

## ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ CD163<sup>+</sup> И HLA-DR<sup>+</sup> НА МОНОЦИТАХ КРОВИ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

М. Р. Патышева<sup>1,2</sup>✉, М. Н. Стахеева<sup>1,2</sup>, Е. С. Григорьева<sup>2</sup>, Н. А. Тарабановская<sup>1</sup>, О. Д. Брагина<sup>1</sup>, Ю. Г. Кжышковска<sup>2,3</sup>, Н. В. Чердынцева<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия

<sup>2</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

<sup>3</sup> Университет Гейдельберга, Мангейм, Германия

Циркулирующие моноциты — значимые участники патогенеза опухолевого роста. Показано, что в крови больных раком молочной железы наблюдаются особенности популяций моноцитов, экспрессирующих рецепторы эндотоза, либо компонентов главного комплекса гистосовместимости. Целью данной работы было проведение анализа взаимосвязи параметров опухоли и цитокинового профиля крови с популяционным составом циркулирующих моноцитов больных локализованными и местно-распространенными формами рака молочной железы. В исследовании было показано, что фенотипические характеристики циркулирующих моноцитов взаимосвязаны с клинико-морфологическими особенностями опухолевого процесса. Содержание популяций с фенотипом CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>CD163<sup>+</sup> и CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup> имело положительную корреляцию со стадией заболевания, в то время как больший размер первичного опухолевого узла ассоциирован с более низким содержанием CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>-моноцитов. У больных РМЖ увеличено содержание IL8 и MCP-1 в сыворотке крови. Высокий уровень содержания IL6 у больных РМЖ ассоциирован со снижением доли CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-моноцитов, CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-моноцитов и CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>-моноцитов. Таким образом, CD163<sup>+</sup> и HLA-DR<sup>+</sup>-моноциты связаны с клинико-морфологическими параметрами и уровнем цитокинов крови, что свидетельствует о вовлечении данных популяций в прогрессию рака молочной железы и говорит о целесообразности дальнейших исследований для трансляции полученных результатов в клиническую практику.

**Ключевые слова:** моноциты, CD163, HLA-DR, рак молочной железы, интерлейкин 8, интерлейкин 6, фактор миграции моноцитов

**Финансирование:** работа выполнена при поддержке гранта РНФ №22-25-00435.

**Благодарности:** благодарим ведущего научного сотрудника института персонализированной психиатрии и неврологии НИМИЦ ПН имени В. М. Бехтерева (г. Санкт-Петербург) О. Е. Савельеву за помощь в проведении проточной цитометрии.

**Вклад авторов:** М. Р. Патышева — дизайн исследования, проточная цитометрия, анализ данных, написание статьи; М. Н. Стахеева — разработка концепции работы, дизайн исследования, анализ данных, написание статьи; Е. С. Григорьева — проточная цитометрия; Н. А. Тарабановская — подбор пациентов, сбор клинических данных о пациентах; О. Д. Брагина — подбор пациентов, сбор клинических данных о пациентах; Ю. Г. Кжышковска — разработка концепции работы, поиск грантовой поддержки работы, обсуждение результатов; Н. В. Чердынцева — дизайн исследования, обсуждение результатов.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ (протокол № 10 от 05 декабря 2019 г.). Все участники подписали информированное согласие об участии в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Марина Ринатовна Патышева  
пер. Кооперативный, д. 7/1, г. Томск, 634009, Россия; patysheva\_mr@onco.tnimg.ru

**Статья получена:** 14.09.2023 **Статья принята к печати:** 10.10.2023 **Опубликована онлайн:** 31.10.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.043

## FEATURES OF CD163<sup>+</sup> AND HLA-DR<sup>+</sup> EXPRESSION ON BLOOD MONOCYTES ASSOCIATED WITH BREAST CANCER

Patysheva MR<sup>1,2</sup>✉, Stakheyeva MN<sup>1,2</sup>, Grigoryeva ES<sup>2</sup>, Tarabanovskaya NA<sup>1</sup>, Bragina OD<sup>1</sup>, Kzhyshkowska JG<sup>2,3</sup>, Cherdyntseva NV<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

<sup>2</sup> National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

<sup>3</sup> University of Heidelberg, Mannheim, Germany

Circulating monocytes are important actors of the tumor growth pathogenesis. It has been shown that some features of the monocyte populations expressing endocytosis receptors or the major histocompatibility complex components are observed in blood of patients with breast cancer. The study was aimed to assess the relationship of tumor parameters and blood cytokine profile with the composition of circulating monocyte populations in patients with localized and locally advanced breast cancer. The study has shown that the circulating monocytes' phenotypic characteristics are correlated to the clinical and morphological features of the neoplastic process. The content of populations with the CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>CD163<sup>+</sup> and CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup> phenotypes positively correlates with the disease stage, while larger primary tumor size is associated with lower CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> monocyte levels. Elevated serum levels of IL8 and MCP-1 are observed in breast cancer patients. High IL6 levels in patients with breast cancer are associated with the reduced percentage of CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>HLA-DR<sup>+</sup> and CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup> monocytes. Thus, CD163<sup>+</sup> and HLA-DR<sup>+</sup> monocytes are associated with the clinical and morphological parameters and blood levels of cytokines, which suggests that these populations are involved in breast cancer progression and indicates that further research is advisable for translation of the findings into clinical practice.

**Keywords:** monocytes, CD163, HLA-DR, breast cancer, IL6, IL8, MCP-1

**Funding:** the study was supported by the RSF grant (№ 22-25-00435).

**Acknowledgements:** we would like to express our gratitude to O. E. Savelieva, the lead researcher at the Institute of Personalized Psychiatry and Neurology, Bekhterev National Research Medical Center for Psychiatry and Neurology (Saint Petersburg), for assistance in conducting flow cytometry.

**Author contribution:** Patysheva MR — study design, flow cytometry, data analysis, manuscript writing; Stakheyeva MN — study concept, study design, data analysis, manuscript writing; Grigoryeva ES — flow cytometry; Tarabanovskaya NA — selection of patients, patient clinical data acquisition; Bragina OD — selection of patients, patient clinical data acquisition; Kzhyshkowska JG — study concept, search for funding, discussion; Cherdyntseva NV — study design, discussion.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (protocol № 10 dated 05 December 2019). All subjects submitted the informed consent to study participation.

✉ **Correspondence should be addressed:** Marina R. Patysheva  
per. Kooperativnyi, 7/1, Tomsk, 634009, Russia; patysheva\_mr@onco.tnimg.ru

**Received:** 14.09.2023 **Accepted:** 10.10.2023 **Published online:** 31.10.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.043

Моноциты — важнейшие эффекторы неспецифического иммунитета, которые задействованы во множестве патологических процессов, сопровождающихся хроническим воспалением. Появление и развитие злокачественного новообразования представляют собой один из таких процессов и характеризуются вовлечением моноцитов на всех этапах патогенеза опухоли. К настоящему моменту известно, что пул моноцитов составлен тремя основными популяциями: классической с фенотипом CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>, неклассической с фенотипом CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> и промежуточной CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> [1]. При этом CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>-моноциты — источник для пополнения пула опухолеассоциированных макрофагов, дендритных клеток и миелоидных клеток-супрессоров в ткани опухоли [2]. Для CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>-клеток характерна способность поддерживать целостность эндотелия и поглощать чужеродные частицы [2, 3]. Роль промежуточной популяции исследована недостаточно, но предполагают, что она занимает переходное положение между двумя другими [4].

Помимо деления на три основные популяции, моноциты отличаются по экспрессии белковых рецепторов, связанных с определенной функцией клетки. Так, способность моноцитов к эндоцитозу гемоглибин-гаптоглобинового комплекса посредством рецептора CD163 отражает способность к поглощению частиц и повышается при воздействии на моноциты медиаторов, снижающих провоспалительную активность этих клеток [5]. Также известно, что клетки моноцитарно-макрофагального ряда обладают функциональной пластичностью и экспрессируют рецепторы, связанные с антиген-презентирующей функцией моноцитов и макрофагов [6]. Повышение количества моноцитов с низкой степенью экспрессии HLA-DR связывают с иммуносупрессией при онкологических и инфекционных заболеваниях [7]. Таким образом, целесообразно исследовать популяционную структуру моноцитов не только на основании маркеров классической, промежуточной и неклассической популяций, но и с учетом дополнительных функциональных маркеров.

Динамику развития злокачественного новообразования тесно связывают с двумя основными факторами: индивидуальными особенностями организма и биологическими свойствами опухоли. В частности, показано, что возраст пациента, в котором манифестируется РМЖ, наследственная предрасположенность и наличие герминальных мутаций могут определять клиническое течение заболевания [8]. Поскольку биологические процессы в ткани молочной железы в значительной степени зависят от гормонального здоровья женщины, РМЖ часто ассоциирован с нарушением регуляции половых гормонов, следовательно, коррелирует с состоянием менструальной функции [9]. Кроме того, гормональные нарушения и метаболический статус организма находятся в доказанной взаимосвязи с продукцией опухолю биологических факторов, цитокинов и хемокинов, регулирующих функциональную активность иммунных клеток [10]. Индекс массы тела (ИМТ), один из критериев состояния метаболического статуса, также может быть связан с течением РМЖ [11]. Показана связь повышения массы тела с развитием РМЖ в зрелом возрасте, когда увеличение на каждые 5 кг/м<sup>2</sup> соответствует увеличению риска развития рака молочной железы у женщин на 2% [11, 12].

Помимо индивидуальных особенностей пациентки, значимыми факторами, связанными с клиническим

течением РМЖ, являются клинико-морфологические параметры, такие как размер первичного опухолевого узла, регионарная распространенность опухолевого процесса и молекулярно-биологический подтип опухоли [13, 14].

Цитокины — основные регуляторы иммунного ответа [15]. Цитокиновый профиль циркулирующей крови отражает системный гомеостаз организма [15]. При злокачественных новообразованиях сама опухоль способна вносить вклад в формирование патологического гомеостаза организма, оказывая влияние на компоненты иммунной системы [15]. Установлено, что программирование моноцитов под действием интерлейкина 6 (IL6) и интерлейкина 8 (IL8) — необходимый этап индукции их воспалительного фенотипа [16]. Миграция моноцитов из костного мозга или селезенки, которая является для них депонирующим органом, происходит под контролем основного фактора миграции моноцитов (MCP-1 или CCL2). Установление связи популяционного состава моноцитов со стадией заболевания и индивидуальными особенностями пациенток позволяет охарактеризовать вовлеченность моноцитов в патогенез РМЖ.

В связи с тем что клетки моноцитарно-макрофагального ряда имеют важное значение в развитии РМЖ, целью исследования стало изучение ассоциаций между содержанием CD163<sup>+</sup> и HLA-DR<sup>+</sup>-моноцитов с клинико-морфологическими характеристиками заболевания и профилем цитокинов крови при РМЖ.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 50 больных первичным раком молочной железы I–III стадии, T1-3N0-3M0, возраст которых составил 52,0 [46,0–63,0] лет. Диагноз был верифицирован морфологически. Во всех случаях гистологический тип опухоли соответствовал инвазивной карциноме неспецифического типа. Для классификации опухолей молочной железы согласно молекулярно-биологическим подтипам использована классическая панель из иммуногистохимических маркеров ER $\alpha$ , PR и HER2. Клинико-анамнестические данные были получены при анализе историй болезни и амбулаторных карт пациентов. Характеристика больных, вошедших в исследование, представлена в табл. 1. Для каждой пациентки вычисляли ИМТ по формуле: соотношение показателя массы тела в кг к показателю роста в метрах в квадрате. Критерии исключения: наличие у больных первично-множественных злокачественных опухолей, онкологические заболевания других локализаций в анамнезе, операционные вмешательства в зоне молочной железы, проводимые ранее.

В качестве контроля выступила группа здоровых женщин (средний возраст 61,0 [50,0–69,0] лет). Критерии исключения: наличие онкологического заболевания в анамнезе и состояние обострения хронических заболеваний.

## Определение молекулярно-биологического подтипа опухоли

Для определения молекулярно-биологического подтипа РМЖ с помощью иммуногистохимического метода выполняли оценку экспрессии рецепторов к эстрогенам (ER), прогестерону (PR), HER2/neu статуса (HER2) и пролиферативной активности (экспрессия Ki-67).

Таблица 1. Клинико-морфологические параметры больных раком молочной железы

Клинико-патологические параметры	N (%) (n = 50)
Возраст ИМТ	59,3 ± 10,4 27,2 ± 5,54
Состояние менструальной функции: сохранена менопауза	24 (48,2) 26 (51,8)
Стадия I II III	7 (14,0) 23 (46) 20 (40)
Молекулярно-биологический подтип Люминальный В Трижды негативный подтип HER2-позитивный	25 (50,0) 19 (38,0) 6 (12)
Лимфогенное метастазирование есть нет	22 (46,5) 28 (53,5)

Иммуногистохимическое исследование осуществляли по стандартной методике. Использовали антитела (Dako; Дания) к рецепторам эстрогена (клон 1D5, RTU, мышинные), к рецепторам прогестерона (клон PgR636, RTU, мышинные), к онкопротеину c-erbB-2 (HER2/neu, рабочее разведение 1 : 500, кроличьи), к Ki-67 (клон MIB-1, RTU, мышинные). Оценку экспрессии рецепторов к половым гормонам производили количественным методом гисто-счета (Histo-Score). Экспрессию Ki-67 оценивали в процентном содержании положительно окрашенных опухолевых клеток инвазивной карциномы неспецифического типа молочной железы (в 10 полях зрения на 1000 клеток при увеличении  $\times 400$ ). На основании сочетания экспрессии рецепторов к эстрогенам, прогестерону, HER2/neu статуса и Ki-67 определяли молекулярно-биологические подтипы PMЖ: люминальный В HER2<sup>-</sup> (ER<sup>+</sup> и/или PR<sup>+</sup>, HER2<sup>-</sup> и Ki-67  $\geq$  20%), люминальный В HER2<sup>+</sup> (ER<sup>+</sup> и/или PR<sup>+</sup>, HER2<sup>+</sup>), трижды-негативный (ER<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup> и HER2<sup>-</sup>), а также подтип с гиперэкспрессией HER2/neu (ER<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup>, HER2<sup>+</sup>).

#### Фенотипирование моноцитов периферической крови

В крови группы PMЖ была оценена экспрессия CD163<sup>+</sup> (скавенджер рецептор) и HLA-DR<sup>+</sup> на моноцитах классической CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>, неклассической CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> и промежуточной CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> популяций. Для этого у пациенток и доноров была взята венозная кровь в вакуумные системы сбора с КЗ-ЭДТА. Для определения популяционного состава моноцитов крови было отобрано 100 мкл фракции лейкоцитов. Далее клетки ресуспендировали в 150 мкл буфера для окрашивания (Cell Staining Buffer, Sony; Япония). Подсчет клеток производили с помощью автоматического счетчика Luna II (Logos Biosystems, Inc.; Корея). Затем к клеточному концентрату добавляли 5 мкл Human TruStain FcX™ (Biolegend; США) для блокирования неспецифического связывания, инкубировали в течение 10 мин. Далее окрашивали набором меченных моноклональных антител против маркеров CD45, CD14, CD16, CD163 и HLA-DR. В работе использовали следующие антитела: CD45–APC-Cy7 (BD Bioscience, кат. 557833; США), CD56–PE-Cy7 (eBioscience, Thermo Fisher Scientific; США), CD14–FITC (BD Bioscience, кат. 345784; США), CD16 –APC (BD Bioscience, США; кат. 561248), CD163–PE (BD Bioscience, США; кат. 556018), HLA-DR–PE-Cy5 (BD Bioscience, кат. 555813; США), Isotype PE-Cy™5 (BD Bioscience, кат. 555750; США), Isotype PE

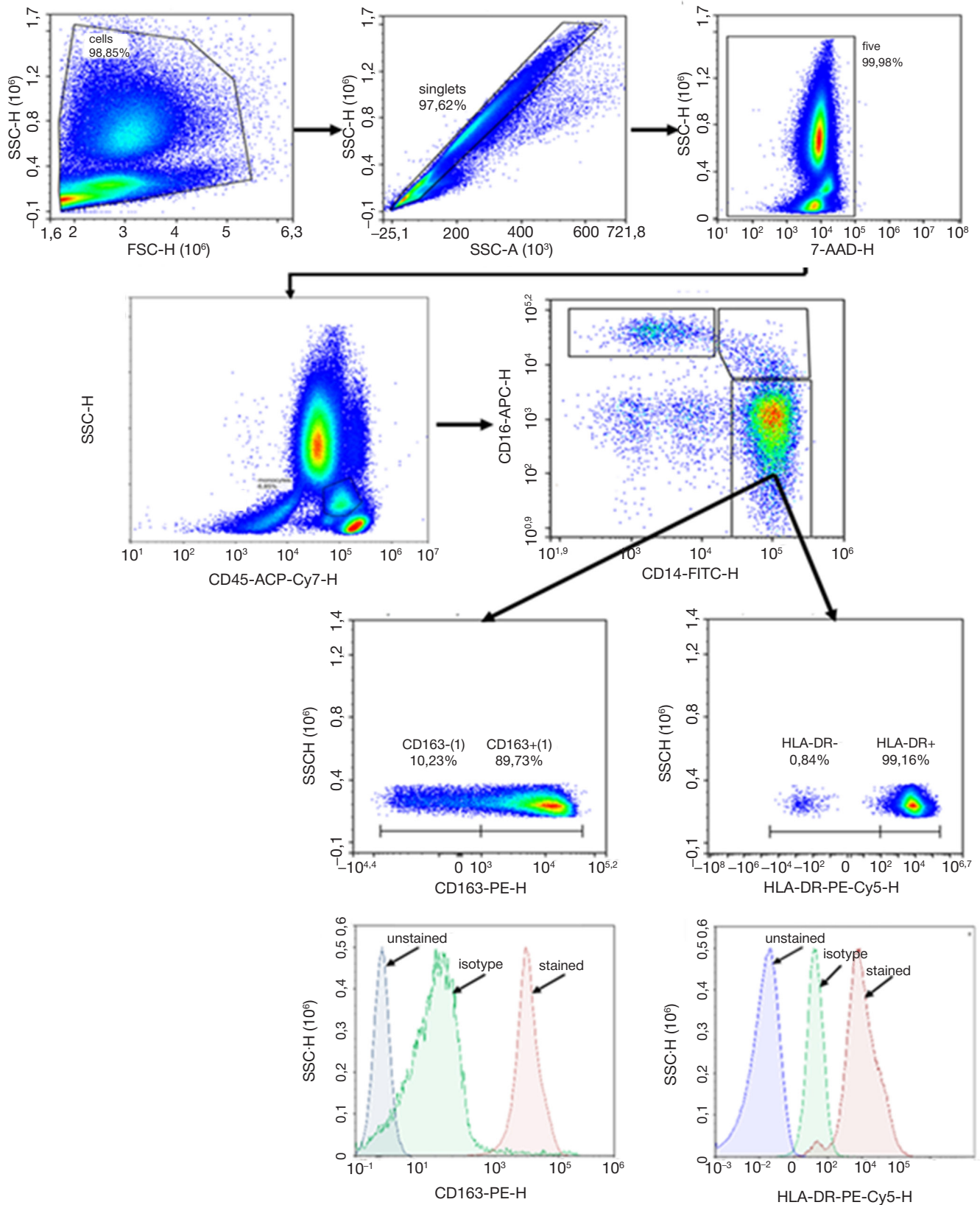
(BD Bioscience, кат. 556018; США). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью ядерного красителя 7-AAD (BD Bioscience; США). Окраску проводили путем внесения антител в соотношении 5 мкл на 10<sup>6</sup> клеток. В качестве отрицательного контроля использовали образцы с добавлением соответствующего изотопического контроля в аналогичной концентрации. Их инкубировали при комнатной температуре в темноте 20 мин. Затем в каждую неокрашенную и окрашенную пробу добавляли 900 мкл лизирующего буфера VersaLyse Lysing Solution (Beckman Coulter; США). Образцы анализировали на проточном цитофлуориметре NovoCyte (ACEA Bioscience; США). Тактика гейтирования приведена на рис. 1. Обработку полученных данных проводили с помощью программного пакета NovoExpress SoftWare (Acea; США).

#### Исследование содержания цитокинов в сыворотке крови

Содержание цитокинов сыворотки оценивали с помощью мультиплексных наборов на основе магнитных шариков Bio-Plex (Bio-Rad, Hercules, CA; США). Панель Human Milliplex MAG использовали для анализа трех аналитов: IL6, IL8 и MCP-1; 50 мкл сыворотки из каждого случая и контроля анализировали с использованием анализатора Luminex 200 с программным обеспечением для контроля MasterPlex CT и для анализа — MasterPlex QT (MiraiBio; США). Стандартные кривые были построены с использованием стандартов производителя. Перед анализом образцы сыворотки больных PMЖ и здоровых людей были инактивированы нагреванием. В работе оценивали влияние тепловой инактивации на стабильность цитокинов, критерием для исключения из анализа была невозможность нормализации.

#### Методы статистической обработки данных

Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica 8.0 for Windows (StatSoft Inc.; США). Проверку закона распределения исследуемых переменных на нормальность проводили по критерию Колмогорова–Смирнова. По результатам проверки полученные числовые данные были представлены в формате Me [LQu–UQu]. Для определения статистически значимых различий в независимых группах использовали критерии



**Рис. 1.** Возможный продукт межмолекулярной циклизации — тетрамер диоксииндола как основа циклической структуры нейромеланина

Манна-Уитни. Корреляционный анализ проводили с расчетом ранговой корреляции Спирмена. Результаты концентрации цитокинов сыворотки крови представлены с использованием программы GraphPad Prism 8 SoftWare (GraphPad Soft Inc; США). Для всех исследований указывали статистически значимые различия при следующих уровнях значимости:  $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$  и  $p < 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В исследуемой группе возраст пациенток не был связан с популяционной структурой моноцитов крови. В то же время для ИМТ была отмечена отрицательная корреляция средней силы с процентным содержанием CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-клеток с коэффициентом корреляции, равным 0,409 и  $p \leq 0,05$  (табл. 2).

**Таблица 2.** Взаимосвязь индивидуальных особенностей и клинико-морфологических параметров опухоли с субпопуляционной структурой моноцитов у пациенток с РМЖ

	Возраст	ИМТ	Стадия	T	N
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>-</sup> , %	$r = 0,135$ $p \geq 0,05$	$r = -0,073$ $p \geq 0,05$	$r = 0,228$ $p \geq 0,05$	$r = 0,206$ $p \geq 0,05$	$r = 0,149$ $p \geq 0,05$
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> , %	$r = -0,123$ $p \geq 0,05$	$r = 0,120$ $p \geq 0,05$	$r = -0,087$ $p \geq 0,05$	$r = -0,389$ $p \leq 0,05$	$r = -0,129$ $p \geq 0,05$
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> , %	$r = -0,122$ $p \geq 0,05$	$r = -0,043$ $p \geq 0,05$	$r = -0,028$ $p \geq 0,05$	$r = -0,026$ $p \geq 0,05$	$r = -0,036$ $p \geq 0,05$
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>-</sup> 163 <sup>+</sup> , %	$r = 0,038$ $p \geq 0,05$	$r = -0,017$ $p \geq 0,05$	$r = 0,521$ $p \leq 0,05$	$r = -0,082$ $p \geq 0,05$	$r = 0,198$ $p \geq 0,05$
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup> , %	$r = -0,127$ $p \geq 0,05$	$r = 0,211$ $p \geq 0,05$	$r = 0,301$ $p \geq 0,05$	$r = -0,114$ $p \geq 0,05$	$r = -0,196$ $p \geq 0,05$
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> 163 <sup>+</sup> , %	$r = 0,027$ $p \geq 0,05$	$r = -0,061$ $p \geq 0,05$	$r = 0,153$ $p \geq 0,05$	$r = -0,272$ $p \geq 0,05$	$r = -0,021$ $p \geq 0,05$
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup> , %	$r = 0,069$ $p \geq 0,05$	$r = 0,082$ $p \geq 0,05$	$r = 0,093$ $p \geq 0,05$	$r = 0,159$ $p \geq 0,05$	$r = -0,085$ $p \geq 0,05$
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> 163 <sup>+</sup> , %	$r = -0,250$ $p \geq 0,05$	$r = 0,195$ $p \geq 0,05$	$r = 0,356$ $p \leq 0,05$	$r = -0,171$ $p \geq 0,05$	$r = 0,217$ $p \geq 0,05$
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup> , %	$r = 0,082$ $p \geq 0,05$	$r = -0,409$ $p \leq 0,05$	$r = 0,091$ $p \geq 0,05$	$r = 0,106$ $p \geq 0,05$	$r = 0,079$ $p \geq 0,05$

Примечания: ИМТ — индекс массы тела.

Известно, что сохранность либо угасание менструальной функции при РМЖ напрямую связаны с гормональным статусом и гомеостазом организма больных. Содержание CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>-моноцитов было незначительно снижено у женщин с сохранной менструальной функцией по сравнению с группой в менопаузе/постменопаузе с 96,01 [83,29–98,46]% против 99,49 [89,79–100,00]% на уровне статистической тенденции  $p = 0,056$ .

Популяционная структура моноцитов у больных была взаимосвязана с клинико-морфологическими характеристиками опухоли. Увеличение клинической стадии опухолевого процесса находилось в положительной корреляционной связи с содержанием клеток классической CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>CD163<sup>+</sup> со средней силой корреляции, в то время как для промежуточной CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>-популяции — со слабой силой корреляции ( $r = 0,52$  и  $0,356$  соответственно,  $p < 0,05$ ). Напротив, T, размер опухолевого

узла, был слабо связан обратной корреляционной связью с содержанием клеток неклассической CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>-популяции ( $r = -0,389$  и  $p < 0,05$ ). Для параметра N, отображающего метастатическое поражение регионарных лимфатических узлов, не выявлено статистически значимых корреляций с показателями фенотипического состава моноцитов крови (табл. 2).

При сравнении двух групп больных с размером опухолевого узла T1–2 и T3–4 было обнаружено, что по мере увеличения размера опухоли достоверно уменьшалось количество CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>-моноцитов (табл. 3). В то же время количество CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>-моноцитов снижалось на уровне статистической тенденции с 98,77 [77,94–99,97]% при T1–2 до 69,81 [41,36–99,1]% при T3–4 ( $p = 0,09$ ). Популяционная структура моноцитов также была ассоциирована со степенью вовлечения регионарных лимфатических узлов. Содержание

**Таблица 3.** Ассоциация стадии заболевания с фенотипическими особенностями моноцитов у больных РМЖ

	T1–2 (n = 29)	T3–4 (n = 21)	N0–1	N2–3	Стадия I–IIA	Стадия IIB–IIIC
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>-</sup> , %	92,2 [83,7–94,58]	94,2 [92,1–96,88]	92,85 [83,7–96,69]	93,21 [89,28–96,13]	89,4 [83,48–94,18]	94,2 [92,4–96,69]
	$p = 0,15$		$p = 0,55$		$p = 0,05$	
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> , %	4,63 [1,3–10,23]	2,01 [1,24–2,41]	2,56 [1,3–9,13]	4,1 [1,51–5,8]	4,7 [2,56–11,41]	2,01 [1,44–2,44]
	$p = 0,04$		$p = 0,6$		$p = 0,01$	
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> , %	2,42 [1,3–10,23]	1,5 [1,24–5,49]	2,01 [1,24–5,16]	2,05 [0,48–5,6]	2,42 [1,13–5,6]	2,01 [1,28–3,42]
	$p = 0,63$		$p = 0,79$		$p = 0,54$	
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>-</sup> 163 <sup>+</sup> , %	94,63 [89,23–99,67]	96,74 [76,9–99,73]	94,63 [89,23–99,85]	96,74 [55,35–99,67]	92,94 [89,12–98,34]	97,98 [94,9–99,99]
	$p = 0,92$		$p = 0,65$		$p = 0,03$	
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup> , %	99,26 [97,34–99,9]	99,01 [96,65–99,81]	99,6 [98,08–99,9]	95,09 [87,7–99,01]	99,26 [97,34–99,99]	99,26 [98,09–99,93]
	$p = 0,48$		$p = 0,02$		$p = 0,93$	
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> 163 <sup>+</sup> , %	98,77 [77,94–99,97]	69,81 [41,36–99,1]	99,6 [98,08–99,9]	50,0 [25,6–99,21]	89,89 [65,41–99,29]	98,08 [50,0–99,86]
	$p = 0,09$		$p = 0,15$		$p = 0,64$	
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup> , %	68,92 [54,06–87,73]	79,32 [55,08–93,31]	96,87 [69,81–99,97]	60,03 [37,0–79,32]	69,58 [54,06–85,91]	76,15 [60,03–93,13]
	$p = 0,37$		$p = 0,55$		$p = 0,36$	
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> 163 <sup>+</sup> , %	98,0 [89,79–99,9]	98,7 [77,86–99,81]	76,15 [55,12–93,31]	98,7 [31,27–99,81]	96,19 [83,79–99,9]	99,18 [94,58–99,9]
	$p = 0,44$		$p = 0,16$		$p = 0,23$	
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> , %	93,04 [80,43–98,44]	96,88 [89,85–98,47]	95,24 [88–98,47]	84,51 [55,0–97,5]	93,04 [86,99–98,28]	96,88 [84,51–98,44]
	$p = 0,48$		$p = 0,74$		$p = 0,86$	

Таблица 4. Фенотипические особенности моноцитов крови в зависимости от молекулярно-биологического подтипа опухоли

	ТНPMЖ	Люм В/Her2 <sup>+</sup>	<i>p</i>
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>-</sup> , %	89,28 [79,79–96,13]	93,21 [92,1–96,69]	0,09
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> , %	4,1 [1,04–11,41]	2,41 [1,44–5,45]	0,1
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> , %	2,05 [1,39–6,43]	2,01 [1,13–3,89]	0,31
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> 163 <sup>+</sup> , %	94,63 [89,15–99,67]	95,34 [90,87–99,85]	0,76
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> , %	99,26 [90,5–100,00]	99,26 [98,08–99,9]	0,23
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> 163 <sup>+</sup> , %	84,28 [50,00–99,29]	98,77 [53,47–100,0]	0,15
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> , %	62,6 [53,4–84,06]	84,51 [60,03–96,33]	0,02
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> 163 <sup>+</sup> , %	98,06 [87,6–100,0]	98,00 [83,79–99,97]	0,19
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> , %	95,67 [80,43–99,03]	93,14 [84,51–98,28]	0,54
	Her2 <sup>+</sup>	Люм В/ ТНPMЖ	
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>-</sup> , %	94,2 [92,1–96,88]	92,4 [83,7–96,13]	0,63
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> , %	2,01 [0,15–4,7]	3,8 [1,51–9,13]	0,09
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> , %	1,28 [1,00–5,49]	2,05 [1,33–5,16]	0,08
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> 163 <sup>+</sup> , %	99,67 [99,48–100,00]	94,3 [89,12–98,34]	0,04
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> , %	99,6 [99,26–99,00]	99,01 [96,65–99,99]	0,33
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> 163 <sup>+</sup> , %	99,86 [69,81–100,00]	91,28 [50,00–99,29]	0,62
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> , %	93,31 [60,03–98,81]	68,92 [54,06–85,91]	0,03
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> 163 <sup>+</sup> , %	100,00 [98,86–100,00]	96,19 [82,79–99,81]	0,02
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> , %	96,88 [80,43–99,71]	93,14 [84,51–98,44]	0,08
	Люм В	ТНPMЖ/Her2 <sup>+</sup>	
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>-</sup> , %	93,09 [88,64–94,58]	92,1 [86,7–96,13]	0,24
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> , %	2,56 [1,69–5,8]	3,65 [1,04–8,3]	0,55
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> , %	2,01 [1,24–3,3]	2,05 [1,28–5,6]	0,86
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> 163 <sup>+</sup> , %	94,3 [89,08–96,74]	98,34 [90,74–99,73]	0,09
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> , %	99,01 [97,34–99,93]	99,6 [98,09–99,99]	0,71
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> 163 <sup>+</sup> , %	98,08 [53,47–99,78]	89,89 [65,4–99,86]	0,65
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> , %	76,15 [55,12–93,01]	69,58 [55,08–90,5]	0,09
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> 163 <sup>+</sup> , %	95,83 [82,79–98,1]	99,81 [92,79–100,00]	0,04
CD14 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> , %	93,04 [84,51–98,06]	96,79 [86,99–99,03]	0,35

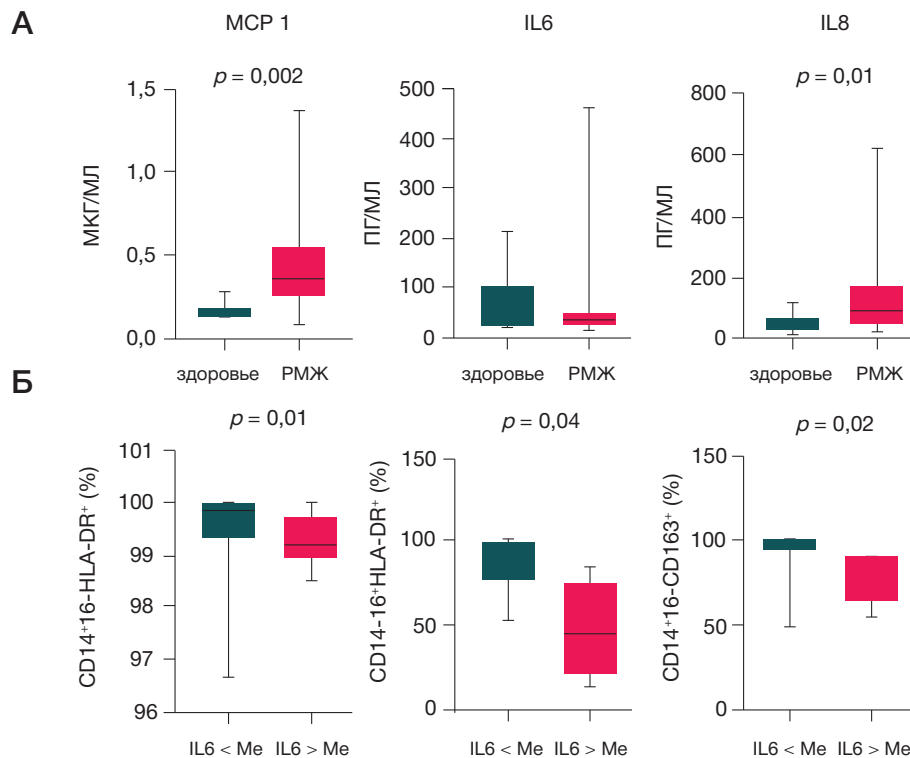
Примечания: Т — размер опухоли согласно системе TNM, N — метастатическое поражение лимфатических узлов согласно TNM.

CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup>-клеток для группы больных с N0-1 превышало показатель для группы с N2-3 более чем на 4%. Стадия заболевания как интегральный показатель распространенности опухолевого процесса была связана с распределением моноцитов среди основных популяций. Нами было проведено сравнение группы больных без распространения опухолевого процесса в регионарные лимфатические узлы (стадия заболевания I-IIA) против группы с распространением опухоли в регионарные лимфатические узлы (стадия IIB-IIIС). Так, для группы больных в стадии I-IIA доля клеток CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> составила 89,4 [83,48–94,18]%, а для группы с IIB-IIIС была равна 94,2 [92,4–96,69]%, с *p* = 0,05. Для моноцитов с фенотипом CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> эти показатели были выше в стадии I-IIA по сравнению с IIB-IIIС. Содержание CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>-клеток при стадии I-IIA также было выше показателя группы больных с IIB-IIIС с *p* = 0,03.

Параметры экспрессии CD163<sup>+</sup> и HLA-DR<sup>+</sup> на разных популяциях моноцитов были связаны с молекулярно-биологическими подтипами опухоли (табл. 4). Так, больные

с трижды негативным подтипом (ТНPMЖ) отличались от группы больных с люминальным В и Her2<sup>+</sup> подтипом сниженным содержанием CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-клеток. В свою очередь, Her2<sup>+</sup> подтип характеризовался повышенным уровнем CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>CD163<sup>+</sup> и CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>-клеток по сравнению с аналогичными показателями объединенной группы люминальный В/ТНPMЖ (*p* < 0,05). Содержание CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> также было статистически достоверно выше у больных с Her2<sup>+</sup> опухолью против показателя больных с люминальным В и ТНPMЖ (*p* < 0,05). Группа больных с люминальным В подтипом опухоли отличалась только сниженным содержанием CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>-моноцитов при люминальном В против группы больных с люминальным В и Her2<sup>+</sup> подтипами (*p* < 0,05).

Одна из важных характеристик организма, определяющих его системный уровень функционирования, — цитокиновый профиль циркулирующей крови. Первоначально была проведена оценка содержания цитокинов IL6, IL8 и MCP-1 в сыворотке крови больных и здоровых женщин. При анализе содержания MCP-1, IL6 и



**Рис. 2.** Ассоциация содержания цитокинов крови с фенотипом моноцитов при раке молочной железы. **А.** Содержание цитокинов в сыворотке крови больных раком молочной железы и здоровых женщин. **Б.** Взаимосвязь содержания IL6 в сыворотке крови с содержанием CD163<sup>+</sup> и HLA-DR<sup>+</sup>-моноцитов при раке молочной железы

IL8 в сыворотке крови было обнаружено, что группа с PMЖ отличалась повышенным содержанием MCP-1, а именно 0,32 [0,07–0,41] мкг/мл, по сравнению с показателем здоровых женщин, составляющим 0,14 [0,12–0,27] мкг/мл,  $p = 0,002$  (рис. 2).

Содержание IL8 в сыворотке крови больных PMЖ составляло 70,1 [25,6–300,0] пг/мл и также превышало показатель группы здоровых женщин, равный 46,0 [16,3–113,0] пг/мл,  $p = 0,01$ . Количество IL6 в крови больных, напротив, было снижено по сравнению с показателем у здоровых лиц, а именно 23,3 [17,2–30,4] против 28,3 [24,3–33,4] пг/мл, но лишь на уровне статистической тенденции с  $p = 0,06$ .

Для оценки характера взаимосвязи содержания сывороточного MCP-1, IL8 и IL6 с фенотипическими особенностями моноцитов при PMЖ группа пациентов была разделена на две подгруппы с низким (< Me) и высоким содержанием биологического фактора ( $\geq$  Me). Если в отношении MCP-1 и IL8 достоверных различий обнаружено не было, то содержание IL6 сыворотки было связано с фенотипом моноцитов. Высокий уровень содержания IL6 был ассоциирован со снижением доли CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>CD163<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup> и CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-моноцитов и составил 91,29 [75,03–97,89]% против 99,12 [94,3–100,0]%, 98,09 [95,65–99,43]% против 99,93 [99,34–100,0]% и 48,06 [32,1–78,3]% против 93,01 [75,41–98,81]% соответственно. Таким образом, сниженная экспрессия HLA-DR на моноцитах была характерна при понижении уровня IL6 в сыворотке (рис. 2Б).

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Распространение опухолевого процесса (увеличение размера опухолевого узла, метастазирование в региональные лимфатические узлы и другие органы) —

критерий прогрессирования онкологического заболевания. В нашей работе количество CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>-моноцитов, принадлежащих к неклассической популяции, имело обратную корреляцию с размером опухоли (табл. 2). При оценке ассоциации популяционной структуры со стадией нами отмечено, что более поздняя стадия развития заболевания характеризуется меньшим содержанием CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>-клеток. В отношении популяции CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>, представленной в крови в подавляющем количестве, наблюдали противоположную тенденцию — по мере увеличения стадии заболевания содержание CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>увеличивается (табл. 3). Таким образом, содержание CD163<sup>+</sup> и HLA-DR<sup>+</sup>-моноцитов связано с рядом ключевых факторов прогрессии PMЖ, а именно со стадией заболевания и наличием метастазов в регионарных лимфатических узлах. Обращает на себя внимание тот факт, что снижается содержание CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>-клеток, которые могут иметь противоопухолевую активность. Так, моноциты неклассической популяции в мышиных моделях рака легкого демонстрируют способность подавлять метастазирование [17]. В то же время увеличивается количество CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>-клеток, служащих источником для пополнения пула опухолеассоциированных макрофагов [2, 4].

Популяция CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-моноцитов была связана с вовлечением в опухолевый процесс регионарных лимфатических узлов (табл. 3). Известно, что CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>-популяция рекрутируется для выполнения функции антигенпрезентирующих клеток во время воспалительного ответа [18]. По-видимому, при PMЖ поражение регионарных лимфатических узлов может стимулировать образование CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-моноцитов, способных поддерживать противоопухолевый иммунный ответ. В то же время прогрессирование заболевания, выраженное в увеличении стадии злокачественного процесса, ассоциировано

с повышением доли CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>CD163<sup>+</sup> и CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>-клеток, в то время как количество CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>CD163<sup>+</sup>-моноцитов при увеличении размера опухолевого узла уменьшается (табл. 2, 3). Примечательно, что содержание моноцитов CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>-популяций также положительно коррелирует со стадией заболевания. Ранее нами было показано, что экспрессия молекулы CD163 повышена в моноцитах больных РМЖ, а в макрофагах опухоли молочной железы этот показатель увеличивается в ответ на проведение химиотерапевтического лечения [19]. Критическим моментом при этом может быть перераспределение количества моноцитов между CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> и CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>-популяциями, что обуславливает разнонаправленное изменение количества клеток этих популяций по мере увеличения стадии заболевания и размера опухоли. Среди моноцитов классической популяции связь с клинико-морфологическими параметрами показали клетки, экспрессирующие рецептор CD163. Последнее свидетельствует о центральной роли механизмов, опосредованных рецептором CD163 в патогенезе РМЖ.

Показано, что молекулярные подтипы РМЖ отличаются по иммуногенности [20]. Так, подавляющая часть подтипов ТНРМЖ характеризуется повышенными мутационной нагрузкой и содержанием опухолеинфильтрирующих лимфоцитов — критериями назначения иммунотерапевтических препаратов [21]. Нами было отмечено, что популяционная структура моноцитов взаимосвязана с молекулярным подтипом опухоли. Так, ТНРМЖ отличался сниженным в 1,4 раза содержанием CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-клеток (табл. 4). В то же время Her2<sup>+</sup> подтип отличался повышенным содержанием CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-моноцитов. Таким образом, на уровне популяционной структуры моноцитов крови возможно детектировать различие подтипа РМЖ.

Циркулирующие в крови растворимые факторы создают определенную информационную среду, которая способна осуществлять функциональную поляризацию эффекторов и регуляторов иммунной системы [22]. С этой целью был выполнен анализ взаимосвязи содержания ряда цитокинов (IL6, IL8 и MCP-1) в сыворотке крови с показателями популяционной структуры моноцитов. Обращает на себя внимание повышение концентрации основного фактора миграции моноцитов MCP-1 у больных, что, вероятно, связано с активацией процессов рекрутирования моноцитов в ткань опухоли (рис. 2А). Хотя нами не было отмечено изменений в концентрации IL6 в крови при РМЖ, мы обнаружили связь между

содержанием IL6 и популяционным составом моноцитов (рис. 2А). Интересно, что наряду с экспрессией молекулы HLA-DR экспрессия рецептора CD163 на CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>-клетках также снижалась, что ранее не было описано для больных РМЖ и требует дальнейших исследований. Пациентки с высоким уровнем IL6 имели сниженное содержание CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup> и CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-клеток (рис. 2Б). IL6 разнонаправленно воздействует на злокачественные новообразования и может как поддерживать рост опухоли, так и ингибировать его [23]. Показано, что для больных РМЖ увеличение IL6 в сыворотке — плохой прогностический фактор [23, 24]. Возможно, одно из вероятных объяснений негативного влияния IL6 на течение РМЖ — связь повышенного уровня данного цитокина со снижением количества моноцитов с противоопухолевой функциональной направленностью (рис. 2Б). Существует ряд доказательств в пользу того, что моноциты с низкой экспрессией HLA-DR обладают способностью дифференцироваться в миелоидные клетки-супрессоры, подавляющие иммунный ответ [25]. Вероятно, связь количества IL6 и содержания HLA-DR<sup>+</sup> моноцитов может быть одним из механизмов развития опухоли молочной железы и требует дальнейшего исследования.

## Выводы

Таким образом, проведенное исследование выявило, что прогрессирование заболевания сопровождается перераспределением основных популяций моноцитов в сторону увеличения классической. При этом повышенная экспрессия рецептора CD163 на моноцитах классической популяции характерна для поздней стадии заболевания, а повышенная экспрессия HLA-DR, напротив, наблюдается при отсутствии или минимальном метастатическом поражении регионарных лимфатических узлов. Молекулярный подтип опухоли молочной железы также связан с распределением CD163<sup>+</sup> и HLA-DR<sup>+</sup>-моноцитов среди классической, промежуточной и неклассической популяций. Снижение экспрессии HLA-DR на CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> и CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>, а CD163 на CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> моноцитах связано с повышением концентрации IL6 в сыворотке крови больных. Полагаем, что определение субпопуляционной структуры моноцитов у пациенток с РМЖ может способствовать разработке дополнительных критериев для формирования тактики лечения. Целесообразны дальнейшие трансляционные исследования, направленные на возможность применения показателей популяционных характеристик моноцитов в клинической практике для больных РМЖ.

## Литература

- Ziegler-Heitbrock L. Blood monocytes and their subsets: established features and open questions. *Frontiers in immunology*. 2015; 6: 423.
- Xin Fu MY. Monocytes in tumor: The perspectives of single-cell analysis. *Tumor Discovery*. 2022; 1 (1): 4.
- Mildner A, Schönheit J, Giladi A, David E, Lara-Astiaso D, Lorenzo-Vivas E, et al. Genomic Characterization of Murine Monocytes Reveals C/EBP $\beta$  Transcription Factor Dependence of Ly6C(-) Cells. *Immunity*. 2017; 46 (5): 849–62.e7.
- Kapellos TS, Bonaguro L, Gemünd I, Reusch N, Saglam A, Hinkley ER, et al. Human monocyte subsets and phenotypes in major chronic inflammatory diseases. *Frontiers in immunology*. 2019; 10: 2035.
- Skytthe MK, Graversen JH, Moestrup SK. Targeting of CD163(+) Macrophages in Inflammatory and Malignant Diseases. *International journal of molecular sciences*. 2020; 21 (15).
- Joshi I, Carney WP, Rock EP. Utility of monocyte HLA-DR and rationale for therapeutic GM-CSF in sepsis immunoparalysis. *Frontiers in immunology*. 2023; 14: 1130214.
- Veglia F, Perego M, Gabrilovich D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nature immunology*. 2018; 19 (2): 108–19.
- Wang YA, Jian JW, Hung CF, Peng HP, Yang CF, Cheng HS, et al. Germline breast cancer susceptibility gene mutations and breast cancer outcomes. *BMC cancer*. 2018; 18 (1): 315.
- Olsson HL, Olsson ML. The menstrual cycle and risk of breast cancer: a review. *Frontiers in oncology*. 2020; 10: 21.



10. Brown KA. Metabolic pathways in obesity-related breast cancer. *Nature reviews Endocrinology*. 2021; 17 (6): 350–63.
11. Byun D, Hong S, Ryu S, Nam Y, Jang H, Cho Y, et al. Early-life body mass index and risks of breast, endometrial, and ovarian cancers: a dose-response meta-analysis of prospective studies. *British journal of cancer*. 2022; 126 (4): 664–72.
12. Liu K, Zhang W, Dai Z, Wang M, Tian T, Liu X, et al. Association between body mass index and breast cancer risk: evidence based on a dose-response meta-analysis. *Cancer management and research*. 2018; 10: 143–51.
13. Koh J, Kim MJ. Introduction of a New Staging System of Breast Cancer for Radiologists: An Emphasis on the Prognostic Stage. *Korean journal of radiology*. 2019; 20 (1): 69–82.
14. Urru SAM, Gallus S, Bosetti C, Moi T, Medda R, Sollai E, et al. Clinical and pathological factors influencing survival in a large cohort of triple-negative breast cancer patients. *BMC cancer*. 2018; 18 (1): 56.
15. Morris RM, Mortimer TO, O'Neill KL. Cytokines: can cancer get the message? *Cancers*. 2022; 14 (9).
16. Niraula A, Sheridan JF. IL6 signaling in monocytes: a potential therapeutic avenue for stress-induced mood impairments. *Chronic stress (Thousand Oaks, Calif)*. 2019; 3.
17. Hanna RN, Cekic C, Sag D, Tacke R, Thomas GD, Nowyhed H, et al. Patrolling monocytes control tumor metastasis to the lung. *Science (New York, NY)*. 2015; 350 (6263): 985–90.
18. Lee J, Tam H, Adler L, Istad-Minnihan A, Macaubas C, Mellins ED. The MHC class II antigen presentation pathway in human monocytes differs by subset and is regulated by cytokines. *PLoS one*. 2017; 12 (8): e0183594.
19. Patysheva M, Larionova I, Stakheyeva M, Grigoryeva E, lamshchikov P, Tarabanovskaya N, et al. Effect of early-stage human breast carcinoma on monocyte programming. *Frontiers in oncology*. 2021; 11: 800235.
20. Stenmark Tullberg A, Sjöström M, Niméus E, Killander F, Chang SL, Feng FY, et al. Integrating Tumor-Intrinsic and Immunologic Factors to Identify Immunogenic Breast Cancers from a Low-Risk Cohort: Results from the Randomized SweBCG91RT Trial. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2023; 29 (9): 1783–93.
21. Loizides S, Constantinidou A. Triple negative breast cancer: Immunogenicity, tumor microenvironment, and immunotherapy. *Frontiers in genetics*. 2022; 13: 1095839.
22. Kartikasari AER, Huertas CS, Mitchell A, Plebanski M. Tumor-Induced Inflammatory Cytokines and the Emerging Diagnostic Devices for Cancer Detection and Prognosis. *Frontiers in oncology*. 2021; 11: 692142.
23. Knüpfer H, Preiss R. Significance of interleukin-6 (IL6) in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2007; 102 (2): 129–35.
24. Chen J, Wei Y, Yang W, Huang Q, Chen Y, Zeng K, et al. IL6: the link between inflammation, immunity and breast cancer. *Frontiers in oncology*. 2022; 12: 903800.
25. Chen J, Wei Y, Yang W, Huang Q, Chen Y, Zeng K, et al. IL6: the link between inflammation, immunity and breast cancer. *Frontiers in oncology*. 2022; 12: 903800.

## References

1. Ziegler-Heitbrock L. Blood monocytes and their subsets: established features and open questions. *Frontiers in immunology*. 2015; 6: 423.
2. Xin Fu MY. Monocytes in tumor: The perspectives of single-cell analysis. *Tumor Discovery*. 2022; 1 (1): 4.
3. Mildner A, Schönheit J, Giladi A, David E, Lara-Astiaso D, Lorenzo-Vivas E, et al. Genomic Characterization of Murine Monocytes Reveals C/EBP $\beta$  Transcription Factor Dependence of Ly6C(-) Cells. *Immunity*. 2017; 46 (5): 849–62.e7.
4. Kapellos TS, Bonaguro L, Gemünd I, Reusch N, Saglam A, Hinkley ER, et al. Human monocyte subsets and phenotypes in major chronic inflammatory diseases. *Frontiers in immunology*. 2019; 10: 2035.
5. Skytthe MK, Graversen JH, Moestrup SK. Targeting of CD163(+) Macrophages in Inflammatory and Malignant Diseases. *International journal of molecular sciences*. 2020; 21 (15).
6. Joshi I, Carney WP, Rock EP. Utility of monocyte HLA-DR and rationale for therapeutic GM-CSF in sepsis immunoparalysis. *Frontiers in immunology*. 2023; 14: 1130214.
7. Veglia F, Perego M, Gabrilovich D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nature immunology*. 2018; 19 (2): 108–19.
8. Wang YA, Jian JW, Hung CF, Peng HP, Yang CF, Cheng HS, et al. Germline breast cancer susceptibility gene mutations and breast cancer outcomes. *BMC cancer*. 2018; 18 (1): 315.
9. Olsson HL, Olsson ML. The menstrual cycle and risk of breast cancer: a review. *Frontiers in oncology*. 2020; 10: 21.
10. Brown KA. Metabolic pathways in obesity-related breast cancer. *Nature reviews Endocrinology*. 2021; 17 (6): 350–63.
11. Byun D, Hong S, Ryu S, Nam Y, Jang H, Cho Y, et al. Early-life body mass index and risks of breast, endometrial, and ovarian cancers: a dose-response meta-analysis of prospective studies. *British journal of cancer*. 2022; 126 (4): 664–72.
12. Liu K, Zhang W, Dai Z, Wang M, Tian T, Liu X, et al. Association between body mass index and breast cancer risk: evidence based on a dose-response meta-analysis. *Cancer management and research*. 2018; 10: 143–51.
13. Koh J, Kim MJ. Introduction of a New Staging System of Breast Cancer for Radiologists: An Emphasis on the Prognostic Stage. *Korean journal of radiology*. 2019; 20 (1): 69–82.
14. Urru SAM, Gallus S, Bosetti C, Moi T, Medda R, Sollai E, et al. Clinical and pathological factors influencing survival in a large cohort of triple-negative breast cancer patients. *BMC cancer*. 2018; 18 (1): 56.
15. Morris RM, Mortimer TO, O'Neill KL. Cytokines: can cancer get the message? *Cancers*. 2022; 14 (9).
16. Niraula A, Sheridan JF. IL6 signaling in monocytes: a potential therapeutic avenue for stress-induced mood impairments. *Chronic stress (Thousand Oaks, Calif)*. 2019; 3.
17. Hanna RN, Cekic C, Sag D, Tacke R, Thomas GD, Nowyhed H, et al. Patrolling monocytes control tumor metastasis to the lung. *Science (New York, NY)*. 2015; 350 (6263): 985–90.
18. Lee J, Tam H, Adler L, Istad-Minnihan A, Macaubas C, Mellins ED. The MHC class II antigen presentation pathway in human monocytes differs by subset and is regulated by cytokines. *PLoS one*. 2017; 12 (8): e0183594.
19. Patysheva M, Larionova I, Stakheyeva M, Grigoryeva E, lamshchikov P, Tarabanovskaya N, et al. Effect of early-stage human breast carcinoma on monocyte programming. *Frontiers in oncology*. 2021; 11: 800235.
20. Stenmark Tullberg A, Sjöström M, Niméus E, Killander F, Chang SL, Feng FY, et al. Integrating Tumor-Intrinsic and Immunologic Factors to Identify Immunogenic Breast Cancers from a Low-Risk Cohort: Results from the Randomized SweBCG91RT Trial. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2023; 29 (9): 1783–93.
21. Loizides S, Constantinidou A. Triple negative breast cancer: Immunogenicity, tumor microenvironment, and immunotherapy. *Frontiers in genetics*. 2022; 13: 1095839.
22. Kartikasari AER, Huertas CS, Mitchell A, Plebanski M. Tumor-Induced Inflammatory Cytokines and the Emerging Diagnostic Devices for Cancer Detection and Prognosis. *Frontiers in oncology*. 2021; 11: 692142.
23. Knüpfer H, Preiss R. Significance of interleukin-6 (IL6) in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2007; 102 (2): 129–35.
24. Chen J, Wei Y, Yang W, Huang Q, Chen Y, Zeng K, et al. IL6: the link between inflammation, immunity and breast cancer. *Frontiers in oncology*. 2022; 12: 903800.
25. Chen J, Wei Y, Yang W, Huang Q, Chen Y, Zeng K, et al. IL6: the link between inflammation, immunity and breast cancer. *Frontiers in oncology*. 2022; 12: 903800.