

## БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Сарф Е.А., Дьяченко Е.И., Бельская Л.В.

### СВОБОДНЫЙ ТРАНС-4-ГИДРОКСИПРОЛИН В СЛЮНЕ ПРИ РАЗНЫХ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ПОДТИПАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

ФГБОУ ВО «Омский государственный педагогический университет», 644099, г. Омск, Россия

**Актуальность.** Изменение продукции и структуры коллагена при раке молочной железы (РМЖ) может влиять на стимулирование и прогрессирование опухоли от ее злокачественного трансформирования до усиленной инвазии, ангиогенеза и метастазирования.

**Цель работы:** определение концентрации пролина (Pro), транс-4-гидроксипролина (t4HYP) и гидроксипролина (Hyl) как основных аминокислот, входящих в структуру коллагена в слюне при РМЖ, а также оценка их взаимосвязи с клинико-патологическими и молекулярно-биологическими характеристиками РМЖ.

**Материал и методы.** Проведено исследование на 141 добровольцах, разделенных на 2 группы: основная (рак молочной железы, n=116) и контрольная группа (условно здоровые, n=25).

**Результаты.** Установлено повышение концентрации Pro в слюне, не зависящее от клинико-патологических и молекулярно-биологических характеристик РМЖ, что может рассматриваться как потенциальный диагностический маркер. Повышенное содержание Pro, t4HYP и Hyl в слюне коррелирует с HER2-положительным статусом РМЖ, тогда как повышенное содержание t4HYP и Hyl коррелирует с отсутствием экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона, низкой дифференцировкой и высокой пролиферативной активностью опухоли, что в комплексе является прогностически неблагоприятными признаками и характерно для агрессивных молекулярно-биологических подтипов РМЖ. Для t4HYP показаны взаимосвязи с показателями иммунного статуса (ИЛ-2, ИЛ-10 и ИЛ-18) в слюне при РМЖ.

**Обсуждение.** Показано, что концентрация Pro в целом повышена в слюне при РМЖ, тогда так именно для t4HYP и Hyl выявлены тонкие различия между подгруппами РМЖ, отличающимися по клинико-патологическим и молекулярно-биологическим характеристикам. Для t4HYP показано больше взаимосвязей с показателями иммунного статуса в слюне при РМЖ.

**Заключение.** Это подчеркивает необходимость комплексной оценки содержания метаболитов коллагена в слюне при РМЖ.

**Ключевые слова:** слюна; рак молочной железы; пролин; транс-4-гидроксипролин; гидроксипролин; коллаген

**Для цитирования:** Сарф Е.А., Дьяченко Е.И., Бельская Л.В. Свободный транс-4-гидроксипролин в слюне при разных молекулярно-биологических подтипах рака молочной железы. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (9): 431-438. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-9-431-438>

**Для корреспонденции:** Бельская Людмила Владимировна, канд. хим. наук, зав. научно-исследовательской лаб. биохимии; e-mail: [belskaya@omgpru.ru](mailto:belskaya@omgpru.ru).

**Финансирование.** Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда «Диагностическая и прогностическая значимость аминокислотного профиля слюны при раке молочной железы», проект 23-15-00188.

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

Поступила 28.05.2024

Принята к печати 02.07.2024

Опубликовано 00.09.2024

Sarf E.A., Dyachenko E.I., Bel'skaya L.V.

### SALIVARY FREE TRANS-4-HYDROXYPROLINE IN DIFFERENT MOLECULAR BIOLOGICAL SUBTYPES OF BREAST CANCER

Omsk State Pedagogical University, 644099, Omsk, Russia

**Background.** Alterations in collagen production and structure in breast cancer may influence tumor stimulation and progression from malignant transformation to increased invasion, angiogenesis, and metastasis.

**Objective.** The purpose of the work is to determine the concentration of proline (Pro), trans-4-hydroxyproline (t4HYP) and hydroxylysine (Hyl) as the main amino acids included in the structure of collagen in saliva in breast cancer, as well as to assess their relationship with clinicopathological and molecular biological characteristics breast cancer.

**Material and methods.** A study was conducted on 141 volunteers, divided into 2 groups: the main group (breast cancer, n=116) and the control group (conditionally healthy, n=25).

**Results.** An increase in the concentration of Pro in saliva was established, independent of the clinicopathological and molecular biological characteristics of breast cancer, which can be considered as a potential diagnostic marker. Increased levels of Pro, t4HYP and

*Hyl* in saliva correlate with the HER2-positive status of breast cancer, while increased levels of t4HYP and Hyl correlate with the lack of expression of estrogen and progesterone receptors, low differentiation and high proliferative activity of the tumor, which in combination are prognostically unfavorable signs and characteristic for aggressive molecular biological subtypes of breast cancer. For t4HYP, relationships with indicators of immune status (IL-2, IL-10 and IL-18) in saliva in breast cancer were shown.

**Discussion.** It has been shown that the concentration of Pro is generally increased in saliva in breast cancer, while subtle differences in clinicopathological and molecular biological characteristics have been identified for t4HYP and Hyl. For t4HYP, more relationships were shown with indicators of salivary immune status in breast cancer.

**Conclusion.** This emphasizes the need for a comprehensive assessment of the content of collagen metabolites in saliva in breast cancer.

**Key words:** saliva; breast cancer; proline; trans-4-hydroxyproline; hydroxylysine; collagen

**For citation:** Sarf E.A., Dyachenko E.I., Bel'skaya L.V. Salivary free trans-4-hydroxyproline in different molecular biological subtypes of breast cancer. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (9): 431-438 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-9-431-438>

**For correspondence:** Bel'skaya L.V., PhD in Chemistry, Head of Laboratory, Biochemistry Research Laboratory; e-mail: [belskaya@omgpu.ru](mailto:belskaya@omgpu.ru)

#### Information about authors:

Sarf E.A., <https://orcid.org/0000-0003-4918-6937>;

Bel'skaya L.V., <https://orcid.org/0000-0002-6147-4854>;

Dyachenko E.I., <https://orcid.org/0009-0005-3081-3226>.

**Acknowledgment.** This research was funded by Russian Science Foundation, grant number 23-15-00188.

**Conflict of interests.** The authors declare absence of conflict of interests.

Received 28.05.2024

Accepted 02.07.2024

Published 00.09.2024

**Введение.** К основным методам обследования молочной железы на наличие уплотнений являются пальпаторным и маммографический методы диагностики. Данные способы позволяют получить результат, который является достаточным и необходимым симптоматическим признаком для дальнейшего обследования пациентов с целью исключения или подтверждения наличия рака молочной железы (РМЖ). Поскольку увеличение плотности внеклеточного матрикса (ВКМ) опухолевой ткани по сравнению с нормальной тканью молочной железы происходит за счет гиперпродукции коллагена, его высокой степени жесткости и повышенной стабилизации, в научной литературе отмечается повышенный интерес к изучению состава и структуры коллагена [1-3]. Известно, что на этапе синтеза коллагена после включения пролина (Pro) и лизина (Lys) в полипептидную цепь происходит их гидроксирование с образованием транс-4-гидроксипролина (t4HYP) и гидроксизина (Hyl). Реакцию образования t4HYP катализирует фермент коллаген-пролил-4-гидроксилаза (С-Р4Н) [4], который сверхэкспрессируется при РМЖ и способствует его прогрессированию посредством нескольких механизмов [5-7]. Посттрансляционная модификация Lys и Hyl обусловлена активацией фермента лизилоксидазы (LOX), также участвует в формировании стабильной структуры коллагеновых волокон [8-12]. Отмечено, что коллаген может непосредственно влиять на пролиферацию и дифференцировку эпителия молочной железы. Pro может стимулировать пентозофосфатный путь (ПФП), усиливать поток рибозы и тем самым ускорять синтез нуклеотидов, которые являются строительным материалом для раковых клеток в состоянии пролиферативной активности [13-17]. Помимо этого, опухоль-ассоциированный коллаген является модулятором иммунного ответа в микроокружении опухоли через активацию или подавление цитокинового ответа, тем самым, влияя на прогрессирование рака

[18]. Коллаген активирует Т- и В-клетки посредством связи с ИЛ-2 [19] и ингибирует синтез противовоспалительных цитокинов ИЛ-10 и ИЛ-18 [20]. Таким образом, сверх продукция коллагена обеспечивает физические и биохимические сигналы для поддержания пролиферативной активности и инвазивного роста раковых клеток [21]. При этом за счет образования поперечных связей структура коллагена становится более плотной, что приводит к повышенной жесткости ВКМ и может влиять на стимулирование и прогрессирование опухоли от ее злокачественного трансформирования до усиленной инвазии, ангиогенеза и метастазирования [22,23].

Ранее нами показано, что метаболические особенности РМЖ находят отражение в изменении биохимического состава слюны [24-26]. Это позволяет неинвазивным способом получать дополнительную информацию, которая может быть полезна как для понимания механизма развития РМЖ, так и для поиска новых диагностических маркеров [27-29].

Целью данной работы являлось определение концентрации Pro, t4HYP и Hyl как основных аминокислот, входящих в структуру коллагена в слюне при РМЖ, а также оценка их взаимосвязи с клинико-патологическими и молекулярно-биологическими характеристиками РМЖ.

**Материал и методы.** В исследовании случай – контроль приняли участие добровольцы, которые были разделены на 2 группы: основную (РМЖ,  $n=116$ , возраст  $56.6\pm 2.3$  года) и контрольную группу (условно здоровые,  $n=25$ , возраст  $49.7\pm 4.1$  года). Включение в группы происходило параллельно. В качестве критериев включения рассматривались: женский пол, возраст пациентов 30–60 лет, отсутствие какого-либо лечения на момент проведения исследования, в том числе хирургического, химиотерапевтического или лучевого, отсутствие признаков активной инфекции (включая гнойные процессы), проведение санации полости рта.

Критерии невключения: отсутствие гистологической верификации диагноза. Исследования одобрены на заседании комитета по этике БУЗ Омской области «Клинический онкологический диспансер» от 21 июля 2016 г., протокол № 15.

У всех пациенток основной группы гистологически и цитологически была подтверждена инвазивная карцинома молочных желез следующих стадий: стадия I+II – 80 (69,0%), стадия III+IV – 36 (31,0%). У 60 пациенток не выявлено признаков поражения метастазами регионарных лимфатических узлов ( $N_0$  – 51,7%), у 56 пациенток выявлены метастазы в смежаемых подмышечных лимфатических узлах ( $N_{1-3}$  – 48,3%). Опухоли молочных желез были классифицированы по степени дифференцировки ткани на высоко- и средне дифференцированные (G I+II,  $n=74$ ) и низкодифференцированные (GIII,  $n=42$ ). Во всех случаях определен статус рецепторов HER2, эстрогена и прогестерона. У 88 пациентов (75,9%) подтвержден HER2-отрицательный статус, у 27 (24,1%) – HER2-положительный; у 37 пациенток (31,9%) подтвержден ER-отрицательный статус, у 79 (68,1%) – ER-положительный; у 46 пациенток (39,7%) подтвержден PR-отрицательный статус, у 70 (60,3%) – PR-положительный. Значения Ki-67 менее 20% определено у 57 пациенток (49,1%), более 20% – у 59 пациенток (50,9%). По молекулярно-биологическим подтипам рака молочной железы пациентки распределены следующим образом: тройной негативный (ТНРМЖ) – 14 (12,1%), люминальный А – 40 (34,5%), люминальный В (HER2-отрицательный) – 35 (30,2%), люминальный В (HER2-положительный) – 15 (12,9%), нелюминальный РМЖ – 12 (10,3%). У добровольцев контрольной группы не было выявлено патологий молочных желез при плановом маммографическом и ультразвуковом исследованиях.

Образцы слюны собирали однократно на этапе госпитализации строго до начала лечения. Сбор образцов проведен в стерильные полипропиленовые центрифужные пробирки с завинчивающейся крышкой в объеме 2 мл. Образцы слюны собирали путем сплевывания без дополнительной стимуляции в интервале 8-10 часов утра, время максимальной секреции слюны, натошак после предварительного полоскания полости рта водой. У всех испытуемых рассчитывали скорость саливации (мл/мин), чтобы исключить влияния вязкости слюны на измеряемые параметры. Различий в скорости саливации между основной и контрольной группой не выявлено.

Непосредственно после сбора образцы центрифугировали при  $10,000 \times g$  в течение 10 минут (ЦЛн-16), отбирали 1 мл верхнего слоя, переносили в пробирки типа Эппендорф и хранили в морозильной камере при температуре  $-80^\circ\text{C}$  до проведения анализа.

Определение аминокислотного состава слюны выполнено методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, разработанным в лаборатории биоинформатики и метабономики репродукции человека на базе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова».

Аликвоту образца объемом 40 мкл помещали в центрифужную пробирку и добавляли 40 мкл внутреннего стандарта и перемешивали с помощью вортекса Vortex

Labtex V-2 (Labtex) в течение 30 секунд. Затем добавляли 480 мкл раствора хлороформ/метанол = 2/1, об.:об. и 10 мкл воды очищенной. Перемешивали с помощью Vortex Labtex V-2 (Labtex) в течение 10 минут и центрифугировали 10 минут при скорости 16000 об/мин. при температуре  $-7^\circ\text{C}$  (ОНАУС, Ohaus Corp., Нью-Джерси, США). Отбирали 100 мкл верхнего водно-метанольного слоя в центрифужную пробирку вместимостью 1,5 мл и высушивали с помощью концентратора в токе азота. К сухому остатку добавляли 200 мкл 3N раствора хлористоводородной кислоты в бутаноле и перемешивали с помощью Multi-Vortex V-32 (Biosan) в течение 3 минут. Далее термостатировали 15 минут температуре  $60^\circ\text{C}$  и высушивали с помощью концентратора. Сухой остаток перерастворяли в 200 мкл раствора ацетонитрил/вода=3/1 и центрифугировали 30 минут при 16000 об/мин. при температуре  $-7^\circ\text{C}$ . После чего 100 мкл супернатанта переносили в чистую центрифужную пробирку типа Эппендорф и добавляли 200 мкл 10 мМ формиата аммония. Центрифугировали 30 минут при 16000 об/мин при температуре  $-7^\circ\text{C}$ , 100 мкл супернатанта переносили в виалу со вставкой.

Анализ образцов осуществляли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе 1260 Infinity II (Agilent, США) с детектированием на масс-спектрометре 6460 Triple Quad (Agilent, США). Разделение образцов осуществляли методом жидкостной хроматографии с использованием колонки Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18  $2,1 \times 100$  мм, с диаметром сорбента 1,8 мкм (Agilent, США). Для анализа тестируемых соединений в пробах разработан ВЭЖХ метод с масс-спектрометрическим детектированием в режиме мониторинга выбранных реакций. Для обратного расчёта концентраций использовали метод внутреннего стандарта. В качестве внутреннего стандарта использовали аланин-d4. Для построения калибровочной шкалы использовали не менее 6 образцов набора «Amino Acid» (Jasem, Turkey). Использовалось автоматическое интегрирование хроматограмм с помощью программного обеспечения «Quantitative Quant-myway» (Agilent, США).

Содержание в слюне цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-10, ИЛ-18) определяли методом твердофазного иммуоферментного анализа с использованием наборов «Вектор Бест» (Россия) на анализаторе Thermo Fisher Multiskan FC (Waltham, США). Объем аликвоты во всех случаях составил 100 мкл, анализ и расчет концентрации цитокинов (пг/мл) проведен в соответствии с инструкцией производителя.

Статистический анализ полученных данных выполнен при помощи программ Statistica 10.0 (StatSoft) непараметрическим методом с использованием в зависимых группах критерия Вилкоксона, в независимых группах – U-критерия Манна-Уитни. Предварительно проведена проверка характера распределения и гомогенности дисперсий в группах. Согласно тесту Шапиро-Уилка содержание всех определяемых параметров не соответствует нормальному распределению ( $p < 0.05$ ). Проведённый тест на гомогенность дисперсий в группах (тест Бартлетта) позволил отклонить гипотезу, что дисперсии гомогенны по группам ( $p < 0.0001$ ). Поэтому для обработки полученных данных были применены непараметрические методы статистики. Описание выборки произво-

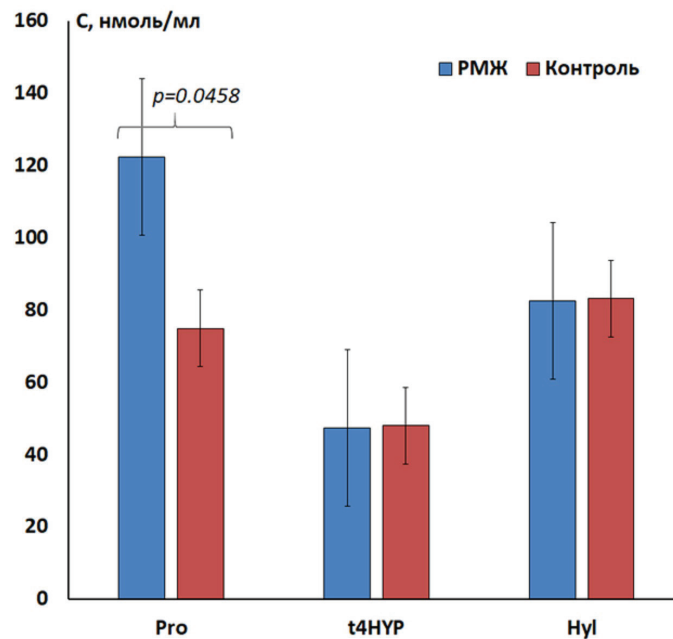


Рис.1. Концентрация аминокислот в слюне при РМЖ и в контрольной группе.

**Содержание Pro, t4HYP и HYL в слюне при РМЖ в зависимости от клинико-патологических и молекулярно-биологических характеристик опухоли**

Характеристика	n	Pro, нмоль/мл	t4HYP, нмоль/мл	Hyl, нмоль/мл
<b>Стадия:</b>				
Стадия I + II	80	125.6 [91.50; 162.9]*	47.32 [46.81; 47.99]	76.98 [41.60; 84.27]
Стадия III + IV	36	117.6 [84.38; 238.7]*	48.33 [47.94; 49.03]	82.74 [41.98; 84.58]
		-	<i>p=0.0195</i>	-
<b>Поражение лимфоузлов:</b>				
N <sub>0</sub>	60	120.9 [88.58; 150.9]*	47.42 [47.05; 52.53]	82.78 [41.53; 84.89]
N <sub>1-3</sub>	56	127.2 [89.30; 188.7]*	47.94 [46.48; 49.03]	56.09 [42.29; 83.50]
<b>Молекулярно-биологический подтип:</b>				
Люминальный A	40	122.2 [88.58; 199.6]*	47.16 [9.10; 47.46]	45.14 [41.53; 84.51]
Люминальный B (HER2+)	15	141.5 [103.7; 222.3]*	47.32 [31.81; 47.94]	67.86 [51.15; 84.58]
Люминальный B (HER2-)	35	117.4 [73.68; 175.2]*	47.50 [46.98; 48.33]	82.64 [41.98; 83.88]
Нелюминальный	12	120.9 [88.63; 182.4]*	48.13 [47.94; 48.33]	83.03 [83.01; 84.21]
ТНРМЖ	14	129.4 [84.78; 151.4]*	48.40 [47.35; 52.92]	84.58 [63.18; 87.74]
<b>Статус экспрессии рецепторов HER2:</b>				
HER2 (-)	88	121.6 [83.22; 172.6]*	47.38 [46.94; 48.06]	65.06 [41.60; 84.27]
HER2 (+)	27	135.8 [102.1; 220.1]*	48.13 [47.94; 48.33]	83.61 [51.15; 84.58]
		-	<i>p=0.0461</i>	-
<b>Статус экспрессии рецепторов эстрогена (ER):</b>				
ER (-)	37	128.0 [89.77; 151.4]*	48.33 [47.94; 48.40]	83.01 [43.62; 85.40]
ER (+)	79	122.1 [87.39; 181.1]*	47.32 [46.81; 47.99]	65.06 [41.79; 84.25]
<b>Статус экспрессии рецепторов прогестерона (PR):</b>				
PR (-)	46	119.6 [88.63; 175.6]*	47.94 [46.81; 48.33]	83.01 [48.58; 84.21]
PR (+)	70	124.9 [88.58; 170.7]*	47.42 [47.15; 48.06]	50.66 [41.41; 84.70]
<b>Степень дифференцировки (G):</b>				
G I + II	74	122.9 [89.77; 188.6]*	47.21 [46.81; 47.38]	52.30 [41.98; 84.51]
G III	42	119.6 [85.43; 148.7]*	48.06 [47.94; 48.67]	83.01 [41.26; 84.27]
		-	<i>p=0.0071</i>	-
<b>Индекс пролиферативной активности Ki-67:</b>				
< 20%	57	127.9 [91.16; 186.8]*	47.16 [27.96; 47.76]	52.30 [41.60; 84.51]
> 20%	59	117.8 [84.78; 170.1]*	47.94 [47.27; 48.67]	82.74 [41.98; 84.27]
		-	<i>p=0.0486</i>	-

Примечание. \* - различия с контрольной группой статистически достоверны,  $p < 0,05$ ; n - число обследованных.

дили с помощью медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25-го и 75-го перцентилей [LQ; UQ]. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** Концентрация Pro в слюне при РМЖ статистически значимо выше, чем в норме: 122.4 [88.58; 172.6] vs. 74.96 [63.51; 189.4] нмоль/мл, тогда как для t4НУР и Ну1 различий со здоровым контролем не выявлено (рис.1).

Следует отметить, что для Pro независимо от деления на подгруппы в зависимости от клинико-патологических и молекулярно-биологических характеристик РМЖ во всех случаях сохраняется статистически значимое различие с контрольной группой (см. таблицу, рис. 2, А).

Только для t4НУР показаны статистически значимые различия при анализе отдельных подгрупп РМЖ (см. таблицу). Так, концентрация t4НУР растет с увеличением стадии и степени дифференцировки РМЖ. Наблюдается рост концентрации t4НУР при наличии экспрессии HER2, отрицательном статусе экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона, а также высоком значении Ki-67. Максимальное увеличение концентрации t4НУР отмечено в слюне при нелюминальном и тройном негативном РМЖ (ТНРМЖ) (рис. 2, Б).

Для Ну1 показано незначительное увеличение кон-

центрации на распространенных стадиях РМЖ, а также при низкой степени дифференцировки и высоком значении Ki-67 (см. таблицу). Концентрация Ну1 растет при HER2 положительном статусе, а также при отсутствии экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона. Незначительное увеличение концентрации Ну1 отмечено только для ТНРМЖ (рис. 2, В).

Показано, что именно повышение концентрации t4НУР коррелирует с ростом уровня ИЛ-2 ( $r=0.3414$ ), а также уменьшением уровня ИЛ-10 ( $r=-0.4274$ ) и ИЛ-18 ( $r=-0.5491$ ) в слюне. Известно, что эти цитокины играют важную скоординированную роль в генезе РМЖ. Для Pro и Ну1 корреляционных взаимосвязей с цитокинами не выявлено.

Показано, что изменение концентрации ИЛ-2 и ИЛ-10 повышается в слюне для всех молекулярно-биологических подтипов РМЖ (рис. 3, А). Для ИЛ-2 отмечено более низкое содержание при люминальных А и В подтипах, тогда как содержание ИЛ-10 повышено при HER2-положительных подтипах РМЖ. Для ИЛ-18 отмечена интересная тенденция: концентрация при люминальных (эстроген- и прогестерон-положительных) подтипах РМЖ выше, чем в контрольной группе, тогда как при гормон-отрицательных подтипах РМЖ – ниже (рис. 3, Б).

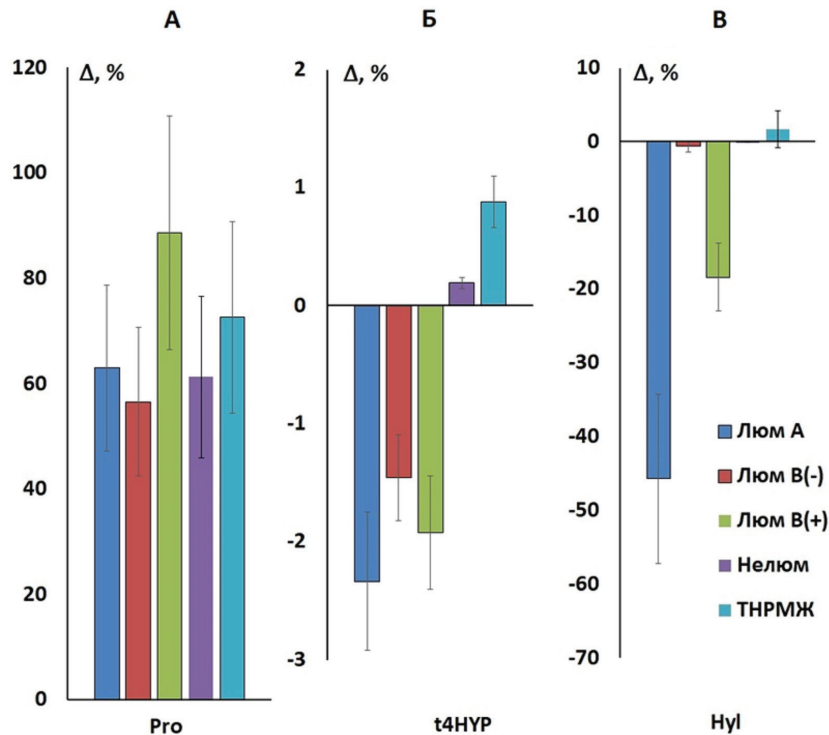


Рис.2. Относительное изменение концентрации аминокислот в слюне при РМЖ по сравнению с контрольной группой для разных молекулярно-биологических подтипов. А – Pro, Б – t4НУР, В – Ну1. Относительное изменение рассчитано как разница концентраций в исследуемой и контрольной группах по отношению к контрольной группе, %.

**Обсуждение.** Нами продемонстрирован рост концентрации Pro в слюне при РМЖ, независимо от клинико-патологических и молекулярно-биологических характеристик опухоли. Повышение его концентрации не отражает специфические метаболические реакции для конкретного молекулярного подтипа РМЖ. Роль Pro в организме человека разнообразна: он подвергается

посттрансляционной модификации гидроксилирования с образованием t4НУР и коллагеновых волокон; принимает участие в анаплеротической реакции через образование  $\alpha$ -кетоглутарата [30], субстрата цикла трикарбоновых кислот, как главного источника АТФ [31]; активует ПФП, синтез рибонуклеотидов, что является источником строительных материалов для активно

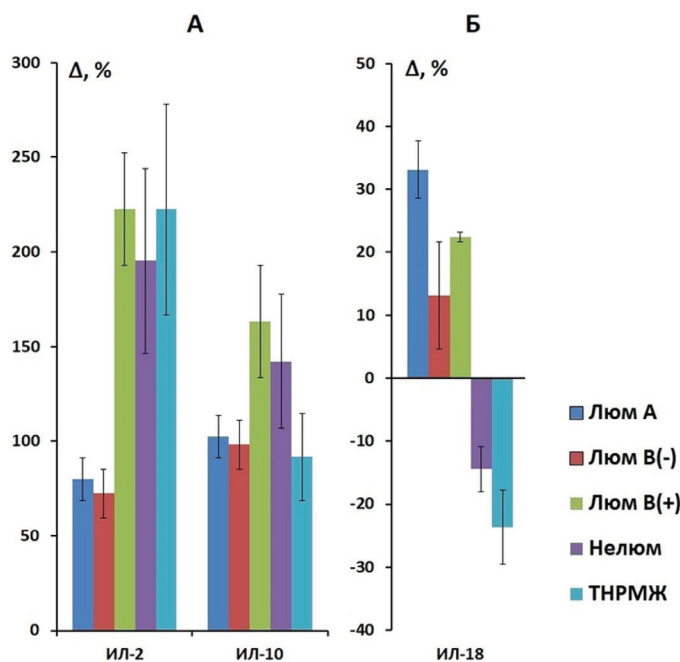


Рис. 3. Относительное изменение концентрации цитокинов в слюне при РМЖ по сравнению с контрольной группой в зависимости от молекулярно-биологического подтипа. А – ИЛ-2, ИЛ-10, Б – ИЛ-18.

делящихся опухолевых клеток [32].

В отличие от Pro для t4НУР нами показана взаимосвязь с характеристиками РМЖ (см. таблицу). Так, статистически значимое увеличение содержания t4НУР коррелирует с увеличением стадии рака груди и степенью дифференцировки онкологических клеток, а также с наличием экспрессии HER2 и высоким значением Ki-67. Исходя из этих данных, уровень свободного t4НУР в слюне должен быть выше у пациентов с нелюминальным подтипом РМЖ, однако нами также показано его увеличение при ТНРМЖ. R. Xu [21] было показано, что высокое содержание С-Р4Н, и как следствие, t4НУР наблюдаются среди пациентов с ТНРМЖ [21]. Для этой группы характерны высокий уровень метастазирования [33], высокая резистентность к химиотерапии и худшие прогнозы по выживаемости [5,34]. По-видимому, повышение уровня t4НУР в слюне для этих подгрупп объясняется другими факторами, в частности отсутствием экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона, что объединяет эти две подгруппы (рис. 2).

Помимо Pro в формировании структуры коллагена участвуют Lys и Hyl. Для создания более длинных коллагеновых волокон [35-37] и придания жесткости ВКМ [38] Lys и Hyl окисляется при воздействии фермента LOX. За счет этого, образуются ковалентные поперечные связи во ВКМ [39]. Данный фермент может выступать в роли пускового механизма для метастазирования при РМЖ [40]. Концентрация Hyl, отражающего стабильность и жесткость ВКМ, увеличивается при отрицательном статусе экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона, низкой дифференцировке и высоким индексом пролиферативной активности, а соответственно при ТНРМЖ (Рис.2).

Известно, что изменение основных компонентов микроокружения опухоли влияет на ее молекулярно-биологические особенности, что приводит к измене-

нию ВКМ [41]. Так, более агрессивный подтип РМЖ может сопровождаться усиленным отложением коллагеновых волокон [42,43].

Нами показано, что содержание t4НУР в слюне коррелирует с показателями иммунного ответа при РМЖ (см. рис. 3). Согласно литературным источникам, сопряженное увеличение уровня ИЛ-2 и t4НУР связано с тем, что коллагеновые волокна I и III типов выступают в роли внеклеточного хранилища для биологически активного ИЛ-2 [44]. В данном случае, коллагеновые волокна оказывают модулирующее действие на локальные ИЛ-2, несущие на себе рецепторы с низким сродством, привлекая Т-клетки, несущие ИЛ-2 с рецепторами, обладающими высоким сродством. Также коллагены содержат интегрин, активность которых влияет на активацию рецепторов ИЛ-2, через активацию рецепторов p55 и p75. Помимо этого, интегрин активируют ряд факторов роста, что приводит к митотической активности ИЛ-2 и входу в S-фазу [45]. Таким образом, коллагены накапливают и стимулируют пролиферацию цитокина ИЛ-2. При его деградации происходит высвобождение существенного количества ИЛ-2 во внеклеточное пространство, где реализуется главная противовоспалительная роль цитокина через активацию Т- и В-клеток и естественных киллеров (НК-клетки) ауто/паракринным методом. Это отражает нормальную физиологическую реакцию на повреждение, как происходит при заживлении ран. Коллагеновые волокна закрывают очаг поражения, а ИЛ-2 активирует клеточный иммунный ответ. Главное отличие между физиологической реакцией на повреждение и РМЖ заключается в том, что коллагеновые волокна в последнем случае имеют измененную структуру и воздействие носит негативный характер [44].

Рост концентрации t4НУР имел обратную направленную связь с ИЛ-10 и ИЛ-18. Помимо общеизвестной

роли данных цитокинов в регуляции иммунного ответа, они могут подавлять продукцию ВКМ. Так, ИЛ-10 ослабляет продукцию ВКМ [46,47] и стимулирует активность протеолитических ферментов, участвующих в его деградации [48], и наоборот, низкий уровень ИЛ-10 может способствовать синтезу коллагена [49]. Так, в одном из исследований были обнаружены антифибротические свойства ИЛ-10 на примере изучения гипертрофического рубцевания кожи. Установлено, что ИЛ-10 ингибировал фиброз за счет активации перекрестных помех между путями передачи сигналов PI3K/AKT и STAT3 [50].

Антифибротические свойства ИЛ-18 реализуются за счет подавления экспрессии коллагеновых волокон через активацию гена Ets-1 [51,52] посредством фосфорилирования ERK, одного из ключевых сигнальных путей MAPK [53,54], что приводит к ингибированию TGF- $\beta$  (трансформирующего фактора роста  $\beta$ ) и синтезу коллагеновых волокон [55]. По всей видимости, как увеличенный синтез коллагеновых волокон, так и запуск сигнальных путей направлен на защиту от антифибротического влияния ИЛ-10 и ИЛ-18. Это согласуется с полученными нами результатами.

Таким образом, повышение концентрации Pro в слюне, не зависящее от клинико-патологических и молекулярно-биологических характеристик РМЖ, может рассматриваться как потенциальный диагностический маркер. Повышенное содержание Pro, t4HYP и Hyl в слюне коррелирует с HER2-положительным статусом РМЖ, тогда как повышенное содержание t4HYP и Hyl коррелирует с отсутствием экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона, низкой дифференцировкой и высокой пролиферативной активностью опухоли, что в комплексе является прогностически неблагоприятными признаками. Тем не менее, полученные результаты являются предварительными и требуют дальнейшей верификации на более представительной выборке.

**Заключение.** Показано, что концентрация Pro в целом повышена в слюне при РМЖ, тогда так именно для t4HYP и Hyl выявлены тонкие различия между подгруппами РМЖ, отличающимися по клинико-патологическим и молекулярно-биологическим характеристикам. Для t4HYP показано больше взаимосвязей с показателями иммунного статуса в слюне при РМЖ. Это подчеркивает необходимость комплексной оценки содержания Pro и его метаболитов в слюне при РМЖ.

#### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Li H.X., Zheng J.H., Fan H.X., Li H.P., Gao Z.X., Chen D. Expression of  $\alpha\beta$ 6 Integrin and Collagen Fibre in Oral Squamous Cell Carcinoma: Association With Clinical Outcomes and Prognostic Implications. *J. Oral. Pathol. Med.* 2013; 42: 547–56. DOI: 10.1111/jop.12044.
- Conklin M.W., Eickhoff J.C., Riching K.M., Pehlke C.A., Eliceiri K.W., Provenzano P.P., et al. Aligned Collagen Is a Prognostic Signature for Survival in Human Breast Carcinoma. *Am. J. Pathol.* 2011; 178: 1221–32. DOI: 10.1016/j.ajpath.2010.11.076.
- Esbona K., Yi Y., Saha S., Yu M., Van Doorn R.R., Conklin M.W., et al. The Presence of Cyclooxygenase 2, Tumor-Associated Macrophages, and Collagen Alignment as Prognostic Markers for Invasive Breast Carcinoma Patients. *Am. J. Pathol.* 2018; 188 (3): 559–73. DOI: 10.1016/j.ajpath.2017.10.025.
- Phang J.M. The regulatory mechanisms of proline and hydroxyproline metabolism: Recent advances in perspective. *Front. Oncol.* 2023; 26 (12): 1118675. DOI: 10.3389/fonc.2022.1118675.
- Shi R., Gao S., Zhang J., Xu J., Graham L.M., Yang X., et al. Collagen prolyl 4-hydroxylases modify tumor progression. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 2021; 53 (7): 805–814. DOI: 10.1093/abbs/gmab065.
- Gorres K.L., Raines R.T. Prolyl 4-hydroxylase. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2010; 45 (2): 106–24. DOI: 10.3109/10409231003627991.
- Vasta J.D., Raines R.T. Human Collagen Prolyl 4-Hydroxylase Is Activated by Ligands for Its Iron Center. *Biochemistry*. 2016; 55 (23): 3224–33. DOI: 10.1021/acs.biochem.6b00251.
- Yamauchi M., Sricholpech M. Lysine post-translational modifications of collagen. *Essays Biochem.* 2012; 52: 113–33. DOI: 10.1042/bse0520113.
- Lucero H.A., Kagan H.M. Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell Mol. Life Sci.* 2006; 63: 2304–16. DOI: 10.1007/s00018-006-6149-9.
- Payne S.L., Hendrix M.J., Kirschmann D.A. Paradoxical roles for lysyl oxidases in cancer: a prospect. *J. Cell Biochem.* 2007; 101: 1338–1354. DOI: 10.1002/jcb.21371.
- Barry-Hamilton V., Spangler R., Marshall D., McCauley S., Rodriguez H.M., Oyasu M., et al. Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment. *Nat. Med.* 2010; 16 (9): 1009–17. DOI: 10.1038/nm.2208.
- Siddikuzzaman, Grace V.M., Guruvayoorappan C. Lysyl oxidase: a potential target for cancer therapy. *Inflammopharmacology*. 2011; 19: 117–29. DOI: 10.1007/s10787-010-0073-1.
- Burke L., Guterman I., Palacios G. R., Britton R.G., Burschowsky D., Tufarelli C., et al. The Janus-like role of proline metabolism in cancer. *Cell Death Discov.* 2020; 6: 104. DOI: 10.1038/s41420-020-00341-8.
- Liu W., Hancock C.N., Fischer J.W., Harman M., Phang J. M. Proline biosynthesis augments tumor cell growth and aerobic glycolysis: involvement of pyridine nucleotides. *Sci. Rep.* 2015; 5: 17206. DOI: 10.1038/srep17206.
- Pandhare J., Donald S. P., Cooper S. K., Phang J. M. Regulation and function of proline oxidase under nutrient stress. *J. Cell Biochem.* 2009; 107 (4): 759–68. DOI: 10.1002/jcb.22174.
- Tanner J.J., Fendt S.M., Becker D.F. The proline cycle as a potential cancer therapy target. *Biochemistry*. 2018; 57 (25): 3433–44. DOI: 10.1021/acs.biochem.8b00215.
- Phang J.M., Liu W., Zahirnyk O. Proline metabolism and microenvironmental stress. *Annu Rev. Nutr.* 2010; 30: 441–63. DOI: 10.1146/annurev.nutr.012809.104638.
- Gordon-Weeks A., Yuzhalin A.E. Cancer Extracellular Matrix Proteins Regulate Tumour Immunity. *Cancers (Basel)*. 2020; 12 (11): 3331. DOI: 10.3390/cancers12113331.
- Silver A.B., Tzeng S.Y., Lager M., Wang J., Ishihara J., Green J.J., et al. An engineered immunocytokine with collagen affinity improves the tumor bioavailability, tolerability, and therapeutic efficacy of IL-2. *Cell Rep. Med.* 2023; 4 (11): 101289. DOI: 10.1016/j.xcrm.2023.101289.
- Huang Y., Zou K., Jiang H., Li Z. The complex role of IL-10 in malignant ascites: a review. *Cancer Immunol. Immunother.* 2024; 73 (2): 32. DOI: 10.1007/s00262-023-03616-y.
- Xu R. P4HA1 is a new regulator of the HIF-1 pathway in breast cancer. *Cell Stress*. 2019; 3 (1): 27–28. DOI: 10.15698/cst2019.01.173.
- Pickup M.W., Mouw J.K., Weaver V.M. The Extracellular Matrix Modulates the Hallmarks of Cancer. *EMBO Rep.* 2014; 15: 1243–53. DOI: 10.15252/embr.201439246.
- Rømer A.M.A., Thorseth M.L., Madsen D.H. Immune Modulatory Properties of Collagen in Cancer. *Front. Immunol.* 2021; 12: 791453. DOI: 10.3389/fimmu.2021.791453.
- Bel'skaya L.V., Sarf E.A., Solomatin D.V., Kosenok V.K. Metabolic Features of Saliva in Breast Cancer Patients. *Metabolites*. 2022; 12 (2): 166. DOI: 10.3390/metabo12020166.
- Bel'skaya L.V., Sarf E.A. «Salivaomics» of Different Molecular Biological Subtypes of Breast Cancer. *Current Issues in Molecular Biology*. 2022; 44 (7): 3053–74. DOI: 10.3390/cimb44070211.
- Bel'skaya L.V., Sarf E.A. Prognostic Value of Salivary Biochemical Indicators in Primary Resectable Breast Cancer. *Metabolites*. 2022; 12 (6): 552. DOI: 10.3390/metabo12060552.
- Koopaie M., Kolahdooz S., Fatahadeh M., Manifar S. Salivary biomarkers in breast cancer diagnosis: A systematic review and diagnostic meta-analysis. *Cancer Med.* 2022; 11 (13): 2644–61. DOI: 10.1002/cam4.4640.

28. Nonaka T., Wong D.T.W. Saliva diagnostics: Salivaomics, saliva exo-omics, and saliva liquid biopsy. *J. Am. Dent. Assoc.* 2023; 154 (8): 696-704. DOI: 10.1016/j.adaj.2023.05.006.
29. Porto-Mascarenhas E.C., Assad D.X., Chardin H., Gozal D., De Luca Canto G., Acevedo A.C., et al. Salivary biomarkers in the diagnosis of breast cancer: A review. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2017; 110: 62-73. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2016.12.009.
30. Hancock C.N., Liu W., Alvord W.G., Phang J.M. Co-regulation of mitochondrial respiration by proline dehydrogenase/oxidase and succinate. *Amino Acids.* 2016; 48 (3): 859-72. DOI: 10.1007/s00726-015-2134-7.
31. Mihaylova M.M., Shaw R.J. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat. Cell Biol.* 2011; 13 (9): 1016-23. DOI: 10.1038/ncb2329.
32. Phang J.M. Proline metabolism in cell regulation and cancer biology: Recent advances and hypotheses. *Antioxid. Redox Signaling.* 2019; 30 (4): 635-49. DOI: 10.1089/ars.2017.7350.
33. Gilkes D.M., Chaturvedi P., Bajpai S., Wong C.C., Wei H., Pitcairn S., et al. Collagen prolyl hydroxylases are essential for breast cancer metastasis. *Cancer Res.* 2013; 73: 3285-96. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3963.
34. Xiong G., Deng L., Zhu J., Rychahou P.G., Xu R. Prolyl-4-hydroxylase  $\alpha$  subunit 2 promotes breast cancer progression and metastasis by regulating collagen deposition. *BMC Cancer.* 2014; 14: 1. DOI: 10.1186/1471-2407-14-1.
35. Mouw J.K., Ou G., Weaver V.M. Extracellular Matrix Assembly: A Multiscale Deconstruction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014; 15: 771-85. DOI: 10.1038/nrm3902.
36. Molnar J., Fong K.S., He Q.P., Hayashi K., Kim Y., Fong S.F., et al. Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 2003; 1647 (1-2): 220-4. DOI: 10.1016/s1570-9639(03)00053-0.
37. Eyre D.R., Glimcher M.J. Collagen Cross-Linking. Isolation of Cross-Linked Peptides From Collagen of Chicken Bone. *Biochem J.* 1973; 135: 393-403. DOI: 10.1042/bj1350393.
38. Baker A.M., Bird D., Lang G., Cox T.R., Erler J.T. Lysyl Oxidase Enzymatic Function Increases Stiffness to Drive Colorectal Cancer Progression Through FAK. *Oncogene.* 2013; 32: 1863-8. DOI: 10.1038/onc.2012.202.
39. Rodriguez-Pascual F., Rosell-Garcia T. The challenge of determining lysyl oxidase activity: Old methods and novel approaches. *Anal. Biochem.* 2022; 639: 114508. DOI: 10.1016/j.ab.2021.114508.
40. Miller B.W., Morton J.P., Pinese M., Saturno G., Jamieson N.B., McGhee E., et al. Targeting the LOX/hypoxia axis reverses many of the features that make pancreatic cancer deadly: inhibition of LOX abrogates metastasis and enhances drug efficacy. *EMBO Mol. Med.* 2015; 7 (8): 1063-76. DOI: 10.15252/emmm.201404827.
41. Acerbi L., Cassereau I., Dean Q., Shi A., Au C., Park Y.Y., et al. Human breast cancer invasion and aggression correlates with ECM stiffening and immune cell infiltration. *Integr. Biol. (Camb.).* 2015; 7 (10): 1120-34. DOI: 10.1039/c5ib00040h.
42. Du W., Xia X., Hu F., Yu J. Extracellular matrix remodeling in the tumor immunity. *Front. Immunol.* 2024; 14: 1340634. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1340634.
43. Yu T., Di G. Role of tumor microenvironment in triple-negative breast cancer and its prognostic significance. *Chin. J. Cancer Res.* 2017; 29 (3): 237-52. DOI: 10.21147/j.issn.1000-9604.2017.03.10.
44. Somasundaram R., Ruehl M., Tiling N., Ackermann R., Schmid M., Riecken E.O. et al. Collagens serve as an extracellular store of bioactive interleukin 2. *J. Biol. Chem.* 2000; 275 (49): 38170-38175. DOI: 10.1074/jbc.M006616200.
45. Dustin M.L. Role of adhesion molecules in activation signaling in T lymphocytes. *J. Clin. Immunol.* 2001; 21 (4): 258-63. DOI: 10.1023/a:1010927208180.
46. Bogdan C., Vodovotz Y., Nathan C. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J. Exp. Med.* 1991; 174 (6): 1549-55. DOI: 10.1084/jem.174.6.1549.
47. Sabat R., Grütz G., Warszawska K., Kirsch S., Witte E., Wolk K., et al. Biology of interleukin-10. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 2010; 21: 331-44. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2010.09.002.
48. Short W.D., Steen E., Kaul A., Wang X., Olutoye O.O. 2nd., Vangapandu H.V., et al. IL-10 promotes endothelial progenitor cell infiltration and wound healing via STAT3. *FASEB J.* 2022; 36 (7): e22298. DOI: 10.1096/fj.201901024RR.
49. Yamamoto T., Eckes B., Krieg T. Effect of interleukin-10 on the gene expression of type I collagen, fibronectin, and decorin in human skin fibroblasts: differential regulation by transforming growth factor-beta and monocyte chemoattractant protein-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 281 (1): 200-5. DOI: 10.1006/bbrc.2001.4321.
50. Shi J., Li J., Guan H., Cai W., Bai X., Fang X., et al. Anti-fibrotic actions of interleukin-10 against hypertrophic scarring by activation of PI3K/AKT and STAT3 signaling pathways in scar-forming fibroblasts. *PLoS One.* 2014; 9(5): e98228. DOI: 10.1371/journal.pone.0098228.
51. Czuwara-Ladykowska J., Sementchenko V.I., Watson D.K.; Trojanowska M. Ets1 is an effector of the transforming growth factor beta (TGF-beta ) signaling pathway and an antagonist of the profibrotic effects of TGF-beta. *J. Biol. Chem.* 2002; 277 (23): 20399-20408. DOI: 10.1074/jbc.M200206200.
52. Sherriff-Tadano R., Ohta A., Morito F., Mitamura M., Haruta Y., Koarada S., et al. Antifibrotic effects of hepatocyte growth factor on scleroderma fibroblasts and analysis of its mechanism. *Mod. Rheumatol.* 2006; 16 (6): 364-71. DOI: 10.1007/s10165-006-0525-z.
53. Westermarck J., Kähäri V.M. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J.* 1999; 13 (8): 781-92.
54. Reunanen N., Foschi M., Han J., Kahari V.M. Activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 inhibits type I collagen expression by human skin fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 2000; 275 (44): 34634-9. DOI: 10.1074/jbc.C000175200.
55. Kim H.J., Song S.B., Choi J.M., Kim K.M., Cho B.K., Cho D.H., Park H.J. IL-18 downregulates collagen production in human dermal fibroblasts via the ERK pathway. *J. Invest Dermatol.* 2010; 130 (3): 706-15. DOI: 10.1038/jid.2009.302.