

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

## **Сопряженность уровней микроРНК в сыворотке крови с количеством и функциональной активностью клеток гемо- и лимфопоэза при экспериментальном раке молочной железы**

<sup>1</sup>НИИ клинической и экспериментальной лимфологии,  
<sup>2</sup>НИИ фундаментальной и клинической иммунологии,  
<sup>3</sup>ФГБУ НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАН, Новосибирск

Оценивали наличие сопряженности уровней микроРНК в сыворотке крови с количественными и функциональными показателями клеток гемо- и лимфопоэза при экспериментальном раке молочной железы (РМЖ), индуцированным N-метил-N-нитрозомочевинной (МНМ) у крыс линии Wistar. Исследовали уровни микроРНК-21, -221, -222 и -429 в сыворотке крови, а также количественные и функциональные параметры клеток из костного мозга, лимфы грудного протока и селезенки. Выявлены статистически значимые различия по уровню микроРНК в сыворотке крови и охарактеризованы взаимосвязи уровней микроРНК с количественными и функциональными показателями клеток гемо- и лимфопоэза.

**Ключевые слова:** N-метил-N-нитрозомочевина, микроРНК, рак молочной железы, пролиферативный потенциал, цитокины

МикроРНК - это группа малых некодируемых РНК длиной в 18-25 нуклеотидов, функционирующих как посттранскрипционные регуляторы генов и играющих существенную роль в клеточной дифференцировке, пролиферации и апоптозе. Нарушение уровней экспрессии микроРНК выявлено при многих типах опухолей, в том числе и при раке молочной железы [2,6]. МикроРНК включаются в стресс-индуцированный ответ на внеклеточные сигналы (такие, как химические канцерогены, в частности, табачный дым, N-этил-N-нитрозомочевина, 4-(метилнитрозоамино)-1-(3-пиридил)-1-бутанон, гексагидро-1,3,5-тринитро-1,3,5-триазин, 2-ацетиламинофлуорен, винилкарбамат, 7,12-диметилбенз(а)антрацен [4-5]. Понимание механизмов, вовлеченных в канцерогенез при раке молочной железы, важно для разработки более эффективной профилактики опухолей и их терапии [2]. Целью исследования стало изучение уровней микроРНК в сыворотке крови при экспериментальном раке молочной железы.

### **Материалы и методы**

Эксперименты на лабораторных животных проведены в соответствии с соблюдением принципов Хельсинской декларации ВМА (2000) и выполнены на 25 неполовозрелых крысах-самках линии Wistar. Животные содержались на стандартной лабораторной диете и имели свободный доступ к воде. У 22 крыс РМЖ индуцировали введением N-метил-N-нитрозомочевинной (МНМ) в область 2-ой молочной железы справа в дозе 30 мг/кг (Sigma-Aldrich, США) пятикратно через 7 дней, а четыре особи, которым не вводили МНМ, составили группу контроля. Спустя 6 месяцев с момента индукции РМЖ у 17 крыс оперативно удалили опухоль молочной железы. Далее 5 особей получили ПХТ; 5 особям дополнительно к ПХТ подключили лечение фрагментированной ДНК; 3 особи не получали ПХТ и составили группу контроля оперативного способа лечения РМЖ. Также была группа особей, получавшая только ПХТ (n=5) и группа особей, которой не проводилось никакого лечения (n=4) - контрольная группа РМЖ.

Курс ПХТ включал 5-фторурацил (Ebewe, Австрия) в дозе 15 мг/кг внутривенно на 1 и 8 день курса терапии, метотрексат (Ebewe, Австрия) в дозе 2,5 мг/кг внутривенно на 1 и 8 день курса терапии и циклофосфан (ОАО «Биохимия», Саранск) в дозе 3 мг/кг внутривенно ежедневно однократно 14 дней. Курс терапии фрагментированной ДНК (5мг/кг) проводили внутривенным введением однократно в течение 14 дней через 3 часа после введения циклофосфана. В экспериментах использовали субстанцию препарата Панаген с содержанием фрагментированной ДНК 1,7 мг/мл.

Для устранения негативного эффекта цитостатических препаратов, используемых для ПХТ, предложены курсы терапии экзогенной ДНК и показано ее противоопухолевое действие [1].

Животных из эксперимента выводили через 6,5 мес. под наркозом (40 мг/кг нембутала внутривенно; Sigma-Aldrich, США), что обуславливалось необходимостью прижизненного сбора лимфы из грудного лимфатического протока. Ядросодержащие клетки костного мозга (КМ) получали при помощи перфузии бедренных костей лабораторных животных [3]. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) от линии крыс Wistar (n=5) получали из клеток КМ. Ядросодержащие клетки КМ ресуспензировали в среде DMEM (Биолот, СПб) и пропускали через фильтр (размер пор 80 мкм) для удаления клеточного дебриса, подсчитывали количество жизнеспособных клеток.

Для получения КМ-ММСК ядросодержащие клетки КМ инкубировали в пластиковых флаконах (TPP, Швейцария) в среде DMEM (Биолот, СПб), дополненной 100 мкг/мл гентамицина сульфата (Дальхимфарм, Хабаровск), 2 мМ L-глутамин (ICN, США) и 15 % FCS при 37 °C

в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Через 48 час. неприкрепленные к пластику клетки удаляли, а прилипающую фракцию клеток культивировали до получения конфлюэнтного слоя. Снятие КМ-ММСК при пассировании осуществляли с использованием 0,25% раствора трипсина/0,02% раствора ЭДТА (ICN, США). Суспензию спленоцитов получали измельчением селезенки в гомогенизаторе.

Мононуклеарные клетки (МНК) из лимфы получали осаждением при 1500 оборотов/минуту в течение 5 минут с последующей 2-х кратной отмывкой в забуференном физиологическом растворе. Через 72 часа надосадочная жидкость от клеток КМ, спленоцитов и МНК снималась, разливалась по аликвотам и хранилась при -70 °С до момента использования в работе. В кондиционной среде определяли содержание IL-1β, TNF-α, TGF-β1 с использованием коммерческих наборов для иммуноферментного анализа (eBioscience, Австрия). Проллиферативный потенциал клеток КМ, спленоцитов и МНК из лимфы оценивали в МТТ-тесте в присутствии и отсутствии Конканавалина А (Кона; Sigma-Aldrich, США) в дозе 10 мкг/мл. Результаты оценивали спектрофотометрически (длина волны 492 нм) по включению 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид - МТТ (Sigma-Aldrich, США) через 72 часа и выражали в условных единицах оптической плотности.

Тотальную РНК выделяли из тканей опухоли молочной железы, сыворотки крови и из лимфы грудного протока с использованием набора реагентов (ЗАО Вектор-БЕСТ) согласно инструкции. Для получения кДНК проводили обратную транскрипцию по матрице микроРНК с использованием набора реагентов (ЗАО Вектор-БЕСТ) согласно инструкции. Для определения количества микроРНК-21, -221, -222 и 429 в тканях опухоли молочной железы, сыворотке крови и лимфе проводили ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием набора реагентов (ЗАО Вектор-БЕСТ) на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad Laboratories). В качестве гена сравнения использовали малую РНК U6. Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 6.0, меры центральной тенденции и рассеяния описаны медианой (Me), нижним (Lq) и верхним (Hq) квартилями; достоверность различия рассчитывалась по U-критерию Манна-Уитни и принималась при значениях p < 0,05.

### Результаты и обсуждение

По полученным данным, при экспериментальном РМЖ с учетом вида проведенного лечения, как видно из таблицы 1, при РМЖ в сыворотке крови крыс линии Wistar выявлены статистически значимые изменения уровней микроРНК (табл. 1). В частности в контрольной группе животных отмечено статистически значимое снижение уровней микроРНК-21 в сравнении с интактными особями. Это, скорее всего, связано с различной реактивностью особей на МНМ. Генетически по-

рода крыс не однородна, интенсивность метаболизма у особей также может различаться и поэтому они по-разному отвечают динамикой развития опухоли молочной железы, и, следовательно, могут различаться по уровню исследуемых маркеров онкопатологии. Более того, на фоне ПХТ и сочетания оперативного вмешательства с последующим курсом ПХТ также выявлено статистически значимое снижение уровней микроРНК-21, что, очевидно, является результатом подавления функциональной активности клеток опухоли на фоне курса ПХТ; после удаления основного очага опухоли молочной железы и курса ПХТ даже сохранившиеся метастазы не могут продуцировать более высокие уровни микроРНК. В то же время, на фоне только оперативного лечения или сочетания оперативного удаления опухоли с последующим курсом ПХТ, дополненным терапией экзогенной ДНК, отмечено статистически значимое увеличение уровней микроРНК-21, что указывает на сохранность очагов метастазирования опухоли молочной железы в регионарных лимфоузлах и способность ткани метастазов продуцировать микроРНК.

В отношении сывороточных уровней микроРНК-221 отмечено их статистически значимое увеличение уровней в группах животных, получивших только оперативное вмешательство или подвергнутых операции в сочетании с ПХТ, дополненной экзогенной ДНК, по сравнению с интактными животными и группой РМЖ. Это указывает на сохранность в первом случае очагов отсева клеток опухоли молочной железы, а во втором случае экзогенная ДНК является источником урацила, который «борется» с 5-фторурацилом за связывание и, тем самым, препятствует антипролиферативному действию цитостатических препаратов.

Что же касается уровней в сыворотке крови микроРНК-222, то установлено статистически значимое увеличение их в группе животных подвергшихся оперативному вмешательству по поводу РМЖ. Это может рассматриваться как ответная реакция организма на повреждающее воздействие на ткани и органы в ходе удаления очагов опухоли молочной железы. Выявлено также снижение в сыворотке крови уровней

Таблица 1.  
Уровни микроРНК в сыворотке крови крыс линии Wistar при РМЖ

Параметры	Интактные (1)	РМЖ (2)	РМЖ операция (3)	РМЖ операция +ПХТ (4)	РМЖ ПХТ (5)	РМЖ операция +ПХТ+фрДНК (6)
микроРНК-21	1,09 (0,68-1,46)	0,52 (0,09-1,30) <sup>1</sup>	1,37 (0,63-2,26) <sup>2,5</sup>	0,46 (0,21-0,91) <sup>1,3</sup>	0,22 (0,00-0,82) <sup>1</sup>	1,22 (0,31-1,98) <sup>2,5</sup>
микроРНК-221	1,06 (0,51-1,30)	2,45 (0,90-6,03)	3,59 (1,90-6,45) <sup>1,2,5</sup>	2,02 (1,40-3,02) <sup>1,2,5</sup>	0,64 (0,29-1,70)	5,99 (1,85-13,91) <sup>1,2,5</sup>
микроРНК-222	0,71 (0,26-0,92)	0,80 (0,56-2,98)	2,65 (0,48-5,12) <sup>1,2,5</sup>	0,59 (0,29-1,60) <sup>3</sup>	0,35 (0,03-0,70)	1,14 (0,56-1,23) <sup>2,5</sup>
микроРНК-429	0,70 (0,50-2,23)	0,07 (0,06-0,16) <sup>1</sup>	0,20 (0,01-13,02)	0,27 (0,08-2,70)	0,11 (0,04-0,42) <sup>1</sup>	0,19 (0,01-0,61) <sup>1</sup>

Примечание: здесь и далее РМЖ - рак молочной железы, индуцированный нитрозомочевинной; ПХТ - полихимиотерапия; операция - проведено оперативное удаление опухоли молочной железы; фрДНК - терапия фрагментированной ДНК из плаценты человека; 1,2,3,4,5,6 - группы животных; достоверность различия между группами p < 0,05.

Таблица 2.  
Количество и функциональная активность клеток гемо- и лимфопоэза, пролиферативный потенциал клеток и уровни продукции цитокинов у крыс линии Wistar при РМЖ

Параметры	РМЖ					
	Интактные (1)	контроль (2)	операция (3)	операция+ПХТ (4)	ПХТ (5)	операция+ПХТ+фрДНК (6)
Абсолютные значения количества клеток						
МНК (10 <sup>6</sup> )	4,25 (3,87-6,12)	4,0 (3,5-5,1)	8,0 (2,0-10,0)	6,0 (4,05-8,0)	7,25 (4,75-10,75)	4,4 (4,0-7,5)
Спленоциты (10 <sup>6</sup> )	287,5 (277-300)	262,5 (250-275)	675 (450-675) <sup>2,3,4,5</sup>	119 (102-136) <sup>1,3</sup>	350 (300-400) <sup>1,2,3,4</sup>	350 (350-420) <sup>1,2,3,4</sup>
КМ (10 <sup>6</sup> )	207,5 (195-225)	68,75 (62,5-77,5) <sup>1</sup>	160 (155-175) <sup>1,2,5</sup>	153 (144-156,5) <sup>1,2,5</sup>	87,5 (83,75-93,75) <sup>1</sup>	135,0 (120-155) <sup>1,2,5</sup>
КМ-ММСК (10 <sup>6</sup> )	1,25 (1,1-1,3)	0,42 (0,40-0,45) <sup>1</sup>	2,9 (2,8-3,0) <sup>1,3</sup>	0,75 (0,722-0,77) <sup>1,2,3</sup>	0,75 (0,722-0,77) <sup>1,2,3</sup>	1,2 (1,05-1,2) <sup>2,3,5</sup>
Пролиферативный потенциал клеток костного мозга						
Спонтанная	0,359 (0,349-0,359)	0,369 (0,364-0,374) <sup>1</sup>	0,456 (0,450-0,460) <sup>1,2</sup>	0,133 (0,131-0,136) <sup>1,2,3</sup>	0,309 (0,304-0,314) <sup>1,2,3,4</sup>	0,232 (0,230-0,232) <sup>1,2,3,4,5</sup>
Кона-	0,651 (0,646-0,656)	0,563 (0,558-0,568) <sup>1,3</sup>	0,799 (0,790-0,810) <sup>1</sup>	0,272 (0,267-0,285) <sup>1,2,3,5</sup>	0,283 (0,274-0,293) <sup>1,2,3</sup>	0,437 (0,430-0,437) <sup>1,2,3,4,5</sup>
Пролиферативный потенциал спленоцитов						
Спонтанная	0,083 (0,070-0,107)	0,790 (0,780-0,795) <sup>1</sup>	0,400 (0,397-0,417) <sup>1,2</sup>	0,252 (0,247-0,265) <sup>1,2,3,5</sup>	0,363 (0,359-0,374) <sup>1,2,3</sup>	0,170 (0,160-0,170) <sup>1,2,3,4,5</sup>
Кона-	0,063 (0,057-0,074)	0,651 (0,649-0,656) <sup>1</sup>	0,420 (0,410-0,431) <sup>1,2</sup>	0,179 (0,172-0,189) <sup>1,2,3</sup>	0,160 (0,152-0,170) <sup>1,2,3</sup>	0,148 (0,148-0,150) <sup>1,2,3,4</sup>
Пролиферативный потенциал мононуклеаров лимфы грудного протока						
Спонтанная	0,192 (0,162-0,215)	0,304 (0,257-0,316) <sup>1,4</sup>	0,226 (0,212-0,294)	0,354 (0,347-0,380) <sup>1,3</sup>	0,215 (0,204-0,278) <sup>4</sup>	0,267 (0,263-0,309) <sup>1</sup>
Кона-	0,240 (0,189-0,281)	0,235 (0,205-0,304) <sup>4</sup>	0,301 (0,251-0,312)	0,413 (0,355-0,456) <sup>1,3</sup>	0,300 (0,197-0,405)	0,257 (0,210-0,326) <sup>4</sup>

Таблица 2. Продолжение

Параметры	Интактные (1)	РМЖ				ПХТ (5)	операция+ПХТ+фрД НК (6)
		контроль (2)	операция (3)	операция+ПХТ (4)	ПХТ (5)		
Уровни продукции цитокинов клетками костного мозга							
IL1 спонтанный	232 (229-234,6)	310,5 (309-312,4) <sup>1</sup>	292 (290-295,8) <sup>1,2</sup>	221,2 (219-222,7) <sup>1,2,3</sup>	235 (231-237,9) <sup>2,3,4</sup>	207 (205-208) <sup>1,2,3,4,5</sup>	
IL1 Кона	217,5 (212,5-220,5)	318,5 (315,5-321,4)	222 (218-228,4) <sup>2</sup>	250,5 (249,5-251,5) <sup>1,2,3</sup>	254 (249,5-259,3) <sup>1,2,3</sup>	214 (210-214) <sup>1,2,3,4,5</sup>	
TNF спонтанный	500,5 (497,5-501,6)	507,5 (504,5-509,8)	503 (499-507,8) <sup>1,2</sup>	463 (459,5-466,3) <sup>1,2,3</sup>	508,5 (503,5-509,7) <sup>3,4</sup>	470 (470-471) <sup>1,3,4</sup>	
TNF Кона	532,7 (529-537,7)	531,5 (529,5-535,5)	540 (528-549,2) <sup>1,2</sup>	515 (507-521) <sup>1,2,3</sup>	514 (510-518) <sup>1,2,3</sup>	469 (468-470) <sup>3,4,5</sup>	
TGF 1 спонтанный	6015 (6005-6025)	5645 (550-5695) <sup>1</sup>	6200 (6190-6210) <sup>2</sup>	5705 (5695-5720) <sup>1,2,3</sup>	5720 (5695-5750) <sup>1,2,3</sup>	6080 (6010-6090) <sup>1,2,3</sup>	
TGF 1 Кона	6285 (6265-6295)	5990 (5940-6005) <sup>1</sup>	6120 (6110-6120) <sup>2</sup>	6095 (6045-6140) <sup>1,3</sup>	6020 (6005-6195)	6300 (6290-6370) <sup>1,2,3</sup>	
Уровни продукции цитокинов спленocyтaми							
IL1 спонтанный	241,7 (239-243,7)	280 (279-282) <sup>1</sup>	260 (258-264,4) <sup>1,2</sup>	243,5 (241,5-244,6) <sup>2,3</sup>	260,5 (259,5-261,7) <sup>1,3,4</sup>	218 (215-220) <sup>1,2,3,4,5</sup>	
IL1 Кона	371,5 (369,5-375,5)	241,7 (237-249,7) <sup>1</sup>	266 (260-266,4) <sup>1,2</sup>	215,1 (210,5-218,6) <sup>1,2</sup>	237 (235,5-238,9) <sup>1,2,3,4</sup>	210 (210-211) <sup>1,2,3,4</sup>	
TNF спонтанный	506 (502,5-508,5)	779,4 (773-782,4) <sup>1</sup>	660 (658-661,2) <sup>1,2</sup>	475 (469-480,2) <sup>1,2</sup>	521 (519-522) <sup>1,2,3,4</sup>	480 (478-481) <sup>1,2,3,4,5</sup>	
TNF Кона	534 (529,5-542)	745 (735-755,4) <sup>1</sup>	596 (590-600) <sup>2</sup>	529 (516-539,4) <sup>2</sup>	539 (537-542) <sup>2</sup>	538 (518-540) <sup>1,2,3,4,5</sup>	
TGF 1 спонтанный	5915 (5905-5930)	5925,5 (5910,5-5935) <sup>1</sup>	6270 (6100-6300) <sup>2</sup>	5730 (5695-5770) <sup>1,2,3</sup>	5915 (5905-5930) <sup>2,4</sup>	5990 (5900-6000) <sup>2,4</sup>	
TGF 1 Кона	6250 (6195-6345)	6655 (6610-6690)	6290 (6280-6300) <sup>1,2</sup>	5890 (5835-5915) <sup>1,2</sup>	5595 (5297,5-5605) <sup>1,2,3,4</sup>	5790 (5780-5800) <sup>1,2,3,4,5</sup>	
Уровни продукции цитокинов мононуклеарными лимфоцитами грудного протока							
IL1 спонтанный	229,6 (200,1-255,7)	257,2 (250-261)	228,4 (213,6-241,4) <sup>2</sup>	232,2 (203,8-245,35) <sup>2</sup>	216,4 (206,4-261,4)	210 (208,2-219,2) <sup>2</sup>	
IL1 Кона	223 (200,1-245,2)	294 (260,6-349,5)	260,6 (241,4-260,6) <sup>2</sup>	217,3 (210-238,9) <sup>2</sup>	228,4 (211,8-274,5)	228 (215,4-228,4) <sup>2,3</sup>	
TNF спонтанный	505 (498,1-513,3)	529,8 (507,8-573,3)	522,2 (505-532,6)	498,4 (473,6-508)	497,1 (477,5-515)	488,6 (488,6-513,2)	
TNF Кона	509,1 (502,3-513,2)	586,8 (541,3-675,5)	505 (469,4-518,8) <sup>2</sup>	477,7 (458,5-519) <sup>2</sup>	528,7 (495,7-560,7)	515 (510,6-552)	
TGF 1 спонтанный	5872,5 (5820-6337,5)	5745 (5700-5850)	6570 (5700-10920)	5760 (5722,5-5910)	6060 (5775-6225)	6120 (5790-6240)	
TGF 1 Кона	6045 (5850-6360)	5685 (5565-5940)	6240 (5970-6300)	6045 (5940-6270)	5835 (5775-5910) <sup>3,4</sup>	6120 (5910-6360)	

микроРНК-429 в группе животных с РМЖ по сравнению с интактными животными, что является косвенным доказательством активного опухолевого процесса в организме.

Анализ количества клеток в лимфе грудного протока не выявил статистически значимых различий между сравниваемыми группами, что, скорее всего, является результатом восстановления параметров гемо- и лимфопоэза после курса ПХТ (табл. 2). Выявлены различия по количеству спленоцитов, клеток костного мозга и КМ-ММСК между некоторыми группами особей с РМЖ с учетом вида проводимого лечения. Это указывает на различный регенеративный потенциал органов гемо- и лимфопоэза, который зависит от вида лечения.

Также выявлены различия в пролиферативном потенциале МНК у особей после оперативного удаления опухоли молочной железы и курса ПХТ в группе, получавшей экзогенную ДНК, и в группе РМЖ по сравнению с интактными особями (табл. 2). Стимуляция МНК Кона была сопоставима во всех группах, за исключением группы, получившей курс ПХТ после оперативного вмешательства. У особей после оперативного удаления РМЖ и в группе РМЖ без дополнительных воздействий выявлено увеличение спонтанной пролиферации клеток КМ. В большинстве групп, за исключением особей, подвергшихся только оперативному удалению опухоли, отмечено статистически значимое снижение стимулированной пролиферативной активности клеток КМ. Продемонстрировано и увеличение спонтанной и митоген-стимулированной пролиферации спленоцитов во всех группах по сравнению с интактными животными. Таким образом, с учетом типа клеток гемо- и лимфопоэза, функциональная активность их зависит от вида проведенного лечения.

Не выявлено различий по спонтанному уровню продукции TNF $\alpha$  МНК лимфы грудного протока между сравниваемыми группами, но обнаружено статистически значимое увеличение уровней продукции TNF $\alpha$  в контрольной группе РМЖ и в группе особей с добавлением к лечению экзогенной ДНК после стимуляции клеток Кона (табл. 2).

Уровни спонтанной продукции TNF $\alpha$  клетками КМ в группе особей получавших курс ПХТ, были статистически достоверно снижены по сравнению с другими группами особей. Отмечено снижение уровней спонтанной продукции спленоцитами TNF $\alpha$  в группах особей после оперативного лечения в сочетании с курсом ПХТ и в группе с лечением экзогенной ДНК. В ответ на митогенный стимул спленоциты продуцировали TNF $\alpha$  в достоверно большей степени в группе РМЖ, не подвергшейся дополнительным воздействиям.

Уровни продукции МНК IL1 $\beta$  у животных с РМЖ были больше по сравнению с группой особей после оперативного удаления РМЖ и в группе после курса ПХТ или экзогенной ДНК (табл. 2). Выявлено, что уровни спонтанной и митоген-стимулированной продукции клетками КМ IL1 $\beta$  статистически значимо снижены в группе особей после курса ПХТ. Продукции IL1 $\beta$  спленоцитами снижалась в группе животных после курса ПХТ и экзогенной ДНК. МНК, клетки КМ и спленоциты после курса ПХТ продуцировали TGF $\beta$ 1 достоверно менее интенсивно (табл. 2).

Таким образом, в группе животных РМЖ, получавших терапию фрагментированной ДНК, выявлена тенденция к снижению спонтанной продукции провоспалительных цитокинов (TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ ) клетками кроветворения и лимфоидной тканью и увеличение уровней спонтанной продукции иммуносупрессорного фактора (TGF $\beta$ 1) мононуклеарными клетками из лимфы грудного протока, что может свидетельствовать о выраженной иммуносупрессии в данной группе животных. Соответственно, представлялось важным изучить взаимосвязи уровней микроРНК с количественными и функциональными показателями клеток гемо- и лимфопоэза при РМЖ.

Оказалось, что уровни микроРНК-21 были сопряжены с количеством клеток КМ у интактных животных ( $r=-0,88$ ;  $p=0,019$ ). Кроме этого, уровни микроРНК-21 были взаимосвязаны с уровнями митоген-активированной продукции лимфоцитами интактных животных TNF $\alpha$  ( $r=0,88$ ;  $p=0,019$ ), с уровнями спонтанной и митоген-активированной продукции клетками КМ IL1 $\beta$  ( $r=-0,88$ ;  $p=0,019$ ) и уровнями митоген-активированной продукции спленоцитами TNF $\alpha$  и TGF $\beta$ 1 ( $r=-0,88$ ;  $p=0,019$ ). В группе животных, получавших терапию фрагментированной ДНК, выявлены сопряженности сывороточных уровней микроРНК-21 с количеством спленоцитов ( $r=0,79$ ;  $p=0,034$ ).

Уровни микроРНК-221 оказались сопряжены с уровнями спонтанной продукции лимфоцитами TNF $\alpha$  и IL1 $\beta$  ( $r=-0,78$ ;  $p=0,022$ ), а также с уровнями митоген-активированной продукции лимфоцитами TGF $\beta$ 1 ( $r=-0,78$ ;  $p=0,022$ ). В отношении взаимосвязей микроРНК-221 с уровнями продукции цитокинов клетками КМ и селезенки выявлены следующие связи: с уровнями спонтанной продукции TNF $\alpha$  и с уровнями митоген-активированной продукции IL1 $\beta$  клетками КМ, а также спонтанной продукции IL1 $\beta$  и митоген-активированной продукции TGF $\beta$ 1 спленоцитами ( $r=0,78$ ;  $p=0,022$ ).

Для микроРНК-222 отмечена сопряженность с количеством спленоцитов ( $r=0,87$ ;  $p=0,005$ ) и интенсивностью спонтанной пролиферации лимфоцитов ( $r=0,78$ ;  $p=0,022$ ), а также с интен-

сивностью спонтанной и митоген-активированной пролиферации спленоцитов ( $r=0,78$ ;  $p=0,022$  и  $r=-0,78$ ;  $p=0,022$  соответственно) в группе, получившей ПХТ. В группе животных, получившей ПХТ, выявлены сопряженности уровней микроРНК-222 со следующими параметрами: с количеством спленоцитов, уровнями спонтанной и митоген-активированной продукции TNF $\alpha$  и уровнями спонтанной продукции IL1 $\beta$  лимфоцитами ( $r=-0,78$ ;  $p=0,022$ ), а также с уровнями спонтанной ( $r=-0,78$ ;  $p=0,022$ ) и митоген-активированной ( $r=0,78$ ;  $p=0,022$ ) продукции TNF $\alpha$  и митоген-активированной продукции TGF $\beta$ 1 ( $r=-0,87$ ;  $p=0,005$ ) клетками КМ. Уровни спонтанной ( $r=-0,78$ ;  $p=0,022$ ) и митоген-активированной ( $r=-0,87$ ;  $p=0,005$ ) продукции TNF $\alpha$  и митоген-активированной продукции IL1 $\beta$  ( $r=-0,78$ ;  $p=0,022$ ) спленоцитами также были сопряжены с уровнями микроРНК-222. В группе животных, получивших терапию фрагментированной ДНК, выявлены сопряженности сывороточных уровней микроРНК-222 с интенсивностью спонтанной ( $r=-0,92$ ;  $p=0,007$ ) и митоген-активированной ( $r=-0,86$ ;  $p=0,024$ ) пролиферации лимфоцитов. Кроме этого, уровни микроРНК-222 взаимосвязаны с уровнями спонтанной ( $r=-0,88$ ;  $p=0,019$ ) и митоген-активированной ( $r=-0,86$ ;  $p=0,024$ ) продукции TNF $\alpha$  лимфоцитами, а также с уровнями спонтанной продукции IL1 $\beta$  ( $r=0,94$ ;  $p=0,001$ ) и митоген-активированной продукции TGF $\beta$ 1 ( $r=-0,81$ ;  $p=0,049$ ) спленоцитами.

В отношении сывороточных уровней микроРНК-429 выявлены сопряженности с количеством спленоцитов в группе животных, получивших добавочно терапию фрагментированной ДНК ( $r=0,86$ ;  $p=0,012$ ). Выявлена взаимосвязь уровней микроРНК-429 с уровнями спонтанной продукции лимфоцитами животных, получивших ПХТ TNF $\alpha$  ( $r=0,73$ ;  $p=0,039$ ). Кроме этого отмечено наличие сопряженности между уровнями микроРНК-429 и уровнями митоген-активированной продукции TNF $\alpha$  ( $r=0,84$ ;  $p=0,015$ ) и митоген-активированной продукции TGF $\beta$ 1 ( $r=0,94$ ;  $p=0,001$ ) клетками КМ в группе животных, дополнительно получивших терапию фрагментированной ДНК. Помимо этого, установлены взаимосвязи между уровнями в сыворотке крови микроРНК-429 и уровнями митоген-активированной продукции TNF $\alpha$  спленоцитами в группе животных, получивших в дополнение терапию фрагментированной ДНК ( $r=0,94$ ;  $p=0,001$ ).

Полученные нами данные по изменению уровней микроРНК при экспериментальной модели РМЖ не противоречат данным литературы. В частности, в работе [5] отмечено нарушение экспрессии микроРНК клетками печени. Показана aberrantная сверхэкспрессия микроРНК-21 клетками РМЖ, индуцированного введением МНМ [2].

Таким образом, сывороточные уровни микроРНК зависят от вида проведенного лечения у животных по поводу РМЖ и сопряжены с параметрами гемо- и лимфопоэза, что необходимо учитывать при выборе тактики лечения данной патологии у человека.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Беседнова Н.Н., Федянина Л.Н. Противоопухолевое действие экзогенной дезоксирибонуклеиновой кислоты // Тихоокеанск. мед. журнал. - 2009. - № 3. - С. 12-18.
2. Hui C., Yujie F., Lijia Y. et al. MicroRNA-34a and microRNA-21 play roles in the chemopreventive effects of 3,6-dihydroxyflavone on 1-methyl-1-nitrosourea-induced breast carcinogenesis // Breast Cancer Research. - 2012. - Vol. 14. - P. 80-91.
3. Jin L.H., Wei C. Role of microRNAs in the Warburg effect and mitochondrial metabolism in cancer // Asian Pac. J. Cancer Prev. - 2014. - Vol. 15. - P. 7015-7019.
4. Juhasz K., Gombos K., Gocze K. et al. Effect of N-methyl-N-nitrosourea on microRNA expression in CBA/CA mice // J. Environ. Occup. Sci. - 2012. - Vol. 1. - P. 77-82.
5. Li Z., Branham W.S., Dial S.L. et al. Genomic analysis of microRNA time-course expression in liver of mice treated with genotoxic carcinogen N-ethyl-N-nitrosourea // BMC Genomics. - 2010. - Vol. 11. - P. 609- 622.
6. Shah M.Y., Calin G.A. MicroRNAs miR-221 and miR-222: a new level of regulation in aggressive breast cancer // Genome Medicine. - 2011. - Vol. 3. - P. 56-59.

Поступила в редакцию 20.01.2015 г.

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

#### **Associativity of microRNA levels in blood serum to quantity and functional activity of haemo - and lymphopoiesis cells in experimental breast cancer**

<sup>1</sup>Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology

<sup>2</sup>Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology

<sup>3</sup>Research Institute of Molecular Biology and Biophysics  
Novosibirsk

The work purpose was to reveal an existence of an associativity of the microRNA levels in blood serum to quantitative and functional indices of cells haemo - and lymphopoiesis at the experimental breast cancer induced by N - methyl - N - nitrosourea in the remote period after surgery and carrying out neoadjuvant polychemotherapy. At animals there were investigated levels of microRNA-21, microRNA-221, microRNA-222 and microRNA-429 in serum, also investigated quantitative and functional parameters of cells from bone marrow, from lymph of a chest channel and from spleen. Statistically significant distinctions on the microRNA level in blood serum and an existence of interrelations of microRNA levels with quantitative and functional indices of haemo- and lymphopoiesis cells were revealed.

Key words: N - methyl - N - nitrosourea, microRNA, breast cancer, proliferative potential, cytokines