

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ В ЛИМФЕ ГОРМОНОВ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В ПАТОГЕНЕЗ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У КРЫС ЛИНИИ WISTAR

А.П. Лыков¹, Н.А. Бондаренко¹, О.В. Повещенко¹, А.В. Кабаков¹,
Т.В. Райтер¹, О.В. Казаков¹, Д.Н. Струнkin², А.Ф. Повещенко¹, В.И. Коненков¹

ФГБУ «НИИ КЭЛ» СО РАМН, г. Новосибирск¹,
ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, г. Новосибирск²
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2, e-mail: aplykov2@mail.ru¹

Целью исследования явилась оценка уровней гормонов, вовлеченных в патогенез рака молочной железы в лимфе грудного протока. **Методы.** РМЖ индуцировали введением N-метил-N-нитрозомочевина у крыс линии Wistar. Часть животных подвергалась только оперативному вмешательству или же только полихимиотерапии (циклофосфан, метотрексат, 5-фторурацил). У части животных сочетали оперативное вмешательство с последующим курсом ПХТ, а также у части животных дополнительно проводили терапию фрагментированной ДНК. В лимфе исследовали содержание фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), пролактина, лютеинизирующего гормона (ЛГ), эстрадиола (E_2) и тироглобулина (ТГ). **Результаты.** Показано, что оперативное удаление опухоли молочной железы приводит к снижению уровней ЛГ и E_2 в лимфе. Сочетание операции с курсом ПХТ приводит к снижению уровней ФСГ в лимфе. ПХТ без оперативного удаления опухоли молочной железы приводит к уменьшению концентрации E_2 в лимфе. **Заключение.** Концентрация половых гормонов и тироглобулина в лимфе грудного протока при РМЖ у крыс зависит от вида проводимого лечения.

Ключевые слова: рак молочной железы, неoadъювантная полихимиотерапия, половые гормоны, тироглобулин, лимфа.

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE CONTENT IN LYMPH OF HORMONES DRAWING
IN PATHOGENESIS OF BREAST CANCER IN RATS WISTAR
A.P. Lykov¹, N.A. Bondarenko¹, O.V. Poveschenko¹, A.V. Kabakov¹, T.V. Rayter¹, O.V. Kazakov¹,
D.N. Strunkin², A.F. Poveschenko¹, V.I. Konenkov¹
FSBI «Scientific institution of clinical and experimental lymphology» SB RAMS, Novosibirsk¹,
FSBI «Scientific institution of clinical immunology» SB RAMS Novosibirsk²
2, Timakova Street, 630117-Novosibirsk, Russia, e-mail: aplykov2@mail.ru¹

The aim of the research was to study the levels of hormones involved in the pathogenesis of BC in the lymph of the thoracic duct. **Methods.** BC induced by the introduction of n-methyl-N-nitrosourea rats of Wistar breed. The animals underwent only surgery chemotherapy (cyclophosphamide, methotrexate, 5-fluorouracil). In some animals combined surgery followed by a course of chemotherapy, and in some animals advanced therapy fragmented DNA. In the lymph examined the contents of the follicle-stimulating hormone (FSH), prolactin, luteinizing hormone (LH), estradiol (E_2) and thyroglobulin (TG). **Results.** It is shown that surgical removal of tumors in the mammary gland leads to lower levels in the lymph LH and E_2 . The combination of surgery with a course of chemotherapy leads to lower levels in the lymph FSH. Chemotherapy without surgical removal of tumors in the mammary gland leads to a decrease in the concentration of E_2 in the lymph. **Conclusion.** The concentration of sex hormones and thyroglobulin in the lymph of the thoracic duct in breast cancer in rats depends on the type of treatment.

Key words: breast cancer, neoadjuvant polychemotherapy, sex hormones, thyroglobulin, lymph.

РМЖ – наиболее распространенная онкологическая патология у женщин во всем мире [2]. Известно, что уровень половых гормонов ассоциируется с риском развития РМЖ [3–5, 7, 9, 11]. Риск развития РМЖ высок и при заболеваниях щитовидной железы [10]. Более того, уровни гормонов служат прогностическим критерием резистентности к проводимой терапии и риска метастазирования РМЖ. Половые гормоны и гормоны щитовидной железы, помимо влияния

на органы и ткани репродуктивной системы, оказывают влияние на пролиферацию и дифференцировку эпителия молочных желез, а также на клетки иммунной системы, обеспечивающие противоопухолевый иммунитет. Известно, что эпителий молочных желез продуцирует и секретирует гормоны, которые по принципу аутокринного действия оказывают влияние на процессы пролиферации и дифференцировки тканей молочной железы [3, 7, 9, 11].

Целью исследования явилась оценка уровней гормонов, вовлеченных в патогенез РМЖ, в лимфе грудного протока при экспериментальной модели РМЖ у крыс линии Wistar и их взаимосвязи с видом проводимого лечения.

Материал и методы

Эксперименты на лабораторных животных проведены в соответствии с соблюдением принципов Хельсинкской декларации ВМА (2000). Эксперименты выполнены на 25 неполовозрелых крысах-самках линии Wistar. Животные содержались на стандартной лабораторной диете и имели свободный доступ к воде. У 21 крысы РМЖ индуцировали N-метил-N-нитрозомочевинной (30 мг/кг, Sigma-Aldrich, США). Через 6 мес у 13 крыс оперативно удалили опухоль молочной железы, и далее 5 особей получили полихимиотерапию (ПХТ), а еще 5 животным дополнительно к ПХТ подключили лечение фрагментированной ДНК, 3 особи не получали адъювантной химиотерапии, они составили группу контроля оперативного способа лечения РМЖ. Также были группа животных, получавших только ПХТ (n=4), и группа животных, в которой не проводилось никакого лечения (n=4). Курс ПХТ включал: 5-фторурацил (Ebewe, Австрия, в дозе 15 мг/кг внутривентриально, в 1-й и 8-й день), метотрексат (Ebewe, Австрия, в дозе 2,5 мг/кг внутривентриально, в 1-й и 8-й день) и циклофосфан (ОАО «Биохимия», Саранск, в дозе 3 мг/кг внутривентриально, ежедневно в течение 14 дней). Курс терапии фрагментированной ДНК (5 мг/кг) проводили путем внутривентриального введения, в течение 14 дней, препарат вводился через 3 ч после инъекции циклофосфана. В экспериментах использовали субстанцию препарата Панаген с содержанием фрагментированной ДНК 1,7 мг/мл. Курс терапии экзогенной ДНК назначался для устранения побочных эффектов цитостатических препаратов. Кроме этого, ранее было показано противоопухолевое действие экзогенной ДНК [1].

Животных из эксперимента выводили через 6,5 мес под наркозом (40 мг/кг нембутана внутривентриально; Sigma-Aldrich, США), что обуславливалось необходимостью прижизненного сбора лимфы из грудного лимфатического протока. Уровни гормонов в лимфе определяли иммуноферментным анализом с использованием коммерческих наборов: «ГонадотропинИФА-ЛГ»,

«ГонадотропинИФА-ФСГ», «ИФА-Пролактин-01», «ТириодИФА-ТГ» (ООО «Компания Алкор Био», СПб., Россия) и Estradiol ELISA (DRG Diagnostics, Германия), согласно инструкции.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 6.0. Меры центральной тенденции и рассеяния описаны медианой (Me), нижним (Lq) и верхним (Hq) квартилями. Значимость различий рассчитывалась по U-критерию Манна – Уитни и принималась при значениях $p < 0,05$.

Результаты исследования

В лимфе грудного протока крыс породы Wistar выявлены различные уровни гормонов (таблица). Необходимо отметить, что нами не выявлено статистически значимых различий по уровням содержания в лимфе грудного протока животных пролактина. Однако было отмечено статистически значимое снижение уровней ФСГ в лимфе животных, подвергшихся оперативному вмешательству с последующей ПХТ, по сравнению с аналогичными показателями у интактных животных, в контрольной группе (РМЖ без лечения), у прооперированных животных и в группе животных, которым, помимо операции и ПХТ, дополнительно вводилась фрагментированная ДНК ($p < 0,05$). Также выявлено статистически значимое снижение уровней ЛГ в лимфе животных, подвергшихся только оперативному вмешательству, по сравнению с интактными животными, с группой прооперированных животных с последующей ПХТ, животными, получавшими только ПХТ, и контрольной группой животных без лечения РМЖ ($p < 0,05$). Установлено статистически значимое снижение уровней E_2 в лимфе животных с РМЖ, подвергшихся либо оперативному вмешательству, либо ПХТ, по сравнению с интактной группой животных ($p < 0,05$). При оценке уровня ТГ в лимфе животных статистически значимых различий между группами не выявлено.

Обсуждение

Известно, что пролактин синтезируется не только в гипофизе, но и другими типами тканей организма [3, 7], что может объяснить отсутствие различий в уровнях содержания его в лимфе экспериментальных животных по сравнению с интактными животными, а также в группах с учетом типа проведенного лечения. Показано, что ФСГ и

**Уровни содержания гормонов в лимфе грудного протока у крыс Wistar
в норме и при раке молочной железы (Me; Lq-Hq)**

Группы животных	Пролактин	ФСГ	ЛГ	E ₂	ТГ
1. Контрольная	544,1 (510,2–578,0)	19,6 (17,8–21,4) p ₁₋₄ =0,021	5,7 (4,6–6,8) p ₁₋₂ =0,021	526,8 (518,4–535,2) p ₁₋₂ =0,021 p ₁₋₄ =0,021	6,3 (6,2–6,8)
2. Операция	549,5 (530,8–549,5)	17,8 (17,5–17,8) p ₂₋₄ =0,021	4,0 (3,2–4,0) p ₂₋₄ =0,021 p ₂₋₅ =0,021 p ₂₋₆ =0,014	478,0 (478,0–487,2)	6,3 (6,1–6,3)
3. Операция + ПХТ+ фрДНК	539,7 (479,7–558,4)	18,6 (17,8–19,0) p ₃₋₄ =0,014	6,4 (2,3–6,6)	490,0 (469,5–524,4)	7,7 (6,6–8,2)
4. Операция + ПХТ	492,3 (492,3–542,4)	16,3 (15,4–16,3) p ₄₋₆ =0,014	5,7 (5,7–6,5)	444,6 (444,6–572,2)	7,0 (6,2–7,0)
5. ПХТ	514,7 (510,2–578,0)	13,9 (10,0–19,3)	5,7 (5,3–6,5)	490,6 (481,5–504,0)	6,1 (5,5–6,7)
6. РМЖ без лече- ния	545,9 (541,5–600,2)	20,2 (18,7–35,6)	4,7 (4,6–6,1)	501,6 (492,1–517,0)	6,5 (6,4–7,8)

Примечание: E₂ – эстрадиол, ФСГ – фолликулостимулирующий гормон; ЛГ – лютеинизирующий гормон; ТГ – тиреоглобулин; фрДНК – фрагментированная ДНК из плаценты человека; p – значимость различий.

рецепторы к нему вовлечены в развитие рака половых органов, инициацию пролиферации, дифференцировки и метастазирование через активацию аденилатциклазы. А высокие уровни ФСГ являются диагностическим признаком плохого прогноза при РМЖ [11]. Выявленное увеличение уровней в лимфе ФСГ на фоне терапии экзогенной ДНК, скорее всего, является результатом влияния ДНК, выделенной из тканей плаценты, способных активировать продукцию ряда биологически активных веществ, в том числе и гормонов. Известно, что ЛГ выявляется в клетках РМЖ и участвует в прогрессировании опухолевого очага через взаимодействие с рецептором к нему [11]. Установлено, что высокие уровни E₂ ассоциированы с риском развития РМЖ [5, 11], в то же время высокие уровни E₂ при ожирении у женщин в постменопаузе, наоборот, снижают риск развития РМЖ [9]. В работе D.P. Rose et al. [8] было показано, что проводимая химиотерапия у женщин с РМЖ приводила к статистически значимому снижению в плазме уровней E₁ + E₂ и увеличению уровней ЛГ и ФСГ спустя 6 и 10 мес после завершения лечения. Стресс, в том числе и хирургической этиологии, приводит к изменению

в тканях и биологических средах уровней различных биологически активных веществ, включая половые гормоны и гормоны щитовидной железы [6]. Показано, что при патологии щитовидной железы увеличивается риск развития РМЖ. Более того, через взаимодействие тиреоидных гормонов с рецепторами к ним осуществляется дифференцировка клеток молочной железы в норме и активация пролиферации клеток при РМЖ [10].

Закключение

Уровни половых гормонов и гормонов щитовидной железы выявляются в лимфе грудного протока крыс линии Wistar как в норме, так и при раке молочной железы. Уровни некоторых половых гормонов при РМЖ зависели от типа проводимой терапии экспериментального рака молочной железы, индуцированного введением нитрозомочевины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беседнова Н.Н., Федянина Л.Н. Противоопухолевое действие экзогенной дезоксирибонуклеиновой кислоты // Тихоокеанский медицинский журнал. 2009. № 3. С. 12–18.
2. Стенина М.Б., Фролова М.А. Рак молочной железы: наиболее важные научные события и выводы последних лет // Практическая онкология. 2011. № 1. С. 6–11.
3. Bernichtein S., Touraine P., Goffin V. New concepts in prolactin

biology // J. Endocrinology. 2010. Vol. 206 (1). P. 1–11. doi: 10.1677/JOE-10-0069.

4. Clemons M., Goss P. Estrogen and the risk of breast cancer // N. Engl. J. Med. 2001. Vol. 344 (4). P. 276–285.

5. 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. Vol. 103 (7). P. 562–570. doi: 10.1093/jnci/djr031.

6. Figueiredo H.F., Ulrich-Lai Y.M., Choi D.C., Herman J.P. Estrogen potentiates adrenocortical responses to stress in female rats // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2007. Vol. 292 (4). P. 1173–1182.

7. Nitze L.M., Galsgaard E.D., Din N., Lund V.L., Rasmussen B.B., Berchtold M.W., Christensen L., Panina S. Reevaluation of the proposed autocrine proliferative function of prolactin in breast cancer // Breast Cancer Res. Treat. 2013. Vol. 142 (1). P. 31–44. doi: 10.1007/s10549-013-2731-7.

8. Rose D.P., Davis T.E. Effects of adjuvant chemohormonal therapy on the ovarian and adrenal function of breast cancer patients // Cancer Res. 1980. Vol. 40 (11). P. 4043–4047.

9. Suba Z. Circulatory estrogen level protects against breast cancer in obese women // Recent. Pat. AntiCancer Drug Discov. 2013. Vol. 8 (2). P. 154–167.

10. Szychta P., Szychta W., Gesing A., Lewiński A., Karbownik-Lewińska M. TSH receptor antibodies have predictive value for breast cancer – retrospective analysis // Thyroid Research. 2013. Vol. 6 (1). P. 8–15. doi: 10.1186/1756-6614-6-8.

11. 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 // Oncology letters. 2013. Vol. 6 (4). P. 1128–1132.

Поступила 24.11.14

REFERENCES

1. Besednova N.N., Fedyanina L.N. Anticancer effect of exogenous deoxyribonucleic acid // Tihookeanskij medicinskij zhurnal. 2009. № 3. P. 12–18. [in Russian]

2. Stenina M.B., Frolova M.A. Breast cancer: the most important scientific events and the conclusions of the last years // Prakticheskaja onkologija. 2011. № 1. P. 6–11. [in Russian]

3. Bernichtein S., Touraine P., Goffin V. New concepts in prolactin biology // J. Endocrinology. 2010. Vol. 206 (1). P. 1–11. doi: 10.1677/JOE-10-0069.

4. Clemons M., Goss P. Estrogen and the risk of breast cancer // N. Engl. J. Med. 2001. Vol. 344 (4). P. 276–285.

5. 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. Vol. 103 (7). P. 562–570. doi: 10.1093/jnci/djr031.

6. Figueiredo H.F., Ulrich-Lai Y.M., Choi D.C., Herman J.P. Estrogen potentiates adrenocortical responses to stress in female rats // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2007. Vol. 292 (4). P. 1173–1182.

7. Nitze L.M., Galsgaard E.D., Din N., Lund V.L., Rasmussen B.B., Berchtold M.W., Christensen L., Panina S. Reevaluation of the proposed autocrine proliferative function of prolactin in breast cancer // Breast Cancer Res. Treat. 2013. Vol. 142 (1). P. 31–44. doi: 10.1007/s10549-013-2731-7.

8. Rose D.P., Davis T.E. Effects of adjuvant chemohormonal therapy on the ovarian and adrenal function of breast cancer patients // Cancer Res. 1980. Vol. 40 (11). P. 4043–4047.

9. Suba Z. Circulatory estrogen level protects against breast cancer in obese women // Recent. Pat. AntiCancer Drug Discov. 2013. Vol. 8 (2). P. 154–167.

10. Szychta P., Szychta W., Gesing A., Lewiński A., Karbownik-Lewińska M. TSH receptor antibodies have predictive value for breast cancer – retrospective analysis // Thyroid Research. 2013. Vol. 6 (1). P. 8–15. doi: 10.1186/1756-6614-6-8.

11. 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 // Oncology letters. 2013. Vol. 6 (4). P. 1128–1132.