DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.14-20

© Коллектив авторов, 2023
УДК 612.438:616-006.66:616-085:616-089:616-092.9

Казаков О.В., Кабаков А.В., Повещенко А.Ф.

Взаимосвязь проонкогенных микроРНК (-21, -221, -222) и опухоль-супрессирующей микроРНК-429 лимфы со структурой тимуса при химиотерапии и оперативном лечении рака молочной железы

НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиал
ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН»
630060, Новосибирск, ул. Тимакова, д. 2

Введение. Изучение взаимосвязи уровня микроРНК в лимфе с функциональной активностью тимуса может иметь важное значение для понимания участия микроРНК в регуляции иммунного ответа. **Цель исследования** – выявление взаимосвязи структур тимуса с уровнями микроРНК (-21, -221, -222, -429) лимфы грудного протока крыс-самок Вистар при оперативном лечении рака молочной железы (РМЖ) и оперативном лечении РМЖ с последующей химиотерапией (по схеме ЦМФ).
Методика. РМЖ моделировли 5-кратным с интервалом 7 сут подкожным введением N-метил-N-нитрозомочевины (Sigma). Прижизненный забор лимфы у животных осуществлялся (под наркозом) из цистерны грудного лимфатического протока. Тотальную РНК выделяли из лимфы с использованием набора реагентов «Вектор-Бест» по инструкции производителя. Для получения кДНК проводили обратную транскрипцию (ОТ) по матрице микроРНК. Для определения уровней проонкогенных микроРНК-21, микроРНК-221, микроРНК-222 и опухоль-супрессирующей микроРНК-429 в биологических образцах проводили ОТ-ПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad Lab), в качестве гена сравнения использовали малую РНК U6 («Вектор-Бест»). В разных структурных зонах тимуса подсчитывали абсолютное количество клеток на стандартной площади 2025 мкм^2. Взаимосвязь структуры тимуса с уровнями микроРНК (-21, -221, -222, -429) оценивали по коэффициенту ранговой корреляции Спирмена.
Результаты. После оперативного лечения РМЖ уровни проонкогенных микроРНК (-21, -222) в лимфе уменьшаются, а опухоль-супрессирующей микроРНК-42РМЖ9 увеличивается по сравнению с РМЖ без лечения. Выявлена взаимосвязь микроРНК-221 с иммунобластами коркового вещества тимуса, где увеличено количество средних и малых лимфоцитов по сравнению с РМЖ без лечения. Установлена взаимосвязь микроРНК-21 со средними лимфоцитами кортико-медуллярной зоны. Во всех исследуемых зонах уменьшено количество клеток с пикнотичными ядрами и увеличено число макрофагов и эпителиоретикулярных клеток. После резекции РМЖ с ХТ уровни микроРНК-221 и микроРНК-429 снижены по сравнению с оперативным лечением РМЖ. Выявлены корреляции: в субкапсулярной зоне коркового вещества – малых лимфоцитов с микроРНК(-221, -429) и митотически делящихся клеток с микроРНК-429; в центральной части коркового вещества – малых лимфоцитов с микроРНК(-221, -429); клеток с пикнотичными ядрами с микроРНК-222; средних лимфоцитов с микроРНК-429; в кортико-медуллярной зоне – средних лимфоцитов с микроРНК(-21, -221); в центральной части мозгового вещества – малых лимфоцитов с микроРНК(-21, -429).
Заключение. После оперативного лечения РМЖ и химиотерапии, по сравнению только с резекцией РМЖ, выявленные взаимосвязи клеток структурных компонентов тимуса с проонкогенными и опухоль-супрессирующей микроРНК в корковом и мозговом веществе тимуса могут быть обусловлены повышенной пролиферативной активностью, миграцией Т-лимфоцитов из тимуса, усилением цитотоксических механизмов иммунного ответа, увеличением количества гибнущих клеток.

Ключевые слова: лимфа; вилочковая железа; рак молочной железы; микроРНК; оперативное лечение; терапевтические мероприятия

Для цитирования: Казаков О.В., Кабаков А.В., Повещенко А.Ф. Взаимосвязь проонкогенных микроРНК (-21, -221, -222) и опухоль-супрессирующей микроРНК-429 лимфы со структурой тимуса при химиотерапии и оперативном лечении рака молочной железы. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2023; 67(3): 14–20.
DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.14-20

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Казаков О.В., Повещенко А.Ф.; сбор и обработка материала – Казаков О.В., Кабаков А.В.; статистическая обработка материала – Казаков О.В., Кабаков А.В.; написание текста – Казаков О.В., Повещенко А.Ф.; редактирование – Повещенко А.Ф. Утверждение окончательного варианта статьи – все соавторы.
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.
Поступила 03.04.2023
Принята к печати 12.07.2023
Опубликована 20.09.2023

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.14-20

Kazakov O.V., Kabakov A.V., Poveshchenko A.F.

Relationship of pro-oncogenic microRNAs (-21, -221, -222) and tumor-suppressive microRNA-429 lymph with the thymus structure during chemotherapy and surgical treatment of breast cancer

Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division of the Russian Academy of Sciences,
Timakova St. 2, Novosibirsk, 630060, Russian Federation

Aim. To study the relationship between the thymus structure and concentrations of microRNAs (miRNAs-21, -221, -222, -429) in the lymph of female Wistar rats during surgical treatment of breast cancer and subsequent CMF (cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil) chemotherapy for chemically induced breast cancer (intramammary administration of N-methyl-N-nitrosourea).
Methods. BC was modeled by 5 subcutaneous injections of N-methyl-N-nitrosourea (Sigma) at 7-day intervals. Lymph samples were withdrawn from the cisterna chyli of the thoracic lymphatic duct of anesthetized animals. Total RNA was isolated from the lymph using a Vector-Best reagent kit according to the manufacturer's instructions. cDNA was obtained by microRNA reverse transcription (RT). Levels of the pro-oncogenic microRNA-21, microRNA-221, microRNA-222, and the tumor-suppressing microRNA-429 were measured in biological samples by real-time RT-PCR on a CFX96 amplifier (Bio-Rad Lab) with U6 small RNA (Vector-Best) as a reference gene. The absolute number of cells was counted in structural zones of the thymus on a standard area of 2025 μm^2. The relationship between the thymus structure and microRNA (-21, -221, -222, -429) levels was assessed using the Spearman rank correlation coefficient.
Results. After the surgical treatment of breast cancer, concentrations of pro-oncogenic miRNAs (-21, -222) in the lymph were decreased and the concentration of tumor-suppressing miRNA-429 was increased compared to untreated breast cancer. A relationship of miRNA-221 with immunoblasts was observed in the thymic cortical substance, where the numbers of medium and small lymphocytes were increased compared to breast cancer without the treatment. A relationship was found between miRNA-21 and medium lymphocytes in the corticomedullary zone. In all the studied areas, the number of cells with pycnotic nuclei was reduced whereas the numbers of macrophages and epithelioreticular cells were increased. After resection of breast cancer and chemotherapy, the concentrations of miRNA-221 and miRNA-429 were reduced compared to the surgical treatment alone. In the cortical subcapsular region of the thymus, the number of small lymphocytes correlated with miRNA-221 and -429 and the number of mitotically dividing cells correlated with miRNA-429; in the central part of cortical substance, the number of small lymphocytes correlated with miRNAs -221 and -429, the number of cells with pycnotic nuclei correlated with miRNA-222, and the number of medium lymphocytes correlated with miRNA-429; in the cortico-medullary region, the number of medium lymphocytes correlated with miRNAs-21 and -221; and in the central medulla, the number of small lymphocytes correlated with miRNAs-21 and -429.
Conclusion. After the surgical treatment of breast cancer and chemotherapy *vs*. the tumor resection alone, along with the morphological differences, the relationships observed between cells of thymic structures and pro-oncogenic and tumor-suppressing miRNAs in the cortical substance and medullary substance of the thymus may be due to increased proliferative activity, migration of T-lymphocytes from the thymus, increased cytotoxic mechanisms of the immune response, and increased number of dying cells.

Keywords: lymph; thymus gland; breast cancer; microRNA; surgical treatment; therapeutic measures

For citation: Kazakov O.V., Kabakov A.V., Poveshchenko A.F. Relationship of pro-oncogenic miRNAs (-21, -221, -222) and tumor-suppressive miRNAs-429 lymph with the thymus structure during chemotherapy and surgical treatment of breast cancer. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental`naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(3): 14–20. (in Russian).
DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.14-20

Author's contribution: concept and design of the study – Kazakov O.V., Poveshchenko A.F.; collection and processing of material – Kazakov O.V., Kabakov A.V.; statistical processing – Kazakov O.V., Kabakov A.V.; writing the text – Kazakov O.V., Poveshchenko A.F.; editing the text – Poveshchenko A.F. Approval of the final version of the article – all authors.
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 Ciences", 2 Timakova str., Novosibirsk, 630060, Russian Federation, e-mail: kazakoff_oleg@mail.ru

Information about the authors:
Kazakov O.V., https://orcid.org/0000-0003-3947-4038
Kabakov A.V., https://orcid.org/0000-0002-4741-6674
Poveshchenko A.F., https://orcid.org/0000-0002-4433-7110
Financing. The study had no sponsorship.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 03.04.2023
Accepted 12.07.2023
Published 20.09.2023

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.14-20

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) является одним из наиболее распространенных злокачественных новообразований среди женщин во всем мире [1]. МикроРНК контролируют широкий спектр онтогенетических и физиологических путей, включая клеточную пролиферацию, дифференцировку и апоптоз, участвуют в развитии и прогрессировании опухолей, влияя на онкогенные или опухоль-супрессирующие механизмы [2]. МикроРНК играют важную роль в повышении чувствительности опухолевых клеток к воздействию химиотерапевтических препаратов [3]. Изучение взаимосвязей уровней микроРНК в лимфе с функциональной активностью тимуса, как центрального органа иммунной системы при РМЖ, оперативном лечении РМЖ и химиотерапии (ХТ) может иметь значение для понимания участия микроРНК в регуляции иммунного ответа, воздействии на процессы созревания, пролиферации, дифференцировки и активации клеток иммунной системы.

Цель исследования – сравнение уровней микроРНК (-21, -221, -222, -429) в лимфе с преобразованиями в тимусе при РМЖ, оперативном лечении РМЖ, оперативном лечении РМЖ и последующей ХТ.

Методика

Работа выполнена на половозрелых самках крыс Вистар (n=80) с соблюдением принципов надлежащей лабораторной практики и Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета ЕС по охране животных, используемых в научных целях. Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом Саратовского ГМУ им. В.И. Разумовского (протокол №12 от 30.06.2022 года). Возраст крыс на начало эксперимента – 3 мес (масса 250–300 г). Было сформировано 4 группы животных: 1-я – контрольная (интактные крысы), 2-я – РМЖ без лечения, 3-я – резекция РМЖ, 4-я – резекция РМЖ + химиотерапия (ХТ). РМЖ моделировали 5-кратным подкожным введением N-метил-N-нитрозомочевины (Sigma) с интервалом 7 сут в область 2-й молочной железы справа. На основании результатов гистологического и иммуногистохимического исследования верифицировали аналог люминального В-типа РМЖ человека. Оперативное лечение РМЖ проводили через 6 мес от момента начала индукции РМЖ, операция под наркозом (нембутал, «Sigma», 40 мг/кг внутрибрюшинно). Курс ХТ проводили через 6 мес после индукции РМЖ, что включало в себя внутрибрюшинное введение 15 мг/кг 5-фторурацила и 2.5 мг/кг метотрексата («Ebewe») на 1-е и 8-е сут и 3 мг/кг циклофосфана («Биохимия») внутрибрюшинно ежедневно один раз в течение 14 сут. Прижизненный забор лимфы у животных осуществлялся (под наркозом) из цистерны грудного лимфатического протока. Тотальную РНК выделяли из лимфы с использованием набора реагентов «Вектор-Бест» по инструкции производителя. Для получения кДНК проводили обратную транскрипцию (ОТ) по матрице микроРНК. Для определения уровней проонкогенных микроРНК-21, микроРНК-221, микроРНК-222 и опухоль-супрессирующей микроРНК-429 в биологических образцах проводили ОТ-ПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad Lab), в качестве гена сравнения использовали малую РНК U6 («Вектор-Бест»). Всех животных из эксперимента выводили в возрасте 9.5 мес под наркозом – нембутал (Sigma), 40 мг/кг внутрибрюшинно. Гистологические препараты тимуса изучали в окулярной тестовой системе при увеличении х32, х400 и х1000. В разных структурных компонентах тимуса подсчитывали абсолютное количество клеток на стандартной площади 2025 мкм^2.

Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе Statistica 6.0 (StatSoft, Inc.), меры центральной тенденции и рассеяния описаны медианой (Me), нижним (Q1) и верхним (Q3) квартилем; значимость различий рассчитывали по U критерию Манна–Уитни при значениях p<0.05. Сопряженность между уровнями микроРНК(-21, -221, -222, -429) с клетками структурных зон тимуса оценивали по коэффициенту ранговой корреляции Спирмена.

Результаты

После оперативного лечения РМЖ, по сравнению с РМЖ без лечения в лимфе снижаются уровни проонкогенных микроРНК-21 на 54%, микроРНК-222 на 71%, а опухоль-супрессирующей микроРНК-429 увеличивается в 18 раз **(табл. 1)**. В корковом и мозговом веществе тимуса уменьшается количество иммунобластов, клеток с пикнотичными ядрами и увеличивается количество макрофагов и эпителиоретикулярных клеток В центральной части коркового вещества увеличивается количество средних (на 58,5%) и малых (на 24%) лимфоцитов **(табл. 2)**. Выявлены взаимосвязи: в центральной части коркового вещества иммунобластов с микроРНК-221, в кортико-медуллярной зоне – средних лимфоцитов с микроРНК-21 **(табл. 3)**.

После резекции опухоли с последующим курсом химиотерапии по сравнению с оперативным лечением РМЖ выявлено уменьшение уровня микроРНК-221

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.14-20

в лимфе на 75%, а микроРНК-429 – на 93% **(табл. 1)**. В корковом и мозговом веществе тимуса увеличивается количество иммунобластов и митотически делящихся клеток. В корковом веществе возросло количество эпителиоретикулярных клеток. В центральной части коркового вещества увеличено количество клеток с пикнотичными ядрами **(табл. 2)**. Выявлены взаимосвязи: в субкапсулярной зоне – малых лимфоцитов с микроРНК-221 и микроРНК-429; митотически делящихся клеток – с микроРНК-429; в центральной части коркового вещества – малых лимфоцитов с микроРНК-221 и микроРНК-429; средних лимфоцитов – с микроРНК-429; клеток с пикнотичными ядрами – с микроРНК-222 **(табл. 3)**; в центральной части мозгового вещества – малых лимфоцитов с микроРНК-21 и микроРНК-429.

Обсуждение

Взаимосвязь микроРНК-221 с иммунобластами коркового вещества **(табл. 3)** может быть связана с повышенной пролиферативной активностью в корковом веществе тимуса. По данным литературы микроРНК-221 связываясь с p53-зависимым модулятором апоптоза (PUMA) блокирует индуцированный белком p53 апоптоз, влияя на трансформацию клетки и усиление клеточной пролиферации [4]. Онкогенный эффект микроРНК-21 связан с воздействием на опухолевые супрессоры такие как PTEN, PDCD4 и FBXO11 [5]. МикроРНК-21 влияет на процессы пролиферации и миграции раковых клеток путем ингибирования гена *Smad7,* который, в свою очередь, ингибирует активацию сигнальных путей NF-ϰB и TGF-β, ослабляет фиброз, апоптоз, воспаление и дифференцировку Т-лимфоцитов [6, 7], на что может указывать взаимосвязь средних лимфоцитов кортико-медуллярной зоны с микроРНК-21 лимфы. Сохраняющийся повышенный уровень микроРНК-21 в лимфе может быть взаимосвязан с поглощением макрофагами (количество которых увеличено во всех зонах тимуса) апоптотических клеток [8], на что указывает уменьшение количества клеток с пикнотичными ядрами в корковом и мозговом веществе тимуса.

После оперативного лечения РМЖ и ХТ уменьшение уровня микроРНК-221 в лимфе как по сравнению с оперативным лечением РМЖ, так и с интактной группой, может влиять на механизм регулятора клеточного цикла p27 (Kip 1), который действует как супрессор опухоли, и является основным регулятором прогрессии G1 – фазы клеточного цикла и перехода G1→S. Он принимает участие в контроле продвижения G2 и завершения М-фазы/цитокинеза [9, 10]. При этом уровень микроРНК-429 в лимфе уменьшается по сравнению с резекцией РМЖ. МикроРНК-429 является важной опухоль-супрессирующей микроРНК входящей в состав семейства miR-200 [11]. По данным литературы после химиотерапи (на примере мышей с делецией) специфичной для В-клеток показано, что ICOSL в В-клетках повышает противоопухолевый иммунитет за счет увеличения соотношения эффекторных и регуляторных Т-клеток [12]. После химиотерапии тройного негативного рака молочной железы в биопсии отмечалось повышение уровня $CD8^+$ Т-клеток [13].

Таблица 1/Table 1

Уровни микроРНК в лимфе у крыс-самок Вистар при химически индуцированном раке молочной железы (РМЖ) после оперативного лечения и химиотерапии (ХТ) (Me (Q1-Q3); усл. ед.)

MicroRNA levels in lymph in female Wistar rats with chemically induced breast cancer (BC), after surgical treatment and chemotherapy (CT). (Me (Q1-Q3); conventional units)

Показатели Indicators	Интактная группа Intact group (1)	РМЖ Breast cancer (2)	*Резекция РМЖ* Resection of breast cancer (3)	*Резекция РМЖ* + ХТ Resection of breast cancer chemotherapy (4)
МикроРНК-21 miRNA-21	5.16 (3.16–5.25)	38.40 (24.25–85.4)[1]	17.97 (5.45–23.8) [1.2]	24.50 (12.7–35.0)[1]
МикроРНК-221 miRNA-221	0.47 (0.25–0.55)	0.88 (0.59–1.69)[1]	1.5 (0.6–5.38)[1]	0.37 (0.24–0.57)[2.3]
МикроРНК-222 miRNA-222	0.78 (0.53–1.87)	1.43 (1.29–2.08)	0.42 (0.08–0.81)[2]	0.20 (0.05–0.28)[1.2]
МикроРНК-429 miRNA-429	1.71 (1.03–36.27)	0.60 (0.50–1.02)[1]	11.08 (4.33–48.27)[1.2]	0.78 (0.31–4.31)[3]

Примечание. Цифрами 1, 2 и 3 обозначены статистически значимые отличия ($p<0.05$) от величин соответствующих экспериментальных групп.
Note. Numbers 1, 2 and 3 indicate statistically significant differences ($p<0.05$) from the values of the corresponding experimental groups.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.14-20

Таблица 2/Table 2

Клеточный состав структурных компонентов тимуса в интактной группе, при химически индуцированном раке молочной железы (РМЖ), оперативном лечении РМЖ, оперативном лечении РМЖ с последующей химиотерапией (ХТ). (Me (Q1-Q3); усл. ед.)

Cellular composition of the structural components of the thymus intact group, with chemically induced breast cancer (BC), surgical treatment (ST) of breast cancer, surgical treatment (ST) of BC followed by chemotherapy (CT). (Me (Q1-Q3); conventional units)

Клетки / Cells	*Интактная группа / Intact* group*(1)*	*РМЖ / BC (2)*	*Резекция РМЖ /* ST BC *(3)*	*Резекция РМЖ +ХТ ST+CT (4)*
Субкапсулярная зона коркового вещества Subcapsular zone of the cortical substance				
ИМ IM	11.0(9.0–12.0)	17.5(15.0–23.25)[1]	12.0(12.0–13.25)[2]	18.0(17.0–19.0)[1.3]
СЛ ML	25.0(20.75–27.0)	36.5(35.5–45.75)[1]	44.0(41.5–47.0)[1]	40.0(34.0–41.0)[1.2]
МЛ SL	162.5(135.3–190.8)	115.0(110.0–130.0)[1]	132.5(126.5–141.3)	122.0(120.0–130.3)[1]
Мит Mit	2.0(1.75–3.0)	5.5(5.0–6.0)[1]	5.0(4.0–5.25)[1]	5.0(4.75–5.0)[1]
КПЯ CNP	1.0(1.0–2.0)	4.0(3.0–5.0)[1]	1.0(1.0–2.0)[2]	2.5(2.0–3.0)[1.3]
МФ MF	2.0(1.0–2.0)	2.0(1.75–2.0)	5.0(4.0–5.0)[1.2]	4.0(3.75–4.0)[1.2.3]
ЭРК EC	5.0(4.0–6.0)	2.0(2.0–4.0)[1]	7.0(6.0–8.0)[1.2]	10.0(8.0–12.0)[1.2.3]
Центральная часть коркового вещества Central part of the cortical substance				
ИМ IM	8.0(6.0–8.0)	9.5(8.0–14.0)[1]	7.0(6.75–8.0)[2]	15.0(13.0–15.25)[1.3]
СЛ ML	24.0(19.0–25.75)	32.5(24.5–42.5)	51.5(50.25–52.0)[1.2]	43.0(40.25–50.75)[1]
МЛ SL	215.0(176.0–226.5)	133.0(126.0–145.0)[1]	164.5(148.0–172.8)[2]	142.0(127.3–150.0)[1]
Мит Mit	2.0(1.0–2.25)	3.0(2.0–4.0)	2.0(2.0–3.0)	5.0(4.0–5.0)[1.2.3]
КПЯ CNP	1.0(1.0–3.0)	4.0(3.0–4.0)[1]	1.0(0.0–1.0)[2]	2.0(1.0–3.0)[2.3]
МФ MF	1.0(1.0–2.0)	1.0(1.0–2.0)	4.0(4.0–4.0)[1.2]	4.0(3.0–5.0)[1.2]
ЭРК EC	7.0(6.0–7.25)	3.0(2.0–4.0)[1]	8.5(7.0–9.0)[2]	10.0(9.75–12.0)[1.2.3]
Кортико-медуллярная зона Cortico-medullary zone				
ИМ IM	7.0(5.0–9.0)	10.0(7.0–11.0)	9.0(7.0–10.0)	14.0(13.0–15.0)[1.2.3]
СЛ ML	18.0(18.0–22.75)	32.0(31.75–41.0)[1]	35.0(35.0–38.0)[1]	35.0(30.0–38.0)[1]
МЛ SL	189.5(171.0–193.8)	106.5(96.5–137.8)[1]	125.0(114.3–126.0)[1]	115.5(112.0–119.0)[1]
Мит Mit	2.0(2.0–3.0)	3.0(2.0–4.25)	3.0(3.0–4.0)[1]	4.0(4.0–5.25)[1.3]
КПЯ CNP	2.0(2.0–2.25)	2.5(2.0–3.0)	1.0(0.75–2.0)[1.2]	2.0(1.75–3.0)
МФ MF	2.0(1.0–2.0)	2.0(2.0–3.0)	5.0(4.0–5.0)[1.2]	5.0(4.0–5.0)[1.2]
ЭРК EC	9.0(9.0–10.0)	7.0(5.75–9.0)	10.0(9.0–12.0)[2]	14.5(13.0–16.0)[1.2.3]
Центральная часть мозгового вещества Central part of the medulla substance				
ИМ IM	4.0(4.0–5.0)	2.0(1.0–4.25)	0.0(0.0–0.0)[1.2]	3.0(2.0–3.0)[1.3]
СЛ ML	17.5(17.0–20.0)	24.0(22.0–29.25)[1]	17.0(15.75–21.25)[2]	24.0(21.5–24.0)[1.3]
МЛ SL	98.0(84.8–114.0)	76.0(72.5–84.5)[1]	72.0(67.25–81.0)[1]	59.0(52.0–62.25)[1.2.3]
Мит Mit	1.0(0.75–1.0)	1.0(1.0–2.0)	0.0(0.0–0.0)[1.2]	1.0(0.0–1.0)[3]
КПЯ CNP	1.0(1.0–1.0)	2.0(1.0–3.0)	0.0(0.0–1.0)[1.2]	1.0(0.0–1.0)[2]
МФ MF	1.0(1.0–2.0)	3.0(3.0–3.0)[1]	5.5(5.0–6.25)[1.2]	4.0(3.0–5.0)[1.2.3]
ЭРК EC	10.0(10.0–11.0)	10.0(9.0–12.0)	17.0(16.0–18.0)[1.2]	18.0(17.0–19.0)[1.2]

Примечание. ИМ – иммунобласты, СЛ – средние лимфоциты, МЛ – малые лимфоциты, Мит – митозы, КПЯ – клетки с пикнотичными ядрами, МФ – макрофаги, ЭРК – эпителиоретикулярные клетки. Цифрами 1, 2 и 3 – обозначены статистически значимые отличия (p<0.05) от величин соответствующих экспериментальных групп.

Note. IM – immunoblasts, ML – medium lymphocytes, SL – small lymphocytes, Mit – Mitoses, CNP – cells with nuclear pycnosis, MF – macrophages, EC – epithelioreticular cells. Numbers 1, 2 and 3 indicate statistically significant differences (p<0.05) from the values of the corresponding experimental groups.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.14-20

Взаимосвязи малых лимфоцитов в субкапсулярной и центральной части коркового вещества – с проонкогенной микроРНК-221 и с опухоль-супрессирующей микроРНК-429, а также микроРНК-429 – с митотически делящимися клетками субкапсулярной части коркового вещества, могут быть связаны с повышенной пролиферативной активностью Т-клеток в корковом веществе тимуса. Увеличение количества эпителиоретикулярных клеток в корковом веществе может быть связано как делимфатизацией морфофункциональных зон тимической паренхимы, так и со способностью эпителиоретикулоцитов участвовать в процессах как позитивной, так и негативной селекции [14]. На это указывает взаимосвязь средних, и, особенно, малых лимфоцитов коркового вещества тимуса с микроРНК-429 и малых лимфоцитов – с микроРНК-221. При отрицательном отборе развивающиеся Т-клетки, несущие рецепторы к собственным антигенам (аутореактивные клетки), подвергаются апоптозу, на что может указывать увеличение количества клеток с пикнотичными ядрами в корковом веществе тимуса, а также сохраняющееся увеличенное количество макрофагов во всех зонах тимуса. В отличие от группы только с оперативным лечением РМЖ в переходной между корковым и мозговым веществом зоне прослеживается взаимосвязь средних лимфоцитов с микроРНК-21 и микроРНК-221 лимфы, что наряду с увеличением количества иммунобластов, митотически делящихся клеток, эпителиоретикулярных клеток может быть обусловлено повышенной миграцией Т-лимфоцитов из тимуса, усилением цитотоксических

Таблица 3/Table 3

Положительные взаимосвязи клеток структурно-функциональных зон тимуса с микро-РНК в лимфе крыс Вистар при химически индуцированном РМЖ, после оперативного лечения РМЖ и после химиотерапии РМЖ. Приведен коэффициент ранговой корреляции Спирмена (*r*)

Positive relationships between cells of the structural--functional zones of the thymus with microRNA in the lymph of Wistar rats with chemically induced breast cancer, after surgical treatment of breast cancer and after chemotherapy of breast cancer. Spearman's rank correlation coefficient (r) is given

Группы / Groups	Клетки / Cells	МикроРНК/ miRNA-21	МикроРНК/ miRNA-221	МикроРНК/ miRNA-222	МикроРНК/ miRNA-429
Субкапсулярная зона коркового вещества Subcapsular zone of the cortical substance					
РМЖ ВС	СЛ ML	-	0.641	-	-
	Мит Mit	-	-	-	0.804
Опер+ХТ / ST+CT	МЛ SL	-	0.640	-	0.605
	Мит Mit	-	-	-	0.776
Центральная часть коркового вещества Central part of the cortical substance					
РМЖ / ВС	ИМ IM	-	0.708	-	-
	МФ MF	-	0.585	-	-
Опер / ST	ИМ IM	-	0.785	-	-
Опер+ХТ / ST+CT	СЛ ML	-	-	-	0.736
	МЛ SL	-	0.580	-	0.788
	КПЯ CNP	-	-	0.663	-
Кортико-медуллярная зона Cortico-medullary zone					
Опер / ST	СЛ ML	0.754	-	-	-
Опер+ХТ / ST+CT	СЛ ML	0.660	0.639	-	-
Центральная часть мозгового вещества Central part of the medulla substance					
РМЖ / ВС	СЛ ML	0.653	-	-	-
	МФ MF	-	-	-	0.622
Опер+ХТ / ST+CT	МЛ SL	0.600	-	-	0.723

Примечание. ИМ – иммунобласты, СЛ – средние лимфоциты, МЛ – малые лимфоциты, Мит – митозы, КПЯ – клетки с пикнотическими ядрами, МФ – макрофаги; опер – оперативное лечение РМЖ; Опер+ХТ – оперативное лечение с последующей химиотерапией.
Note. IM – immunoblasts, ML – medium lymphocytes, SL – small lymphocytes, Mit – mitoses, CNP – cells with nuclear pycnosis, MF – macrophages. BC – breast cancer; ST – surgical treatment; ST+CT – surgical treatment + chemotherapy.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.14-20

механизмов иммунного ответа. После резекции опухоли и ХТ на это могут указывать, взаимосвязи малых лимфоцитов в центральной части мозгового вещества тимуса с проонкогенной микроРНК-21 и опухоль-супрессирующей микроРНК-429 лимфы. При этом в центральной части мозгового вещества отмечается увеличение количества иммунобластов, средних лимфоцитов и митотически делящихся клеток, а также сохраняющееся повышенное количество макрофагов, которые принимают участие в процессах дифференцировки Т-лимфоцитов.

Заключение

После оперативного лечения РМЖ уровни проонкогенных микроРНК (-21, -222) в лимфе уменьшаются, а опухоль-супрессирующей микроРНК-429 увеличиваются по сравнению с РМЖ без лечения. Взаимосвязи микроРНК лимфы с морфологическими преобразованиями в тимусе свидетельствуют об активации процессов бласттрансформации в корковом веществе тимуса, делимфотизации морфофункциональных зон тимической паренхимы, макрофагальной реакции.

После оперативного лечения РМЖ и химиотерапии, по сравнению только с резекцией РМЖ, и наряду с морфологичесими данными, выявленные взаимосвязи клеток структурных компонентов тимуса с проонкогенными и опухоль-супрессирующей микроРНК в корковом и мозговом веществе тимуса могут быть обусловлены повышенной пролиферативной активностью, миграцией Т-лимфоцитов из тимуса, усилением цитотоксических механизмов иммунного ответа, увеличением количества гибнущих клеток.

Литература/References

1. DeSantis C.E., Ma J., Gaudet M.M., Newman L.A., Miller K.D., Goding Sauer A., et al. Breast cancer statistics, 2019. *CA A Cancer Journal for Clinicians*. 2019; 69(6): 438–51. doi: 10.3322/caac.21583
2. Bertoli G., Cava C., Castiglioni I. MicroRNAs: new biomarkers for diagnosis, prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer. *Theranostics*. 2015; 5(10): 1122–43. doi: 10.7150/thno.11543
3. Wengong Si., Jiaying S., Huilin Z., Weimin F. The role and mechanisms of action of microRNAs in cancer drug resistance. *Clinical Epigenetics*. 2019; 11(25): https://doi.org/10.1186/s13148–018–0587–8
4. Matsuzaki J., Suzuki H. Role of microRNAs-221/222 in digestive systems. *Journal of Clinical Medicine*. 2015; 4(8): 1566–77. doi: 10.3390/jcm4081566
5. Yang C.H., Pfeffer S.R., Sims M., Yue J., Wang Y., Linga V.G., et al. The oncogenic microRNA-21 inhibits the tumor suppressive activity of FBXO11 to promote tumorigenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2015; 290(10): 6037–46. doi: 10.1074/jbc.M114.632125
6. Han M., Wang F., Gu Y., Pei X., Guo G., Yu C., et al. MicroRNA-21 induces breast cancer cell invasion and migration by suppressing smad7 via EGF and TGF-β pathways. *Oncology Reports*. 2016; 35(1): 73–80. https://doi.org/10.3892/or.2015.4360
7. Hu Y., He J., He L., Xu B., Wang Q. Expression and function of Smad7 in autoimmune and inflammatory diseases. *Journal of Molecular Medicine*. 2021; 99: 1209–20 https://doi.org/10.1007/s00109–021–02083–1
8. Das A., Ganesh K., Khanna S., Sen C.K., Roy S. Engulfment of Apoptotic Cells by Macrophages: A Role of microRNA-21 in the Resolution of Wound Inflammation. *Journal of Immunology*. 2014; 192(3): 1120–9. doi: 10.4049/jimmunol.1300613
9. Bencivenga D., Stampone E., Roberti D., Ragione F.D. p27Kip1, an Intrinsically Unstructured Protein with Scaffold Properties. *Cells*. 2021; 10(9): 2254. doi:10.3390/cells10092254
10. Serres M.P., Kossatz U., Chi Y., Roberts J.M., Malek N.P., Besson A. 27(Kip1) controls cytokinesis via the regulation of citron kinase activation. *Journal of Clinical Investigation*. 2012; 122(3): 844–58. doi: 10.1172/JCI60376
11. Diaz-Riascos Z.V., Ginesta M.M., Fabregat J., Serrano T., Busquets J., Buscail L., et al. Expression and Role of MicroRNAs from the miR-200 Family in the Tumor Formation and Metastatic Propensity of Pancreatic Cancer. *Molecular Therapy: Nucleic Acids*. 2019; 17: 491–503. doi.org/10.1016/j.omtn.2019.06.015
12. Lu Y., Zhao Q., Liao J-Y., Song E., Xia Q., Pan J., et al. Complement Signals Determine Opposite Effects of B Cells in Chemotherapy-Induced Immunity. *Cell*. 2020; 180(6): 1081–97.e24. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.015
13. Brockwel N.K., Rautela J., Owen K.L., Gearing L.J., Deb S., Harvey K., et al. Tumor inherent interferon regulators as biomarkers of longterm chemotherapeutic response in TNBC. *Npj Precision Oncology*. 2019; 3(21). https://doi.org/10.1038/s41698–019–0093–2
14. Shi. Y.Y., Ming Z.Z. Medullary thymic epithelial cells, the indispensable player in central tolerance. *Science China Life Sciences*. 2013; 56(5): 392–8. doi: 10.1007/s11427–013–4482–4

Сведения об авторах:
Казаков Олег Васильевич, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. физиологии протективной системы НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН;
Кабаков Алексей Васильевич, канд. мед. наук, науч. сотр., лаб. физиологии протективной системы НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН;
Повещенко Александр Федорович, доктор мед. наук, руководитель лаб. физиологии протективной системы НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН.