

УДК 616-006.699:611.424:577.218

## УРОВНИ МИКРОРНК В ЛИМФЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

<sup>1</sup>Лыков А.П., <sup>1</sup>Кабаков А.В., <sup>1</sup>Райтер Т.В., <sup>1</sup>Бондаренко Н.А., <sup>1</sup>Повещенко О.В.,  
<sup>1</sup>Казаков О.В., <sup>1</sup>Повещенко А.Ф., <sup>2</sup>Стрункин Д.Н., <sup>1</sup>Колмыков С.К., <sup>3</sup>Чанышев М.Д.,  
<sup>3</sup>Гуляева Л.Ф., <sup>1</sup>Коненков И.В.

<sup>1</sup>НИИКЭЛ, Новосибирск, e-mail: aplykov2@mail.ru;

<sup>2</sup>НИИФКИ, Новосибирск;

<sup>3</sup>ФГБУ НИИ МББ СО РАМН, Новосибирск

В патогенезе заболеваний, в том числе и рака, изменениям уровней экспрессии микроРНК отводится существенная роль. Целью исследования стало изучение уровней микроРНК в лимфе при экспериментальном раке молочной железы и взаимосвязи с количеством и функциональной активностью клеток гемо- и лимфопоэза. РМЖ индуцировали введением n-метил-N-нитрозомочевины у крыс линии Wistar. В лимфе исследовали содержание микроРНК-21, 221, 222 и 429. Показано, что между уровнями экспрессии тканями опухоли молочной железы микроРНК, количеством и функциональной активностью клеток гемо- и лимфопоэза сопряженность. Уровни микроРНК при раке молочной железы зависят от вида лечения и сопряжены с параметрами клеток гемо- и лимфопоэза.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, микроРНК, лимфа

## THE LEVELS OF MICRORNA IN THE LYMPH IN EXPERIMENTAL MODELS OF BREAST CANCER

<sup>1</sup>Likov A.P., <sup>1</sup>Kabakov A.V., <sup>1</sup>Rayter T.V., <sup>1</sup>Bondarenko N.A., <sup>1</sup>Poveshchenko O.V.,  
<sup>1</sup>Kazakov O.V., <sup>1</sup>Poveshchenko A.F., <sup>2</sup>Strunkin D.N., <sup>1</sup>Kolmykov S.C., <sup>3</sup>Chanyshev M.D.,  
<sup>3</sup>Gulyaeva L.F., <sup>1</sup>Konenkov I.V.

<sup>1</sup>Scientific institution of clinical and experimental lymphology, Novosibirsk, e-mail: aplykov2@mail.ru;

<sup>2</sup>Scientific institution of fundamental and clinical immunology, Novosibirsk;

<sup>3</sup>Research institute for molecular biology and biophysics SB RAMS, Novosibirsk

In the pathogenesis of diseases, including cancer, changes in the levels of expression of microRNAs play an essential role. The aim of the research was to study the levels of microRNA in the lymph in experimental breast cancer and correlation with the number and functional activity of cells of the hemo – and lymphopoiesis. Breast cancer induced by the introduction of n-methyl-N-nitrosourea in Wistar rats. In the lymph investigated the content of microRNA-21, 221, 222, 429. It is shown that between the levels of expression of tissue breast tumor microRNA, the number and functional activity of cells of the hemo – and lymphopoiesis were present a some correlations. The levels of microRNAs in breast cancer depend on the type of treatment and are associated with parameters of cells hemo – and lymphopoiesis.

**Keywords:** breast cancer, microRNA, lymph

МикроРНК, группа малых некодируемых РНК в 18-25 нуклеотид, функционирующих в клетках эукариотов как посттранскрипционные регуляторы генов [1-2, 6-8]. Анализ экспрессии микроРНК подтвердил, как проонкогенную, так и опухоль-супрессирующую роль данных молекул. Определение уровней циркулирующей и тканевой микроРНК, может стать основой для ранней диагностики онкологических заболеваний [8]. Показано, что микроРНК вовлечены в патогенез рака молочной железы. Так, в частности при раке молочной железы отмечено повышение уровней экспрессии в тканях молочной железы микроРНК-21, микроРНК-155 и микроРНК-206 [8]. Также микроРНК опосредуют стресс индуцированный ответ [3-5]. Понятие механиз-

мов вовлеченных в канцерогенез при раке молочной железы важно для разработки более эффективной профилактики опухолей и терапии. Известно, что препараты нуклеиновых кислот, применяемые в терапии пациентов с онкологической патологией, способствуют активации, как факторов неспецифической защиты организма, так и факторов специфической защиты организма. Однако эффект экзогенной ДНК на экспрессию микроРНК не исследовался. Поэтому целью исследования стало изучение уровней микроРНК в лимфе при экспериментальном раке молочной железы, с учетом вида проводимого лечения и выявление взаимосвязей с параметрами количества и функциональной активности клеток гемо- и лимфопоэза.

### Материалы и методы исследования

Эксперименты на лабораторных животных проведены в соответствии с соблюдением принципов Хельсинской декларации ВМА (2000). Эксперименты выполнены на 67 неполовозрелых крысах-самках линии Wistar. Животные содержались на стандартной лабораторной диете и имели свободный доступ к воде. У 57 крысы РМЖ индуцировали N-метил-N-нитрозомочевинной (30 мг/кг, Sigma-Aldrich, США), а 10 особей составили группу контроля – интактные. Через 6 месяцев у 33 крыс оперативно удалили опухоль молочной железы и далее 9 особей получили ПХТ, 12 особям дополнительно к ПХТ подключили лечение фрагментированной ДНК, 12 особей не получали адьювантной терапии и составили группу контроля оперативного способа лечения РМЖ. Кроме этого, была группа особей, получавшая только ПХТ (n=12) и группа особей, которой не проводилось никакого лечения (n=12). Курс ПХТ включал 5-фторурацил (Ebewe, Австрия в дозе 15 мг/кг внутривенно на 1 и 8 день курса терапии), метотрексат (Ebewe, Австрия в дозе 2,5 мг/кг внутривенно на 1 и 8 день курса терапии) и циклофосфан (ОАО «Биохимия», Саранск в дозе 3 мг/кг внутривенно ежедневно однократно 14 дней). Курс терапии фрагментированной ДНК (5мг/кг) проводили внутривенным введением однократно в течение 14 дней через 3 часа после введения циклофосфана. В экспериментах использовали субстанцию препарата Панаген с содержанием фрагментированной ДНК 1,7 мг/мл. Препарат Панаген (ЛСР № 004429/08 от 09.06.08) представляет собой фрагментированный нуклеопротеидный комплекс, выделенный из плаценты человека. Животных из эксперимента выводили через 6,5 месяцев под наркозом (40 мг/кг нембутана внутривенно; Sigma-Aldrich, США), что обуславливалось необходимостью прижизненного сбора лимфы из грудного лимфатического протока. Ядродержащие клетки костного мозга (КМ) получали при помощи перфузии бедренных костей лабораторных животных. Ядродержащие клетки КМ ресуспендировали в среде DMEM (Биолот, СПб) и пропускали через фильтр (размер пор 80 мкм) для удаления клеточного дебриса, подсчитывали количество жизнеспособных клеток. Для получения костномозговых – мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (КМ-ММСК) ядродержащие клетки КМ инкубировали в пластиковых флаконах (TPP, Швейцария) в среде DMEM (Биолот, СПб), дополненной 100 мкг/мл гентамицина сульфата (Дальхимфарм, Хабаровск), 2 mM L-глутамина (ICN, США) и 15% FCS при 37°C в атмосфере 5%

CO<sub>2</sub>. Через 48 часов неприкрепленные к пластику клетки удаляли, а прилипающую фракцию клеток культивировали до получения конфлюэнтного слоя. Снятие КМ-ММСК при пассировании осуществляли с использованием 0,25% раствора трипсина/0,02% раствора ЭДТА (ICN, США). Суспензию спленцитов получали измельчением селезенки от лабораторных животных. Мононуклеарные клетки (МНК) из лимфы получали осаждением при 1500 об/мин в течение 5 минут с последующей 2-х кратной отмывкой в забуференном физиологическом растворе. Через 72 часа надосадочная жидкость от клеток КМ, спленцитов и МНК снималась, разливалась по аликвотам и хранилась при -70°C до момента использования в работе. В кондиционной среде определяли содержание IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 с использованием коммерческих наборов для иммуноферментного анализа (eBioscience, Австрия). Выделение суммарной РНК из лимфы проводили с использованием набора Qiagen (Rneasy® Lipid Tissue Mini Kit (50), Германия) согласно инструкции. Была проведена ДНКазная обработка образцов при помощи набора RNase-Free DNase Set (50) (Qiagen®, Германия) согласно инструкции, после чего образцы последовательно промывали buffer RW1 и buffer RPE. РНК была выделена с колонки 30 мкл RNase-free water при центрифугировании (1 мин., 8g). Для определения количества выделенной суммарной РНК из лимфы измеряли оптическую плотность раствора (D) на спектрофотометре Agilent 8453 UV-visible Spectroscopy System (Германия) при длинах волн 260, 230 и 280 нм (о степени чистоты РНК от белков судили по величине отношения D260/D280). Приемлемой степенью очистки считали D260/D280=1,6-1,8. О количестве примесей полисахаридов судили по величине отношения D260/D230. Приемлемой степенью очистки считали D260/D230=1,8. Концентрацию РНК в образце рассчитывали, исходя из значения оптической плотности раствора, измеренной при 260 нм. Оптическая плотность, равная 1, соответствует около 40 мкг РНК. Концентрацию РНК рассчитывали по формуле: C (мкг/мл) = [D260 x 40 мкг/мл x Vкюветы (мл)] / VРНК (мл). Обратную транскрипцию проводили для получения кДНК по матрице микроРНК, выделенной из образцов тканей. Использовали набор реагентов, полученный от компании ЗАО «Вектор-бест» согласно рекомендациям производителя с модификациями. Для каждого образца микроРНК был приготовлен раствор объемом 30 мкл, содержащий 3 мкл микроРНК, 16,2 мкл трегалозы, 3 мкл буфера для ревертирования, 3 мкл раствора dNTP, 3 мкл раствора BSA, 0,32 мкл RT, 1,5 мкл раствора соответствующего праймера к микроРНК. Использовали следующие праймеры:

**U6 (малая РНК):** 5'-TCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGGCCATGC-3';  
**miRNA 21:** 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCAACATC-3';  
**miRNA 221:** 5'-TCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGAAACCCA-3';  
**miRNA 222:** 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACCCAGTA-3';  
**miRNA 429:** 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACGGCATT-3'.

Раствор последовательно инкубировали 5 мин. на 25°C, 30 мин. на 42°C, 2 мин. на 85°C, после чего полученные образцы кДНК были убраны в -20°C. Продукты реакции обратной транскрипции использовали для ОТ-ПЦР. Для определения уровня экспрессии микроРНК miR-21, -221, -222, -429 в лимфе проводили ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием реагентов, полученных от компании ЗАО «Вектор-бест», согласно рекомендациям производителя с модификациями на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США). В качестве гена сравнения использовали малую РНК U6, которая стабильно экспрессируется в тканях животных. Использовали следующие олигонуклеотидные пробы: **U6 (малая РНК)** Прямой 5'-GCCGCATACA GAGAAGATTA-3' Обратный 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3' Зонд 5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACGAAACCCA-(BHQ1)-3'; **miR-21** Прямой 5'-GCCGCTAGCTTATCAGACT-3' Обратный 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3' Зонд 5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACTCAACATC (BHQ1)-3'; **miR-221** Прямой 5'-GCCGCAGCTACATTGTCTGC-3' Обратный 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3' Зонд 5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACGAAACCCA-(BHQ1)-3'; **miR-222** Прямой 5'-GCCGCAGCTACATTGTCTGC-3' Обратный 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3' Зонд 5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACGAAACCCA-(BHQ1)-3'; **miR-429** Прямой 5'-ACTGCCACTAATACTGTCTGGT-3' Обратный 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3' Зонд 5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACGACGGCATT-(BHQ1)-3'.

Объем реакционной смеси для каждой реакции составлял 30 мкл, в него входили: 3 мкл полученной кДНК, 14 мкл mQ-H<sub>2</sub>O, 3 мкл буфера для ПЦР, 3 мкл раствора dNTP, 3 мкл раствора BSA, 1 мкл Taq-полимеразы, 3 мкл раствора соответствующего праймера, соединенного с флуорофором (HEX), 0,17 мкл урацил-ДНК-гликозилазы. Протокол реакции ПЦР: предварительный прогрев при 95°C – 3 мин., после этого следовали 50 основных циклов: денатурация при 95°C – 15 с, отжиг при 58°C – 20 с, элонгация и сбор данных по флуоресценции при 72°C – 30 с. Для контроля специфичности ПЦР использовали кривые плавления. Относительный уровень экспрессии генов оценивали с использованием значений пороговых циклов Ct с учетом эффективности реакций (E) исследуемого гена и гена «домашнего хозяйства». Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 6.0, меры центральной тенденции и рассеяния описаны медианой (Me), нижним (Lq) и верхним (Hq) квартилями; достоверность различия рассчитывалась по U-критерию Манна-Уитни, и принималась при значениях  $p < 0,05$ .

### Результаты исследования и их обсуждение

Как видно из табл. 1, в лимфе грудного протока крыс линии Wistar выявлены различные уровни исследуемых микроРНК. Так, отмечено статистически значимое увеличение уровней микроРНК-21 в лимфе при РМЖ в сравнении с интактными особями. Кроме этого, выявлено статисти-

чески значимое снижение уровней микроРНК-21 в лимфе крыс линии Wistar, получивших ПХТ без оперативного вмешательства и в группе крыс, получивших сочетание ПХТ с дополнительным введением фрагментированной ДНК после хирургического удаления опухоли молочной железы по сравнению с контрольной группой крыс по РМЖ. В отношении уровней микроРНК-221 в лимфе грудного протока нами не выявлено статистически значимых различий между группами крыс. Установлено статистически значимое снижение уровней микроРНК-222 в лимфе грудного протока у крыс, получивших ПХТ в любых вариациях в сравнении с интактными животными. Также, отмечено статистически значимое снижение уровней микроРНК-222 в лимфе особей, получивших ПХТ в любых вариациях и в группе крыс, получившей только хирургическое лечение по сравнению с контрольной группой по РМЖ. В лимфе крыс, получивших ПХТ после удаления опухоли молочной железы, выявлено статистически значимое снижение уровней микроРНК-222 в сравнении с крысами, получившими хирургическое лечение. Что же касается уровней микроРНК-429 в лимфе грудного протока, то было установлено статистически значимое увеличение уровней в группе крыс, получивших сочетание хирургического и терапевтического вида лечения дополненного введением экзогенной ДНК в сравнении с интактными особями. Кроме этого, данная группа крыс имела статистически значимо большие уровни микроРНК-429 в лимфе по сравнению с контрольной группой по РМЖ и группой крыс, получивших только ПХТ.

Также в группе крыс, получивших только ПХТ уровни микроРНК-429 в лимфе, были статистически значимо выше по сравнению с контрольной группой крыс по РМЖ.

Как видно из табл. 2, статистически значимых различий по количеству МНК в лимфе между группами не выявлено, что указывает на тот факт, что прошло достаточное время для восстановления пула циркулирующих лимфоцитов. В тоже время, выявлены статистически значимые различия по количеству спленоцитов, ядросодержащих клеток КМ и КМ-ММСК в исследуемых группах животных. Так, отмечено статистически значимое увеличение количества спленоцитов в группе животных, подвергшихся только оперативному лечению, в группе животных, получавших только ПХТ и комбинацию ПХТ с введением фрагментированной ДНК по сравнению с контрольной группой животных, и группой сравнения по РМЖ.

Таблица 1

Уровни микроРНК в лимфе крыс линии Wistar при раке молочной железы (Me, Lq-Hq)

Параметры	микроРНК-21	микроРНК-221	микроРНК-222	микроРНК-429
1. Интактные	<u>3,10</u> 0,02-5,25	<u>0,55</u> 0,45-3,16	<u>0,78</u> 0,53-1,87	<u>1,71</u> 0,06-36,27
2. РМЖ	<u>39,38*</u> 24,25-15,40	<u>0,47</u> 0,06-1,96	<u>1,43</u> 1,29-2,08	<u>1,02</u> 0,29-10,81
3. РМЖ-операция	<u>18,38*</u> 0,20-34,41	<u>1,50</u> 0,06-6,84	<u>0,42<sup>2</sup></u> 0,05-1,00	<u>11,08</u> 2,98-78,04
4. РМЖ-операция+ПХТ	<u>35,00<sup>1</sup></u> 1,27-182,42	<u>0,41</u> 0,25-0,59	<u>0,06<sup>1,2,3</sup></u> 0,01-0,21	<u>1,00</u> 0,04-52,95
5. РМЖ+ПХТ	<u>16,12<sup>1,2</sup></u> 9,89-21,90	<u>0,24</u> 0,17-0,64	<u>0,21<sup>1,2</sup></u> 0,10-0,29	<u>32,02<sup>2</sup></u> 20,16-46,31
6. РМЖ-операция+ПХТ+фрДНК	<u>19,55<sup>1,2</sup></u> 11,18-30,26	<u>0,41</u> 0,32-0,77	<u>0,39<sup>1,2</sup></u> 0,12-0,46	<u>49,29<sup>1,2,5</sup></u> 42,60-60,34

Примечание. \* – достоверность различий  $p < 0,05$ .

Таблица 2

Количество и функциональная активность клеток гемо- и лимфопоэза при экспериментальном раке молочной железы у крыс-самок Wistar с учетом вида лечения

Параметры	Группы особей					
	интактные (1)	РМЖ (2)	РМЖ – операция (3)	РМЖ – операция + ПХТ(4)	РМЖ + ПХТ (5)	РМЖ – операция + ПХТ + фрДНК (6)
1	2	3	4	5	6	7
абсолютные значения клеток ( $10^6/мл$ )						
МНК	<u>4,25</u> 3,87-6,12	<u>4,0</u> 3,5-5,1	<u>8,0</u> 2,0-10,0	<u>6,0</u> 4,05-8,0	<u>7,25</u> 4,75-10,75	<u>4,4</u> 4,0-7,5
Спленоциты	<u>287,5</u> 277-300	<u>262,5<sup>3,4,5,6</sup></u> 250,0-275,0	<u>675,0<sup>1</sup></u> 450,0-675,0	<u>119,0<sup>1,3</sup></u> 102,0-136,0	<u>350,0<sup>3,4</sup></u> 300,0-400,0	<u>350,0<sup>1,3,4</sup></u> 350,0-420,0
Клетки КМ	<u>207,5</u> 195,0-225,0	<u>68,75<sup>1,3,4,5</sup></u> 62,5-77,5	<u>160,0<sup>1,5</sup></u> 155,0-175,0	<u>153,0<sup>1,5</sup></u> 144,0-156,5	<u>87,5<sup>1</sup></u> 83,75-93,75	<u>135,0<sup>1,5</sup></u> 120,0-155,0
КМ-ММСК	<u>1,25</u> 1,1-1,3	<u>0,42<sup>3,4,5,6</sup></u> 0,40-0,45	<u>2,9<sup>1</sup></u> 2,8-3,0	<u>0,75<sup>1,3</sup></u> 0,722-0,77	<u>0,75<sup>1,3</sup></u> 0,722-0,77	<u>1,2<sup>1,3,4,5</sup></u> 1,05-1,2
Пролиферативный потенциал мононуклеаров периферической крови (в единицах оптической плотности)						
спонтанный	<u>0,192</u> 0,162-0,215	<u>0,304<sup>1,4</sup></u> 0,257-0,316	<u>0,226</u> 0,212-0,294	<u>0,354<sup>1,3</sup></u> 0,347-0,380	<u>0,215<sup>4</sup></u> 0,204-0,278	<u>0,267<sup>1</sup></u> 0,263-0,309
Конканавалин А	<u>0,240</u> 0,189-0,281	<u>0,235<sup>4</sup></u> 0,205-0,304	<u>0,301<sup>4</sup></u> 0,251-0,312	<u>0,413<sup>1</sup></u> 0,355-0,456	<u>0,300</u> 0,197-0,405	<u>0,257<sup>4</sup></u> 0,210-0,326
Пролиферативный потенциал ядросодержащих клеток костного мозга (в единицах оптической плотности)						
спонтанный	<u>0,359</u> 0,349-0,359	<u>0,369<sup>1,3,4,5,6</sup></u> 0,364-0,374	<u>0,456<sup>1</sup></u> 0,450-0,4604	<u>0,133<sup>1,3,5,6</sup></u> 0,131-0,136	<u>0,309<sup>1,3,6</sup></u> 0,304-0,314	<u>0,232<sup>1,3</sup></u> 0,230-0,232
Конканавалин А	<u>0,651</u> 0,646-0,656	<u>0,563<sup>1,3,4,5,6</sup></u> 0,558-0,568	<u>0,799<sup>1</sup></u> 0,790-0,810	<u>0,272<sup>1,3</sup></u> 0,267-0,285	<u>0,283<sup>1,3,4</sup></u> 0,274-0,293	<u>0,437<sup>1,3,4,5</sup></u> 0,430-0,437
Пролиферативный потенциал спленоцитов (в единицах оптической плотности)						
спонтанный	<u>0,083</u> 0,070-0,107	<u>0,790<sup>1,3,4,5,6</sup></u> 0,780-0,795	<u>0,400<sup>1,4,5</sup></u> 0,397-0,417	<u>0,252<sup>1,5,6</sup></u> 0,247-0,265	<u>0,363<sup>1,6</sup></u> 0,359-0,374	<u>0,170<sup>1,3</sup></u> 0,160-0,170
Конканавалин А	<u>0,063</u> 0,057-0,074	<u>0,651<sup>1,3,4,5,6</sup></u> 0,649-0,656	<u>0,420<sup>1,6</sup></u> 0,410-0,431	<u>0,179<sup>1,3</sup></u> 0,172-0,189	<u>0,160<sup>1,3</sup></u> 0,152-0,170	<u>0,148<sup>1,3</sup></u> 0,148-0,150

Окончание табл. 2

1	2	3	4	5	6	7
Уровни продукции цитокинов мононуклеарами периферической крови						
TNF- $\alpha$ спонтанный	505,0 498,1-513,3	529,8 507,8-573,3	522,2 505,0-532,6	498,4 473,6-508,0	497,1 477,5-515,0	488,6 488,6-513,2
TNF- $\alpha$ Конканавалин А	509,1 502,3-513,2	586,8 <sup>3,4</sup> 541,3-675,5	505,0 469,4-518,8	477,7 458,5-519,0	528,7 495,7-560,7	516,0 510,6-552,0
IL-1 $\beta$ спонтанный	229,6 200,1-255,7	257,2 <sup>3,4,6</sup> 250,0-261,0	228,4 213,6-241,4	232,2 203,8-245,3	216,4 206,4-261,4	210,0 208,2-219,2
IL-1 $\beta$ Конканавалин А	223,0 200,1-245,2	294,0 <sup>3,4,6</sup> 260,6-349,5	260,6 <sup>6</sup> 241,4-260,6	217,3 210,0-238,9	228,4 211,8-274,5	228,0 215,4-228,4
TGF $\beta$ спонтанный	5872,5 5820,0-6337,5	5745,0 5700,0-5850,0	6570,0 5700,0-10920,0	5760,0 5722,5-5910,0	6060,0 5775,0-6225,0	6120,0 5790,0-6240,0
TGF $\beta$ Конканавалин А	6045,0 5850,0-6360,0	5685,0	6240,0 <sup>5</sup> 5970,0-6300,0	6045,0 <sup>5</sup> 5940,0-6270,0	5835,0 5775,0-5910,0	6120,0 5910,0-6360,0
Уровни продукции цитокинов ядросодержащими клетками костного мозга						
TNF- $\alpha$ спонтанный	500,5 497,5-501,6	507,5 <sup>1,4,6</sup> 504,5-509,8	503,0 499,0-507,8	463,0 <sup>1,6</sup> 459,5-466,3	508,5 <sup>4,6</sup> 503,5-509,7	470,0 <sup>1</sup> 470,0-471,0
TNF- $\alpha$ Конканавалин А	532,7 529,0-537,7	531,5 <sup>6</sup> 529,5-535,5	540,0 528,0-540,2	515,0 <sup>1,3</sup> 507,0-521,0	514,0 <sup>1,3</sup> 510,0-518,0	469,0 <sup>1,3,4,5</sup> 468,0-470,0
IL-1 $\beta$ спонтанный	232,0 229,0-234,6	310,5 <sup>1,4,5,6</sup> 309,0-312,4	292,0 <sup>1</sup> 290,0-295,8	221,2 <sup>3</sup> 219,0-222,7	235,0 <sup>3,4</sup> 231,0-237,9	207,0 <sup>1,3,4,5</sup> 205,0-208,0
IL-1 $\beta$ Конканавалин А	217,5 212,5-220,5	318,5 <sup>1,3,4,5</sup> 315,5-321,4	222,0 <sup>4,5</sup> 218,0-228,4	250,5 <sup>1,3</sup> 249,5-251,5 <sup>6</sup>	254,0 <sup>1,3</sup> 249,5-259,3	214,0 <sup>3,4,5</sup> 210,0-214,0
Уровни продукции цитокинов ядросодержащими клетками костного мозга						
TGF $\beta$ спонтанный	6015,0 6005,0-6025,0	5645,0 <sup>1,6</sup> 5550,0-5695,0	6200,0 <sup>2,4,5,6</sup> 6190,0-6210,0	5705,0 <sup>1</sup> 5695,0-5720,0	5720,0 <sup>1</sup> 5695,0-5750,0	6080,0 <sup>1,4,5</sup> 6010,0-6090,0
TGF $\beta$ Конканавалин А	6285,0 6265,0-6295,0	5990,0 <sup>1,3,4</sup> 5940,0-6005,0	6120,0 <sup>1,6</sup> 6110,0-6120,0	6095,0 <sup>1</sup> 6045,0-6140,0	6020,0 6005,0-6195,0	6300,0 6290,0-6370,0
Уровни продукции цитокинов спленоцитами						
TNF- $\alpha$ спонтанный	506,0 502,5-508,5	779,4 <sup>1,3,4,5,6</sup> 773,0-782,4	660,0 <sup>1</sup> 658,0-661,2	475,0 <sup>1,3,5</sup> 469,0-480,2	521,0 <sup>1,3</sup> 519,0-522,0	480,0 <sup>1,3,5</sup> 478,0-481,0
TNF- $\alpha$ Конканавалин А	534,0 529,5-542,0	745,0 <sup>1,3,4,5,6</sup> 735,0-755,4	596,6 <sup>1</sup> 590,0-600,0	529,0 <sup>3</sup> 516,0-539,4	539,0 <sup>3</sup> 537,0-542,0	538,0 <sup>3</sup> 518,0-540,0
IL-1 $\beta$ спонтанный	241,7 239,0-243,7	280,0 <sup>1,3,4,5,6</sup> 279,0-282,0	260,0 <sup>1</sup> 258,0-264,4	243,5 <sup>3</sup> 241,5-244,6	260,5 <sup>1,4</sup> 259,5-261,7	218,0 <sup>1,3,4,5</sup> 215,0-220,0
IL-1 $\beta$ Конканавалин А	371,5 369,5-375,5	241,7 <sup>1,3,4,6</sup> 237,0-249,7	266,0 <sup>1</sup> 260,0-266,4	215,1 <sup>1,3</sup> 210,5-218,6	237,0 <sup>1,3,4</sup> 235,5-238,9	210,0 <sup>1,3,5</sup> 210,0-211,0
TGF $\beta$ спонтанный	5915,0 5905,0-5930,0	5925,5 <sup>3,4</sup> 5910,5-5935,0	6270,0 <sup>1</sup> 6100,0-6300,0	5730,0 <sup>1,3</sup> 5695,0-5770,0	5915,0 <sup>3,5</sup> 5905,0-5930,0	5990,0 <sup>3,4</sup> 5900,0-6000,0
TGF $\beta$ Конканавалин А	5250,0 6195,0-6345,0	6655,0 <sup>1,3,4,5,6</sup> 6610,0-6695,0	6290,0 6280,0-6300,0	5890,0 <sup>1,3</sup> 5835,0-5915,0	5595,0 <sup>1,3,4</sup> 5297,5-5605,0	5790,0 <sup>1,3,5</sup> 5780,0-5800,0

Однако в группе животных, подвергшихся оперативному вмешательству с проведением ПХТ, отмечено статистически значимое снижение количества спленоцитов в сравнении с остальными группами животных. Что касается количества клеток КМ, то выявлено статистически значимое снижение их количества во всех экспериментальных группах животных с РМЖ по сравнению с интактными животными. В тоже время, наиболее выраженное подавление количества клеток в КМ отмечено в группе животных, подвергшихся оперативному вмешательству и получавших ПХТ в комбинации с фрагментированной ДНК, в группе животных, получавших только ПХТ и в контрольной группе животных по РМЖ. По количеству КМ-ММСК в исследуемых группах также выявлены статистически значимые различия. Так, выявлен па-

радоксальный факт статистически значимого увеличения количества КМ-ММСК в группе животных с РМЖ, подвергшихся только оперативному вмешательству по сравнению с остальными группами животных. Не выявлено статистически значимого различия по количеству КМ-ММСК между интактными животными и группой, получавшей терапию фрагментированной ДНК. Количество КМ-ММСК в группах, подвергшихся ПХТ без оперативного вмешательства или же с оперативным вмешательством, а также в контрольной группе по РМЖ, было статистически значимо меньшим по сравнению с интактными животными и группой крыс, получавших терапию фрагментированной ДНК.

Таким образом, с учетом времени прошедшего после проведения различных схем лечения животных с РМЖ, показана различ-

ная регенеративная способность органов кроветворения и лимфопоэза.

В отношении пролиферативного потенциала МНК отмечено статистически значимое увеличение в группах особей получивших дополнительное лечение экзогенной ДНК и в группе контроля по РМЖ по сравнению с интактными особями (таблица 2). Интенсивность пролиферативного потенциала МНК в ответ на митогенный стимул была сопоставимой во всех группах, за исключением группы, подвергшейся оперативному вмешательству и дополненной ПХТ. Анализ пролиферативной активности клеток КМ в группах животных с РМЖ выявил статистически значимые различия, как в спонтанном, так и митоген-стимулированном тесте (таблица 2). Так, наивысшая спонтанная пролиферативная активность отмечена в группе крыс, подвергшихся только оперативному вмешательству и в группе опухоленосителей. В остальных экспериментальных группах спонтанный пролиферативный потенциал клеток КМ был статистически значимо ниже по сравнению с интактными животными. Аналогичная картина наблюдается и для пролиферативной активности клеток КМ при стимуляции митогеном. Клетки КМ крыс из группы, подвергшейся только удалению молочной железы, имели статистически значимо высокую пролиферацию в ответ на дополнительную стимуляцию их Конканавалином А. В тоже время, в остальных экспериментальных группах пролиферативный потенциал клеток КМ был статистически значимо меньшим по сравнению с аналогичным показателем для интактных животных. Как видно из таблицы 2, спонтанная пролиферативная активность спленоцитов животных из опытных групп была статистически значимо выше по сравнению с аналогичным параметром в интактной группе. Уровень спонтанной пролиферации в группе, получившей лечение экзогенной ДНК, был статистически значимо меньшим по сравнению с другими опытными группами, особенно с группой опухоленосителей. Аналогичная картина характерна и для пролиферативной активности спленоцитов, индуцированной митогенным стимулом.

Таким образом, анализ функциональной активности клеток гемо- и лимфопоэза по данным пролиферативного потенциала, как в спонтанном, так и митоген-стимулированном тесте выявил, что не во всех случаях терапия животных фрагментированной ДНК способствовала активации пролиферации клеток гемо- и лимфопоэза.

Нами не выявлено статистически значимых различий по уровню спонтанной про-

дукции TNF- $\alpha$  МНК в исследуемых группах животных (таблица 2). В тоже время, показано статистически значимое увеличение продукции TNF- $\alpha$  при стимуляции МНК митогеном в контрольной группе РМЖ по сравнению с группой животных, подвергшихся оперативному вмешательству и в группе, получившей дополнительно к оперативному вмешательству ПХТ ( $p < 0,05$ ). В тоже время, уровни спонтанной и митоген-стимулированной продукции TNF- $\alpha$  клетками КМ в группах животных, получивших только ПХТ или же комбинацию ПХТ с оперативным вмешательством по поводу РМЖ, были статистически значимо меньше, нежели в остальных группах животных ( $p < 0,05$ ). Что же касается уровней продукции TNF- $\alpha$  спленоцитами, то показано статистически значимое снижение уровней спонтанной продукции TNF- $\alpha$  спленоцитами в группе животных, получивших оперативное вмешательство с ПХТ, а также в группе с дополнительной терапией фрагментированной ДНК ( $p < 0,05$ ). По уровню митоген-стимулированной продукции TNF- $\alpha$  спленоцитами контрольная группа РМЖ отличалась статистически значимо большими уровнями продукции по сравнению с другими группами животных ( $p < 0,05$ ).

Как видно из табл. 2, по уровню спонтанной и митоген-стимулированной продукции МНК IL-1 $\beta$  в группе контроля РМЖ отмечено статистически значимое увеличение ее в сравнение с уровнями продукции в группе, подвергшейся оперативному вмешательству, а также в группах получивших ПХТ с экзогенной ДНК или без экзогенной ДНК ( $p < 0,05$ ). Кроме этого, отмечено статистически значимое увеличение уровней продукции IL-1 $\beta$  при стимуляции МНК митогеном в группе, подвергшейся оперативному вмешательству по сравнению с группой, получившей терапию фрагментированной ДНК ( $p < 0,05$ ). В группе животных, подвергшихся оперативному вмешательству с последующей ПХТ и лечением фрагментированной ДНК, отмечено статистически значимое уменьшение уровней продукции, как спонтанной, так и митоген-стимулированной, IL-1 $\beta$  по сравнению с другими группами животных ( $p < 0,05$ ). Что касается уровней продукции IL-1 $\beta$  клетками КМ, то показано, что уровни спонтанной и митоген-стимулированной продукции IL-1 $\beta$  в группах животных, получивших только ПХТ или же комбинацию ПХТ с оперативным вмешательством по поводу РМЖ, были статистически значимо меньше, нежели в остальных группах животных ( $p < 0,05$ ). Показано статистически значимые меньшие уровни продукции спленоцитами, как

спонтанной, так и митоген-стимулированной, IL-1 $\beta$  по сравнению с другими группами животных ( $p < 0,05$ ) в группе животных, подвергшихся оперативному вмешательству с последующей ПХТ и лечением фрагментированной ДНК.

Как видно из табл. 2, установлено статистически значимое снижение уровней продукции TGF- $\beta$ 1 МНК в группе, получившей только ПХТ по сравнению с группой, подвергшейся оперативному вмешательству с ПХТ, или без ПХТ ( $p < 0,05$ ). В отношении уровней спонтанной продукции TGF- $\beta$ 1 клетками КМ отмечено статистически значимое снижение уровней продукции в группах, получивших только ПХТ, ПХТ и оперативное вмешательство, а также в контрольной группе РМЖ по сравнению с остальными группами животных ( $p < 0,05$ ). По уровням продукции TGF- $\beta$ 1 клетками КМ контрольная группа животных по РМЖ и группа, получившая ПХТ после оперативного вмешательства, статистически значимо меньше продуцировали уровни TGF- $\beta$ 1 на митогенный стимул по сравнению с остальными группами животных ( $p < 0,05$ ). В отношении уровней продукции TGF- $\beta$ 1 спленоцитами установлено, что статистически значимо меньшие уровни спонтанной продукции характерны для группы животных, получившей ПХТ после оперативного вмешательства по сравнению с другими группами животных ( $p < 0,05$ ). В группах животных, получивших ПХТ, комбинацию оперативного лечения с ПХТ и с фрагментированной ДНК или без фрагментированной ДНК уровни продукции TGF- $\beta$ 1 спленоцитами в ответ на митогенный стимул были статистически значимо меньше, нежели в других группах животных ( $p < 0,05$ ).

Корреляционный анализ данных между уровнями микроРНК в лимфе и параметрами клеток гемо- и лимфопоэза при РМЖ с учетом вида лечения выявил наличие их взаимосвязи. Так, показана прямая и высокая взаимосвязь уровней микроРНК-21 с количеством спленоцитов в группе особей, получивших ПХТ ( $r=0,76$ ;  $p=0,027$ ). Уровни в лимфе микроРНК-221 взаимосвязаны с количеством лимфоцитов и спленоцитов в группе особей, получивших хирургическое лечение ( $r=0,95$ ;  $p=0,003$  и  $r=0,82$ ;  $p=0,041$  соответственно). Более того, уровни в лимфе микроРНК-221 находились в прямой и высокой степени сопряженности с пролиферативной активностью спленоцитов в группе крыс, получивших хирургическое лечение ( $r=0,95$ ;  $p=0,003$ ). Выявлена прямая и высокая взаимосвязь уровней микроРНК-221 лимфы в группе

крыс, получивших хирургическое лечение с уровнями: спонтанной продукции лимфоцитами и спленоцитами TNF- $\alpha$ ; с уровнями спонтанной и КонА стимулированной продукции клетками КМ TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$ ; с уровнями спонтанной продукции клетками КМ TGF- $\beta$ 1; с уровнями спонтанной продукции и митоген-стимулированной продукции IL-1 $\beta$ ; с уровнями митоген-стимулированной продукции спленоцитами TGF- $\beta$ 1 ( $r=0,95$ ;  $p=0,003$ ). В группе крыс контрольной по РМЖ установлена сопряженность между уровнями в лимфе микроРНК-221 с параметрами спонтанной продукции спленоцитами IL-1 $\beta$  ( $r=0,75$ ;  $p=0,049$ ). В отношении уровней в лимфе микроРНК-222 в группе крыс контрольной по РМЖ выявлена взаимосвязь ее с уровнями спонтанной продукции клетками КМ TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и TGF- $\beta$ 1, и с уровнями спонтанной продукции спленоцитами IL-1 $\beta$  ( $r=0,81$ ;  $p=0,028$ ). В группе крыс, получивших только ПХТ, установлена обратная и сильная сопряженность уровней микроРНК-222 с уровнями спонтанной и митоген-активированной продукции лимфоцитами IL-1 $\beta$  ( $r=-0,86$ ;  $p=0,012$  и  $r=-0,82$ ;  $p=0,01$  соответственно), и с уровнями спонтанной продукции TGF- $\beta$ 1 ( $r=-0,97$ ;  $p=0,0002$ ). Уровни микроРНК-222 в лимфе в группе крыс, получивших ПХТ, были взаимосвязаны с уровнями спонтанной продукции клетками КМ TNF- $\alpha$  и TGF- $\beta$ 1 ( $r=0,97$ ;  $p=0,0002$  и  $r=0,86$ ;  $p=0,012$  соответственно), и с уровнями спонтанной и митоген-стимулированной продукции IL-1 $\beta$  ( $r=0,86$ ;  $p=0,012$  и  $r=0,97$ ;  $p=0,0002$  соответственно). Также, у крыс, получивших ПХТ, уровни микроРНК-222 в лимфе были сопряжены: с уровнями спонтанной и митоген-стимулированной продукции спленоцитами TNF- $\alpha$  ( $r=0,75$ ;  $p=0,049$  и  $r=0,86$ ;  $p=0,012$  соответственно); с уровнями спонтанной продукции IL-1 $\beta$  ( $r=0,97$ ;  $p=0,0002$ ); с уровнями митоген-стимулированной продукции TGF- $\beta$ 1 ( $r=0,86$ ;  $p=0,012$ ). Что касается крыс, получивших курс ПХТ после хирургического вмешательства, то было установлено сопряженность уровней микроРНК-222 в лимфе с уровнями спонтанной и митоген-стимулированной продукции клетками КМ IL-1 $\beta$  ( $r=0,88$ ;  $p=0,019$ ), и с уровнями спонтанной продукции TGF- $\beta$ 1 ( $r=0,88$ ;  $p=0,019$ ). Также, для данной группы животных установлена взаимосвязь уровней микроРНК-222 с уровнями спонтанной продукции спленоцитами IL-1 $\beta$  и TGF- $\beta$ 1 ( $r=0,88$ ;  $p=0,019$ ).

Полученные нами данные по изменению уровней микроРНК при экспериментальной модели РМЖ не противоречат литературным данным. В частности, в работе [5] отмечено нарушение экспрессии микроРНК

клетками печени. При инициации РМЖ введением НМН в клетках опухоли молочной железы отмечена повышенная экспрессия микроРНК-21 [2]. Что же касается уровней микроРНК в лимфе, то нами не найдено исследований, посвященным изучению уровней микроРНК в лимфе, поэтому мы не можем судить о совпадении или же различий уровней микроРНК в лимфе при экспериментальной модели рака молочной железы у крыс.

#### **Заключение**

Уровни микроРНК в лимфе зависели от вида проведенного лечения и были сопряжены с количеством и функциональной активностью клеток гемо- и лимфопоэза, что может быть использовано для прогнозирования эффективности неoadъювантной полихимиотерапии при раке молочной железы.

#### **Список литературы**

1. Bandopadhyay M., Banerjee A., Sarkar N. et al. Tumor suppressor micro RNA miR-145 and onco micro RNAs miR-21 and miR-222 expressions are differentially modulated by

Hepatitis B virus X protein in malignant hepatocytes // *BMC Cancer*. – 2014. – Vol. 14. – P. 721-733.

2. Hui C., Yujie F., Lijia Y. et al. MicroRNA-34a and microRNA-21 play roles in the chemopreventive effects of 3,6-dihydroxyflavone on 1-methyl-1-nitrosourea-induced breast carcinogenesis // *Breast Cancer Research*. – 2012. – Vol. 14. – P. 80-91.

3. Jin L.H., Wei C. Role of microRNAs in the Warburg effect and mitochondrial metabolism in cancer // *Asian Pac. J. Cancer Prev*. – 2014. – Vol. 15. – P. 7015-7019.

4. Juhasz K., Gombos K., Gocze K. et al. Effect of N-methyl-N-nitrosourea on microRNA expression in CBA/CA mice // *J. Environ. Occup. Sci*. – 2012. – Vol. 1. – P. 77-82.

5. Li Z., Branham W.S., Dial S.L. et al. Genomic analysis of microRNA time-course expression in liver of mice treated with genotoxic carcinogen N-ethyl-N-nitrosourea // *BMC Genomics*. – 2010. – Vol. 11. – P. 609-622.

6. Raychaudhuri M., Schuster T., Buchner T. et al. Intratumoral heterogeneity of microRNA expression in breast cancer // *J. Mol. Diagn*. – 2012. – Vol. q4. – P. 376-384.

7. Shah M.Y., Calin G.A. MicroRNAs miR-221 and miR-222: a new level of regulation in aggressive breast cancer // *Genome Medicine*. – 2011. – Vol. 3. – P. 56-59.

8. Waters P.S., McDermott A.M., Wall D. et al. (2012) Relationship between Circulating and Tissue microRNAs in a Murine Model of Breast Cancer // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7: e50459. doi:10.1371/journal.pone.0050459.