

Повещенко А.Ф.^{1,5}, Казаков О.В.¹, Орлов Н.Б.¹, Повещенко О.В.^{1,5}, Ким И.И.¹,
Бондаренко Н.А.¹, Соловьева И.Г.², Стрункин Д.Н.³, Кабаков А.В.¹, Райтер Т.В.¹,
Лыков А.П.¹, Богачев С.С.⁴, Покушалов Е.А.⁶, Коненков В.И.¹

Цитокины лимфы как маркеры онкогенеза и эффективности терапии при экспериментальной опухоли молочной железы крыс Wistar

¹ — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии»,
630060, г.Новосибирск, ул. Тимакова, д. 2

² — ГБОУ ВПО НГМУ Минздрава России, 630091, г.Новосибирск, Красный просп., д. 52

³ — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
630099, г.Новосибирск, ул. Ядринцовская, д. 14

⁴ — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН), 630090, г.Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, д. 10

⁵ — ФГБОУ ВПО НГПУ, 630126, г.Новосибирск, ул. Вилюйская, д. 28

⁶ — Новосибирский «Научно-исследовательский институт патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина»,
630055, г.Новосибирск, ул. Речуновская, д. 15

Цель работы — изучение уровней цитокинов в лимфе, вовлеченных в патогенез рака молочной железы (РМЖ). **Методика.** Рак молочной железы индуцировали введением *n*-метил-*N*-нитрозомочевины крысам Wistar. Часть животных подвергалась только оперативному вмешательству или же только полихимиотерапии (ПХТ) (циклофосфан, метотрексат, 5-фторурацил). У части животных сочетали оба вида терапии, а также в отдельной группе к ПХТ добавляли препарат панаген, представляющий собой фрагментированные молекулы ДНК. Для исследования концентрации цитокинов в лимфе использовали тест-систему Bio-Plex Pro Rat Cytokines 24-Plex Assay (Bio-Rad, США). **Результаты.** У крыс с РМЖ содержание большинства исследованных цитокинов, таких, как IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, IL-13, IL-17A, MIP-1 α , MIP-3 α , RANTES, TNF- α , MCP-1 статистически значимо было выше, чем у интактных животных. Оперативное удаление опухоли приводило к статистически значимому снижению содержания в лимфе провоспалительных цитокинов. Сравнительное исследование показателей содержания цитокинов в лимфе после удаления опухоли с интактными животными показало, что содержание цитокинов, таких, как IL-10, IL-18, GRO/KC, RANTES было значимо выше в группе контрольных животных. Проведение ПХТ приводило к статистически значимому снижению содержания IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, MIP-1 α , MIP-3 α , RANTES в лимфе крыс с РМЖ. Сравнительное исследование содержания цитокинов в лимфе прооперированных животных после проведения полихимиотерапии и введения препарата панаген показало, что большинство показателей содержания цитокинов, таких, как IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-18, GRO/KC, IFN γ , MIP-3 α в лимфе было выше после введения препарата панаген. **Заключение.** При проведении сравнительного исследования цитокинового профиля лимфы крыс Wistar установлено, что содержание цитокинов зависело от проводимой терапии у животных с индуцированным раком молочной железы. Уровни цитокинов лимфы могут служить диагностическим критерием опухолевого роста, а также прогностическим критерием эффективности проводимой терапии и риска метастазирования РМЖ.

Ключевые слова: рак молочной железы; цитокины лимфы; полихимиотерапия; панаген; крысы Wistar

Для корреспонденции: Повещенко Александр Федорович, зав. лаб. физиологии протективной системы, ФГБНУ НИИКЭЛ, e-mail: poveshchenkoa200@mail.ru

Для цитирования: Повещенко А.Ф., Казаков О.В., Орлов Н.Б., Повещенко О.В., Ким И.И., Бондаренко Н.А., Соловьева И.Г., Стрункин Д.Н., Кабаков А.В., Райтер Т.В., Лыков А.П., Богачев С.С., Покушалов Е.А., Коненков В.И. Цитокины лимфы как маркеры онкогенеза и эффективности терапии при экспериментальной опухоли молочной железы крыс Wistar. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(3): 68–75.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.11.2015

Poveshchenko A.F.^{1,5}, Kazakov O.V.¹, Orlov N.B.¹, Poveshchenko O.V.^{1,5}, Kim I.I.¹,
Bondarenko N.A.¹, Solovieva I.G.², Strunkin D.N.³, Kabakov A.V.¹, Rayter T.V.¹, Lykov A.P.¹,
Bogachev S.S.⁴, Pokushalov E.A.⁶, Kononkov V.I.¹

Lymph cytokines as markers oncogenesis and effective treatment of experimental breast cancer Wistar rat

¹ — FGBNU «Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology», 630060, ul. Timakova 2, Novosibirsk, Russia

² — Medical University NSMU Russian Ministry of Health, 630091, Krasny Prospekt, 52, Novosibirsk, Russia

³ — FGBNU «Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology», 630099, ul. Yadrintsevskaya 14, Novosibirsk, Russia

⁴ — Federalnoe State Institution of Science Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (ICG SB RAS), 630090, p-t Ak.Lavrenteva 10, Novosibirsk, Russia

⁵ — FGBOU VPO NGPU, 630126, ul. Viluiskaya, 28, Novosibirsk, Russia

⁶ — Novosibirsk Research Institute of Circulation Pathology im. Akademika E.N.Meshalkina, 630055, ul.Rechkunovskaya 15, Novosibirsk, Russia

The purpose of this paper is to examine the levels of cytokines in the lymph involved in the pathogenesis of breast cancer. Methods. Breast cancer was induced by introducing n-methyl-N-nitrosourea rats Wistar breed. Some of the animals subjected to surgery alone or chemotherapy alone (cyclophosphamide, methotrexate, 5-fluorouracil). Some animals combine both types of therapy, as well as a separate group to the administration of chemotherapy added Panagene drug presenting a fragmented DNA. To investigate the concentration of cytokines used in lymph test system Bio-Plex Pro Rat Cytokone 24-Plex Assay (Bio-Rad, USA). Results. In rats with breast cancer content of most studied cytokines such as, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, IL-13, IL-17A, MIP-1 α , MIP-3 α , RANTES, TNF- α , MCP-1 was significantly higher than in intact animals. Surgical removal of the tumor resulted in a significant decrease in the content in the lymph as a pro-inflammatory cytokine. Comparative performance study cytokine content in the lymph after tumor removal from intact animals showed that the content of cytokines such as IL-10, IL-18, GRO / KC, RANTES were significantly higher in the control animals group. Conducting chemotherapy has led to a significant decrease in the content of IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, MIP-1 α , MIP-3 α , RANTES in rat breast cancer lymph. Comparative study of cytokine content in the lymph operated animals after the administration of chemotherapy and Panagene revealed that most of the content indicators cytokines such as IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-18, GRO / KC, IFN γ , MIP-3 α in the lymph was higher after administration of the drug Panagene. Conclusion. In a comparative study cytokine profile lymph Wistar rats found that cytokine content depended on the therapy in animals with induced breast cancer. Lymph cytokine levels may serve as a diagnostic criterion for tumor growth, as well as the predictor of the effectiveness of the therapy and the risk of metastasis of breast cancer.

Keywords: breast cancer, cytokines, chemotherapy, Panagene, Wistar rats

For citation: Poveshchenko A.F., Kazakov O.V., Orlov N.B., Poveshchenko O.V., Kim I.I., Bondarenko N.A., Solovieva I.G., Strunkin D.N., Kabakov A.V., Reiter T.V., Lykov A.P., Bogachev S.S., Pokushalov E.A., Kononkov V.I. Lymph cytokines as markers oncogenesis and effective treatment of experimental breast cancer Wistar rat. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (3): 68–75. (in Russ).

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

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

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

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

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

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

Kim I.I., <http://orcid.org/0000-0002-7380-2763>

Bondarenko N.A., <http://orcid.org/0000-0002-8443-656X>

Solovieva I.G., <http://orcid.org/0000-0001-6360-0853>

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

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

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

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

Bogachev S.S., <http://orcid.org/0000-0001-9557-6712>

Pokushalov E.A., <http://orcid.org/0000-0002-9494-4234>

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

Received 11.11.2015

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) сохраняет лидирующую позицию среди онкологической патологии у женщин во всем мире [1—3]. Одним из патогенетических механизмов возникновения и прогрессии опухолевого роста являются белковые медиаторы — цитокины, хемокины и ростовые факторы. Цитокины секретируются как лимфоидными, так и опухолевыми клетками [2—7], оказывают влияние на множество различных клеток-мишеней, а цитокиновая сеть является важнейшим регуляторным механизмом межклеточных взаимодействий. С одной стороны, цитокины проявляют себя как факторы усиления опухолевой прогрессии, активируя ангиогенез и миграцию опухолевых клеток, изменяют функцию клеток-мишеней, вовлеченных в механизм уклонения опухолевых клеток от системы иммунного надзора [8]. С другой стороны, цитокины могут являться основными медиаторами противоопухолевого иммунитета. Концентрация и баланс уровней цитокинов и их антагонистов способствуют усилению или ингибированию роста рака молочной железы [9]. Изменения относительной концентрации некоторых цитокинов, таких, как IL-1, IL-6, IL-11, IL-19, TGF- β , могут прямо и опосредовано стимулировать рак молочной железы [9]. Опухолевый рост относится к патологии, при которой имеется повреждение, воспаление, распад, разрушение тканей. Воспаление проявляется повышенным содержанием в сыворотке крови провоспалительных цитокинов и хемокинов и является характерным для опухолевого роста и метастазирования. Значение воспалительного ответа в патогенезе опухолевого роста подтверждается ассоциацией между концентрацией некоторых провоспалительных цитокинов и хемокинов с характером прогрессии и тяжестью заболевания. Цитокины могут обладать прогностической значимостью и являться мишенью для терапевтических воздействий, что обуславливает важность их изучения при онкогенезе. Цитокины также могут влиять на эффективность лечения рака, усугублять токсическое воздействие химиотерапии и оказывать действие на метаболизм лекарственных препаратов. В настоящее время важная роль системы цитокинов как факторов внутренней среды организма в нормальных условиях и на разных этапах онкогенеза, как прогностических факторов при развитии социально значимых болезней, не вызывает сомнений. Изучение уровня продукции цитокинов в сыворотке крови при опухолях имеет большое значение для прогнозирования выживаемости, оценки риска развития рецидивов и смертности онкологических больных.

Цитокины как факторы лимфатической и лимфоидной систем играют важную роль в патогенезе социально значимых патологий к которым относится рак.

Если работы по изучению цитокинового профиля крови при онкологических заболеваниях существуют, то цитокиновый профиль лимфы остается практически не изученным. Особую актуальность приобретает изучение цитокинового профиля лимфы при опухолевом росте, поскольку лимфатическая система играет важную роль в патогенезе и распространение опухолевого процесса и метастазирование происходит преимущественно лимфогенно.

Несмотря на очевидную взаимосвязь цитокинов с патогенезом роста и метастазирования опухолей, их очевидное диагностическое и прогностическое значение, комплексные исследования разных функциональных групп цитокинов, сравнительная оценка цитокинов в сыворотке крови и лимфе до сих пор не проводилась. Проблема участия цитокинов в опухолевом росте и при применении различных способов лечения требует дальнейшего изучения.

Цель исследования — определение количественных характеристик и качественных особенностей цитокинового профиля лимфы выделенной из грудного лимфатического протока на различных этапах онкогенеза РМЖ, проведение сравнительного исследования цитокинов лимфы крыс Wistar после проведения операции, полихимиотерапии, полихимиотерапии в сочетании с курсом терапии препаратом панаген.

Методика

Эксперименты проведены в соответствии с «Правилами работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. № 755) и с соблюдением принципов Хельсинской декларации ВМА (2000). Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище. Забой осуществляли одновременно в утренние часы.

Исследования проводили на половозрелых (возраст 3 мес.) крысах-самках Wistar массой 250—300 г в количестве 9—10 животных в каждой группе:

- 1-я группа — интактные крысы;
- 2-я — крысы с РМЖ (опухоленосители);
- 3-я — РМЖ после проведения полихимиотерапии (ПХТ);
- 4-я — крысы после хирургического удаления РМЖ (оперированные животные);
- 5-я — удаление раковой опухоли и ПХТ;
- 6-я — после удаления опухоли в сочетании с ПХТ и введением препарата панаген (фрагментированная ДНК).

Опухоль индуцировали инъекцией N-метил-N-нитрозомочевины (МНМ) в область молоч-

ной железы крысам-самкам пятикратно (1 инъекция в неделю) (Sigma-Aldrich, США), в результате чего через 6 мес. развивается РМЖ (аденокарцинома) [1, 10]. Оперативное вмешательство осуществляли через 6 мес. от момента индукции РМЖ. Для ПХТ использовали схему ЦМФ (циклофосфан — в дозе 100 мг/м^2 с 1 по 14 день; метотрексат — в дозе 40 мг/м^2 в 1 и 8 дни; 5-фторурацил — в дозе 600 мг/м^2 в 1 и 8) (Sigma-Aldrich, США) [1]. Курс терапии фрагментированной ДНК (5 мг/кг) проводили внутрибрюшинным введением однократно в течение 14 сут. через 3 ч после введения циклофосфана. В экспериментах использовали субстанцию препарата панаксен с содержанием фрагментированной ДНК $1,7 \text{ мг/мл}$ (ЛСР № 004429/08 от 09.06.08), выделенный из плаценты человека. Животных из эксперимента выводили через 6 мес. под наркозом (40 мг/кг нембутана внутрибрюшинно; Sigma-Aldrich, США). Лимфу забирали из грудного лимфатического протока [11]. Концентрации 24 цитокинов в лимфе оценивали методом проточной флюориметрии на 2-лучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Assay System (Bio-Rad, США) с использованием коммерческой тест-системы, (определяемый динамический диапазон 2—32000 пкг/мл) в соответствии с инструкцией фирмы производителя Bio-Plex Pro Rat Cytokone 24-Plex Assay (Bio-Rad, США). Результаты представлены средним значением и среднеквадратическим отклонением ($M \pm \sigma$); медианой (Me), нижним и верхним квартилями (Q1; Q3). При статистической обработке значения цитокинов, выходящие за нижнюю границу чувствительности метода ($<2 \text{ пкг/мл}$), принимали за 1 пкг/мл . Статистическая значимость различий рассчитывалась по U-критерию Манна—Уитни. Различия между группами считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования содержания цитокинов в лимфе грудного лимфатического протока животных представлены в таблице. У крыс с РМЖ содержание большинства исследованных цитокинов, таких, как, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, IL-13, IL-17A, MIP-1 α , MIP-3 α , RANTES, TNF- α , MCP-1 статистически значимо было выше, чем у интактных животных. IFN- γ также был выше у крыс с РМЖ, но его показатели были статистически незначимы по сравнению с контрольной группой. Уровень таких провоспалительных цитокинов как IL-1 β , IL-6 и TNF- α статистически значимо увеличивался при РМЖ в 7,5, в 4,5 и 3,9 раза соответственно. Индуцирование РМЖ приводило к значимому повышению уровня ряда хемокинов, таких, как MIP-1 α ,

MIP-3 α , RANTES, MCP-1 в 2,2, в 2,8, в 1,9 и в 1,4 раза соответственно, и снижению продукции GRO/KC в 2 раза. Индуцирование РМЖ приводило к статистически значимому снижению продукции противовоспалительного цитокина IL-10 в 3,1 раза ($p = 0,0088$), что может способствовать иммуносупрессии и ослаблению противоопухолевой защиты. Можно предположить, что указанные цитокины, в том числе провоспалительные и хемокины, продуцируются прежде всего опухолевыми клетками, а также инфильтрирующими опухоль лимфоидными клетками. Некоторые из этих цитокинов действуют как аутокринные или паракринные факторы роста для опухолевой ткани. По мнению многих исследователей провоспалительные цитокины внутри опухоли и ее микроокружения связаны с прогрессированием РМЖ [4, 5]. Высокое содержание этих биологически активных факторов у животных с РМЖ позволяет отнести их к маркерам опухолевого роста. Полученные данные согласуются с результатами других исследований, касающихся цитокинов сыворотки крови [3—5].

Оперативное удаление опухоли приводило к статистически значимому снижению содержания в лимфе провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-12, IL-18) в 9,5, в 5,6, в 1,75 и в 2,9 раза соответственно.

Обнаружено статистически значимое снижение концентрации в лимфе как хемокинов (MIP-1 α , MIP-3 α , RANTES) в 2,1, в 4 и в 3,7 раза соответственно, так и противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-13) в 4,6 и более чем в 13 раз, а также IL-7 в 4,9 раза по сравнению с РМЖ. Количество IL-10 в лимфе после операции осталось на уровне как при РМЖ. Сравнительное исследование показателей содержания цитокинов в лимфе после удаления опухоли с интактными животными показало, что содержание цитокинов, таких, как IL-10, IL-18, GRO/KC, RANTES было значимо выше в группе контрольных животных. Основным источником IL-10 в опухолевом микроокружении являются макрофаги, которые увеличивают экспрессию IL-10 в ответ на сигналы от гибнущих раковых клеток. Удаление первичного опухолевого очага, очевидно, ослабляло сигнальные пути, и продукция IL-10 была невысока. Содержание IL-6, IL-17A в группе прооперированных животных было существенно выше по сравнению с контролем в 2,2 и 2,1 раза соответственно, что позволяет считать их не только провоспалительными маркерами, но и маркерами метастазирования. Кроме того у прооперированных животных показатели концентрации TNF- α , MCP-1 в лимфе выше по сравнению с контролем в 3,3 и в 1,9 раза соответственно, но различия статистически незначимы.

Содержание цитокинов в лимфе крыс опухоленосителей РМЖ
по сравнению с контролем и после проведения различных видов лечения РМЖ

Содержание цитокина (пг/мл)	Группа животных					
	Контрольная группа (интактные животные) М ± σ Ме; (LQ-HQ)	РМЖ М ± σ Ме; (LQ-HQ)	Животные после операции удаления РМЖ М ± σ Ме; (LQ-HQ)	Животные с РМЖ после ПХТ М ± σ Ме; (LQ-HQ)	Животные после операции удаления РМЖ и ПХТ М ± σ Ме; (LQ-HQ)	Животные после операции удаления РМЖ и полихимиотерапии и введения панагена М ± σ Ме; (LQ-HQ)
IL-1α	45,6 ± 23,4 48,8; (16,7-70,9)	50,3 ± 20,0 46,7; (46,7-75,4)	21,4 ± 7,5 20,3; (13,3-20,3) ®	42,9 ± 12,5 43,4; (27,3-43,4)	35,4 ± 12,4 29,2; (23,6-37,6) ☐	53,3 ± 38,6 33,8; (16,2-64,4)
IL-1β	54,4 ± 29,3 42,8; (35,7-43,1)	393,6 ± 157,1 402,2; (294,3-466,6) **	41,2 ± 13,9 41,4; (26,4-45,2) #	62,0 ± 22,9 48,6; (46,9-49,7) •	55,3 ± 19,4 53,1; (40,6-70,0)	93,9 ± 69,1 44,7; (35,7-142,6)
IL-2	108,3 ± 31,5 82,3; (82,3-136,9)	362,2 ± 109,4 401,4; (226,2-402,6) **	64,6 ± 22,4 73,3; (46,8-85,3) #®	250,4 ± 92,5 226,3; (146,8-366,0)	122,5 ± 21,6 106,7; (104,2-147,7) ☐	180,6 ± 35,0 209,8; (136,9-209,8) &
IL-4	40,6 ± 2,6 39,5; (37,8-43,1)	111,6 ± 75,4 67,2; (66,5-82,3) **	24,0 ± 10,8 18,2; (16,7-26,8) #	39,8 ± 11,8 42,2; (40,2-51,1) •	26,6 ± 7,2 31,4; (18,4-32,8) ♦	81,4 ± 62,1 64,4; (14,4-116,3)
IL-5	166,5 ± 95,4 118,9; (104,5-170,2)	175,4 ± 85,9 128,3; (107,7-205,2)	100,2 ± 23,0 93,9; (79,7-128,3)	108,3 ± 49,4 83,1; (76,2-161,5)	37,2 ± 11,6 33,2; (28,3-34,2) ♦	164,4 ± 34,1 165,2; (163,8-176,8) ×
IL-6	312,9 ± 91,0 310,5; (200,3-330,5)	1413,2 ± 646,0 1400,4; (667,7-1777,8) **	711,0 ± 215,8 843,1; (487,7-850,1) *	546,7 ± 195,8 392,4; (371,5-626,5) •	342,5 ± 80,2 337,9; (246,4-442,7)	835,5 ± 307,6 980,1; (578,0-1027,7) &×
IL-7	121,4 ± 89,0 128,2; (10,1-228,2)	429,7 ± 57,8 435,3; (421,0-442,1) **	86,1 ± 36,5 110,2; (58,8-116,8) # ®	182,2 ± 67,1 126,3; (126,3-266,1) •	59,5 ± 38,8 59,1; (11,5-62,0) ☐	138,6 ± 34,4 122,7; (119,5-179,8) ×
IL-10	1712,1 ± 405,4 1466,0; (1466,0-2207,1)	541,0 ± 231,3 499,7; (364,5-522,8) **	498,8 ± 213,8 411,4; (402,9-727,1) *®	146,7 ± 33,8 129,1; (119,4-178,6) •	115,6 ± 30,1 101,6; (96,2-102,1) ♦☐	895,9 ± 593,5 661,3; (296,8-1274,1) ×
IL-12	63,6 ± 22,9 75,9; (40,0-80,0)	140,1 ± 47,5 131,7; (90,0-189,7) **	80,4 ± 12,6 80,0; (70,0-80,0) # ®	121,8 ± 13,4 126,0; (121,0-132,0)	72,5 ± 10,4 72,6; (69,5-80,7)	91,6 ± 37,0 101,6; (79,9-128,4)
IL-13	79,9 ± 104,1 12,7; (10,0-26,5)	330,4 ± 304,8 112,1; (59,5-610,1) **	25,3 ± 13,4 18,5; (16,6-19,9) #	109,1 ± 76,3 88,0; (47,0-98,0)	17,5 ± 3,8 15,3; (14,1-21,6)	316,9 ± 234,8 433,1; (26,5-511,6) &×
IL-17 A	63,7 ± 30,3 49,8; (33,1-69,9)	242,3 ± 119,7 243,3; (143,7-341,4)	133,5 ± 48,9 137,5; (102,1-142,9) *	67,1 ± 20,3 71,4; (46,3-90,3) •	59,5 ± 19,2 71,2; (62,7-73,8)	280,3 ± 135,9 189,4; (169,8-400,1) &×
IL-18	5704,1 ± 1932,2 4741,0; (4590,9-5276,7)	3195,9 ± 1439,1 2468,7; (2269,0-3345,7)	1087,6 ± 73,4 1130,1; (1071,5-1151,3) *#	1863,4 ± 659,9 1851,2; (1090,4-1861,4)	1322,6 ± 979,3 1022,5; (290,2-2016,9) ♦	6633,7 ± 2006,2 7159,9; (5953,3-8878,4) ×
EPO	1102,3 ± 501,0 848,0; (665,3-1167,7)	797,5 ± 877,7 306,0; (50,7-594,2)	623,9 ± 206,3 566,5; (554,6-626,8) ®	114,3 ± 65,0 84,3; (64,2-85,1)	281,0 ± 193,4 227,4; (66,3-317,1) ♦☐	442,1 ± 361,3 350,0; (41,4-746,4)
G-CSF	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
GM-CSF	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
GRO/KC	28,5 ± 7,3 24,6; (23,4-33,3)	14,0 ± 3,6 11,9; (11,1-17,1)	15,5 ± 5,8 11,2; (10,7-21,8) *	7,2 ± 4,6 10,0; (3,0-11,0)	44,3 ± 34,9 24,6; (10,6-87,4)	94,9 ± 35,4 99,4; (90,6-135,2) ×
IFNγ	60,8 ± 18,3 54,2; (53,9-66,9)	106,5 ± 40,9 120,7; (80,9-140,6)	86,6 ± 53,9 84,2; (24,1-91,2)	63,8 ± 25,7 77,2; (33,9-88,3)	28,2 ± 13,5 20,4; (19,2-42,1) ♦	133,9 ± 66,9 104,8; (88,1-120,3)&×
M-CSF	132,0 ± 71,9 149,9; (48,6-186,8)	133,7 ± 42,4 153,8; (87,0-157,1)	112,5 ± 48,4 117,5; (72,1-162,9)	127,3 ± 88,8 59,6; (57,7-228,3)	90,0 ± 44,6 101,0; (54,7-114,5)	109,6 ± 38,2 97,7; (92,9-114,5)
MIP-1 α	1458,1 ± 358,0 1555,9; (1406,3-1594,4)	3230,1 ± 475,0 3528,2; (3143,0-3549,6)	1412,2 ± 794,5 1200,3; (754,9-2282,2) #	1355,2 ± 764,0 1737,4; (700,1-2119,0) •	902,2 ± 669,4 700,7; (194,9-1318,4)	2660,3 ± 1690,8 2387,2; (866,7-2873,5)
MIP-3 α	96,2 ± 32,5 120,1; (60,7-121,6)	274,5 ± 63,2 307,5; (250,1-333,3)	67,3 ± 23,8 72,1; (38,1-92,1) #	108,8 ± 60,7 71,4; (61,5-142,6) •	57,8 ± 21,4 55,6; (54,3-78,5) ☐	210,9 ± 93,0 144,1; (128,6-314,1) &×
RANTES	356,4 ± 125,7 276,5; (276,5-513,6)	678,3 ± 224,6 601,5; (536,9-650,1)	180,4 ± 40,0 195,0; (191,6-207,2) *#	205,2 ± 39,1 221,5; (157,5-231,6) •	422,2 ± 128,7 467,3; (367,5-520,1) ☐	552,9 ± 176,5 580,7; (452,6-680,4)
TNFα	22,9 ± 2,1 22,4; (20,7-24,1)	80,2 ± 19,8 87,0; (80,1-90,4)	74,6 ± 40,5 61,7; (40,3-83,3)	74,9 ± 49,9 50,4; (38,9-127,9)	43,1 ± 12,8 44,3; (31,4-46,9) ♦	67,8 ± 36,3 49,1; (42,6-80,6) &
VEGF	60,7 ± 38,4 68,9; (14,8-46,4)	51,1 ± 29,7 60,8; (18,6-67,1)	57,6 ± 13,9 67,4; (41,1-68,8)	54,0 ± 17,6 58,6; (54,8-66,7)	34,1 ± 9,0 33,1; (32,6-43,5)	44,7 ± 14,6 42,4; (42,3-45,2)
MCP-1	611,3 ± 115,1 624,1; (477,8-747,3)	903,7 ± 186,5 777,9; (767,8-935,6)	1212,0 ± 1662,1 847,0; (579,1-1558,7)	658,2 ± 255,6 767,8; (381,9-847,0)	629,2 ± 125,6 552,8; (531,5-612,6) ☐	657,3 ± 186,1 620,3; (581,2-851,3)

Примечание. Обозначены статистически значимые отличия от величин соответствующих показателей лимфы контрольных (интактных) (** — при $p < 0,05$), от лимфы крыс с РМЖ. Контрольных (интактных) (* — при $p < 0,05$), от лимфы крыс после операции удаления РМЖ. Контрольных (интактных) (♦ — при $p < 0,05$), от лимфы крыс после операции удаления РМЖ и проведения полихимиотерапии. Контрольных (интактных) (& — при $p < 0,05$), от лимфы крыс после операции удаления РМЖ и проведения полихимиотерапии и введения панагена. РМЖ (# — при $p < 0,05$), лимфы оперированных животных. РМЖ (• — при $p < 0,05$), лимфы РМЖ после химиотерапии. Животных после операции удаления РМЖ (⊖ — при $p < 0,05$), лимфы животных после операции удаления РМЖ и проведения химиотерапии. Животных после операции удаления РМЖ в сочетании с полихимиотерапией (× — при $p < 0,05$), по сравнению с животными после операции удаления РМЖ и проведения полихимиотерапии и введения панагена. Животных после операции удаления РМЖ (® — при $p < 0,05$), по сравнению с животными с РМЖ и проведения полихимиотерапии.

Доказано, что удаление первичных опухолей (без удаления региональных лимфоузлов и последующей химиотерапии) может приводить к ускорению метастазирования, что связано со многими факторами, в том числе со стимулированием ангиогенеза и лимфангиогенеза.

Проведение ПХТ приводило к значимому снижению содержания IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, MIP-1 α , MIP-3 α , RANTES в лимфе крыс с РМЖ в 6,3, в 2,8, в 2,5, в 2,3, в 3,7, в 2,2, в 2,5 и в 3,3 раза соответственно.

При исследовании концентрации цитокинов в лимфе крыс после удаления опухоли по сравнению с животными после удаления РМЖ и ПХТ не было обнаружено статистически значимых различий в содержании большинства цитокинов. Тем не менее, содержание IL-7, IL-10, EPO, MIP-3 α , MCP-1, в лимфе было значимо выше в группе оперированных животных по сравнению с показателями группы с сочетанной терапией. В данном случае имеют место изменения продукции маркеров метастазирования, таких, как MIP-3 α , MCP-1, но отсутствуют изменения IL-1 β , IL-6, MIP-1 α , VEGF. В то же время уровень продукции таких цитокинов и хемокинов, как IL-1 α , IL-2, IL-12, RANTES выше при сочетании ПХТ и оперативного лечения.

Сравнительное исследование содержания цитокинов в лимфе прооперированных животных после проведения полихимиотерапии и введения препарата панаген показало, что большинство показателей содержания цитокинов, таких, как IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-18, GRO/KC, IFN γ , MIP-3 α в лимфе было выше после введения препарата панаген. Стимулирующее влияние препарата панаген на лимфоидные клетки выражается в увеличении продукции целого ряда цитокинов. Концентрация IL-6, IL-13, IL-17A, MIP-3 α , IFN γ , после введения панагена была выше по сравнению с интактными животными. Это совпадает с представлениями о том, что цитостатики в сочетании с препаратом ДНК (панаген) возможно обеспечивают противоопухолевый эффект и стимулирует лимфоидные клетки иммунной системы [12].

Опухолевые клетки способны продуцировать различные цитокиновые молекулы и имеют к ним рецеп-

торы, что позволяет осуществлять аутокринную регуляцию собственной жизнедеятельности [7, 13, 14]. Показано, что один и тот же цитокин может проявлять различные эффекты на разных стадиях опухолевого процесса [4]. Результаты некоторых исследований показали, что содержание всех изученных цитокинов в опухолевой ткани было существенно выше, чем в неизменной ткани. Так, IL-6, IL-8, IL-10 могут продуцироваться опухолевыми клетками и служить факторами роста и прогрессии опухоли, что совпадает с ранее полученными нами и также другими авторами результатами [3, 4].

Наиболее перспективными в качестве маркеров опухолевого роста и прогностических факторов при злокачественных новообразованиях являются цитокины IL-1 β , TNF α , IL-6 и IL-4. Известно, что провоспалительные цитокины IL-6, TNF- α и IL-1 β , которые вырабатываются как лимфоцитами, так и опухолевыми клетками, проявляют себя как факторы усиления опухолевой прогрессии, активирующие ангиогенез и миграцию опухолевых клеток, а TNF- α , являясь индуктором апоптоза, может вызывать усиление гибели лимфоцитов, и миграции в этот орган опухолевых клеток [4, 5]. Для ряда солидных опухолей человека показана корреляция уровня данных цитокинов с агрессивностью течения онкологических заболеваний, метастатическим потенциалом, риском развития рецидивов и продолжительностью жизни больных [15]. С увеличением тяжести опухолевой прогрессии повышается способность клеток крови к продукции цитокинов, обладающих мощным проопухолевым влиянием, то есть активируются механизмы положительной обратной связи.

Цитокины играют важную роль в патогенезе опухолевого роста и метастазирования, детерминируя течение заболевания, тяжесть заболевания, осложнения. Учитывая плейотропность цитокинов и их патогенетическую значимость необходимо исследование широкого спектра цитокинов на разных этапах опухолевого роста, с применением разных видов лечения с учетом сравнительного исследования цитокинов лимфы и крови. Использование мультиплексного анализа позволяет более полно охарактеризовать цитокиновый профиль лимфы. Обсуждая полученные результаты мы анализируем функциональные группы цитокинов:

про- (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-18), и противовоспалительные (IL-4, IL-10) цитокины, иммунорегуляторные цитокины (IL-2, IFN γ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, IL-13, IL-17A, IL-18), ростовые факторы (EPO, G-CSF, M-CSF, VEGF, IL-13), хемокины (GRO/KC, MIP-1 α , MIP-3 α , RANTES, MCP-1). Как видно из таблицы, концентрации таких ростовых факторов в лимфе G-CSF, M-CSF не превышали нижнюю границу чувствительности метода и были <1 пкг/мл, что является особенностью лимфы, так как в сыворотке крови подобный феномен нами не обнаружен [3]. Исследование показало, что продуцентами цитокинов являются не только клетки крови и лимфы, но и опухоль, — обнаружено увеличение секреции цитокинов всех функциональных групп. Усиление продукции отдельных групп цитокинов ассоциировано с опухолевым ростом или метастазированием либо обратным развитием опухоли (патоморфозом). В нашем исследовании обнаружено увеличение концентрации провоспалительных цитокинов в лимфе у животных с РМЖ. Провоспалительные цитокины и хемокины могут способствовать метастазированию опухоли и стимулировать ангиогенез как прямо, так и опосредованно через другие биологически активные вещества.

Заключение

При проведении сравнительного исследования цитокинового профиля лимфы крыс Wistar установлено, что количественное содержание цитокинов при РМЖ зависит от типа проводимой терапии по поводу заболевания. РМЖ стимулирует продукцию как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов, основными продуцентами которых являются иммунокомпетентные клетки, клетки опухолевого микроокружения и самой опухоли. Продукция цитокинов может изменяться в процессе прогрессирования, подавления развития опухоли или метастазирования. Уровни цитокинов лимфы могут служить диагностическим критерием опухолевого роста, а также прогностическим критерием эффективности проводимой терапии и риска метастазирования РМЖ.

Список литературы

1. Волкова М.С. Лимфатический регион молочной железы в норме, при индуцированной опухоли, химиотерапии и фитокоррекции: дис. кандидата мед.наук. Новосибирск; 2014. 241 с.
2. Канцерогенез, цитокины и иммунитет: патогенетическая взаимосвязь в динамике развития неоплазий / Под общ. ред. В.М. Попкова, Н.П. Чесноковой, В.Ю. Барсукова. Саратов: Изд-во СГМУ, 2014. -379 с.
3. Повешенко А.Ф., Казаков О.В., Орлов Н.Б., Повешенко О.В., Ким И.И., Бондаренко Н.А., Мил-

лер Т.В., Соловьева И.Г., Стрункин Д.Н., Кабаков А.В., Райтер Т.В., Лыков А.П., Рогачев В.А., Богачев С.С., Коненков В.И. Цитокины сыворотки крови как маркеры онкогенеза и эффективности терапии при экспериментальной опухоли молочной железы крыс Wistar. *Фундаментальные исследования*. 2015; 1: 1664-70.

4. Соснина А.В., Великая Н.В., Аутеншлюс А.И. Роль цитокинов в патогенезе злокачественных новообразований. Новосибирск; 2013.

5. Стахеева М.Н., Слонимская Е.М., Кухарев Я.В., Гарбуков Е.Ю., Горева Е.П., Сенников С.В., Козлов В.А., Чердынцева Н.В. Взаимосвязь уровня продукции IL-1 β клетками крови у больных раком молочной железы с различным исходом. *Цитокины и воспаление*. 2010; 9(3): 72-3.

6. Boon T., van den Eynde B. Tumour immunology. *Current Opinion in Immunology*. 2003; 15(2): 129-30.

7. Wilson J. and Balkwill F. The role of cytokines in the epithelial cancer microenvironment. *Seminars in Cancer Biology*. 2002; 12(2): 113-20.

8. Purohit A., Newman S. P., and Reed M. J. The role of cytokines in regulating estrogen synthesis: implications for the etiology of breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2002; 4(2): 65-9.

9. Nicolini A., Carpi A., and Rossi G. Cytokines in breast cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2006; 17(5): 325-37.

10. Джиоев, Ф.К. Исследование факторов, влияющих на процесс канцерогенеза, и поиск антиканцерогенных соединений: автореферат дис. д-ра мед. наук. Ленинград; 1984. 42 с.

11. Кузнецов А.В. Новый способ забора лимфы у животных. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1993; (9): 329-31.

12. Alyamkina E.A., Leplina O.Y., Sakhno L.V., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Efremov Y.R., Shilov A.G., Proskurina A.S., Orishchenko K.E., Dolgova E.V., Rogachev V.A., Nikolin V.P., Popova N.A., Zagrebelniy S.N., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Effect of double-stranded DNA on maturation of dendritic cells in vitro. *Cellular Immunology*. 2010; 266: 46-1.

13. Waugh D.J., Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res*. 2008; 14: 6735-41.

14. Wang T.B., Deng M.H., Qiu W.S., Dong W.G. Association of serum vascular endothelial growth factor-C and lymphatic vessel density with lymph node metastasis and prognosis of patients with gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2007; 13: 1794-97.

15. Sivaparvathi M., R. Sawaya R., Wang S.W. Overexpression cytokines during the progression of human gliomas. *Clin. Exp. Metastasis*. 1995; 13(1): 49-6.

References

1. Volkova M.S. *Lymphatic breast region is normal, when the induced tumor, chemotherapy and phytoremediation: dis. med candidate*. Novosibirsk; 2014. (in Russian)
2. *Kantserogenez, cytokines and immunity: pathogenetic relations in the dynamics of the development of neoplasia / Pod Society*. Ed. VM Popkov, NP Chesnokova, VY Barsukova.- Saratov: Izd SSMU, 2014. (in Russian)
3. Poveshchenko A.F., Kazakov O.V., Orlov N.B., Poveshchenko O.V., Kim I.I., Bondarenko N.A., Miller T.V., Solovieva I.G., Strunkin D.N., Kabakov A.V., Reiter T.V., Lykov A.P., Rogachev V.A., Bogachev S.S., Konenkov V.I.

Cytokines serum as markers of carcinogenesis and the effectiveness of therapy in breast Wistar rats of experimental tumors. *Basic research*. 2015 (1): 1664-70. (in Russian)

4. Sosnina A.V., Great N.V., Autenshlyus A.I. *Role of cytokines in the pathogenesis of malignancies*. Novosibirsk; 2013. (in Russian)

5. Stakheyeva M.N., Slonim E.M., Kuharev Y.V., Garbuk E.J., Gorev H.E., Sennikov S.V., Kozlov V.A., Cherdynseva N.V. The relationship level of IL-1 β production of blood cells in patients with breast cancer with a different outcome. *Cytokines and inflammation*. 2010; 9 (3): 72-3. (in Russian)

6. Boon T., van den Eynde B. Tumour immunology. *Current Opinion in Immunology*. 2003; 15 (2): 129-30.

7. Wilson J., Balkwill F. The role of cytokines in the epithelial cancer microenvironment. *Seminars in Cancer Biology*. 2002; 12 (2): 113-20.

8. Purohit A., Newman S.P., Reed M.J. The role of cytokines in regulating estrogen synthesis: implications for the etiology of breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2002; 4 (2): 65-9.

9. Nicolini A., Carpi A., and Rossi G. Cytokines in breast cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2006; 17 (5): 325-37.

10. Dzhioev, F.K. A study of factors influencing the process of carcinogenesis, and the search for anti-carcinogenic compounds: abstract dis. Dr. med. Sciences. Leningrad; 1984. (in Russian)

11. Kuznetsov A.V. A new way of lymph intake in animals. *Bulleten Experimentalnoy Biologii Meditsin*. 1993; (9): 329-31. (in Russian)

12. Alyamkina E.A., Leplina O.Y., Sakhno L.V., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Efremov Y.R., Shilov A.G., Proskurina A.S., Orishchenko K.E., Dolgova E.V., Rogachev V.A., Nikolov V.P., Popova N.A., Zagrebelniy S.N., Bogachev S.S., Shurdiv M.A. Effect of double-stranded DNA on maturation of dendritic cells in vitro. *Cellular Immunology*. 2010; 266: 46-1.

13. Waugh D.J., Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res*. 2008; 14: 6735-41.

14. Wang T.B., Deng M.H., Qiu W.S., Dong W.G. Association of serum vascular endothelial growth factor-C and lymphatic vessel density with lymph node metastasis and prognosis of patients with gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2007; 13: 1794-97.

15. Sivaparvathi M., Sawaya R., Wang S.W. Overexpression cytokines during the progression of human gliomas. *Clin. Exp. Metastasis*. 1995; 13 (1): 49-6.

Сведения об авторах:

Повещенко Александр Федорович, доктор мед. наук, зав. лаб. физиологии протективной системы НИИКЭЛ, e-mail: poveshchenkoa200@mail.ru

Казаков Олег Васильевич, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. физиологии протективной системы НИИКЭЛ, e-mail: Kazakoff_oleg@mail.ru

Орлов Николай Борисович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. иммуногенетики НИИКЭЛ, e-mail: nbo@ngs.ru

Повещенко Ольга Владимировна, доктор мед. наук, зав. лаб. клеточных технологий НИИКЭЛ, e-mail: PoveshchenkoOV@yandex.ru

Ким Ирина Иннокентьевна, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. клеточных технологий НИИКЭЛ, e-mail: kii5@yandex.ru

Бондаренко Наталья Анатольевна, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. клеточных технологий НИИКЭЛ, e-mail: bond802888@yandex.ru

Соловьева Ирина Геннадьевна, доктор мед. наук, и. о. зав. каф. клинической психологии ГБОУ ВПО НГМУ Минздрава России, e-mail: irraso@mail.ru

Стрункин Дмитрий Николаевич, канд. мед. наук, науч. сотр. ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии», 630099, ул. Ядринцовская 14, Новосибирск, e-mail: strunkind@mail.ru

Кабаков Алексей Васильевич, аспирант лаб. физиологии протективной системы НИИКЭЛ, e-mail: Doctor03-85@ngs.ru

Райтер Татьяна Владимировна, аспирант лаб. физиологии протективной системы НИИКЭЛ, e-mail: reitert@mail.ru

Лыков Александр Петрович, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. клеточных технологий НИИКЭЛ, e-mail: arlykov2@mail.ru

Богачев Сергей Станиславович, доктор биол. наук, зав. лаб. индуцированных клеточных процессов ФГБУН «Институт цитологии и генетики» (ИЦиГ СО РАН), e-mail: gorbi@bionet.nsc.ru

Покушалов Евгений Анатольевич, доктор мед. наук, проф., заместитель директора по научно-экспериментальной работе, руководитель центра интервенционной кардиологии Новосибирского Научно-исследовательского института патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина

Коненков Владимир Иосифович, доктор мед. наук, проф., акад. РАН, зав. лаб. иммуногенетики, директор по науке НИИКЭЛ, e-mail: vikonenkov@gmail.com