НОСИТЕЛЕЙ ПОЛИМОРФИЗМА *-308(G/A)TNF* БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

Контактное лицо: Татьяна Федоровна Маливанова, e-mail: tmalivanova@yandex.ru

### РЕФЕРАТ

**Цель:** Адьювантная лучевая терапия (АДЛТ), неотъемлемая часть локорегиональной терапии рака молочной железы (РМЖ), действуя не только местно, но и системно, приводит к сдвигу гомеостаза, что отражается в показателях общеклинических тестов. Фактор некроза опухоли (*TNF*) – провоспалительный цитокин, на продукцию которого способна влиять однонуклеотидная замена *-308(G/A)TNF*. Минорный аллель *-308A* может входить в стабильный наследуемый гаплотип *AH8.1* комплекса генов HLA, при этом носительство аллеля *-308A* вне гаплотипа *AH8.1* ассоциировано с плохим прогнозом у больных РМЖ. Целью исследования была оценка особенностей системного ответа на курс АДЛТ у носителей *TNF*-ассоциированных генотипов при РМЖ.

**Материал и методы:** Выборка представлена 147 больными РМЖ, проходившими курс АДЛТ (РОД 2 Гр до СОД 50 Гр). Клинико-морфологические характеристики и данные общеклинического анализа крови получали из историй болезни. Образцы венозной крови для исследования получали в начале и в конце курса АДЛТ. Методом аллель-специфической ПЦР определяли аллели *-308(G/A)TNF* и маркерные аллели гаплотипа *AH8.1* (*HLA-A\*01*, *HLA-B\*08* и *HLA-DRB1\*03*). Методом ИФА концентрации *sTNF* определяли в 102 образцах плазмы крови.

**Результаты:** На основе генотипирования были выделены *TNF*-ассоциированные группы сравнения: (1) 114 носителей *-308GG* гена *TNF* независимо от гаплотипа *AH8.1* (77,6 %); (2) 23 носителя *-308A(AH8.1pos)* имели хотя бы один маркерный аллель *AH8.1* (15,6 %); (3) 10 носителей *-308A(AH8.1neg)* не имели ни одного маркерного аллеля *AH8.1* (6,8 %). Средняя концентрация *sTNF* как в начале, так и в конце АДЛТ в группе *-308A(AH8.1neg)* была достоверно выше и, в отличие от других групп сравнения, достоверно не снижалась в конце курса АДЛТ. Для лейкоцитов, тромбоцитов и лимфоцитов в ряде случаев выявлено достоверное снижение абсолютных показателей при проведении АДЛТ, однако в рамках референсных значений. В группе *-308A(AH8.1neg)* корреляционный анализ выявил высокую силу положительных связей между *sTNF* и лейкоцитами ( $r=0,71$ ;  $p=0,027$ ), тромбоцитами ( $r=0,67$ ;  $p=0,04$ ), нейтрофилами ( $r=0,70$ ;  $p=0,027$ ) только в конце АДЛТ, тогда как в начале АДЛТ эти корреляционные связи были слабыми ( $r\leq 0,3$ ) и статистически недостоверными. Для других генетических групп выявленные корреляционные связи не имели достаточной достоверности.

**Заключение:** Выявленные особенности системного ответа на АДЛТ у носителей прогностически неблагоприятного генотипа *-308A(AH8.1neg)* – высокая концентрация *sTNF* и положительная корреляция с содержанием лейкоцитов (вероятно, за счет нейтрофилов) и тромбоцитов – могут рассматриваться как мишени индивидуализированной терапии.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, адьювантная лучевая терапия, фактор некроза опухоли, геномный полиморфизм

**Для цитирования:** Маливанова Т.Ф., Астрелина Т.А., Кобзева И.В., Никитина В.А., Сучкова Ю.Б., Головкова А.И., Осташкин А.С., Усупжанова Д.Ю., Брунчуков В.А., Расторгуева А.А., Добровольская Е.И., Кирильчев А.П., Сухова М.Ю., Соколова Н.В., Михадаркина О.Г., Самойлов А.С. Особенности системного ответа на адьювантную лучевую терапию у носителей полиморфизма *-308(G/A)TNF* больных раком молочной железы // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2023. Т. 68. № 6. С. 92–98. DOI:10.33266/1024-6177-2023-68-6-92-98

T.F. Malivanova, T.A. Astrelina, I.V. Kobzeva, V.A. Nikitina, Y.B. Suchkova,  
A.I. Golovkova, A.S. Ostashkin, D.Y. Usupzhanova, V.A. Brunchukov, A.A. Rastorgueva,  
E.I. Dobrovol'skaya, A.P. Kirilchev, M.Yu. Sukhova, O.G. Mikhadarkina, N.V. Sokolova, A.S. Samoilov

## Features of the Systemic Response to Adjuvant Radiation Therapy in Carriers of Polymorphism *-308(G/A)TNF* in Breast Cancer Patients

A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

Contact person: Tatyana Feodorovna Malivanova, e-mail: tmalivanova@yandex.ru

### ABSTRACT

**Background:** Adjuvant radiation therapy (ART), an integral part of locoregional breast cancer (BC) therapy, acting not only locally, but also systemically and leads to a shift in homeostasis, which is reflected in routine general clinical tests. Tumor necrosis factor (*TNF*) is a proinflammatory cytokine, the production of which can be influenced by the single-nucleotide substitution *-308(G/A)TNF*. The minor allele *-308A* can be included in the stable inherited haplotype *AH8.1* of the HLA gene complex. At the same time, the carriage of the *-308A* without the *AH8.1* haplotype is associated with a poor prognosis in patients with BC. The aim of the study was to evaluate the features of the systemic response to the course of ART in carriers of *TNF*-associated genotypes with BC.

**Material and methods:** The sample is represented by 147 BC patients who underwent a course of ART (2 Gy in 25 fractions). Clinical and morphological characteristics and data of general clinical blood analysis were obtained from medical histories. Venous blood samples for

the study were obtained at the beginning and at the end of the ART course. Alleles *-308(G/A)TNF* and marker alleles of haplotype *AH8.1* (*HLA-A\*01*, *HLA-B\*08* and *HLA-DRB1\*03*) were determined by allele-specific PCR. *sTNF* concentrations were determined by the ELISA in 102 blood plasma samples.

**Results:** *TNF*-associated comparison groups were identified based on genotyping: (1) 114 carriers *-308GG* of the *TNF* gene, regardless of the *AH8.1* haplotype (77,6 %); (2) 23 carrier *-308A(AH8.1pos)* had at least one *AH8.1* marker allele (15,6 %); (3) 10 carriers *-308A(AH8.1neg)* did not have any *AH8.1* marker allele (6,8 %). In the *-308A(AH8.1neg)* group the average concentration of *sTNF* both at the beginning and at the end of ART was significantly higher and, unlike other comparison groups, did not significantly decrease at the end of the ART course. A significant decrease in absolute values was revealed during ART in a number of cases for leukocytes, platelets and lymphocytes, however within the reference values. In the group *-308A(AH8.1neg)* correlation analysis revealed a high strength of positive connections between *sTNF* and leukocytes ( $r=0.71$ ;  $p=0.027$ ), platelets ( $r=0.67$ ;  $p=0.04$ ), neutrophils ( $r=0.70$ ;  $p=0.027$ ) only at the end of ART, whereas at the beginning ART these correlations were weak ( $r\leq 0.3$ ) and statistically unreliable. For other genetic groups, the revealed correlations were not strong enough.

**Conclusion:** The revealed features of the systemic response to ART for carriers of a prognostically unfavorable genotype *-308A(AH8.1neg)* – a high concentration of *sTNF* and a positive correlation with the content of leukocytes (probably due to neutrophils) and platelets – can be considered as targets of individualized therapy.

**Keywords:** breast cancer; adjuvant radiation therapy; tumor necrosis factor; genomic polymorphism

**For citation:** Malivanova TF, Astrelina TA, Kobzeva IV, Nikitina VA, Suchkova YB, Golovkova AI, Ostashkin AS, Usupzhanova DY, Brunchukov VA, Rastorgueva AA, Dobrovolskaya EI, Kirilchev AP, Sukhova MYu, Mikhadarkina OG, Sokolova NV, Samoilov AS. Features of the Systemic Response to Adjuvant Radiation Therapy in Carriers of Polymorphism *-308(G/A)TNF* in Breast Cancer Patients. Medical Radiology and Radiation Safety. 2023;68(6):92–98. (In Russian). DOI:10.33266/1024-6177-2023-68-6-92-98

## Введение

Рак молочной железы (РМЖ) – это одна из наиболее распространенных форм злокачественных новообразований. Аджьювантная лучевая терапия (АДЛТ) является неотъемлемой частью локорегиональной терапии РМЖ. Наряду с основным механизмом воздействия ионизирующего излучения на опухолевые клетки – повреждением ДНК, активно изучается радиационно-индуцированный иммунный ответ на повреждение тканей и последующее воспаление [1]. Предполагается, что иммуогенная гибель клеток обеспечивает механистическую связь между местным и системным воздействием ионизирующего излучения и что абскопальный эффект может объяснить вклад лучевой терапии в снижении смертности от РМЖ [2]. АДЛТ, действуя не только местно, но и системно, приводит к сдвигу гомеостаза, что отражается в показателях общеклинических тестов. При РМЖ показатели формулы крови, которые характеризуют изменение гомеостаза и являются маркерами системной воспалительной реакции, могут иметь прогностическое значение [3].

Фактор некроза опухоли (Tumor Necrosis Factor, *TNF*) – это провоспалительный цитокин, секретируется преимущественно моноцитами и макрофагами (системно и локально в пораженных тканях), также лимфоцитами, NK-клетками, нейтрофилами, клетками эндотелия, нейроглией. *TNF* имеет два рецептора, активация которых приводит либо к гибели клетки, либо её активации и пролиферации. В низких концентрациях *TNF* выполняет гомеостатические функции, такие как защита от внутриклеточных патогенов, тогда как в высоких концентрациях *TNF* способствует избыточному воспалению и повреждению органов [4].

Известно, что на уровень продукции *TNF* способны влиять функциональные одно-нуклеотидные замены в регуляторной области гена, а полиморфизм *-308(G/A)TNF* (rs1800629) в экспериментах *in vitro* увеличивает продукцию цитокина [5]. Ген *TNF* расположен в области генов *HLA* III класса (6p21.3) и минорный аллель *-308A* может входить в стабильный наследуемый гаплотип *AH8.1*, ассоциированный с предрасположенностью к аутоиммунным заболеваниям [6]. Ранее нами было показано, что при РМЖ носительство аллеля *-308A* вне гаплотипа *AH8.1* ассоциировано с существенным снижением общей выживаемости больных [7]. Определение особенностей течения заболевания для этой прогности-

чески неблагоприятной группы больных РМЖ поможет в поиске специфических терапевтических мишеней.

Цель исследования – оценка особенностей системной воспалительной реакции у носителей *TNF*-ассоциированных генотипов на фоне проведения курса АДЛТ при РМЖ.

## Материал и методы

Выборка представлена 147 больными РМЖ без удаленных метастазов после хирургического лечения, проходившими курс АДЛТ (РОД 2 Гр до СОД 50 Гр) в ФМБЦ имени А. И. Бурназяна ФМБА России в 2021–2022 гг. (от 33 до 87 лет; средний возраст 58,0). Клинико-морфологические характеристики и данные общего клинического анализа крови получали из историй болезни. До начала исследования от каждого из участников получено информированное добровольное согласие, в соответствии с этическими стандартами нашего центра и национального комитета по исследовательской этике.

Образцы венозной крови для исследования получали в начале и в конце курса АДЛТ (на 1-й и на 5-й неделе). Из лейкоцитов венозной крови выделяли геномную ДНК набором QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Нидерланды). Методом аллель-специфической ПЦР определяли аллели *-308(G/A)TNF* и маркерные аллели гаплотипа *AH8.1* (*HLA-A\*01*, *HLA-B\*08* и *HLA-DRB1\*03*), как ранее [7]. Плазма крови до проведения ИФА хранилась при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Концентрации *sTNF* определяли набором альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ по протоколу производителя (ЗАО «ВЕКТОР-БЕСТ», Россия).

Группы сравнения выделяли на основе результатов генетического анализа. Средние значения представляли как Mean [95 % CI]. При статистической обработке данных использовали критерий согласия Пирсона  $\chi^2$ , парный/непарный *t*-критерий Стьюдента, ANOVA с поправкой на множественные сравнения по Тьюки, корреляционный и линейный регрессионный анализ. Для всех критериев различия считали достоверными при достижении  $p<0,05$ .

## Результаты

В полученной выборке 33 из 147 больных РМЖ (22,5 %) являлись носителями аллеля *-308A* (2 из них – в виде гомозиготы) и распределение генотипов *-308(G/A)TNF* соответствовало распределению Харди–Вайнберга. На основе полученных данных о полиморфизме

-308(G/A)TNF и маркерных аллелей гаплотипа ANH8.1 были выделены три TNF-ассоциированные группы сравнения: (1) 114 носителей дикого типа -308GG гена TNF независимо от гаплотипа ANH8.1 (77,6 %); (2) 23 носителя -308A(ANH8.1pos) имели хотя бы один маркерный аллель гаплотипа ANH8.1 (15,6 %) (3) 10 носителей -308A(ANH8.1neg) не имели ни одного маркерного аллеля ANH8.1 (6,8 %).

Клинико-морфологические характеристики больных РМЖ в группах сравнения не имели статистически значимых отличий относительно возраста, стадии заболевания, гистологического типа, степени злокачественности, молекулярного подтипа опухоли и числа пациентов, получавших полихимиотерапию (ПХТ) до проведения курса АДЛТ (табл. 1).

Таблица 1

**Клинико-морфологические характеристики больных РМЖ**  
**Clinical and morphological characteristics of breast cancer patients**

| Клинико-морфологические характеристики | -308GG            | -308A (ANH8.1pos) | -308A (ANH8.1neg) | ВСЕГО             |
|----------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Возраст                                | n=114             | n=23              | n=10              | n=147             |
| Mean [95 % CI]                         | 57,3 [55,3; 59,3] | 60,5 [56,4; 64,6] | 60,5 [52,6; 68,4] | 58,0 [56,3; 59,8] |
| Стадия РМЖ                             | n=114             | n=23              | n=10              | n=147             |
| 0                                      | 3 (2,6 %)         | 1 (4,3 %)         | 1 (10,0 %)        | 5 (3,4 %)         |
| I                                      | 39 (34,2 %)       | 6 (26,1 %)        | 3 (30,0 %)        | 48 (32,7 %)       |
| II                                     | 51 (44,7 %)       | 10 (43,5 %)       | 3 (30,0 %)        | 64 (43,5 %)       |
| III                                    | 21 (18,4 %)       | 6 (26,1 %)        | 3 (30,0 %)        | 30 (20,4 %)       |
| Гистологический тип                    | n=114             | n=23              | n=10              | n=147             |
| Неспецифический                        | 94 (82,5 %)       | 16 (69,6 %)       | 8 (80,0 %)        | 118 (80,3 %)      |
| Дольковый                              | 15 (13,2 %)       | 5 (21,7 %)        | 2 (20,0 %)        | 22 (15,0 %)       |
| Другие                                 | 5 (4,4 %)         | 2 (8,7 %)         | 0 (0,0 %)         | 7 (4,8 %)         |
| Степень злокачественности              | n=105             | n=21              | n=9               | n=135             |
| G1                                     | 14 (13,3 %)       | 2 (9,5 %)         | 0 (0,0 %)         | 16 (11,9 %)       |
| G2                                     | 61 (58,1 %)       | 14 (66,7 %)       | 8 (88,9 %)        | 83 (61,5 %)       |
| G3                                     | 30 (28,6 %)       | 5 (23,8 %)        | 1 (11,1 %)        | 36 (26,7 %)       |
| Молекулярный подтип                    | n=109             | n=23              | n=10              | n=142             |
| Lum A                                  | 30 (27,5 %)       | 7 (30,4 %)        | 2 (20,0 %)        | 39 (27,5 %)       |
| Lum B                                  | 61 (56,0 %)       | 12 (52,2 %)       | 6 (60,0 %)        | 79 (55,6 %)       |
| HER2                                   | 5 (4,6 %)         | 3 (13,0 %)        | 1 (10,0 %)        | 9 (6,3 %)         |
| TN                                     | 13 (11,9 %)       | 1 (4,3 %)         | 1 (10,0 %)        | 15 (10,6 %)       |
| Проведенное лечение                    | n=114             | n=23              | n=10              | n=147             |
| ПХТ                                    | 74 (64,9 %)       | 13 (56,5 %)       | 5 (50,0 %)        | 92 (62,6 %)       |
| Не проводилось                         | 40 (35,1 %)       | 10 (43,5 %)       | 5 (50,0 %)        | 55 (37,4 %)       |

Для определения особенностей системной реакции на АДЛТ в выделенных генетических группах была проанализирована динамика абсолютных показателей формулы крови и концентраций sTNF (рис. 1). Для всех генетических групп сравнения было отмечено стати-

стически значимое снижение количества лимфоцитов, для носителей генотипа -308GG статистически значимым было также снижение лейкоцитов и тромбоцитов, для носителей -308A(ANH8.1pos) – снижение тромбоцитов. Вместе с тем, все средние показатели оставались в пределах референсных значений, за исключением абсолютных показателей лимфоцитарной фракции для группы -308A(ANH8.1pos) в конце курса АДЛТ (рис. 1 а-в). Для нейтрофилов, моноцитов, базофилов и эозинофилов средние показатели во всех группах находились также в пределах референсных значений, но без статистически значимой динамики (рис. 1г-ж). Для 102 больных РМЖ (71 носитель генотипа -308GG, 21 носитель -308A(ANH8.1pos) и 10 носителей -308A(ANH8.1neg)) в плазме крови были определены концентрации sTNF. Средние значения концентраций sTNF в группе носителей -308A(ANH8.1neg) были достоверно выше в начале и в конце АДЛТ (13,6 [1,3; 25,9] пкг/мл и 17,8 [-0,1; 35,6] пкг/мл соответственно), по сравнению с носителями генотипа -308GG (4,9 [3,0; 6,7] пкг/мл в начале АДЛТ и 2,9 [1,8; 4,1] пкг/мл в конце АДЛТ) и -308A(ANH8.1pos) (6,7 [1,8; 11,6] пкг/мл в начале АДЛТ и 1,9 [0,49; 3,39] пкг/мл в конце АДЛТ) (рис. 1з).

В трех генетических группах сравнения до и после проведения курса АДЛТ были построены тепловые карты значений коэффициента корреляции Спирмена (рис. 2). Нужно отметить, что все статистически значимые корреляционные связи оказались положительными. В целом, для носителей генотипов -308GG и -308A(ANH8.1pos) корреляционные связи были довольно слабыми и относительно стабильными – незначительно изменялись после курса АДЛТ (рис. 2а и 2б), тогда как для носителей -308A(ANH8.1neg) – довольно сильными и с выраженной динамикой при проведении АДЛТ (рис. 2в).

При анализе корреляционных связей sTNF статистически значимая слабая корреляция была выявлена для носителей генотипа -308GG между sTNF и базофилами ( $r_s=0,28$ ;  $p=0,020$ ), моноцитами ( $r_s=0,30$ ;  $p=0,014$ ) – в начале АДЛТ, и лейкоцитами ( $r_s=0,25$ ;  $p=0,036$ ), эозинофилами ( $r_s=0,27$ ;  $p=0,022$ ) – в конце АДЛТ (рис. 2а). Линейный характер корреляции sTNF с базофилами был подтвержден в начале АДЛТ ( $r_p=0,27$ ;  $p=0,027$ ) (рис. 2г) и с эозинофилами в конце АДЛТ ( $r_p=0,34$ ;  $p=0,0034$ ) (рис. 2д). В группе -308A(ANH8.1neg) статистически значимые положительные сильные корреляционные связи были выявлены только после АДЛТ между sTNF и лейкоцитами ( $r_s=0,71$ ;  $p=0,027$ ), тромбоцитами ( $r_s=0,67$ ;  $p=0,04$ ), нейтрофилами ( $r_s=0,70$ ;  $p=0,027$ ) (рис. 2в) с подтвержденной линейностью связи sTNF с лейкоцитами ( $r_p=0,63$ ;  $p=0,049$ ; 40 % объясненной вариабельности) и тромбоцитами ( $r_p=0,67$ ;  $p=0,034$ ; 45 % объясненной вариабельности) (рис. 2е и 2ж).

### Обсуждение

TNF играет существенную роль на всех этапах канцерогенеза, при прогрессировании и метастазировании РМЖ. Эксперименты *in vitro* и результаты немногочисленных доклинических и клинических испытаний, систематизированные Cruceriu et al [8], говорят о том, что при различных подходах к лечению РМЖ TNF может быть как мишенью, так и лекарственным средством, и потенциал TNF в терапии РМЖ представляет большой интерес.

Полиморфизм -308(G/A) TNF широко изучается как маркер предрасположенности к заболеванию раком молочной железы и в гораздо меньшей степени как маркер прогноза РМЖ. Ранее было показано, что группа носи-

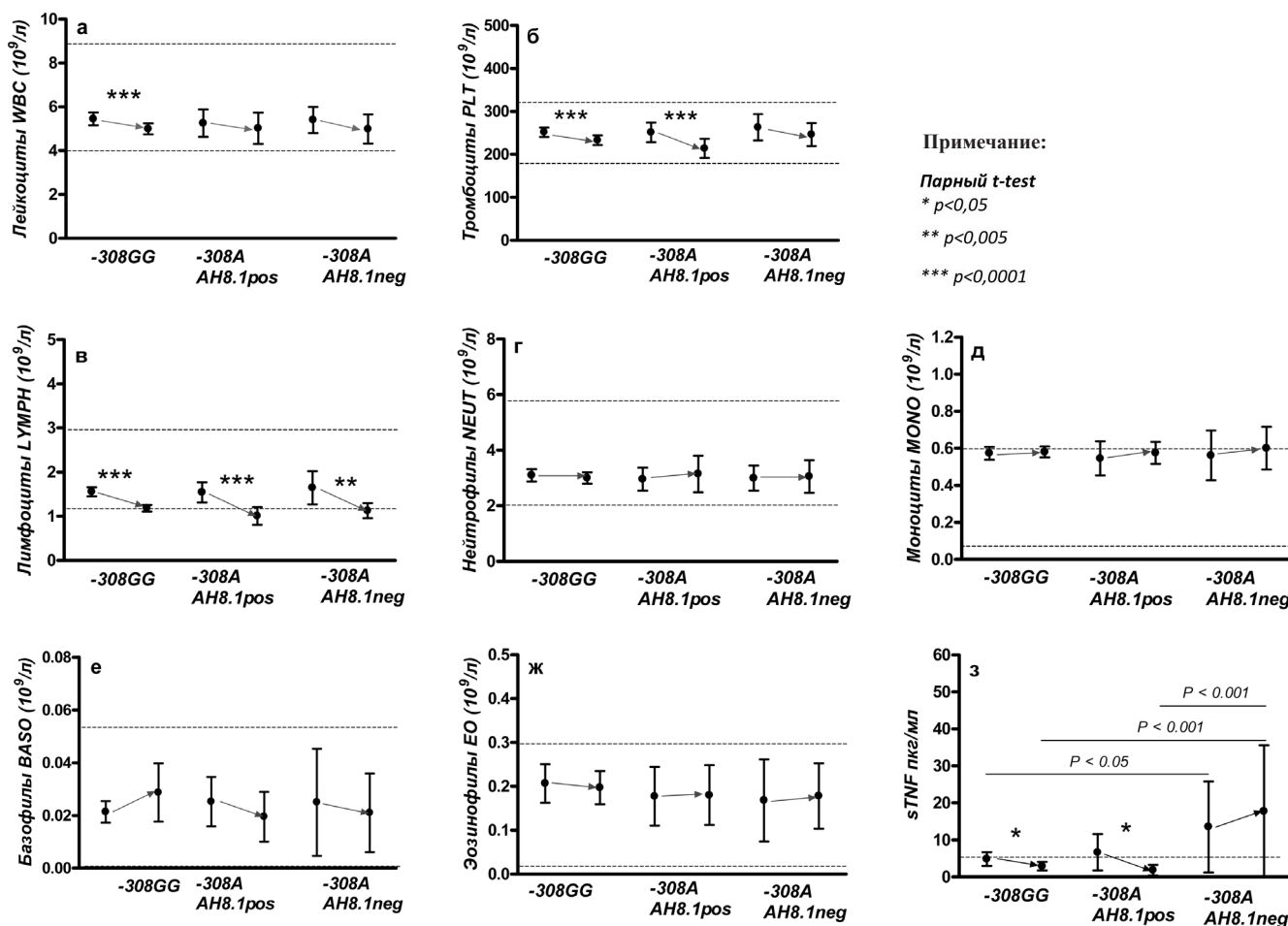


Рис. 1. Абсолютные показатели формулы крови и концентраций *sTNF* в начале и в конце курса АДЛТ  
 Fig. 1. Absolute values of blood count and *sTNF* concentration at the beginning and at the end of the ART course

телей аллеля *-308A* гетерогенна, и прогноз РМЖ зависит от геномного окружения, а именно от наследуемого гаплотипа генов *HLA*, в котором находится этот аллель [7]. Наше исследование подтвердило полученные ранее данные [9], что группа больных РМЖ – носителей прогностически неблагоприятного генотипа *-308A(AH8.1neg)* отличается высоким уровнем *sTNF* от носителей как распространенного генотипа *-308GG*, так и от носителей аллеля *-308A* при наличии хотя бы одного дополнительного аллеля гаплотипа *AH8.1* (группа *-308A(AH8.1pos)*). Примечательно, что в то время как другие группы реагируют на АДЛТ статистически значимым снижением уровня цитокина, для носителей *-308A(AH8.1neg)* уровень *sTNF* повышался, хотя и статистически не достоверно. В нашем исследовании АДЛТ угнетающе действовала на уровень *TNF* у более чем 90 % больных РМЖ, тогда как у носителей *-308A(AH8.1neg)* уровень *TNF* после радиотерапии был почти на порядок выше (рис. 1з). Подобное исследование проводилось впервые, в публикациях представлены лишь данные об отсутствии статистически значимых отличий между абсолютными значениями уровня *sTNF* до и после стандартного курса радиотерапии в общей группе больных РМЖ (без учета генотипических различий) [10].

Известно, что АДЛТ оказывает угнетающее действие на лимфоциты [11], абсолютное число которых в нашем исследовании также достоверно снижалось во всех генетических группах, однако снижение ниже референсных значений было отмечено только для носителей

*-308A(AH8.1pos)* (рис. 1в). Известно, что при инфекции вирусом иммунодефицита человека аллель *-308A* гена *TNF* ассоциирован с усиленным апоптозом лимфоцитов [12]. С другой стороны, аутоиммунные реакции усиливают иммунологический надзор за счет повышения общего иммунного тонуса, способствуют уничтожению циркулирующих опухолевых клеток и, вероятно, могут давать преимущества в общей выживаемости, что объясняет благоприятное влияние аутоиммунного гаплотипа *AH8.1* на общую выживаемость больных РМЖ [7].

Основными продуцентами *TNF* считаются моноциты и тканевые макрофаги [13]. Мы не обнаружили достоверных изменений абсолютных показателей для моноцитов периферической крови при проведении АДЛТ. Слабая положительная корреляция между количеством моноцитов и концентрацией *sTNF* была отмечена для носителей генотипа *-308GG*, но не для других генетических групп, и только до проведения АДЛТ (рис. 2а). Это еще раз подчеркивает отличие минорных групп носителей полиморфного аллеля *-308A* от основной группы носителей дикого типа *-308GG*.

По данным литературы, АДЛТ снижает абсолютное количество тромбоцитов [14], что соответствует нашим результатам для носителей генотипов *-308GG* и *-308A(AH8.1pos)*. Наиболее интересно, что для прогностически неблагоприятной группы носителей генотипа *-308A(AH8.1neg)* при проведении АДЛТ достоверно не изменялись абсолютные показатели тромбоцитов, при этом обнаруживалась весьма высокая положительная ли-

**а**

|                    |       | после проведения АДЛТ |             |             |             |             |             |             |             |
|--------------------|-------|-----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                    |       | WBC                   | PLT         | BASO        | EO          | MONO        | LYMPH       | NEUT        | sTNF        |
| до проведения АДЛТ | WBC   | 1,00<br>***           | 0,47<br>*** | 0,20<br>*   | 0,42<br>*** | 0,41<br>*** | 0,52<br>*** | 0,90<br>*** | 0,25<br>*   |
|                    | PLT   | 0,42<br>***           | 1,00<br>*** | 0,06<br>ns  | 0,30<br>**  | 0,07<br>ns  | 0,29<br>**  | 0,47<br>*** | 0,16<br>ns  |
|                    | BASO  | 0,32<br>***           | 0,15<br>ns  | 1,00<br>*** | 0,10<br>ns  | 0,28<br>**  | 0,31<br>*** | 0,04<br>ns  | 0,15<br>ns  |
|                    | EO    | 0,20<br>*             | 0,10<br>ns  | 0,23<br>*   | 1,00<br>*** | 0,24<br>*   | 0,29<br>**  | 0,26<br>**  | 0,27<br>*   |
|                    | MONO  | 0,57<br>***           | 0,20<br>*   | 0,34<br>*** | 0,10<br>ns  | 1,00<br>*** | 0,16<br>ns  | 0,29<br>**  | 0,14<br>ns  |
|                    | LYMPH | 0,56<br>***           | 0,26<br>**  | 0,21<br>*   | 0,11<br>ns  | 0,35<br>*** | 1,00<br>*** | 0,19<br>*   | 0,16<br>ns  |
|                    | NEUT  | 0,91<br>***           | 0,38<br>*** | 0,22<br>*   | 0,07<br>ns  | 0,45<br>*** | 0,26<br>**  | 1,00<br>*** | 0,21<br>ns  |
|                    | sTNF  | 0,19<br>ns            | 0,09<br>ns  | 0,28<br>*   | 0,13<br>ns  | 0,30<br>*   | 0,19<br>ns  | 0,11<br>ns  | 1,00<br>*** |

Примечание:

| Гху            | менее 0,3 | от 0,3 до 0,5 | от 0,5 до 0,7 | от 0,7 до 0,9 | более 0,9      |
|----------------|-----------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| Теснота (сила) | слабая    | умеренная     | заметная      | высокая       | весьма высокая |

\*  $p < 0,05$   
 \*\*  $p < 0,005$   
 \*\*\*  $p < 0,0001$

**б**

|                    |       | после проведения АДЛТ |             |             |             |             |             |             |             |
|--------------------|-------|-----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                    |       | WBC                   | PLT         | BASO        | EO          | MONO        | LYMPH       | NEUT        | sTNF        |
| до проведения АДЛТ | WBC   | 1,00<br>***           | 0,25<br>ns  | 0,29<br>ns  | 0,23<br>ns  | 0,43<br>*   | 0,41<br>ns  | 0,93<br>*** | 0,00<br>ns  |
|                    | PLT   | 0,02<br>ns            | 1,00<br>*** | 0,66<br>*** | 0,01<br>ns  | 0,00<br>ns  | 0,29<br>ns  | 0,22<br>ns  | 0,17<br>ns  |
|                    | BASO  | 0,40<br>ns            | 0,47<br>*   | 1,00<br>*** | 0,11<br>ns  | 0,19<br>ns  | 0,21<br>ns  | 0,28<br>ns  | 0,04<br>ns  |
|                    | EO    | 0,42<br>*             | 0,15<br>ns  | 0,35<br>ns  | 1,00<br>*** | 0,34<br>ns  | 0,51<br>*   | 0,07<br>ns  | -0,25<br>ns |
|                    | MONO  | 0,69<br>***           | -0,19<br>ns | 0,24<br>ns  | 0,48<br>*   | 1,00<br>*** | 0,48<br>*   | 0,33<br>ns  | 0,15<br>ns  |
|                    | LYMPH | 0,72<br>***           | -0,02<br>ns | 0,24<br>ns  | 0,44<br>*   | 0,43<br>*   | 1,00<br>*** | 0,13<br>ns  | 0,35<br>ns  |
|                    | NEUT  | 0,81<br>***           | 0,06<br>ns  | 0,30<br>ns  | 0,18<br>ns  | 0,55<br>**  | 0,27<br>ns  | 1,00<br>*** | -0,06<br>ns |
|                    | sTNF  | 0,16<br>ns            | -0,10<br>ns | 0,38<br>ns  | -0,01<br>ns | 0,23<br>ns  | 0,22<br>ns  | 0,07<br>ns  | 1,00<br>*** |

**в**

|                    |       | после проведения АДЛТ |             |             |             |             |             |             |             |
|--------------------|-------|-----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                    |       | WBC                   | PLT         | BASO        | EO          | MONO        | LYMPH       | NEUT        | sTNF        |
| до проведения АДЛТ | WBC   | 1,00<br>***           | 0,44<br>ns  | 0,03<br>ns  | 0,74<br>*   | 0,52<br>ns  | 0,03<br>ns  | 0,96<br>*** | 0,71<br>*   |
|                    | PLT   | 0,69<br>*             | 1,00<br>*** | -0,06<br>ns | 0,59<br>ns  | 0,47<br>ns  | 0,50<br>ns  | 0,33<br>ns  | 0,67<br>*   |
|                    | BASO  | 0,17<br>ns            | 0,35<br>ns  | 1,00<br>*** | 0,17<br>ns  | 0,34<br>ns  | -0,56<br>ns | 0,05<br>ns  | -0,03<br>ns |
|                    | EO    | 0,35<br>ns            | 0,83<br>**  | 0,73<br>*   | 1,00<br>*** | 0,74<br>*   | 0,36<br>ns  | 0,57<br>ns  | 0,54<br>ns  |
|                    | MONO  | 0,21<br>ns            | 0,19<br>ns  | 0,31<br>ns  | 0,19<br>ns  | 1,00<br>*** | 0,21<br>ns  | 0,34<br>ns  | 0,29<br>ns  |
|                    | LYMPH | 0,49<br>ns            | 0,46<br>ns  | -0,53<br>ns | 0,00<br>ns  | -0,22<br>ns | 1,00<br>*** | -0,14<br>ns | -0,02<br>ns |
|                    | NEUT  | 0,44<br>ns            | -0,05<br>ns | 0,22<br>ns  | -0,09<br>ns | -0,31<br>ns | -0,23<br>ns | 1,00<br>*** | 0,70<br>*   |
|                    | sTNF  | 0,30<br>ns            | 0,07<br>ns  | 0,17<br>ns  | 0,13<br>ns  | -0,22<br>ns | 0,17<br>ns  | 0,26<br>ns  | 1,00<br>*** |

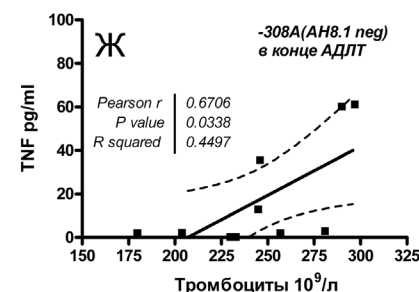
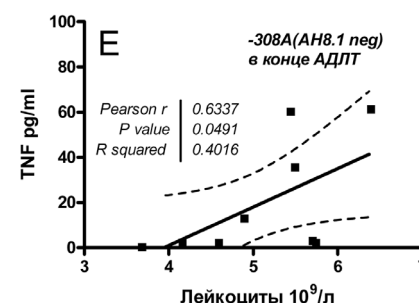
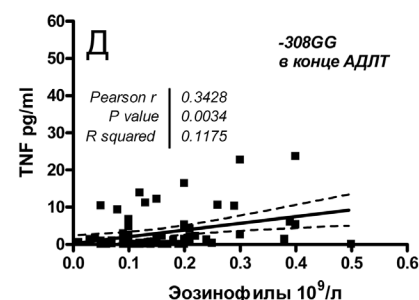
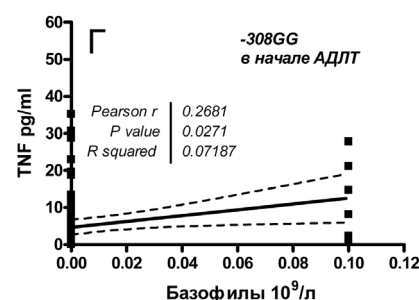


Рис. 2. Анализ корреляционных связей между показателями периферической крови в *TNF*-ассоциированных генетических группах до и после проведения курса АДЛТ (а–в, коэффициент корреляции Спирмена  $r_s$ ) и подтверждение линейного характера связи (г–ж, коэффициент корреляции Пирсона  $r_p$ )

Fig. 2. Analysis of correlations between peripheral blood indicators in *TNF*-associated genetic groups at the beginning and at the end of ART course (a–в, Spearman correlation coefficient  $r_s$ ) and confirmation of the linear character of the relationship (г–ж, Pearson correlation coefficient  $r_p$ )

нейная корреляция с *sTNF* после АДЛТ (рис. 1б, рис. 2в и рис. 2ж). Также высокая корреляция с *sTNF* после АДЛТ отмечается для нейтрофилов и лейкоцитов (вероятно за счет фракции нейтрофилов).

Тромбоциты, в дополнение к гемостазу и тромбозу, играют важную роль при воспалении, заживлении ран, опухолевом росте и метастазировании. Опухоль-активированные тромбоциты способны агрегироваться вокруг циркулирующих опухолевых клеток, защищая их от атак иммунной системы [15]. При некоторых патологиях было показано, что высокие уровни *sTNF* в плазме крови могут вызывать активацию тромбоцитов и служить фактором риска тромбофилии [16]. При таком аутоиммунном заболевании как анкилозирующий спондилит, анти-*TNF*-терапия снижала количество тромбоцитов [17]. С другой стороны, на модели РМЖ *in vivo* было показано, что нановезикулы активированных тромбоцитов значительно повышают уровни нейтрофилов, лимфоцитов и цитокинов, в том числе *TNF*, в опухолевых тканях [18]. Можно предположить, что в ходе АДЛТ в прогностически неблагоприятной группе носителей -308A(*AH8.Ineg*), отличительной особенностью которой является высокий уровень *sTNF*, активируются тромбоциты, которые, взаимодействуя с нейтрофилами «спасают» циркулирующие опухолевые клетки, способствуя метастазированию и прогрессии заболевания. Нейтрофилы составляют большую часть лейкоцитов периферической крови и являются передовым отрядом врожденного иммунитета. Не так давно была обнаружена способность нейтрофилов образовывать нейтрофильные внеклеточные ловушки (*NETs*)

– экстрацеллюлярные сети ДНК и белков. Было показано, что при хроническом воспалении передача ауто- и паракринных сигналов *TNF* индуцирует образование *NETs* [19]. В онкологии *NETs* связаны с опухоль-ассоциированным тромбозом, образованием про-метастатических ниш и метастазированием и рассматриваются как новая мишень в терапии злокачественных новообразований [20].

Таким образом, исходя из полученных результатов исследования и опираясь на данные научной литературы, для больных РМЖ носителей генотипа -308A(*AH8.Ineg*) в качестве индивидуализированной терапии можно рассматривать применение анти-*TNF* и анти-тромботических препаратов.

### Заключение

Выявленные особенности системного ответа на АДЛТ у носителей прогностически неблагоприятного генотипа -308A(*AH8.Ineg*) – высокая концентрация *sTNF* и положительная корреляция с содержанием лейкоцитов (вероятно, за счет нейтрофилов) и тромбоцитов – могут рассматриваться как мишени индивидуализированной терапии.

### Соблюдение прав больных и правил биоэтики

До начала исследования от каждого из участников получено информированное добровольное согласие в соответствии с этическими стандартами этического комитета ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России.

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

- Brandmaier A., Formenti S.C. The Impact of Radiation Therapy on Innate and Adaptive Tumor Immunity. *Semin Radiat Oncol.* 2020;30;2:139-144. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2019.12.005>.
- Jatoi I., Benson J.R., Kunkler I. Hypothesis: Can the Abscopal Effect Explain the Impact of Adjuvant Radiotherapy on Breast Cancer Mortality? *NPJ Breast Cancer.* 2018;4:8. <https://doi.org/10.1038/s41523-018-0061-y>.
- Cho U., Park H.S., Im S.Y., Yoo C.Y., Jung J.H., Suh Y.J., et al. Prognostic Value of Systemic Inflammatory Markers and Development of a Nomogram in Breast Cancer. *PLoS ONE.* 2018;13;7:e0200936. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200936>.
- Holbrook J., Lara-Reyna S., Jarosz-Griffiths H., McDermott M.F. Tumour Necrosis Factor Signalling in Health and Disease *F1000Research.* 2019;8:F1000 Faculty Rev:111. <https://doi.org/10.12688/f1000research.17023.1>.
- Karimi M., Goldie L.C., Cruickshank M.N., Moses E.K., Abraham L.J. A Critical Assessment of the Factors Affecting Reporter Gene Assays for Promoter SNP Function: a Reassessment of -308 TNF Polymorphism Function Using a Novel Integrated Reporter System. *Eur. J. Hum. Genet.* 2009;17;11:1454-62. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2009.80>.
- Aly T.A., Eller E., Ide A., Gowan K., Babu S.R., Erlich H.A., Rewers M.J., Eisenbarth G.S., Fain P.R. Multi-SNP Analysis of MHC Region: Remarkable Conservation of HLA-A1-B8-DR3 Haplotype. *Diabetes.* 2006;55;5:1265-1269. <https://doi.org/10.2337/db05-1276>.
- Malivanova T.F., Alferova E.V., Ostashkin A.S., et al. The Overall Survival of Breast Cancer Patients Depends on a Combination of Polymorphisms of Tumor Necrosis Factor Gene and HLA Haplotypes. *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 2020;35:38-46. <https://doi.org/10.3103/S0891416820010061>.
- 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. *Review Cell Oncol (Dordr).* 2020;43;1:1-18. <https://doi.org/10.1007/s13402-019-00489-1>.
- Маливанова Т.Ф., Астрелина Т.А., Кобзева И.В., Никитина В.А., Сучкова Ю.Б., Осташкин А.С., Усупжанова Д.Ю., Добровольская Е.И., Брунчук В.А., Расторгуева А.А., Ломоносова Е.Е., Любаева Е.С., Кретова Е.Ю., Степанянц Н.Г., Сухова М.Ю., Самойлов А.С. Аутоиммунный гаплотип AH8.1 нормализует уровень фактора некроза опухоли в сыворотках крови больных раком молочной железы // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2023. Т.41, № 1. С. 38-45. [Malivanova T.F., Astrelina T.A., Kobzeva I.V., Nikitina V.A., Suchkova Yu.B., Ostashkin A.S., Usupzhanova D.Yu., Brunchukov V.A., Dobrovol'skaya E.I., Rastorgueva A.A., Lomonosova E.E., Lubaeva E.S., Kretova E.Yu., Stepanyants N.G., Sukhova M.Yu., Samoylov A.S. Autoimmune Haplotype AH8.1 Normalizes the Level of Tumor Necrosis Factor in the Blood Sera of Breast Cancer Patients. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya* = Molecular Genetics, Microbiology and Virology. 2023;41;1:38-45 (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/molgen20234101138>].
- Bower J.E., Ganz P.A., Irwin M.R., Cole S.W., et al. Acute and Chronic Effects of Adjuvant Therapy on Inflammatory Markers in Breast Cancer Patients. *JNCI Cancer Spectr.* 2022;6;4:pkac052. <https://doi.org/10.1093/jncics/pkac052>.
- Chen F., Jin J.-Y., Hui T.S.K., Jing H., Zhang H., Nong Y., Han Y., Wang W., Ma L., Yi F., Chen Q., Zhang Y., Fu P., Yang L., Xu Z., Kong F.-M.S. Radiation Induced Lymphopenia Is Associated with the Effective Dose to the Circulating Immune Cells in Breast Cancer. *Front. Oncol.* 2022;12:768956. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.768956>.
- Singh S., Sharma A., Arora S.K. High Producer Haplotype (CAG) of -863C/A, -308G/A and -238G/A Polymorphisms in the Promoter Region of TNF- $\alpha$  Gene Associate with Enhanced Apoptosis of Lymphocytes in HIV-1 Subtype C Infected Individuals from North India. *PLoS ONE.* 2014;9;5:e98020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098020>.
- Shirmohammadi E., Ebrahimi S.S., Farshchi A., Salimi M. The Efficacy of Etanercept as Anti-Breast Cancer Treatment Is Attenuated by Residing Macrophages. *BMC Cancer.* 2020;20;1:836. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07228-y>.

14. Lewin N.L., Luetragoon T., Shamoun L., Oliva D., et al. The Influence of Adjuvant Radiotherapy and Single Nucleotide Polymorphisms on Circulating Immune Response Cell Numbers and Phenotypes of Patients with Breast Cancer. *Anticancer Res.* 2019;39;9:4957-4963. <https://doi.org/10.21873/anticancer.13684>.
15. Kaur S., Singh A., Kaur J., Verma N., et al. Upregulation of Cytokine Signalling in Platelets Increases Risk of Thrombophilia in Severe COVID-19 Patients. *Blood Cells Mol. Dis.* 2022;94:102653. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2022.102653>.
16. Wang L., Wang X., Guo E., Mao X., Miao S. Emerging Roles of Platelets in Cancer Biology and Their Potential as Therapeutic Targets. *Front. Oncol.* 2022;12:939089. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.939089>.
17. Qian H., Chen R., Wang B., Yuan X., Chen S., Liu Y., Shi G. Associations of Platelet Count with Inflammation and Response to Anti TNF- $\alpha$  Therapy in Patients with Ankylosing Spondylitis. *Front. Pharmacol.* 2020;11:559593. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.559593>.
18. Shang Y., Sun J., Wu X., Wang Q. Activated Platelet Membrane Nanovesicles Recruit Neutrophils to Exert the Antitumor Efficiency. *Front. Chem.* 2022;10:955995. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.955995>.
19. Neuenfeldt F., Schumacher J.C., Grieshaber-Bouyer R., Habicht J., et al. Inflammation Induces Pro-NETotic Neutrophils Via TNFR2 Signaling. *Cell Rep.* 2022;39;3:110710. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110710>.
20. Snoderly H.T., Boone B.A., Bennewitz M.F. Neutrophil Extracellular Traps in Breast Cancer and Beyond: Current Perspectives on NET Stimuli, Thrombosis and Metastasis, and Clinical Utility for Diagnosis and Treatment. *Breast Cancer Res.* 2019;21;1:145. <https://doi.org/10.1186/s13058-019-1237-6>.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Обеспечение ядерной и радиационной безопасности на 2016–2020 годы и на период до 2035 года».

**Участие авторов.** Статья подготовлена с равным участием авторов.

**Поступила:** 20.07.2023. Принята к публикации: 27.08.2023.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Financing.** The study was carried out with the financial support of the Federal Target Program “Ensuring Nuclear and Radiation Safety for 2016-2020 and for the period up to 2035”.

**Contribution.** Article was prepared with equal participation of the authors.

**Article received:** 20.07.2023. Accepted for publication: 27.08.2023.