

© Коллектив авторов, 2020

УДК 612.428:616-006.66:616-085:616-089:616-092.9

Казаков О.В.¹, Повещенко А.Ф.^{1,2}, Орлов Н.Б.¹, Райтер Т.В.¹, Повещенко О.В.¹,
Кабаков А.В.¹, Стрункин Д.Н.¹, Лыков А.П.¹, Коненков В.И.¹

Взаимосвязь содержания цитокинов лимфы и структурных преобразований в брыжеечных лимфатических узлах при химиотерапии, оперативном лечении и химиотерапии экспериментального рака молочной железы

¹НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН»,
630060, г. Новосибирск, Россия, ул. Тимакова, д. 2;²ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный педагогический университет»,
630126, г. Новосибирск, Россия, ул. Виллюйская, д. 28

Цель исследования – анализ корреляции морфометрии брыжеечных лимфатических узлов и концентрации цитокинов в лимфе грудного протока при химиотерапии рака молочной железы, хирургическом лечении и последующей химиотерапии. **Методика.** Рак молочной железы индуцировали введением N-метил-N-нитрозомочевины 5 раз с интервалом 7 сут подкожно в область 2-й молочной железы справа. Курс химиотерапии проходил по схеме CMF. Корреляцию между концентрациями 24 цитокинов лимфы и числом клеток структурных зон лимфатических узлов оценивали по коэффициенту ранговой корреляции Спирмена. **Результаты.** После химиотерапии РМЖ, по сравнению с РМЖ без лечения, морфологические преобразования в лимфатических узлах свидетельствуют о снижении активности местного иммунного ответа. Исследование корреляции концентрации цитокинов в лимфе со структурными изменениями в лимфатических узлах выявило зависимости направленные на повышение иммуномодулирующего и противоопухолевого действия цитокинов. После оперативного лечения РМЖ и последующей химиотерапии, по сравнению только с химиотерапией РМЖ, выявлены положительные связи иммунобластов с цитокином GRO/KC в герминативных центрах, цитокина IL-6 – с митотически делящимися клетками в герминативных центрах и мозговых тяжах, IL-5 – с иммунобластами в мозговых тяжах, хемокина MIP-1a – со зрелыми плазматическими клетками в мозговых синусах. Увеличено количество иммунобластов, средних и малых лимфоцитов в герминативных центрах, возросло количество малых лимфоцитов, незрелых и зрелых плазматических клеток в мозговых синусах. Увеличены площади мозговых тяжей и паракортикальной зоны. Выявлена корреляция: цитокина IL-1α с малыми лимфоцитами, IL-6 с иммунобластами, IL-7 и IL-18 – со средними лимфоцитами, GRO/KC – с иммунобластами, IL-17 – с макрофагами в T-зависимой зоне; IL-7 и IL-18 – с иммунобластами, IL-12 – с макрофагами, MIP-1a и MCP-1 со зрелыми плазматическими клетками в мозговых синусах. **Заключение.** После оперативного лечения РМЖ с последующей химиотерапией, по сравнению только с химиотерапией РМЖ, выявлены взаимозависимости концентрации цитокинов в лимфе грудного протока с морфологическими изменениями в брыжеечных лимфатических узлах, которые могут указывать на повышение активности местного звена иммунного ответа.

Ключевые слова: лимфатические узлы; цитокины лимфы; рак молочной железы; химиотерапия; оперативное лечение; крысы.

Для цитирования: Казаков О.В., Повещенко А.Ф., Орлов Н.Б., Райтер Т.В., Повещенко О.В., Кабаков А.В., Стрункин Д.Н., Лыков А.П., Коненков В.И. Взаимосвязь содержания цитокинов лимфы и структурных преобразований в брыжеечных лимфатических узлах при химиотерапии, оперативном лечении и химиотерапии экспериментального рака молочной железы. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(2): 37-45.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.37-45

Для корреспонденции: Казаков Олег Васильевич, e-mail: kazakoff_oleg@mail.ru**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Казаков О.В., Повещенко А.Ф.;

сбор и обработка материала – Казаков О.В., Кабаков А.В., Орлов Н.Б., Райтер Т.В., Повещенко О.В.; статистическая обработка – Лыков А.П., Стрункин Д.Н.; написание текста – Казаков О.В., Повещенко А.Ф.; редактирование – Коненков В.И.

Поступила 25.11.2019

Принята к печати 20.04.2020

Опубликовано 28.05.2020

Kazakov O.V.¹, Poveshchenko A.F.^{1,2}, Orlov N.B.¹, Reiter T.V.¹, Poveshchenko O.V.¹, Kabakov A.V.¹, Strunkin D.N.¹, Lykov A.P.¹, Konenkov V.I.¹

Relationship between lymph concentration of cytokines and structural transformations in mesenteric lymph nodes in chemotherapy, surgical treatment, and chemotherapy of experimental breast cancer

¹Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Timakova Str. 2, Novosibirsk 630060, Russia;

²Novosibirsk State Pedagogical University, Vilyuiskaya Str. 28, Novosibirsk 630126, Russia

The aim of this study was to analyze correlations of the morphometry of mesenteric lymph nodes with cytokine concentrations in thoracic duct lymph in chemotherapy and surgical treatment with subsequent chemotherapy of breast cancer. **Methods.** Breast cancer was induced by subcutaneous injection of N-methyl-N-nitrosourea 5 times with 7-day intervals, into the region of the 2nd breast on the right. The course of chemotherapy was performed according to the CMF scheme. Correlations between concentrations of 24 cytokines of the lymph and cells of lymph node structural regions were estimated by the Spearman rank correlation coefficient. **Results.** After chemotherapy for breast cancer compared to untreated breast cancer, morphological transformations in lymph nodes indicated decreased activity of the local immune response. Analysis of correlations between lymph concentrations of cytokines and structural changes in lymph nodes identified relationships aimed at increasing the immunomodulatory and antitumor effects of cytokines. After surgical treatment of breast cancer and subsequent chemotherapy compared to chemotherapy alone, positive correlations were found for immunoblasts with cytokine GRO/KC in germinative centers, for cytokine IL-6 with mitotically dividing cells in germinative centers and medullary cords, for IL-5 with immunoblasts in medullary cords, and for chemokine MIP-1a with mature plasma cells in medullary sinuses. Numbers of immunoblasts and medium and small lymphocytes were increased in germinative centers whereas numbers of small lymphocytes and immature and mature plasma cells were increased in medullary sinuses. Areas of medullary cords and the paracortical zone were increased. Correlations were found for cytokine IL-1 α with small lymphocytes, for IL-6 with immunoblasts, for IL-7 and IL-18 with medium lymphocytes, for GRO/KC with immunoblasts, for IL-17 with macrophages in the T-dependent zone, for IL-7 and IL-18 with immunoblasts, for IL-12 with macrophages, and for MIP-1a and MCP-1 with mature plasma cells in medullary sinuses. **Conclusion.** After surgical treatment of breast cancer and subsequent chemotherapy compared to chemotherapy alone, cytokine concentrations in lymph of the thoracic duct were observed to correlate with morphological changes in mesenteric lymph nodes, which may indicate increased activity of the local immune response.

Keywords: lymph nodes; lymph cytokines; breast cancer; chemotherapy; surgical treatment; rats.

For citation: Kazakov O.V., Poveshchenko A.F., Orlov N.B., Reiter T.V., Poveshchenko O.V., Kabakov A.V., Strunkin D.N., Lykov A.P., Konenkov V.I. Relationship between lymph concentration of cytokines and structural transformations in mesenteric lymph nodes in chemotherapy, surgical treatment, and chemotherapy of experimental breast cancer. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(2): 37-45. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.37-45

For correspondence: Oleg V. Kazakov, Candidate of Biological Sciences, leading researcher, «Scientific institution of clinical and experimental lymphology – branch of federal state budgetary scientific institution “Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics Siberian Division of the Russian Academy of Sciences”, 2 Timakova str., Novosibirsk 630060, Russian Federation, e-mail: kazakoff_oleg@mail.ru

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Contribution: the concept and design of the study — Kazakov O.V., Poveshchenko A.F.; collection and processing of material — Kazakov O.V., Kabakov A.V., Orlov N.B., Reiter T.V., Poveshchenko O.V.; statistical processing — Lykov A.P., Strunkin D.N.; writing a text — Kazakov O.V., Poveshchenko A.F.; editing — Konenkov V.I.

Information about the authors:

Kazakov O.V., <http://orcid.org/0000-0003-3947-4038>

Poveshchenko A.F., <http://orcid.org/0000-0002-4433-7110>

Orlov N.B., <http://orcid.org/0000-0002-3437-7151>

Reiter T.V., <http://orcid.org/0000-0003-0883-9516>

Poveshchenko O.V., <http://orcid.org/0000-0001-9956-0056>

Kabakov A.V., <http://orcid.org/0000-0002-4741-6674>

Strunkin D.N., <http://orcid.org/0000-0003-4357-7443>

Lykov A.P., <http://orcid.org/0000-0003-4897-8676>

Konenkov V.I., <http://orcid.org/0000-0001-7385-6270>

Received 25.11.2019

Accepted 20.04.2020

Published 28.05.2020

Рак молочной железы (РМЖ) является самой широко диагностируемой онкопатологией у женщин в большинстве стран мира [8]. Одним из патогенетических механизмов возникновения и прогрессии опухолевого роста являются белки, главным образом активированных клеток иммунной системы, обеспечивающие межклеточные взаимодействия — цитокины. Они секретируются как лимфоидными, так и опухолевыми клетками, оказывая влияние на множество различных клеток-мишеней, играя свою роль в патогенезе опухолевого роста и метастазировании, которое происходит, преимущественно, лимфогенно [4, 11]. При метастазировании основным, а зачастую, единственным методом лечения рака является химиотерапия (ХТ), которая усугубляет имеющийся дисбаланс в иммунной системе, оказывая повреждающее действие на лимфоидную ткань, что является одной из центральных проблем терапии опухолей. Изучение взаимосвязи содержания цитокинов в лимфе грудного протока со структурными изменениями в брыжеечных лимфатических узлах при химически индуцированном РМЖ, после химиотерапии, а также оперативного лечения РМЖ с последующей химиотерапии позволит оценить состояние местного иммунного ответа при данных способах лечения.

Цель исследования — изучение взаимосвязи разных функциональных групп цитокинов лимфы грудного лимфатического протока с морфологическими показателями структурно-функциональных зон брыжеечных лимфатических узлов крыс при экспериментальном раке молочной железы, а также после оперативного лечения рака молочной железы и химиотерапии.

Методика

Работа выполнена на 80 половозрелых самках крыс Вистар. Возраст крыс на начало эксперимента 3 мес, масса 250–300 г. Все эксперименты выполнены в соответствии с «Правилами работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными приказом Минздрава № 577 от 12.08.77 г., с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского сообщества (86/609/ЕС). Было сформировано четыре группы животных: 1-я — интактные животные, 2-я — РМЖ без лечения, 3-я — РМЖ+химиотерапия (ХТ), 4-я — резекция РМЖ + ХТ. В каждой группе было по 20 животных. РМЖ индуцировали 5-кратным введением N-метил-N-нитрозомочевины (МНМ; «Sigma») с интервалом в 7 сут (подкожно в область 2-й молочной железы справа) [1]. Через 6 мес с момента индукции РМЖ проводили курс ХТ в виде внутрибрюшинного введения 15 мг/кг 5-фторурацила и 2,5 мг/кг метотрексата («Еbewe») на 1-е и 8-е сут

и 3 мг/кг циклофосфана («Биохимия») внутрибрюшинно ежедневно однократно в течение 14 сут. Из эксперимента крыс выводили через 6,5 мес с момента индукции РМЖ под наркозом (40 мг/кг нембутала внутрибрюшинно; «Sigma»). На основании результатов гистологического и иммуногистохимического исследования через 6 мес верифицирован аналог люминального В-типа РМЖ человека [1]. Гистологическое исследование брыжеечных лимфатических узлов проводили по стандартной методике. При микроскопии определяли общую площадь среза лимфатических узлов, площадь лимфоидных узелков с герминативными и без герминативных центров, коркового плато и паракортикальной зон, мозговых тяжей и мозговых синусов, краевого синуса, капсулы и трабекул. Лимфу брали из цистерны грудного лимфатического протока, куда оттекает лимфа от краиниальных брыжеечных лимфатических узлов. Концентрации цитокинов в лимфе оценивали методом проточной флюориметрии на 2-лучевом лазерном автоматизированном анализаторе Bio-Plex Assay System (Bio-Rad) с использованием коммерческой тест-системы в соответствии с инструкцией фирмы-производителя Bio-Plex Pro Rat Cytokone 24-Plex Assay (Bio-Rad) [3].

Результаты исследования статистически обрабатывали в программе Statistica 6.0 (StatSoft, Inc.). Данные представлены как среднее значение и среднеквадратическое отклонение ($M \pm s$); медиана (Me), нижний и верхний квартили (Q1; Q3). При статистической обработке значения цитокинов, выходящие за нижнюю границу чувствительности метода (< 2 пкг/мл), принимали за 1 пкг/мл. Статистическую значимость различий рассчитывали по U критерию Манна—Уитни. Различия между группами считали значимыми при $p < 0,05$. Сопряженность между исследуемыми параметрами (цитокинами и клетками структурных зон брыжеечных лимфатических узлов) оценивали по коэффициенту ранговой корреляции Спирмена (r).

Результаты

Исследование взаимосвязи концентрации цитокинов лимфы с морфологическими изменениями брыжеечных лимфатических узлов при химически индуцированном РМЖ выявило ряд зависимостей, которые могут быть обусловлены местным иммунным ответом в лимфатических узлах направленным на противоопухолевую защиту [2]. Морфометрические параметры брыжеечных лимфатических узлов при экспериментальном РМЖ и различных вариантов терапии представлены в **табл. 1, 2**.

Как видно из табл. 1 площади герминативных центров лимфоидных узелков и мозговых тяжей увеличе-

ны. Выявлена корреляция (табл. 3) между количеством митотически делящихся клеток в герминативных центрах и мозговых тяжах с иммунорегуляторным цитокином IL-5, который стимулирует пролиферацию и дифференцировку активированных В-клеток [16]. Выявлена корреляция средних лимфоцитов в герминативных центрах и мозговых тяжах с хемокином MIP-1 α , иммунобластов герминативных центров с цитокином GRO/KC (табл. 3), увеличено количество макрофагов в В- и Т-зависимых зонах (табл. 2) при увеличении площади синусной системы и общей площади срезов лимфатических узлов (табл. 1).

В паракортикальной зоне выявлена корреляция макрофагов с хемокином MCP-1 и IL-6 с ретикулярными клетками (табл. 3). Оба цитокина продуцируются мезенхимными стволовыми клетками, способствуя миграции и метастазированию клеток РМЖ, что может служить одним из факторов роста и прогрессирования опухоли [6, 7, 14].

Об этом может свидетельствовать корреляция ретикулярных клеток с цитокином M-CSF, который оказывает влияние на фагоцитарную активность, что также может быть связано с ростом первичной опухоли и метастазами в лимфатические узлы. Уменьшение количества малых лимфоцитов и зрелых плазматических клеток в мозговых синусах и их прямая взаимосвязь с хемокином GRO/KC, определяющим хемотаксис иммунокомпетентных клеток, может быть обусловлена миграцией этих клеток из лимфатического узла.

После ХТ РМЖ выявлена положительная связь концентрации цитокина IFN γ с макрофагами и малыми лимфоцитами в герминативных центрах лимфоидных узелков (площадь герминативных центров уменьшена, пролиферативная активность клеток в ней снижена),

и митотически делящимися клетками в мозговых тяжах (площадь мозговых тяжей уменьшена). Эта зависимость может быть связана с действием IFN γ , который обладает иммуномодулирующим и противоопухолевым действием, усиливая цитотоксические реакции, опосредованные Т-лимфоцитами. О влиянии на иммунную систему может указывать корреляция иммунобластов с хемокином MIP-1 α в герминативных центрах и увеличение количества малых лимфоцитов на 28% в Т-зависимой зоне лимфатических узлов. Об этом также может свидетельствовать корреляция цитокина IL-17 с количеством зрелых плазматических клеток (количество увеличено на 34%) в мозговых тяжах. Основное действие IL-17 заключается в активации нейтрофилов и макрофагов в месте воспаления, а также в усилении активности большинства цитокинов, особенно провоспалительных [5]. К провоспалительным цитокинам относится и цитокин IL-12, имеющий положительную связь с нейтрофилами в мозговых тяжах и являющийся ключевым цитокином для усиления клеточно-опосредованного иммунного ответа. В мозговых синусах выявлена положительная связь зрелых плазматических клеток с цитокином IL-18, который непосредственно вовлечен в патогенез РМЖ, являясь одним из основных иммунорегуляторных цитокинов, принимающим участие в местном ответе организма на процессы опухолеобразования [13]. По биологическим эффектам IL-18 является функциональным дублером и синергистом IL-12 [15], способствуя преимущественной дифференцировке Т-хелперов 0 в Т-хелперы 1. Кроме того, IL-18 приводит к образованию GM-CSF и тем самым усиливает лейкопоэз.

После оперативного лечения РМЖ и последующей ХТ, по сравнению только с ХТ РМЖ, выявлены взаи-

Таблица 1

Изменение площади брыжеечных лимфатических узлов, лимфоидных узелков с герминативными центрами, мозговых тяжей, мозговых и краевого синусов, паракортикальной зоны при химически индуцированном РМЖ, химиотерапии (ХТ), операции РМЖ и ХТ (ОХТ), Me (LQ-HQ)

Параметр	Контроль (1)	РМЖ (2)	ХТ (3)	ОХТ (4)
Общая площадь БЛУ	215.5 (200-248)	284 (249-308) ¹	117 (111-134) ^{1,2}	212 (198-228) ^{2,3}
Площадь лимфоидных узелков с герминативными центрами	6 (4-7)	9 (9-11) ¹	2 (2-3) ^{1,2}	3 (2-3) ²
Площадь мозговых тяжей	71,5 (69-86)	95 (90-102) ¹	45 (43-50) ^{1,2}	71 (69-77) ^{2,3}
Площадь мозговых синусов	56 (54-60)	92 (80-93) ¹	38 (37-40) ^{1,2}	73 (69-78) ^{1,3}
Площадь краевого синуса	2 (2-2)	3 (3-4) ¹	1 (0-2) ²	1 (1-2) ²
Площадь паракортикальной зоны	65 (58-73)	62 (48-72)	24 (22-29) ^{1,2}	55 (51-58) ³

Примечание. Цифры 1, 2, 3 — статистически значимые отличия от величин соответствующих экспериментальных групп, $p < 0,05$.

Клеточный состав структурно-функциональных зон брыжеечных лимфатических узлов крыс Вистар в контроле, при химически индуцированном РМЖ, химиотерапии (ХТ), операции и ХТ (ОХТ), Ме (LQ-HQ)

Клетки	Интактные животные (1)	РМЖ (2)	ХТ (3)	ОХТ (4)
Герминативные центры вторичных лимфоидных узлов				
ИМ	8,4 (7,2-9,0)	9,4 (9,4-9,8) ¹	3,2 (3,0-3,4) ^{1,2}	10,4 (10,4-12,0) ^{1,2,3}
СЛ	16,0 (15,6-16,6)	15,0 (14,0-15,2)	9,2 (8,8-9,2) ^{1,2}	14,6 (14,4-14,6) ^{1,3}
МЛ	40,4 (37,4-40,6)	26,4 (26,4-26,6) ¹	31,0 (31,4-32,8) ^{1,2}	35,6 (35,4-35,6) ^{1,2,3}
МФ	3,4 (3,0-3,6)	5,2 (4,8-5,4) ¹	1,6 (1,6-1,8) ^{1,2}	4,0 (4,0-4,4) ^{1,2,3}
РК	5,0 (4,8-6,0)	4,2 (4,2-4,6)	4,6 (4,2-4,8)	6,6 (6,6-7,0) ^{1,2,3}
Митозы	1,6 (1,4-1,6)	2,6 (2,2-2,6) ¹	0,0 (0,0-0,4) ^{1,2}	3,4 (2,8-3,4) ^{1,2,3}
Паракортикальная зона				
ИМ	1,2 (0,8-1,2)	0,6 (0,4-0,6) ¹	0,2 (0,2-0,4)	0,2 (0,0-0,2)
СЛ	4,6 (4,6-5,2)	4,0 (4,0-4,4) ¹	3,8 (3,8-4,8)	6,2 (6,0-6,4) ^{1,2,3}
МЛ	77,6 (75,6-82,0)	64,8 (63,6-67,8) ¹	83,0 (82,2-83,0) ^{1,2}	56,2 (56,0-58,6) ^{1,2,3}
МФ	2,8 (2,8-3,0)	4,8 (4,8-5,8) ¹	1,0 (1,0-1,2) ^{1,2}	1,8 (1,6-2,0) ^{1,2,3}
РК	3,6 (3,4-4,0)	4,4 (4,0-4,6)	3,8 (3,4-3,8) ²	7,2 (7,2-8,6) ^{1,2,3}
ТК	0,2 (0-0,2)	0,2 (0-0,2)	0,2 (0,2-0,4)	0,2 (0,2-0,2)
Мозговые тучки				
СЛ	5,2 (5,0-7,2)	7,0 (6,8-7,8)	8,8 (6,0-8,8)	7,0 (6,8-7,2)
МЛ	17,4 (17,4-17,8)	11,8 (11,4-12,2) ¹	14,8 (14,6-15,2) ^{1,2}	12,6 (12,6-12,8) ^{1,2,3}
ИМ	1,4 (1,4-1,6)	1,2 (1,2-1,6)	1,4 (1,2-1,4)	1,6 (1,4-2,2)
НПл	4,8 (4,8-5,2)	5,0 (5,0-7,0)	12,4 (11,2-13,8) ^{1,2}	10,8 (10,6-10,8) ^{1,2,3}
ЗПл	21,4 (20,6-24,0)	16,0 (15,2-17,6) ¹	21,4 (20,6-21,6) ²	19,0 (18,8-19,0) ^{1,2}
МФ	2,8 (2,4-2,8)	6,0 (6,0-6,2) ¹	3,8 (3,6-4,0) ^{1,2}	3,6 (3,6-3,6) ^{1,2}
РК	3,2 (2,8-3,4)	6,0 (5,8-6,2) ¹	7,4 (7,2-8,0) ^{1,2}	6,6 (6,6-6,8) ^{1,2,3}
Митозы	0,2 (0,2-0,4)	0,6 (0,4-0,8)	0,2 (0,2-0,4)	0,2 (0,2-0,6)
НФ	0,2 (0,2-0,2)	0,2 (0,2-0,2)	0,2 (0,2-0,2)	0,6 (0,6-0,6)
Мозговые синусы				
СЛ	4,0 (3,8-4,6)	3,4 (3,0-4,0)	3,0 (3,0-3,8)	10,0 (10,0-10,4) ^{1,2,3}
МЛ	18,0 (16,8-18,8)	11,4 (10,4-11,8) ¹	10,2 (9,8-10,2) ^{1,2}	16,0 (15,8-16,2) ^{2,3}
ИМ	0,8 (0,8-0,8)	1,0 (1,0-1,2) ¹	0,4 (0,2-0,4) ^{1,2}	0,2 (0,2-0,4) ^{1,2}
НПл	4,8 (4,4-5,0)	3,6 (3,0-3,8) ¹	4,2 (3,8-4,4)	6,6 (6,6-6,8) ^{1,2,3}
ЗПл	14,2 (13,0-14,4)	9,2 (9,2-9,6) ¹	14,0 (13,0-14,4) ²	21,8 (21,2-22,0) ^{1,2,3}
МФ	2,2 (2,0-2,4)	4,4 (4,4-5,4) ¹	2,4 (2,4-2,6) ²	4,0 (3,6-4,6) ^{1,3}
РК	5,8 (4,8-6,0)	6,6 (6,0-6,6)	6,2 (5,2-6,2)	6,6 (6,4-6,8) ¹
ТК	0,2 (0,2-0,2)	0,2 (0,0-0,2)	0,0 (0,0-0,4)	0,2 (0,2-0,2)
НФ	0,0 (0,0-0,4)	0,2 (0,0-0,2)	0,2 (0,2-0,4)	0,4 (0,4-0,6) ²

Примечание. ИМ — иммунобласты, СЛ — средние лимфоциты, МЛ — малые лимфоциты, НПл — незрелые плазмциты, ЗПл — зрелые плазмциты, РК — ретикулярные клетки, МФ — макрофаги, ТК — тучные клетки, НФ — нейтрофилы. 1, 2, 3 — обозначено статистически значимое отличие от величин соответствующих экспериментальных групп. $p < 0,05$.

Таблица 3

Положительные связи клеток структурно-функциональных зон брыжеечных лимфатических узлов с цитокинами в лимфе крыс Вистар при химически индуцированном РМЖ, после химиотерапии РМЖ (ХТ) и после операции и химиотерапии (ОХТ) (r)

Группы	Клетки	Цитокины											
		IL-1a	IL-5	IL-6	IL-7	IL-12	IL-17	IL-18	GRO/KC	IFN γ	M-CSF	MIP-1a	MCP-1
Герминативные центры вторичных лимфоидных узелков													
РМЖ	ИМ	-	-	-	-	-	-	-	0.949	-	-	-	-
	СЛ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.90	-
	РК	-	-	-	-	0.949	-	-	-	-	-	-	-
	Мит	-	0,975	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ХТ	ИМ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.975	-
	МЛ	-	-	-	-	-	-	-	-	0.90	-	-	-
	МФ	-	-	-	-	-	-	-	-	0.975	-	-	-
ОХТ	ИМ	-	-	-	-	-	-	-	0.979	-	-	-	-
	Мит	-	-	0.889	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Паракортикальная зона													
РМЖ	МФ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.949
	ТК	-	0.949	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	РК	-	-	0.90	-	-	-	-	-	-	0.90	-	-
ОХТ	ИМ	-	-	0.892	-	-	-	-	0.949	-	-	-	-
	СЛ	-	-	-	0.90	-	-	0.90	-	-	-	-	-
	МЛ	0.90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	МФ	-	-	-	-	-	0.975	-	-	-	-	-	-
	ТК	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.894	-	-
Мозговые тяжи													
РМЖ	СЛ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.90	-
	Мит	-	0.90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ХТ	ИМ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.975	-	-
	ЗПл	-	-	-	-	-	0.975	-	-	-	-	-	-
	Мит	-	-	-	-	-	-	-	-	0.975	-	-	-
	НФ	-	-	-	-	0.895	-	-	-	-	-	-	-
ОХТ	ИМ	-	0.90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	СЛ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.90	-	-
	Мит	-	-	0.973	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	РК	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.975
Мозговые синусы													
РМЖ	МЛ	-	-	-	-	-	-	-	0.90	-	-	-	-
	ИМ	-	-	-	-	-	-	-	-	0.894	-	-	-
	ЗПл	-	-	-	-	-	-	-	0.975	-	-	-	-
ХТ	ЗПл	-	-	-	-	-	-	0.90	-	-	-	-	-
	МФ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ОХТ	ИМ	-	-	-	0.894	-	-	0.894	-	-	-	-	-
	ЗПл	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.90	0.90	-
	МФ	-	-	-	-	0.90	-	-	-	-	-	-	-
	РК	-	-	-	-	0.90	-	-	-	-	-	-	-

Примечание. Приведен коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r). Сокращения: ИМ – иммунобласты, СЛ – средние лимфоциты, МЛ – малые лимфоциты, ЗПл – зрелые плазмциты, Мит – митозы, РК – ретикулярные клетки, МФ – макрофаги, ТК – тучные клетки. $p < 0,05$.

мозависимости концентрации цитокинов в лимфе грудного протока с морфологическими изменениями в брыжеечных лимфатических узлах, которые могут указывать на повышение активности местного звена иммунного ответа. Об этом могут свидетельствовать выявленные положительные связи иммунобластов в герминативных центрах лимфоидных узелков с цитокином GRO/КС, цитокина IL-6 – с количеством митотически делящихся клеток в герминативных центрах и мозговых телях, IL-5 – с иммунобластами в мозговых телях, хемокина MIP-1a – с количеством зрелых плазматических клеток в мозговых синусах.

Обсуждение

Выявленные коррелятивные взаимосвязи могут указывать на усиление пролиферативной активности В-клеток, регуляции процессов созревания антителопродуцирующих клеток и продукции иммуноглобулинов [12, 17]. Эти зависимости выявлены на фоне повышения пролиферативной активности клеток в герминативных центрах, увеличения площади мозговых телях, увеличения количества малых лимфоцитов, а также незрелых и зрелых плазматических клеток в мозговых синусах (табл. 1, 2). После оперативного лечения РМЖ и ХТ нами также были выявлены признаки повышения активности Т-звена иммунного ответа. Отмечаемая в паракортикальной зоне положительная связь малых лимфоцитов с цитокином IL-1 α может быть вызвана преимущественной активацией данным цитокином Т-лимфоцитов. Взаимосвязи цитокина IL-6 с иммунобластами, а IL-7 и IL-18 – со средними лимфоцитами в паракортикальной зоне и иммунобластами в мозговых синусах, могут быть обусловлены стимуляцией пролиферации незрелых и дифференцированных активированных Т-клеток. По данным литературы цитокин IL-6 демонстрирует более сильную синергию с IL-7, чтобы стимулировать наивные CD8 (+) Т-клетки [9]. Отмечаемая положительная связь средних лимфоцитов (количество которых в паракортикальной зоне увеличено) с цитокином IL-18, а также увеличение самой площади паракортикальной зоны может свидетельствовать о повышении активности Т-звена иммунного ответа. При этом в паракортикальной зоне выявлены связи GRO/КС – с иммунобластами, M-CSF – с тучными клетками, а также отмечаются признаки макрофагальной реакции: возросло количество макрофагов, выявлена положительная связь IL-17 с макрофагами. Об активации макрофагальной реакции и влиянии на иммунные клеточные реакции может свидетельствовать положительная взаимосвязь IL-12 с макрофагами [10] в мозговых сину-

сах, а также увеличение количества макрофагов в герминативных центрах и мозговых синусах.

Заключение

После оперативного лечения РМЖ и последующей ХТ, по сравнению только с ХТ РМЖ, выявлены взаимосвязи концентрации цитокинов в лимфе грудного протока с морфологическими изменениями в брыжеечных лимфатических узлах, которые могут указывать на повышение активности местного звена иммунного ответа.

Литература

1. Кабаков А.В., Лыков А.П., Морозов Д.В., Казаков О.В., Повешенко А.Ф., Райтер Т.В., Струнkin Д.Н., Коненков В.И. Фенотипическая характеристика химически индуцированной опухоли молочной железы. *Бюл. exper. биол. и мед.* 2017; 163(4): 490-3.
2. Казаков О.В., Райтер Т.В., Повешенко А.Ф., Орлов Н.Б., Повешенко О.В., Кабаков А.В. и др. Корреляционный анализ морфологических изменений структурно-функциональных зон брыжеечных лимфатических узлов с цитокинами лимфы грудного лимфатического протока при экспериментальном раке молочной железы. *Бюл. exper. биол. и мед.* 2019; 168(10): 501-5.
3. Повешенко А.Ф., Казаков О.В., Орлов Н.Б., Повешенко О.В., Ким И.И., Бондаренко Н.А., и др. Цитокины лимфы как маркеры онкогенеза и эффективности терапии при экспериментальной опухоли молочной железы крыс Wistar. *Пат. физиол. и exper. тер.* 2016; 60(3): 68-75.
4. Соснина А.В., Великая Н.В., Аутеншлюс А.И. *Роль цитокинов в патогенезе злокачественных новообразований.* Новосибирск: Вектор-Бест, 2013.
5. Шипилов М.В., Иванов В.В. Th17-ответ организма при острых респираторных вирусных инфекциях различного генеза. *Цитокины и воспаление.* 2012; 11(1): 109-13.
6. De Luca A., Gallo M., Aldinucci D., Ribatti D., Lamura L., D'Alessio A., et al. Role of the EGFR ligand/receptor system in the secretion of angiogenic factors in mesenchymal stem cells. *J. Cell Physiol* 2011; 226(8): 2131-38.
7. De Luca A, Lamura L, Gallo M, Maffia V., Normanno N. Mesenchymal stem cell-derived interleukin-6 and vascular endothelial growth factor promote breast cancer cell migration. *J Cell Biochem.* 2012; 113(11): 3363-70.
8. Dhesy-Thind S., Fletcher G.G., Blanchette P.S., Clemons M.J., Dillmon M.S., Frank E.S., et al. Use of Adjuvant Bisphosphonates and Other Bone-Modifying Agents in Breast Cancer: A Cancer Care Ontario and American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clinical Oncology.* 2017; 35(18): 2062-81.
9. Gagnon J., Ramanathan S., Leblanc C., Cloutier A., McDonald P.P., Ilangumaran S. IL-6, in synergy with IL-7 or IL-15, stimulates TCR-independent proliferation and functional differentiation of CD8+ T lymphocytes. *J Immunol.* 2008; 180(12): 7958-68.
10. Grohmann U., Belladonna M.L., Vacca C., Bianchi R., Fallarino F., Orabona C., et al. Positive Regulatory Role of IL-12 in Macrophages and Modulation by IFN- γ . *J Immunol.* 2001; 167(1): 221-7.
11. Harrel M.I., Iritani B.M., Ruddell A. Tumor-induced sentinel lymph node lymphangiogenesis and increased lymph flow precede melanoma metastasis. *Am. J. Pathol.* 2007; 170(2): 774-86.

12. Kita M., Ohmoto Y., Hirai Y., Yamaguchi N., Imanishi J. Induction of cytokines in human peripheral blood mononuclear cells by mycoplasmas. *Microbiol. Immunol.* 1992; 36: 507–16.
13. Merendino R.A., Gangemi S, Ruello A, Bene A, Losi E, Lonbardo G, Purello-Dambrosio G. Serum levels of interleukin-18 and sICAM-1 in patients affected by breast cancer: preliminary considerations. *Int J Biol Markers.* 2001; 16(2): 126–9.
14. Molloy A. P., Martin F. T., Dwyer R. M., Griffin T. P., Murphy M., Barry F. P., et al. Mesenchymal stem cell secretion of chemokines during differentiation into osteoblasts, and their potential role in mediating interactions with breast cancer cells. *Int J Cancer.* 2009; 124(2): 326–32.
15. Sugama S., Conti B. Interleukin-18 and stress. *Brain research reviews.* 2008; 58(1): 85–95.
16. Takatsu K. Interleukin 5 and B cell differentiation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998; 9: 25–35.
17. Yokota T., Arai N., J. De Vries, Spits H., Banchemreau J., Zlotnik A., et al. Molecular biology of interleukin 4 and interleukin 5 genes and biology of their products that stimulate B cells, T cells, and hemopoietic cells. *Immunol Rev.* 1988; 102: 137–87.
6. De Luca A., Gallo M., Aldinucci D., Ribatti D., Lamura L., D'Alesio A., et al. Role of the EGFR ligand/receptor system in the secretion of angiogenic factors in mesenchymal stem cells. *J. Cell Physiol* 2011; 226(8): 2131–38.
7. De Luca A, Lamura L, Gallo M, Maffia V, Normanno N. Mesenchymal stem cell-derived interleukin-6 and vascular endothelial growth factor promote breast cancer cell migration. *J Cell Biochem.* 2012; 113(11): 3363–70.
8. Dhesy-Thind S., Fletcher G.G., Blanchette P.S., Clemons M.J., Dillmon M.S., Frank E.S., et al. Use of Adjuvant Bisphosphonates and Other Bone-Modifying Agents in Breast Cancer: A Cancer Care Ontario and American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clinical Oncology.* 2017; 35(18): 2062–81.
9. Gagnon J., Ramanathan S., Leblanc C., Cloutier A., McDonald P.P., Ilangumaran S. IL-6, in synergy with IL-7 or IL-15, stimulates TCR-independent proliferation and functional differentiation of CD8+ T lymphocytes. *J Immunol.* 2008; 180(12): 7958–68.
10. Grohmann U., Belladonna M.L., Vacca C., Bianchi R., Fallarino F., Orabona C., et al. Positive Regulatory Role of IL-12 in Macrophages and Modulation by IFN- γ . *J Immunol.* 2001; 167(1): 221–7.
11. Harrel M.I., Iritani B.M., Ruddell A. Tumor-induced sentinel lymph node lymphangiogenesis and increased lymph flow precede melanoma metastasis. *Am. J. Pathol.* 2007; 170(2): 774–86.

References

1. Kabakov A.V., Lykov A.P., Morozov D.V., Kazakov O.V., Poveshchenko A.F., Rajter T.V., Strunkin D.N., Kononov V.I. Phenotypic characteristic of a chemically induced breast tumor. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 2017; 163(4): 490–93. (In Russian)
2. Kazakov O.V., Rajter T.V., Poveshchenko A.F., Orlov N.B., Poveshchenko O.V., Kabakov A.V., et al. Correlation analysis of morphological changes of structural and functional zones of mesenteric lymph nodes with cytokines of the lymph of the thoracic lymphatic duct in experimental breast cancer. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 2019; 168(10): 501–5. (In Russian)
3. Poveshchenko A.F., Kazakov O.V., Orlov N.B., Poveshchenko O.V., Kim I.I., Bondarenko N.A., et al. Cytokines of lymph as markers of cancer progression and effectiveness of therapy in experimental breast tumors of rats Wistar. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2016; 60(3): 68–75. (in Russian).
4. Sosnina A.V., Velikaya N.V., Autenshlyus A.I. *The role of cytokines in the pathogenesis of malignant neoplasms. [Rol' tsitokinov v patogeneze zlokachestvennykh novoobrazovaniy].* Novosibirsk: Vektor-Best, 2013. (in Russian)
5. Shipilov M.V., Ivanov V.V. Th17 response of an organism in acute respiratory viral infections of various origins. *Tsitokiny i vospalenie.* 2012; 11(1): 109–13. (in Russian).

Сведения об авторах:

Казakov Олег Васильевич, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. физиологии протективной системы «НИИ клинической и экспериментальной лимфологии» – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», e-mail: kazakoff_oleg@mail.ru;

Повещенко Александр Федорович, доктор мед. наук, руководитель лаб. физиологии протективной системы «НИИ клинической и экспериментальной лимфологии» – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», e-mail: poveshchenkoa200@mail.ru;

Орлов Николай Борисович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. клинической иммуногенетики, «НИИ клинической и экспериментальной лимфологии» – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», e-mail: nbo@ngs.ru;

Райтер Татьяна Владимировна, мл. науч. сотр. лаб. физиологии протективной системы «НИИ клинической и экспериментальной лимфологии» – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», e-mail: reitert@mail.ru;

Повещенко Ольга Владимировна, доктор мед. наук, руководитель лаб. клеточных технологий «НИИ клинической и экспериментальной лимфологии» – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», e-mail: PoveschenkoOV@yandex.ru

Кабакон Алексей Васильевич, мл. науч. сотр. лаб. физиологии протективной системы «НИИ клинической и экспериментальной лимфологии» – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», e-mail: kabakov_av85@mail.ru

Стрункин Дмитрий Николаевич, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. физиологии протективной системы «НИИ клинической и экспериментальной лимфологии» – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», e-mail: Strunkind@mail.ru;

Лыков Александр Петрович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. клеточных технологий «НИИ клинической и экспериментальной лимфологии» – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», e-mail: aplykov2@mail.ru;

Коненков Владимир Иосифович, доктор мед. наук, акад. РАН, науч. руководитель филиала «НИИ клинической и экспериментальной лимфологии» – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», e-mail: vikonenkov@gmail.com