

© Е.Д. Мангазеева<sup>1,2</sup>, А.А. Студеникина<sup>1,2</sup>, Е.С. Михайлова<sup>1,2</sup>, С.Е. Титов<sup>3,4</sup>,  
С.Л. Рыжикова<sup>3</sup>, А.П. Богачук<sup>5</sup>, В.М. Липкин<sup>5</sup>, А.И. Аутеншилюс<sup>1,2</sup>**Влияние пептида HLDF-6 на экспрессию генов MYC, SOX2, PAX5a, PAX5b и продукцию цитокинов в биоптатах опухолей молочной железы *in vitro***<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Новосибирск, Российская Федерация<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики» — структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Российская Федерация<sup>3</sup>Акционерное общество «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Российская Федерация<sup>4</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт молекулярной и клеточной биологии» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, Российская Федерация<sup>5</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр Российской Федерации «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук», Москва, Российская Федерация© Ekaterina D. Mangazeeva<sup>1,2</sup>, Anastasiia A. Studenikina<sup>1,2</sup>, Elena S. Mikhailova<sup>1,2</sup>, Sergei E. Titov<sup>3,4</sup>, Svetlana L. Ryzhikova<sup>3</sup>, Anna P. Bogachouk<sup>5</sup>, Valeriy M. Lipkin<sup>5</sup>, Alexander I. Autenshlyus<sup>1,2</sup>**Effect of the HLDF-6 Peptide on the Expression of MYC, SOX2, PAX5a, PAX5b Genes and Cytokine Production in Breast Tumor Bioplates *In Vitro***<sup>1</sup>Novosibirsk State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, the Russian Federation<sup>2</sup>Research Institute of Molecular Biology and Biophysics – a branch of the Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, the Russian Federation<sup>3</sup>Vector-Best Joint Stock Company, Novosibirsk, the Russian Federation<sup>4</sup>Institute of Molecular and Cellular Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, the Russian Federation<sup>5</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, the Russian Federation

**Введение.** Поиск средств, способных не только тормозить пролиферацию, но и усиливать дифференцировку опухолевых клеток, актуален для терапии злокачественных новообразований, в том числе и рака молочной железы. Одним из таких агентов является ацетил-амидная форма синтетического пептида HLDF-6 — короткий фрагмент белка HLDF, обладающий дифференцирующим и иммуномодулирующим потенциалом.

**Цель.** Оценка влияния ацетил-амидной формы синтетического пептида HLDF-6 на экспрессию генов *MYC*, *SOX2*, *PAX5a* и *PAX5b* в биоптатах злокачественных и доброкачественных образований молочной железы *in vitro*, а также выявление сопряженности между уровнем экспрессии этих генов и продукцией цитокинов, отражающих функциональное состояние клеток опухоли и ее микроокружения.

**Материалы и методы.** В нашей работе исследованы биоптаты 44 пациенток с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа и 13 женщин с доброкачественными заболеваниями молочной железы. Проведен анализ экспрессии генов *MYC*, *SOX2*, *PAX5a* и *PAX5b* методом RT-PCR, продукции цитокинов методом ИФА и патогистологическая оценка степени дифференцировки опухолевых клеток в биоптатах без и

**Introduction.** The search for agents capable of not only inhibiting proliferation but also enhancing the differentiation of tumor cells is relevant for the treatment of malignant neoplasms, including breast cancer. One promising candidate is the acetylamide form of the synthetic peptide HLDF-6, a short fragment of the HLDF protein, which possesses both differentiation-inducing and immunomodulatory potential.

**Aim.** To evaluate the *in vitro* effect of the acetylamide form of the synthetic peptide HLDF-6 on the expression of the *MYC*, *SOX2*, *PAX5a*, and *PAX5b* genes in biopsies of malignant and benign breast tumors, and to identify correlations between the expression levels of these genes and the production of cytokines, which reflect the functional state of both the tumor cells and their microenvironment.

**Materials and Methods.** The study analyzed biopsy samples from 44 patients with invasive breast carcinoma of no special type (NST) and 13 women with benign breast diseases. The expression of *MYC*, *SOX2*, *PAX5a*, and *PAX5b* genes was assessed by RT-PCR, cytokine production was measured by immunoassay, and a histopathological assessment of the degree of tumor cell differentiation was performed in biopsies with and without exposure to the acetamide form of the synthetic peptide HLDF-6.

при воздействии ацетил-амидной формы синтетического пептида HLDF-6.

**Результаты.** HLDF-6 статистически значимо повышал экспрессию *MYC* и снижал долю низкодифференцированных клеток в образцах инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа. Отмечены статистически значимые изменения в продукции ряда цитокинов, включая повышение GM-CSF, а также отрицательные корреляции между его уровнем и экспрессией генов *MYC*, *SOX2* и *PAX5b*.

**Заключение.** Полученные данные подтверждают дифференцирующий эффект HLDF-6 и предполагают его роль как потенциального модулятора функциональной активности клеток опухоли и ее микроокружения при раке молочной железы.

**Ключевые слова:** ацетил-амидная форма синтетического пептида HLDF-6; рак молочной железы; *MYC*; дифференцировка клеток; цитокины

**Для цитирования:** Мангазеева Е.Д., Студеникина А.А., Михайлова Е.С., Титов С.Е., Рыжикова С.Л., Богачук А.П., Липкин В.М., Аутеншлюс А.И. Влияние пептида HLDF-6 на экспрессию генов *MYC*, *SOX2*, *PAX5a*, *PAX5b* и продукцию цитокинов в биоптатах опухолей молочной железы *in vitro*. *Вопросы онкологии*. 2026; 72(3): 692-700.-DOI: <https://doi.org/10.37469/0507-3758-2026-72-3-OF-2432>

✉ Контакты: Мангазеева Екатерина Дмитриевна, [lrsp@211.ru](mailto:lrsp@211.ru)

## Введение

Рак молочной железы (РМЖ) отличается высокой молекулярной и патоморфологической гетерогенностью, что существенно затрудняет подбор эффективной терапии [1]. Такая неоднородность способствует ускользанию опухолевых клеток от иммунного надзора, нарушению процессов дифференцировки и усилению пролиферативной активности, что ведет к формированию более агрессивного фенотипа и, как следствие, к повышению злокачественного потенциала [2]. Эти изменения, в свою очередь, обуславливают повышенную устойчивость опухоли к стандартным противоопухолевым агентам [3]. Поиск новых молекул, способных модулировать опухолевый фенотип и функциональную активность клеток опухоли и ее микроокружения, остается актуальной задачей экспериментальной онкологии.

Одним из перспективных подходов к преодолению злокачественного потенциала опухоли является модуляция дифференцировочного статуса клеток. В этом контексте интерес представляет Human Leukemia Differentiation Factor (HLDF) — белок, первоначально выделенный при исследовании линии HL-60 (клеток промиелоцитарного лейкоза человека), обладающий способностью индуцировать дифференцировку опухолевых клеток [4]. Позднее был синтезирован его короткий фрагмент — шестичленный пептид HLDF-6 (Thr-Gly-Glu-Asn-His-Arg), сохраняющий биологическую активность HLDF и демонстрирующий эффект на некоторых экс-

**Results.** HLDF-6 induced a statistically significant increase in *MYC* gene expression and reduced the proportion of poorly differentiated cells in samples of invasive breast carcinoma NST. Statistically significant changes in the production of several cytokines were also observed, including an increase in GM-CSF. Furthermore, negative correlations were found between GM-CSF levels and the expression of *MYC*, *SOX2*, and *PAX5b* genes.

**Conclusion.** The obtained data confirm the differentiation-promoting effect of HLDF-6 and suggest its potential role as a modulator of the functional activity of tumor cells and their microenvironment in breast cancer.

**Keywords:** acetylamide form of synthetic peptide HLDF-6; breast cancer; *MYC*; cell differentiation; cytokines

**For Citation:** Ekaterina D. Mangazeeva, Anastasiia A. Studenikina, Elena S. Mikhailova, Sergei E. Titov, Svetlana L. Ryzhikova, Anna P. Bogachouk, Valeriy M. Lipkin, Alexander I. Autenshlyus. The effect of the HLDF-6 peptide on the expression of *MYC*, *SOX2*, *PAX5a*, *PAX5b* genes and cytokine production in breast tumour bioplates *in vitro*. *Voprosy Onkologii = Problems in Oncology*. 2026; 72(3): 692-700.-DOI: <https://doi.org/10.37469/0507-3758-2026-72-3-OF-2432>

периментальных моделях злокачественных новообразований. Благодаря меньшему размеру HLDF-6 обладает более высокой стабильностью, длительным периодом полураспада и технологической доступностью по сравнению с полно-размерным белком, что делает его удобным для применения в клеточных системах [5].

В своих исследованиях мы использовали ацетил-амидную форму синтетического пептида HLDF-6, ранее показавшую способность снижать относительное содержание низкодифференцированных клеток в биоптатах инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа при культивировании *in vitro* [6]. Кроме того, было выявлено, что HLDF-6 влияет на уровень продукции цитокинов клетками опухоли и ее микроокружения [6, 7].

Это указывает на возможный дифференцирующий и иммуномодулирующий эффект пептида в опухолевой ткани. Однако молекулярные механизмы действия HLDF-6 на опухолевые клетки остаются неясными. Одним из потенциальных векторов действия пептида может быть его возможное влияние на экспрессию генов, участвующих в регуляции пролиферации, дифференцировки и клеточной пластичности. Для проверки этой гипотезы были выбраны гены *MYC*, *SOX2*, *PAX5a* и *PAX5b*.

Выбор этих генов обусловлен данными литературы об их участии в ключевых сигнальных каскадах, регулирующих клеточную идентичность и пластичность. Указанные гены ассоциированы с процессами пролиферации и дифференцировки, а также способны активировать

онкогенные или супрессорные пути в зависимости от молекулярных характеристик опухоли и ее микроокружения [8, 9, 10].

Кроме того, потенциальная связь между экспрессией этих генов и цитокиновым профилем опухоли и ее микроокружения может играть ключевую роль в понимании механизмов действия пептида. Целью настоящего исследования явилась оценка влияния ацетил-амидной формы синтетического пептида HLDF-6 на экспрессию генов *MYC*, *SOX2*, *PAX5a* и *PAX5b* в биоптатах злокачественных и доброкачественных образований молочной железы *in vitro*, а также выявление сопряженности между уровнем экспрессии этих генов и продукцией цитокинов, отражающих функциональное состояние клеток опухоли и ее микроокружения.

### Материалы и методы

Материалом исследования служили биоптаты опухолей молочной железы, полученные от 44 женщин с инвазивной карциномой неспецифического типа II степени злокачественности и 13 пациенток с доброкачественными заболеваниями молочной железы (в том числе 11 с фибroadеномой и две с очаговым фибroadеноматозом), проходивших лечение в отделении опухолей молочной железы городской клинической

больницы № 1 (г. Новосибирск). Средний возраст пациенток со злокачественными и доброкачественными новообразованиями составил 63 и 38,5 лет соответственно. Критериями исключения являлись: наличие отдаленных метастазов, проведение неоадьювантной терапии до забора биопсии, а также обострения хронических заболеваний.

Из каждого биоптата формировали две параллельные пробы (объем — 8 мм<sup>3</sup>), которые помещали в два флакона. Первый содержал 1 мл среды DMEM-F12 (контроль), второй — 1 мл той же среды с добавлением синтетического пептида HLDF-6 в концентрации 20 мкг/мл. Обе пробы инкубировали при температуре 37°C в течение 72 ч. По завершении инкубации кусочки опухоли извлекали из среды; обе пробы фиксировали в 10 % нейтральном формалине с последующей проводкой и заливкой в парафин для патоморфологического анализа. Степень злокачественности опухоли (G) дополнительно определялась патоморфологом; для целей настоящего исследования отбор случаев проводили ретроспективно: в анализ включали только G2, случаи G1 и G3 исключали.

Анализ экспрессии генов *MYC*, *SOX2*, *PAX5a* и *PAX5b* а также GAPDH проводился методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (RT-PCR). Экстракцию

Таблица 1. Последовательность праймеров, использованных в работе

MYC	прямой	5'TGAGGAGACACCGCCAC3'
	обратный	5'CAACATCGATTTCTTCCTCATCTTC3'
SOX2	прямой	5'GAGCTTTGCAGGAAGTTTGC3'
	обратный	5'GCAAGAAGCCTCTCCTTGAA3'
PAX5a	прямой	5'CCTGTCCATTCCATCAAGTCTCG3'
	обратный	5'TTTTGCTGACACAACCATGGCTGAC3'
PAX5b	прямой	5'CCCGATGGAATACACTGTAAGCAC3'
	обратный	5'TTTTGCTGACACAACCATGGCTGAC3'
GAPDH	прямой	5'TCAATGGAATCCCATCACCA3'
	обратный	5'TGATTTGGAGGGATCTCGCT3'

Table 1. Sequence of primers used in the study

MYC	Forward	5'TGAGGAGACACCGCCAC3'
	Reverse	5'CAACATCGATTTCTTCCTCATCTTC3'
SOX2	Forward	5'GAGCTTTGCAGGAAGTTTGC3'
	Reverse	5'GCAAGAAGCCTCTCCTTGAA3'
PAX5a	Forward	5'CCTGTCCATTCCATCAAGTCTCG3'
	Reverse	5'TTTTGCTGACACAACCATGGCTGAC3'
PAX5b	Forward	5'CCCGATGGAATACACTGTAAGCAC3'
	Reverse	5'TTTTGCTGACACAACCATGGCTGAC3'
GAPDH	Forward	5'TCAATGGAATCCCATCACCA3'
	Reverse	5'TGATTTGGAGGGATCTCGCT3'

РНК из парафиновых срезов производилась с помощью набора «РеалБестПараМаг» (АО Вектор-Бест, Россия) согласно инструкции производителя. Для выделения были использованы три среза толщиной 10 мкм, парафин расплавлялся при температуре 90 °С и специально не удалялся из раствора, далее ткань обрабатывалась протеиназой К, а после этого выдерживалась 30 мин при температуре 90 °С. Дальнейшее выделение РНК производилось с помощью магнитных частиц. Для получения комплементарной ДНК использовали набор реагентов для обратной транскрипции «СИНТОЛ», Россия и специфические праймеры (табл. 1). RT-PCR проводили в присутствии красителя EvaGreen «СИНТОЛ» в соответствии с инструкцией производителя. Протокол амплификации: 95 °С — 5 мин, затем 45 циклов (95 °С — 10 сек, 58 °С — 35 сек), флуоресценцию измеряли в течение 78 циклов постепенно снижая температуру 94 °С до 55 °С. Уровни экспрессии генов *MYC*, *SOX2*, *PAX5a* и *PAX5b* были нормализованы по гену «домашнего хозяйства» *GAPDH*. Для сравнительного анализа использовали метод  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  [11].

Проведено патоморфологическое исследование срезов толщиной 4–5 мкм, приготовленных и окрашенных гематоксилином-эозином по стандартной методике. Оценку относительного содержания клеток различной степени дифференцировки проводили методом световой микроскопии на парафиновых срезах обеих проб (контроль/HLDF-6). При выделении популяций руководствовались морфологическими признаками клеточной зрелости; при этом учитывали критерии ядерной атипичности, согласованные с одним из принципов Ноттингемской системы [12] — ядерным плейоморфизмом (вариабельность формы и размеров ядра, степень хроматиновой конденсации, выраженность и число ядрышек) — однако использованный нами показатель является морфометрическим индикатором клеточного уровня и не тождественен суммарному баллу по Nottingham (который применялся патоморфологом для определения грейда опухоли).

Клетки относили к категориям дифференцировки по следующим критериям:

- *высокодифференцированные* — морфология, близкая к нормальным клеткам молочной железы: сравнительно небольшие округлые/овальные ядра с ровными контурами, мелкодисперсный хроматин, единичное мелкое ядрышко/его отсутствие, сохраненная цитоплазма;
- *умеренно дифференцированные* — промежуточные признаки: умеренный ядерный полиморфизм, увеличение размеров ядра, появление отдельных ядрышек;
- *низкодифференцированные* — выраженная ядерная атипичность: крупные ядра с неровными кон-

турами, множественные и/или крупные ядрышки, гиперхромия, высокий ядерно-цитоплазматический индекс, скудная цитоплазма.

С целью определения цитокинпродуцирующего резерва супернатантов опухолей, полученных после извлечения биоптатов и осаждения клеток путем центрифугирования при 2 000 об/мин в течение 15 мин, определяли концентрации цитокинов (IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1 $\beta$ , IL-1ra, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , G-CSF, GM-CSF, VEGF-A, MCP-1) с помощью иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов российского производства.

Статистическая обработка проводилась с помощью программного обеспечения R Studio версия 2023.06.1 Build 524 (R версия 4.4.1). Перед проведением описательной статистики нормальность распределения данных проверяли тестом Шапиро – Уилка. Для сравнения групп были применены непараметрические тесты (критерий Вилкоксона), поскольку распределение отличалось от нормального. Дополнительно был проведен корреляционный анализ по Спирмену. Уровень статистической значимости установлен на  $p < 0,05$ .

## Результаты

Основные результаты анализа экспрессии целевых генов после воздействия синтетического пептида HLDF-6 представлены на рис. 1. Установлено, что экспрессия гена *MYC* достоверно повышалась в обеих группах. Так, в группе доброкачественных заболеваний отмечено статистически значимое повышение уровня экспрессии после воздействия пептида в 1,87 раз ( $\approx$  на 87 %). В группе с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа также зафиксировано повышение экспрессии *MYC*, хотя и менее выраженное.

Изменения экспрессии генов *SOX2*, *PAX5a* и *PAX5b* после воздействия HLDF-6 не достигли уровня статистической значимости ни в одной из исследуемых групп ( $p > 0,05$ ).

Дополнительно проведен патоморфологический анализ биоптатов злокачественных новообразований. Полученные результаты подтверждают и расширяют ранее проведенные нами исследования: после воздействия синтетического пептида HLDF-6 наблюдается статистически значимое снижение относительного содержания низкодифференцированных клеток в образцах по сравнению с инкубацией без добавления пептида (рис. 2) [6].

Выявленные изменения уровня экспрессии *MYC* в обеих группах, наряду со снижением относительного содержания низкодифференцированных клеток в образцах РМЖ, позволили

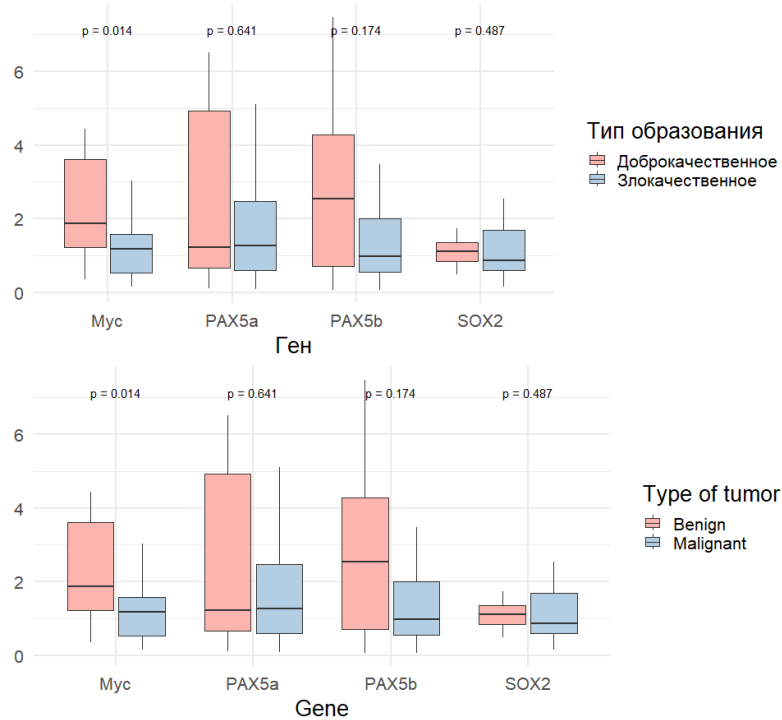


Рис. 1. Влияние пептида HLDF-6 на уровень экспрессии генов *MYC*, *PAX5a*, *PAX5b* и *SOX2* в биоптатах злокачественных и доброкачественных заболеваний молочной железы. Представлены значения, рассчитанные методом  $2^{\Delta\Delta Ct}$ . Указаны значения  $p$  по сравнению с контролем

Fig. 1. Effect of HLDF-6 peptide on the expression levels of *MYC*, *PAX5a*, *PAX5b*, and *SOX2* genes in biopsies of malignant and benign breast diseases. Values calculated using the  $2^{\Delta\Delta Ct}$  method are presented. p-values are indicated in comparison with the control

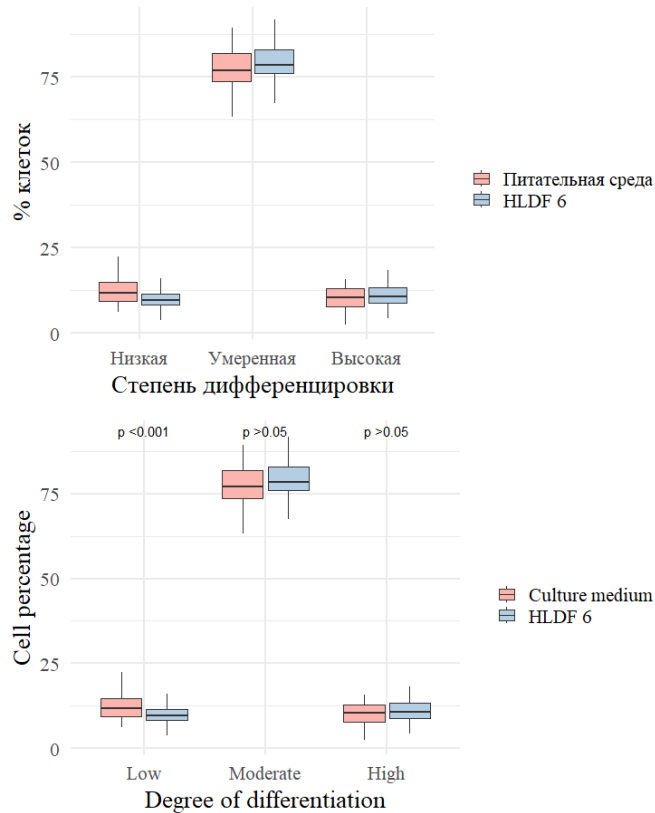


Рис. 2. Соотношение клеток различной степени дифференцировки в биоптатах инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа без и после инкубации с HLDF-6. Наблюдается статистически значимое снижение относительного содержания низкодифференцированных клеток ( $p < 0,001$ ); различия по умеренно- и высокодифференцированным клеткам не достигли уровня статистической значимости ( $p > 0,05$ )

Fig. 2. Ratio of cells with varying degrees of differentiation in biopsies of invasive breast carcinoma of a non-specific type before and without incubation with HLDF-6. There is a statistically significant decrease in the relative content of low-differentiated cells ( $p < 0.001$ ); differences in moderately and highly differentiated cells did not reach statistical significance ( $p > 0.05$ )

предположить, что эффект пептида HLDF-6 может реализовываться и через модуляцию функциональной активности опухолевого микроокружения. В связи с этим была проанализирована продукция цитокинов в супернатантах биоптатов без и после инкубации с изучаемым пептидом.

В группе злокачественных новообразований после воздействия HLDF-6 были зафиксированы статистически значимые изменения: снижение концентрации IL-6 ( $p = 0,044$ ), IL-17 ( $p = 0,005$ ), IL-18 ( $p < 0,001$ ), IL-1 $\beta$  ( $p < 0,001$ ) и VEGF ( $p = 0,009$ ), а также повышение концентрации IL-10 ( $p < 0,001$ ) и GM-CSF ( $p = 0,01$ ).

В группе доброкачественных образований молочной железы достоверное увеличение было отмечено для IL-10 ( $p = 0,004$ ) и TNF- $\alpha$  ( $p = 0,008$ ). Концентрации остальных цитокинов статистически значимо не изменялись. Эти данные в целом согласуются с ранее опубликованными результатами для полноразмерного HLDF [7], что подтверждает способность HLDF и его производных модулировать цитокиновый профиль опухолевой ткани.

В дальнейшем, для более глубокого понимания механизмов действия пептида, а также выявления возможной связи между его влиянием на функциональную активность опухоли и

ее микроокружения и экспрессией генов, был проведен корреляционный анализ между уровнем продукции цитокинов и экспрессией генов MYC, SOX2, PAX5a и PAX5b в каждой из групп без и после инкубации с HLDF-6. В группе доброкачественных образований статистически значимых корреляций выявлено не было. В то же время в группе злокачественных опухолей обнаружены множественные корреляционные связи ( $p < 0,05$ ), представленные в табл. 2.

Так, наиболее устойчивой оказалась обратная корреляционная связь между экспрессией гена SOX2 и уровнем IL-1 $\beta$ , сохранявшаяся как без, так и после воздействия HLDF-6. После инкубации с пептидом выявлены новые обратные корреляции: GM-CSF — с экспрессией генов MYC, SOX2 и PAX5b; IL-10 — с экспрессией PAX5bG; IL-18 — с экспрессией SOX2G. Примечательно, что все цитокины, сопряженные с экспрессией генов в этой группе, демонстрировали статистически значимое изменение концентрации после воздействия пептида HLDF-6, преимущественно в сторону повышения, за исключением IL-18, продукция которого снижалась. Эти данные могут указывать на функциональную взаимосвязь между экспрессией изучаемых генов и цитокиновым профилем в условиях воздействия пептида.

**Таблица 2. Статистически значимые корреляции между экспрессией генов и уровнем продукции цитокинов в биоптатах инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа без и после инкубации с пептидом HLDF-6**

Ген	Цитокин	r	p-значение	Период
MYC	GM-CSF	-0,44	0,004	После HLDF-6
SOX2	IL-1 $\beta$	-0,43	0,004	Без HLDF-6
	IL-1 $\beta$	-0,36	0,019	
	IL-18	-0,42	0,005	После HLDF-6
	GM-CSF	-0,46	0,002	
	TNF- $\alpha$	-0,46	0,002	
PAX5b	IL-10	-0,42	0,005	После HLDF-6
	GM-CSF	-0,48	0,001	

**Table 2. Statistically significant correlations between gene expression and cytokine levels in biopsy samples of invasive breast carcinoma (no special type, NST) at baseline and after incubation with the HLDF-6 peptide**

Gene	Cytokine	r	p-value	Treatment period
MYC	GM-CSF	-0.44	0.004	Before HLDF-6
SOX2	IL-1 $\beta$	-0.43	0.004	Without HLDF-6
	IL-1 $\beta$	-0.36	0.019	
	IL-18	-0.42	0.005	Before HLDF-6
	GM-CSF	-0.46	0.002	
	TNF- $\alpha$	-0.46	0.002	
PAX5b	IL-10	-0.42	0.005	Before HLDF-6
	GM-CSF	-0.48	0.001	

## Обсуждение

Проведенное исследование выявило статистически значимое повышение экспрессии гена *MYC* под влиянием синтетического пептида HLDF-6 в образцах как злокачественных, так и доброкачественных образований молочной железы. На первый взгляд это противоречит устоявшимся представлениям, согласно которым *MYC* рассматривается преимущественно как пролиферативный онкоген, ассоциированный с агрессивным ростом и неблагоприятным прогнозом [9]. Однако в последнее время в научной литературе все чаще подчеркивается контекстуальная двойственность функции *MYC*: в зависимости от типа ткани, клеточного микроокружения и сигнального фона он может не только усиливать пролиферацию, но и запускать процессы дифференцировки, клеточного старения и даже апоптоза [13]. Так, в эпидермальных стволовых клетках было показано, что активация *MYC* приводит не к усилению пролиферации, а к выходу клеток из стволового пула и индукции терминальной дифференцировки [14, 15]. Это явление рассматривается как один из механизмов «защитного ограничения» самообновления. Более того, согласно современным исследованиям, роль *MYC* в дифференцировке оказывается фазозависимой: на ранних этапах он необходим для запуска программ дифференцировки, в то время как в поздних стадиях может поддерживать пролиферативную активность уже дифференцированных клеток [16].

В нашем исследовании повышение экспрессии *MYC* может отражать не проопухолевую активацию, а напротив — компенсаторный механизм перестройки опухолевых клеток в сторону более зрелого, а значит и менее агрессивного фенотипа. Это предположение подкрепляется результатами патоморфологического анализа: после воздействия HLDF-6 отмечено статистически значимое снижение доли низкодифференцированных клеток, что согласуется с ранее проведенными исследованиями и подтверждает воспроизводимость дифференцирующего действия пептида. Мы предполагаем, что повышение экспрессии *MYC* в сочетании со снижением доли низкодифференцированных клеток может отражать адаптивный механизм, при котором экспрессия гена *MYC* способствует завершению интерфазы и переходу клеток к дифференцированному фенотипу, особенно в условиях иммуномодулирующего воздействия HLDF-6.

Дополнительный интерес представляют выявленные в группе злокачественных опухолей корреляции между уровнем продукции цитокинов и экспрессией изучаемых генов. Особенно

показательной является ситуация с гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором GM-CSF: его продукция статистически значимо увеличивалась после воздействия пептида HLDF-6. При проведении корреляционного анализа мы установили, что повышение GM-CSF сопровождалось статистически значимыми обратными сопряженностями с экспрессией всех исследуемых генов (табл. 2).

На первый взгляд, выявленная обратная связь между уровнем GM-CSF и экспрессией *MYC* может показаться парадоксальной, особенно с учетом того, что под влиянием HLDF-6 они оба демонстрируют тенденцию к повышению. Однако это расхождение может указывать на фазовую асинхронность или пространственную гетерогенность сигнального ответа при влиянии пептида: например, экспрессия *MYC* может активироваться в одной субпопуляции опухолевых клеток, тогда как повышение продукции GM-CSF связано с функциональной активностью другой — возможно, более дифференцированной части опухолевого пула или компонентов микроокружения. Дополнительно следует учитывать, что GM-CSF способен запускать сигнальные каскады (включая JAK-STAT, MAPK и PI3K), которые, в зависимости от контекста, могут не только усиливать дифференцировку, но и подавлять транскрипцию пролиферативных генов, включая *MYC* [17]. Таким образом, статистически значимое повышение продукции GM-CSF при воздействии HLDF-6 может запускать сигнальную цепь, способствующую дифференцировке опухолевых клеток, при этом одновременно действуя как «тормозящий» фактор для гена *MYC*: именно это и проявляется как обратная корреляция между ними, несмотря на общую тенденцию к повышению. Подобное наблюдение согласуется с современными представлениями о GM-CSF как медиаторе иммуномодуляции и пластичности опухолевых клеток, способном запускать дифференцировочные программы и стабилизировать фенотип опухоли [18].

Следует также отметить, что были выявлены дополнительные достоверные корреляционные связи, в том числе между продукцией IL-10, IL-18, IL-1 $\beta$  и экспрессией *SOX2* и *PAX5b*. Однако, учитывая отсутствие достоверных изменений уровня экспрессии этих генов при воздействии пептида HLDF-6, трактовка этих взаимосвязей требует осторожности и представляется предварительной. Тем не менее полученные данные могут служить основанием для постановки гипотез о роли функциональной активности клеток опухоли и ее микроокружения в опосредовании эффектов HLDF-6.

## Заключение

Таким образом, наши корреляционные данные впервые демонстрируют возможную связь между экспрессией *MYC* и цитокиновым ремоделированием в опухолевой ткани, опосредованным воздействием пептида HLDF-6. Эти результаты позволяют рассматривать ацетил-амидную форму синтетического пептида HLDF-6 не только как дифференцирующий агент, но и как потенциальный модулятор противоопухолевого иммунного ответа, открывающий перспективы для разработки комбинированных иммунодифференцирующих стратегий терапии. Полученные данные требуют подтверждения в расширенных клинических когортах и на доклинических моделях, что станет важным шагом к валидации ацетил-амидной формы синтетического пептида HLDF-6 как компонента персонализированной терапии РМЖ.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### Финансирование

Исследование выполнено в рамках темы государственного задания (регистрационный номер 124022900076-5) и в рамках темы НИР ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики (регистрационный номер 125031203556-7).

### Funding

This study was supported by a state assignment (Registration No. 124022900076-5) and conducted within the framework of the research project at the Federal Research Centre for Fundamental and Translational Medicine, specifically by the Research Institute of Molecular Biology and Biophysics (Registration No. 125031203556-7).

### Соблюдение правил биоэтики

Все процедуры соответствовали принципам Хельсинкской декларации. Исследование было одобрено этическим комитетом (протокол № 28 от 27.09.2023), все пациентки подписали информированное согласие.

### Compliance with the rules of bioethics

All procedures complied with the principles of the Declaration of Helsinki. The study was approved by the Ethics Committee (Protocol No. 28 dated September 27, 2023). Written informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

### Участие авторов

Все авторы в равной степени участвовали в подготовке публикации: разработке концепции статьи, получении и анализе фактических данных, написании и редактировании текста статьи, проверке и утверждении текста статьи.

### Authors' contributions

All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, and final approval of the version to be published.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Guo L., Kong D., Liu J., et al. Breast cancer heterogeneity and its implication in personalized precision therapy. *Exp Hematol Oncol.* 2023; 12(1): 3.-DOI: <https://doi.org/10.1186/s40164-022-00363-1>.
- Li J., Stanger B.Z. How tumor cell dedifferentiation drives immune evasion and resistance to immunotherapy. *Cancer Research.* 2020; 80(19): 4037-4041.-DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-1420>.
- Polyak K. Heterogeneity in breast cancer. *J Clin Invest.* 2011; 121(10): 3786-3788.-DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI60534>.
- Гибанова Н.В., Ракитина Т.В., Липкин В.М. и др. Индуктор дифференцировки гранулоцитов, гексапептид HLDF-6, снижает цитотоксический эффект фактора некроза опухоли на клеточную линию HL-60. *Биохимия (Москва).* 2007; 49–60.-DOI: <https://doi.org/10.1134/S0006297907010063> [Gibanova N.V., Rakitina T.V., Lipkin V.M., et al. The granulocyte differentiation inducer, hexapeptide HLDF-6, reduces the cytotoxic effect of tumor necrosis factor on the HL-60 cell line. *Biochemistry (Moscow).* 2007; 49–60.-DOI: <https://doi.org/10.1134/S0006297907010063>]
- Костянян И.А., Астапова М.В., Наволоцкая Е.В., et al. Биологически активный фрагмент фактора дифференцировки клеток линии HL-60. Идентификация и свойства. *Биоорганическая химия.* 2000; 26(7): 505-511. [Kostanyan I.A., Astapova M.V., Navolotskaya E.V., et al. Biologically active fragment of differentiation factor of HL-60 cell line: identification and properties. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* 2000; 26(7): 505-511 (In Rus)].
- Студеникина А.А., Мангазеева Е.Д., Богачук А.П., et al. Влияние ацетиламидного синтетического пептида HLDF-6 на дифференцировку клеток при раке молочной железы. *Архив патологии.* 2025; 87(2): 5-10.-DOI: <https://doi.org/10.17116/patol2025870215>. [Studenikina A.A., Mangazeeva E.D., Bogachuk A.P., et al. The effect of acetylamide synthetic peptide HLDF-6 on cell differentiation in breast cancer. *Russian Journal of Archive of Pathology.* 2025; 87(2): 5-10.-DOI: <https://doi.org/10.17116/patol2025870215> (In Rus)].
- Аутеншлюс А.И., Студеникина А.А., Михайлова Ю.С., и др. Влияние фактора дифференцировки HLDF на продукцию цитокинов биоптатами ткани молочной железы при ее незлокачественных заболеваниях и при инвазивной карциноме неспецифического типа. *Биомедицинская химия.* 2020; 66(6): 485-493.-DOI: <https://doi.org/10.18097/PBMC20206606485>. [Autenshlyus A.I., Studenikina A.A., Mikhailova Yu.S., et al. Effect of HLDF differentiation factor on cytokine production by breast tissue biopsy specimens in benign diseases and invasive carcinoma of no special type. *Biomedical Chemistry.* 2020; 66(6): 485-493.-DOI: <https://doi.org/10.18097/PBMC20206606485> (In Rus)].
- Benzina S., Beauregard A., Guerrette R., et al. Pax-5 is a potent regulator of E-cadherin and breast cancer malignant processes. *Oncotarget.* 2017; 8: 12052-12066.-DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14511>.
- Gao F.Y., Li X.T., Xu K., et al. c-MYC mediates the cross-talk between breast cancer cells and tumor microenvironment. *Cell Commun Signal.* 2023; 21(1): 28.-DOI: <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01043-1>.
- Zhang S., Xiong X., Sun Y. Functional characterization of SOX2 as an anticancer target. *Signal Transduct Target Ther.* 2020; 5: 135.-DOI: <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00242-3>.

11. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method. *Methods*. 2001; 25(4): 402-408.-DOI: <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
12. Rakha E.A., El-Sayed M.E., Lee A.H., et al. Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol*. 2008; 26(19): 3153-3158.-DOI: <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.5986>.
13. Edwards-Hicks J., Su H., Mangolini M., et al. MYC sensitises cells to apoptosis by driving energetic demand. *Nat Commun*. 2022; 13: 4674.-DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32368-z>.
14. Arnold I., Watt F.M. c-Myc activation in suprabasal differentiating keratinocytes leads to apoptosis. *Oncogene*. 2001; 20(47): 7013-7021.-DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204866>.
15. Waikel R.L., Kawachi Y., Waikel P.A., et al. Deregulated expression of c-Myc depletes epidermal stem cells. *Nature Genetics*. 2001; 28(2): 165-168.-DOI: <https://doi.org/10.1038/88889>.
16. McFerrin L.G., Atchley W.R. Phase-specific roles of MYC in the regulation of differentiation and proliferation of stem and progenitor cells. *Front Cell Dev Biol*. 2024; 12: 1342872.-DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1342872>.
17. Hamilton J.A. GM-CSF in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol*. 2014; 35(8): 420-428.-DOI: <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.06.001>.
18. Kumar A., Taghi Khani A., Sanchez Ortiz A., Swaminathan S. GM-CSF: A double-edged sword in cancer immunotherapy. *Front Immunol*. 2022; 13: 901277.-DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.901277>.

Поступила в редакцию / Received / 10.07.2025

Прошла рецензирование / Reviewed / 06.11.2025

Принята к печати / Accepted for publication / 18.12.2025

### Сведения об авторах / Author Information / ORCID

Екатерина Дмитриевна Мангазева / Ekaterina D. Mangazeeva / ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0005-3916-0233>.

Анастасия Александровна Студеникина / Anastasiia A. Studenikina / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3936-1316>; eLibrary SPIN: 8785-5526.

Елена Семеновна Михайлова / Elena S. Mikhailova / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8364-819X>; eLibrary SPIN: 1267-0585.

Сергей Евгеньевич Титов / Sergei E. Titov / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9401-5737>.

Светлана Леонидовна Рыжикова / Svetlana L. Ryzhikova / ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0009-3169-3747>; eLibrary SPIN: 146582.

Анна Пайзеневна Богачук / Anna P. Bogachouk / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3362-8286>.

Валерий Михайлович Липкин / Valeriy M. Lipkin / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6400-6714>.

Александр Исаевич Аутеншлюс / Alexander I. Autenshlyus / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7180-010X>; eLibrary SPIN: 1742-2175.

