

ЛАБОРАТОРНЫЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

DOI: 10.21294/1814-4861-2016-15-5-33-
УДК: 618.19-006.6-092.9:612.621.31:612.42:577.215.3

УРОВНИ ГОРМОНОВ, микроРНК И ЦИТОКИНОВ В ЛИМФЕ В НОРМЕ И ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

А.П. Лыков¹, А.В. Кабаков¹, Н.А. Бондаренко¹, О.В. Повещенко¹,
Т.В. Райтер¹, О.В. Казаков¹, Д.Н. Стрункин², А.Ф. Повещенко^{1,3,4},
Н.Б. Орлов¹, В.И. Коненков¹

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии», г. Новосибирск¹

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск²

ФГБУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Новосибирск³

ФГБУ ВО «Новосибирский государственный педагогический университет», г. Новосибирск⁴
630060, г. Новосибирск, Тимакова. 2, e-mail: aplykov2@mail.ru¹

Аннотация

Цель исследования – оценка уровней гормонов, микроРНК и цитокинов в лимфе. **Материал и методы.** Экспериментальный рак молочной железы индуцировали введением N-метил-N-нитрозомочевины у крыс Wistar. Часть животных подвергалась только оперативному вмешательству или только химиотерапии (циклофосфан, метотрексат, 5-фторурацил). У части животных сочетали оперативное вмешательство с последующим курсом ХТ. В лимфе исследовали содержание фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), пролактина, лютеинизирующего гормона (ЛГ), эстрадиола (E_2) и тиреоглобулина (ТГ), микроРНК-21, микроРНК-221, микроРНК-222, микроРНК-429 и 24 цитокинов. **Результаты.** Показано, что на фоне ХТ снижаются уровни пролактина, тиреоглобулина, ФСГ и эстрадиола. В группе животных с РМЖ увеличены уровни экспрессии микроРНК-21, микроРНК-221, микроРНК-222 и снижены уровни экспрессии микроРНК-429. При РМЖ в лимфе увеличены уровни большинства цитокинов. Между уровнями в лимфе цитокинов, гормонов и микроРНК определены взаимосвязи. В лимфе выявляются различные уровни цитокинов, гормонов и микроРНК с учетом вида проведенного лечения.

Ключевые слова: рак молочной железы, химиотерапия, половые гормоны, тиреоглобулин, микроРНК, цитокины, лимфа.

В патогенез рака молочной железы (РМЖ) вовлечены половые гормоны и гормоны щитовидной железы [1–4]. На основании уровней гормонов в сыворотке крови больных РМЖ прогнозируется эффективность терапии и риск метастазирования [1, 4]. В патогенезе опухолей, в том числе и РМЖ, принимают активное участие микроРНК [5]. Кроме этого, существенная роль при РМЖ отводится цитокинам, которые могут как активировать, так и ингибировать пролиферацию и метастазирование опухолевых клеток [6, 7]. Лимфа, разновидность соединительной ткани, которая составляет внутреннюю окружающую среду для клеток организма, в том числе и для молочных желез, собирает продукты жизнедеятельности клеток из межклеточного пространства, поэтому может служить для оценки функции клеток органов, например молочных желез.

Целью исследования стала оценка уровней гормонов, цитокинов и микроРНК, вовлеченных в патогенез РМЖ, в лимфе грудного протока при экспериментальной модели РМЖ.

Материал и методы

Эксперименты на лабораторных животных проведены в соответствии с принципами Хельсинкской декларации ВМА (2000). Эксперименты выполнены на 118 неполовозрелых крысах-самках линии Wistar. Животные содержались на стандартной лабораторной диете и имели свободный доступ к воде. У 109 крыс РМЖ индуцировали N-метил-N-нитрозомочевинной (30 мг/кг, Sigma-Aldrich, США), 9 крыс составили группу контроля. Через 6 мес у 39 крыс оперативно удалили опухоль молочной железы, и далее 9 животных получили химиотерапию (ХТ), 30 животных не получали ХТ и составили

✉ Лыков Александр Петрович, aplykov2@mail.ru

группу контроля оперативного способа лечения РМЖ. Кроме того, была группа животных, получавшая ХТ (n=30) по схеме: 5-фторурацил (Ebewe, Австрия в дозе 15 мг/кг внутривнутрибрюшинно на 1-й и 8-й день курса терапии), метотрексат (Ebewe, Австрия, в дозе 2,5 мг/кг внутривнутрибрюшинно на 1-й и 8-й день курса терапии) и циклофосфан (ОАО «Биохимия», Саранск, в дозе 3 мг/кг внутривнутрибрюшинно ежедневно однократно 14 дней), и группа животных, которым не проводилось никакого лечения (n=30). Животных из эксперимента выводили через 6,5 мес под наркозом (40 мг/кг нембутана внутривнутрибрюшинно; Sigma-Aldrich, США), что обуславливалось необходимостью прижизненного сбора лимфы. Уровни гормонов в лимфе определяли иммуноферментным анализом с использованием коммерческих наборов: «ГонадотропинИФА-ЛГ», «ГонадотропинИФА – ФСГ», «ИФА-Пролактин-01», «ТириодИФА – ТГ» (ООО «Компания Алкор Био», Санкт-Петербург, Россия) и «Estradiol ELISA» (DRG Diagnostics, Германия). Уровни цитокинов в лимфе изучали с помощью тест-системы Bio-Plex Pro Rat Cytokines 24-Plex Assay (Bio-Rad, США). Выделение суммарной РНК из лимфы проводили с использованием набора Qiagen (Rneasy® Lipid Tissue Mini kit (50), Германия). Обратную транскрипцию проводили для получения кДНК по матрице микроРНК, выделенной из образцов тканей с использованием набора реагентов ЗАО «Вектор-Бест». Для определения уровня экспрессии микроРНК miR-21, -221, -222, -429 в лимфе проводили ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием реагентов ЗАО «Вектор-Бест» на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США). Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 6.0, меры центральной тенденции и рассеяния описаны медианой (Me), нижним (Lq) и верхним (Hq) квар-

тилями; достоверность различия рассчитывалась по U-критерию Манна – Уитни и принималась при значениях $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Анализ уровней гормонов в лимфе грудного протока у крыс в норме и при РМЖ (табл. 1) выявил статистически значимое снижение уровней пролактина, тиреоглобулина, ФСГ и эстрадиола на фоне ХТ ($p < 0,05$). В группе крыс с РМЖ без лечения отмечено статистически значимое увеличение уровней пролактина, тиреоглобулина, ФСГ по сравнению с другими опытными группами ($p < 0,05$).

В лимфе грудного протока опытных групп (табл. 2) отмечено статистически значимое увеличение уровней экспрессии микроРНК-21 по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Также при РМЖ в лимфе статистически значимо выше уровни экспрессии микроРНК-221 и микроРНК-222 по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Необходимо отметить тот факт, что при РМЖ без лечения и при сочетании оперативного вмешательства с курсом ХТ в лимфе грудного протока статистически значимо снижен уровень экспрессии микроРНК-429 по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Также показано, что с учетом вида проводимого лечения уровни экспрессии микроРНК-21, микроРНК-221 и микроРНК-222 чаще снижаются после оперативного вмешательства или же на фоне курса ХТ, по сравнению с другими опытными группами, а уровни экспрессии микроРНК-429 возрастают ($p < 0,05$).

В лимфе грудного протока при РМЖ отмечено статистически значимое увеличение уровней IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-13, IL-17 α , IL-18, IFN γ , MIP-1 α , MIP-3 α и RANTES, по сравнению с другими опытными группами, а также уровней эритропоэтина, за исключением группы

Таблица 1

Уровни гормонов в лимфе в норме и при раке молочной железы

Группы животных	Пролактин	Тиреоглобулин	ФСГ	ЛГ	Эстрадиол ₂
1. Контроль	544,13 ^{4,5} 510,21–578,04	6,25 ^{2,5} 6,2–6,3	19,59 ^{3,4,5} 17,82–21,35	5,7 ³ 4,59–6,81	526,82 ^{2,3,5} 518,44–535,19
2. РМЖ	545,94 ^{3,4} 541,51–600,24	6,49 ^{3,5} 6,38–7,82	20,2 ^{3,4,5} 18,67–35,62	4,66 ³ 4,59–6,05	501,56 ³ 492,07–516,95
3. РМЖ – операция	549,51 ⁴ 530,76–549,51	6,3 6,08–6,3	17,82 ⁴ 17,51–17,82	4,04 ^{4,5} 3,16–4,04	478,02 ⁵ 478,02–487,24
4. РМЖ – операция + ХТ	492,29 492,29–542,37	6,95 ⁵ 6,16–6,95	16,34 15,41–16,34	5,7 5,7–6,52	444,59 444,59–572,19
5. РМЖ – ХТ	514,68 504,84–545,04	6,06 5,49–6,69	13,92 10,01–19,32	5,67 5,28–6,53	490,55 481,54–504,04

Примечание: 1,2,3,4,5 – группы животных; статистическая значимость различия между группами по U-критерию Манна – Уитни, $p < 0,05$.

Таблица 2

Уровни микроРНК в лимфе в норме и при раке молочной железы

Группы животных	МикроРНК			
	21	221	222	429
1. Контроль	3,1 ^{2,3,4,5}	0,55 ^{2,3,5}	0,78 ^{2,3,4,5}	1,71 ^{2,5}
	0,02–5,25	0,45–3,16	0,53–1,87	0,06–36,27
2. РМЖ	27,25 ^{3,5}	0,81 ³	1,43 ^{3,4,5}	1,02 ^{3,5}
	22,82–54,71	0,09–2,71	1,27–2,41	0,53–2,07
3. РМЖ – операция	17,97 ^{4,5}	0,07 ^{4,5}	0,5 ^{4,5}	6,21 ⁵
	17,56–20,25	0,07–0,07	0,34–0,56	5,68–6,73
4. РМЖ – операция + ХТ	35,0	0,41	0,06	1,0
	1,27–182,42	0,25–0,59	0,01–0,21	0,04–52,95
5. РМЖ – ХТ	16,38	0,14	0,25	13,24
	10,91–16,93	0,14–0,15	0,22–0,29	9,89–14,84

Примечание: 1,2,3,4,5 – группы животных; статистическая значимость различия между группами по U-критерию Манна – Уитни, $p < 0,05$.

животных, подвергшихся операции ($p < 0,05$). Необходимо отметить, что уровни в лимфе грудного протока G-CSF и GM-CSF были ниже порога чувствительности набора (табл. 3).

Анализ сопряженностей уровней экспрессии микроРНК с уровнями гормонов и цитокинов в лимфе грудного протока в контрольной группе выявил наличие обратной и сильной взаимосвязи уровней IL-1 β с уровнями экспрессии микроРНК-21 и микроРНК-429 ($r = -0,9$; $p = 0,037$), прямой и сильной взаимосвязи уровней IL-12 с уровнями экспрессии микроРНК-21 и микроРНК-429 ($r = 0,9$; $p = 0,037$), что может свидетельствовать о вовлеченности данных цитокинов в противоопухолевый иммунитет. В группе животных с РМЖ показана обратная и сильная сопряженность уровней экспрессии микроРНК-221 с уровнями IL-1 α и IL-2 ($r = -0,95$; $p = 0,014$ и $r = -0,9$; $p = 0,037$ соответственно). Кроме этого, между уровнями экспрессии микроРНК-222 и уровнями IL-6, IL-10, IL-13 и M-CSF в лимфе грудного протока также имеется взаимосвязь ($r = -0,9$; $p = 0,037$; $r = 0,9$; $p = 0,037$; $r = -0,9$; $p = 0,037$ и $r = -0,9$; $p = 0,037$ соответственно), что указывает на вовлеченность исследуемых параметров в процесс онкогенеза при РМЖ. После операции у животных определены сопряженности уровней экспрессии микроРНК-222 с уровнями VEGF в лимфе грудного протока ($r = -0,97$; $p = 0,005$), что косвенно может свидетельствовать о наличии метастазов в организме животных, так как именно VEGF способствует неоангиогенезу в области опухоли и тем самым способствует метастазированию опухолевых клеток. В группе животных, которые после удаления опухоли получили курс ХТ, выявлены взаимосвязи уровней экспрессии микроРНК-221 с уровнями IL-1 α , IL-2 и IL-12 ($r = -0,94$; $p = 0,014$; $r = -0,94$; $p = 0,014$ и $r = 0,9$; $p = 0,037$ соответственно), а также между уровнями экспрессии микроРНК-222 с уровнями IL-1 α и IL-2 ($r = -0,94$; $p = 0,014$), что также указывает на вовлеченность в онкогенез провоспалительных цитокинов при РМЖ. В группе животных с РМЖ,

получивших только курс ХТ, установлены взаимосвязности уровней экспрессии микроРНК-221 с уровнями в лимфе грудного протока VEGF ($r = -0,97$; $p = 0,005$), а также между уровнями экспрессии микроРНК-429 и уровнями IL-13 и TNF- α ($r = 0,97$; $p = 0,005$), что отражает сохранность риска метастазирования, так как высокие уровни VEGF указывают на сохранность процесса неоангиогенеза, а высокие уровни IL-13 и TNF- α , с одной стороны, – на переключение организма носителя опухоли на синтез антител, которые могут маскировать антигенные структуры клеток опухоли, а с другой стороны, TNF- α способствует слушиванию клеток опухоли от основного очага роста опухоли и тем самым метастазированию.

Кроме этого, между уровнями цитокинов и уровнями гормонов в лимфе грудного протока в некоторых опытных группах также были выявлены взаимосвязи. Так, в группе животных с РМЖ уровни IL-1 β сопряжены с уровнями тиреоглобулина и эстрадиола ($r = -0,9$; $p = 0,037$ и $r = 0,9$; $p = 0,037$ соответственно), а уровни IL-7 – с уровнями пролактина и ФСГ ($r = 0,9$; $p = 0,037$), уровни IL-12 – с уровнями тиреоглобулина и эстрадиола ($r = 0,9$; $p = 0,037$ и $r = -0,9$; $p = 0,037$ соответственно), уровни IL-17 α – с уровнями пролактина и ЛГ ($r = 0,9$; $p = 0,037$), а уровни MIP-3 α и RANTES – с уровнями пролактина ($r = 0,9$; $p = 0,037$), что отражает сложные молекулярные механизмы при онкогенезе. Кроме этого, только в группе животных, получивших курс ХТ, были показаны сопряженности уровней цитокинов с уровнями гормонов в лимфе грудного протока, а именно: IL-1 α – с тиреоглобулином ($r = 0,95$; $p = 0,014$), IL-1 β – с эстрадиолом ($r = 0,95$; $p = 0,014$), IL-5 и IL-7 – с эстрадиолом ($r = 0,95$; $p = 0,014$), MIP-1 α и MIP-3 α – с тиреоглобулином ($r = 0,95$; $p = 0,014$ и $r = -0,95$; $p = 0,014$), MCP-1 с эстрадиолом ($r = 0,95$; $p = 0,014$), что отражает многоуровневый механизм канцерогенеза при РМЖ.

Снижение уровней в лимфе грудного протока гормонов, вовлеченных в патогенез при РМЖ, за исключением ЛГ, на фоне ХТ, может быть прояв-

Таблица 3

Уровни цитокинов в лимфе в норме и при раке молочной железы

Параметры	1. Контроль	2. РМЖ	3. РМЖ -операция	4. РМЖ –операция + ХТ	5. РМЖ - ХТ
IL-1 α	48,82	75,38 ^{3,4,5}	20,3 ⁴	43,36	29,19
	16,65-70,9	46,65-75,38	13,25-20,3	27,34-43,36	23,6-37,56
IL-1 β	42,75 ^{2,4}	402,24 ^{3,4,5}	41,43 ⁴	48,61	53,05
	35,71-43,07	294,33-466,59	26,38-45,17	46,88-49,71	40,61-70,01
IL-2	82,34 ²	401,41 ^{3,5}	73,3 ⁵	226,25 ⁵	106,7
	82,34-136,87	226,17-402,64	46,76-85,3	146,76-366,0	104,2-147,65
IL-4	39,5 ⁵	67,2 ^{3,5}	18,2	42,22 ⁵	31,4
	37,82-43,1	66,52-82,3	16,72-26,8	40,22-51,1	18,4-32,8
IL-5	137,82 ⁵	128,32 ⁵	93,93 ⁵	83,11 ⁵	33,17
	118,85-170,23	107,69-205,2	79,72-128,32	76,15-161,45	28,32-34,23
IL-6	310,47 ^{2,3}	1400,43 ^{4,5}	843,1 ⁵	392,4	337,9
	200,34-330,47	667,7-1777,8	487,67-850,1	371,5-626,5	246,4-442,66
IL-7	128,2 ²	435,32 ^{3,4,5}	110,16 ⁴	126,25 ⁵	59,06
	101,3-228,2	420,98-442,05	58,8-116,8	126,25-266,1	11,5-61,95
IL-10	1465,99 ^{2,3,4,5}	499,68 ^{4,5}	411,4 ^{4,5}	129,06	101,6
	1465,99-2207,07	364,48-522,78	402,94-727,06	119,41-178,6	96,21-102,09
IL-12	75,93 ^{2,4}	131,7 ^{3,5}	80,0 ⁴	126,0 ⁵	72,6
	40,0-80,0	90,0-189,7	70,0-80,0	121,0-132,0	69,5-80,7
IL-13	12,72 ²	112,06 ^{3,4,5}	18,51	88,0	15,32
	10,0-26,54	59,53-610,13	16,61-19,88	47,0-98,0	14,1-21,64
IL-17 α	49,79 ^{2,3}	243,3 ^{4,5}	137,5 ^{4,5}	71,4	71,2
	33,14-69,9	143,7-341,4	102,1-142,9	46,28-90,3	62,7-73,8
IL-18	4740,97 ^{3,4,5}	2468,71 ³	1130,09	1851,24	1022,47
	4590,89-5276,72	2268,96-3345,73	1071,47-1151,34	1090,38-1861,4	290,21-2016,91
Epo	848,0 ⁴	305,96 ⁴	566,48 ^{4,5}	84,33	227,43
	665,28-1167,65	50,68-594,19	554,59-626,8	64,2-85,1	66,27-317,07
GRO/KC	24,6 ^{2,3,4}	11,92	11,2	10,03	24,63
	23,4-33,26	11,09-17,08	10,72-21,83	3,02-11,0	10,56-87,35
IFN γ	54,2 ^{2,3,5}	120,7 ^{4,5}	84,2 ^{4,5}	77,2	20,4
	53,88-66,9	80,9-140,6	24,1-91,2	33,83-88,3	19,2-42,1
M-CSF	149,9	153,75	117,52	59,57 ⁵	100,96
	148,57-186,79	86,97-157,08	72,05-162,93	57,7-228,33	54,66-114,52
MIP-1 α	1594,38 ²	3528,23 ^{3,4,5}	1200,3	1737,42	700,7
	1555,89-1614,86	3142,96-3549,64	754,91-2282,15	700,1-2119,04	194,93-1318,38
MIP-3 α	120,1 ²	307,5 ^{3,4,5}	72,1	71,4	55,6
	60,7-121,6	250,1-333,33	38,13-92,13	61,5-142,6	54,28-78,5
RANTES	276,52 ^{2,3,4}	601,54 ^{3,4}	194,99	221,46	467,3
	276,52-513,58	536,88-650,1	191,6-207,2	157,51-231,6	367,48-520,1
TNF- α	22,35 ^{2,5}	87,01	61,74	50,4	44,3
	20,65-24,1	80,08-90,42	40,3-83,28	38,9-127,9	31,4-46,89
VEGF	106,0 ^{3,5}	60,75	67,4	58,6 ⁵	33,08
	76,4-133,02	18,56-67,06	41,09-68,78	54,8-66,7	32,6-43,47
MCP-1	624,14 ²	777,9	846,97	767,79	552,83
	477,82-747,32	767,79-935,57	579,11-1558,71	381,92-846,97	531,53-612,59

лением токсического эффекта медикаментозных препаратов не только на клетки опухоли, но и на другие клетки организма, в том числе и на клетки эндокринных желез. Известно, что после курсов ХТ у женщин с РМЖ снижены уровни эстрадиолов в сыворотке крови [5], а на фоне оперативных вмешательств меняются уровни гормонов [8]. Выявленные изменения уровней экспрессии микроРНК при экспериментальной модели РМЖ согласуются

с аналогичными исследованиями других авторов, показавших возрастание уровней экспрессии микроРНК-21 в клетках опухоли молочной железы, индуцированной N-метил-N-нитрозомочевинной [9]. Повышенные уровни цитокинов в лимфе грудного протока в опытных группах животных могут быть результатом продукции и секреции их не только лимфоцитами, но и опухолевыми клетками молочной железы. Выявленные сопряженности

уровней экспрессии микроРНК с цитокинами, а уровней цитокинов с уровнями гормонов свидетельствуют о вовлеченности данных молекул в канцерогенез при РМЖ и взаимовлиянии друг на друга, что косвенно указывает на многоуровневые патогенетические механизмы канцерогенеза и противоопухолевого иммунитета при РМЖ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bernichtein S., Touraine P., Goffin Y. New concepts in prolactin biology. *J Endocrinol.* 2010 Jul; 206 (1): 1–11. doi: 10.1677/JOE-10-0069.
2. Farhat G.N., Cummings S.R., Chlebowski R.T., Parimi N., Cauley J.A., Rohan T.E., Huang A.J., Vitolins M., Hubbell F.A., Manson J.E., Cochrane B.B., Lane D.S., Lee J.S. Sex hormone levels and risks of estrogen receptor-negative and estrogen receptor-positive breast cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2011 Apr 6; 103 (7): 562–70. doi: 10.1093/jnci/djr031.
3. Szycha P., Szycha W., Gesing A., Lewinski A., Karbownik-Lewinska M. TSH receptor antibodies have predictive value for breast cancer – retrospective analysis. *Thyroid Res.* 2013 May 16; 6 (1): 8. doi: 10.1186/1756-6614-6-8.
4. Zhou J., Chen Y., Huang Y., Long J., Wan F., Zhang S. Serum follicle-stimulating hormone level is associated with human epidermal growth factor receptor type 2 and Ki67 expression in post-menopausal females with breast cancer. *Oncol Lett.* 2013 Oct; 6 (4): 1128–1132.
5. Waters P.S., McDermott A.M., Wall D., Heneghan H.M., Miller N., Newell J., Kerin M.J., Dwyer R.M. Relationship between Circulating and

Заклучение

Различные уровни гормонов, микроРНК и цитокинов в лимфе грудного протока определяются в норме и при РМЖ у крыс Wistar, индуцированной N-метил-N-нитрозомочевинной. Между уровнями цитокинов, гормонов и микроРНК в лимфе грудного протока определены корреляционные связи различной направленности и силы, указывающие на вовлеченность данных молекул в канцерогенез.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФАНО.

Tissue microRNAs in a Murine Model of Breast Cancer *PLoS One.* 2012; 7 (11): e50459. doi: 10.1371/journal.pone.0050459.

6. Nicolini A., Carpi A., Rossi G. Cytokines in breast cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006 Oct; 17 (5): 325–37.

7. 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 Res.* 2002; 4 (2): 65–9.

8. Raychaudhuri M., Schuster T., Buchner T., Malinowsky K., Bronger H., Schwarz-Boeger U., Hofler H., Avril S. Intratumoral heterogeneity of microRNA expression in breast cancer. *J Mol Diagn.* 2012 Jul; 14 (4): 376–84. doi: 10.1016/j.jmoldx.2012.01.016.

9. Hui C., Yujie F., Lijia Y., Long Y., Hongxia X., Yong Z., Jundong Z., Qianyong Z., Mantian M. MicroRNA-34 and microRNA-21 play roles in the chemopreventive effects of 3,6-dihydroxyflavone on 1-methyl-1-nitrosourea-induced breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res.* 2012 May 22; 14 (3): R80.

Поступила 5.07.16

Принята в печать 5.09.16

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Лыков Александр Петрович, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии (г. Новосибирск, Российская Федерация). E-mail: aplykov2@mail.ru. SPIN-код: 4883-0887.

Кабаков Алексей Васильевич, младший научный сотрудник лаборатории протективной системы, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии (г. Новосибирск, Российская Федерация). E-mail: Doctor03-85@ngs.ru. SPIN-код: 8615-2370.

Бондаренко Наталья Анатольевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии (г. Новосибирск, Российская Федерация). E-mail: bond802888@yandex.ru. SPIN-код: 5722-7157.

Повещенко Ольга Владимировна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией клеточных технологий, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии (г. Новосибирск, Российская Федерация). E-mail: poveshchenkoov@yandex.ru. SPIN-код: 1451-4467.

Райтер Татьяна Владимировна, аспирант, младший научный сотрудник лаборатории протективной системы, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии (г. Новосибирск, Российская Федерация). E-mail: reitert@mail.ru. SPIN-код: 6424-1517.

Казаков Олег Васильевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории протективной системы, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии (г. Новосибирск, Российская Федерация). E-mail: Kazakoff_@mail.ru. SPIN-код: 4565-7180.

Стрункин Дмитрий Николаевич, врач-онколог, Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии (г. Новосибирск, Российская Федерация). E-mail: Strunkind@mail.ru. SPIN-код: 1983-9314.

Повещенко Александр Федорович, доктор медицинских наук, заведующий лабораторией протективной системы, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии (г. Новосибирск, Российская Федерация). E-mail: poveshchenkoa200@mail.ru. SPIN-код: 6495-7412.

Орлов Николай Борисович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии (г. Новосибирск, Российская Федерация).

Коненков Владимир Иосифович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, научный руководитель, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии (г. Новосибирск, Российская Федерация). E-mail: vikonenkov@gmail.com. SPIN-код: 7822-9674.

LEVELS OF HORMONES, microRNA AND CYTOKINES IN LYMPH FROM HEALTHY AND EXPERIMENTAL BREAST CANCER

**A.P. Lykov¹, A.V. Kabakov¹, N.A. Bondarenko¹, O.V. Poveshchenko¹,
T.V. Raiter¹, O.V. Kazakov¹, D.N. Strunkin², A.F. Poveshchenko^{1,3,4},
N.B. Orlov¹, V.I. Konenkov¹**

Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Russia, Novosibirsk¹
Scientific Research Institute of Clinical immunology, Russia, Novosibirsk²
Novosibirsk State Medical University, Russia, Novosibirsk³
Tomsk State Pedagogical University, Russia, Novosibirsk⁴
2, Timakova Street, 630060-Novosibirsk, Russia. E-mail: aplykov2@mail.ru¹

Abstract

The involvement of hormones, microRNAs and cytokines in breast cancer pathogenesis has been well established. Lymph picks up secretory products of breast cancer cells. The purpose of the study was to evaluate the levels of hormones, microRNAs and cytokines in lymph. Wistar rats were injected with N-methyl-N-nitrosourea to induce breast cancer. The rats were subjected to either surgery alone or chemotherapy alone (cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil). In some animals, surgery was followed by chemotherapy. The levels of follicle-stimulating hormone (FSH), prolactin, luteinizing hormone (LH), estradiol (E2) and thyroglobulin (TG), microRNA-21, microRNA-221, microRNA-222, microRNA-429 and 24 cytokines were determined. Chemotherapy was shown to result in the reduction in the levels of prolactin, thyroglobulin, FSH and estradiol. In rats with breast cancer, the expression levels of microRNA-21, microRNA-221 and microRNA-222 were increased, and the expression levels of microRNA-429 were decreased. In breast cancer rats, the levels of most cytokines were found to be increased. Correlations between the levels of cytokines, hormones, and microRNAs in lymph were identified. Differences in the expression levels of cytokines, hormones, and microRNAs in lymph with respect to treatment option were detected.

Key words: breast cancer, chemotherapy, sex hormones, thyroglobulin, microRNA, cytokines, and lymph.

REFERENCES

1. Bernichtein S., Touraine P., Goffin V. New concepts in prolactin biology. *J Endocrinol.* 2010 Jul; 206 (1): 1–11. doi: 10.1677/JOE-10-0069.
2. Farhat G.N., Cummings S.R., Chlebowski R.T., Parimi N., Cauley J.A., Rohan T.E., Huang A.J., Vitols M., Hubbell F.A., Manson J.E., Cochrane B.B., Lane D.S., Lee J.S. Sex hormone levels and risks of estrogen receptor-negative and estrogen receptor-positive breast cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2011 Apr 6; 103 (7): 562–70. doi: 10.1093/jnci/djr031.
3. Szycha P., Szycha W., Gesing A., Lewinski A., Karbownik-Lewinska M. TSH receptor antibodies have predictive value for breast cancer – retrospective analysis. *Thyroid Res.* 2013 May 16; 6 (1): 8. doi: 10.1186/1756-6614-6-8.
4. Zhou J., Chen Y., Huang Y., Long J., Wan F., Zhang S. Serum follicle-stimulating hormone level is associated with human epidermal growth factor receptor type 2 and Ki67 expression in post-menopausal females with breast cancer. *Oncol Lett.* 2013 Oct; 6 (4): 1128–1132.
5. Waters P.S., McDermott A.M., Wall D., Heneghan H.M., Miller N., Newell J., Kerin M.J., Dwyer R.M. Relationship between Circulating and

Tissue microRNAs in a Murine Model of Breast Cancer *PLoS One.* 2012; 7 (11): e50459. doi: 10.1371/journal.pone.0050459.

6. Nicolini A., Carpi A., Rossi G. Cytokines in breast cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006 Oct; 17 (5): 325–37.

7. 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 Res.* 2002; 4 (2): 65–9.

8. Raychaudhuri M., Schuster T., Buchner T., Malinowsky K., Bronger H., Schwarz-Boeger U., Hofler H., Avril S. Intratumoral heterogeneity of microRNA expression in breast cancer. *J Mol Diagn.* 2012 Jul; 14 (4): 376–84. doi: 10.1016/j.jmoldx.2012.01.016.

9. Hui C., Yujie F., Lijia Y., Long Y., Hongxia X., Yong Z., Jundong Z., Qianyong Z., Mantian M. MicroRNA-34 and microRNA-21 play roles in the chemopreventive effects of 3,6-dihydroxyflavone on 1-methyl-1-nitrosourea-induced breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res.* 2012 May 22; 14 (3): R80.

Received 5.07.16
Accepted 5.09.16

ABOUT THE AUTHORS

Lykov Alexandr P., MD, PhD, Principal Research Investigator, Laboratory of Cell Technologies, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology (Novosibirsk, Russian Federation). E-mail: aplykov2@mail.ru. SPIN-code: 4883-0887.

Kabakov Alexey V., Junior Researcher, Laboratory of Protective System, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology (Novosibirsk, Russian Federation). E-mail: Doctor03-85@ngs.ru. SPIN-code: 8615-2370.

Bondarenko Natalia A., PhD, Researcher, Laboratory of Cell Technologies, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology (Novosibirsk, Russian Federation). E-mail: bond802888@yandex.ru. SPIN-code: 5722-7157.

Poveshchenko Olga V., MD, DSc, Head of Laboratory of Cell Technologies, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology (Novosibirsk, Russian Federation). E-mail: poveshchenkoov@yandex.ru. SPIN-code: 1451-4467.

Raiter Tatiana V., Postgraduate, Junior Researcher, Laboratory of Protective System, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology (Novosibirsk, Russian Federation). E-mail: reitert@mail.ru. SPIN-code: 6424-1517.

Kazakov Oleg V., PhD, Researcher, Laboratory of Protective System, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology (Novosibirsk, Russian Federation). E-mail: Kazakoff@mail.ru. SPIN-code: 4565-7180.

Strunkin Dmitry N., Physician-oncologist, Scientific Research Institute of Clinical immunology (Novosibirsk, Russian Federation). E-mail: Strunkind@mail.ru. SPIN-code: 1983-9314.

Poveshchenko Alexandr F., MD, DSc, Head of Protective System Laboratory, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology (Novosibirsk, Russian Federation). E-mail: poveshchenkoa200@mail.ru. SPIN-code: 6495-7412.

Orlov Nikolai B., MD, PhD, Senior Research Investigator, Laboratory of Clinical Genetic Immunity, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology (Novosibirsk, Russian Federation).

Konenkov Vladimir L., MD, DSc, Professor, Academician of RAS, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology (Novosibirsk, Russian Federation). E-mail: vikonenkov@gmail.com. SPIN-code: 7822-9674.