



XIV МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

«ЛИМФОЛОГИЯ: ОТ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
К МЕДИЦИНСКИМ ТЕХНОЛОГИЯМ»

памяти академика Ю.И.Бородина

26-27 марта 2021г.

КОРРЕЛЯЦИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИТОКИНОВ В ЛИМФЕ С КЛЕТОЧНЫМ СОСТАВОМ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ЗОН БРЫЖЕЕЧНЫХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО РМЖ

О.В.Казаков, А.Ф.Повещенко, Н.Б.Орлов, А.В.Кабаков,
А.П.Лыков, В.И.Коненков

*НИИ клинической и экспериментальной лимфологии — филиал
ФГБНУ ФИЦ Института цитологии и генетики СО РАН,
Новосибирск, Россия*

Цель исследования

Выявить взаимосвязь цитокинов лимфы с морфологическими показателями структурно-функциональных зон брыжеечных лимфатических узлов крыс после химиотерапии и после оперативного лечения РМЖ.

Материалы и методы:

Работа выполнена на 80 половозрелых самках крыс Вистар (возраст 3 мес). Экспериментальные группы животных:

1-я - контрольная (интактные животные),

2-я – РМЖ. РМЖ индуцировали (под наркозом) 5-кратным введением N-метил-N-нитрозомочевины (МНМ; "Sigma") с интервалом в 7 сут (подкожно в область 2-й молочной железы справа).

3-я группа – химиотерапия (ХТ) РМЖ. Курс ХТ проводили через 6 мес с момента индукции РМЖ и он включал внутрибрюшинное введение 15 мг/кг 5-фторурацила и 2,5 мг/кг метотрексата на 1-е и 8-е сутки и 3 мг/кг циклофосфана, внутрибрюшинно, ежедневно, однократно в течение 14 сут.

4-я группа – тотальная резекция опухоли молочной железы (через 6 месяцев от момента индукции РМЖ).

Из эксперимента животных выводили через 6.5 мес от момента индукции РМЖ под наркозом.

В структурно-функциональных зонах брыжеечных лимфатических узлов подсчитывали абсолютное количество клеток на стандартной площади 2025 мкм². Данные представлены как медиана (Me), нижний и верхний квартили (Q1; Q3).

Концентрации цитокинов в лимфе грудного лимфатического протока оценивали методом проточной флюориметрии на 2-лучевом лазерном автоматизированном анализаторе Bio-Plex Assay System (Bio-Rad) с использованием коммерческой тест-системы (определяемый динамический диапазон 2-32 000 пкг/мл) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя Bio-Plex Pro Rat Cytokone 24-Plex Assay (Bio-Rad). При статистической обработке значения цитокинов, выходявшие за нижнюю границу чувствительности метода (<2 пкг/мл), принимали за 1 пкг/мл. Достоверность различий рассчитывали по *U* критерию Манна-Уитни. Различия между группами считали достоверными при $p < 0.05$. Сопряженность между исследуемыми параметрами (цитокинами и клетками структурных зон лимфатических узлов) оценивали по коэффициенту ранговой корреляции Спирмена.

Таблица 1. Клеточный состав структурно-функциональных зон БЛУ крыс Вистар в контроле, при химически индуцированном РМЖ, после оперативного лечения РМЖ и после химиотерапии при $p < 0,05$, Me (LQ-HQ).

Клетки	Интактные животные (1)	РМЖ (2)	Химиотерапия РМЖ (3)	Операция РМЖ (4)
Герминативные центры вторичных лимфоидных узлов				
ИМ	8,4 (7,2-9,0)	9,4 (9,4-9,8) ¹	3,2 (3,0-3,4) ^{1,2}	6,6 (6,4-6,6) ^{1,2,3}
СЛ	16,0 (15,6-16,6)	15,0 (14,0-15,2)	9,2 (8,8-10,2) ^{1,2}	12,6 (12,4-13,4) ^{1,2,3}
МЛ	40,4 (37,4-40,6)	26,4 (26,4-26,6) ¹	32,0 (31,4-32,8) ^{1,2}	50,2 (49,8-0,6) ^{1,2,3}
МФ	3,4 (3,0-3,6)	5,2 (4,8-5,4) ¹	1,6 (1,6-1,8) ^{1,2}	4,0 (3,8-4,2) ^{1,2,3}
РК	5,0 (4,8-6,0)	4,2 (4,2-4,6)	4,6 (4,2-4,8)	6,2 (5,8-6,2) ^{2,3}
Митозы	1,6 (1,4-1,6)	2,6 (2,2-2,6) ¹	0,0 (0,0-0,4) ^{1,2}	2,0 (2,0-2,2) ^{1,3}
Паракортикальная зона				
ИМ	1,2 (0,8-1,2)	0,6 (0,4-0,6) ¹	0,2 (0,2-0,4) ¹	0,6 (0,2-0,8)
СЛ	4,6 (4,6-5,2)	4,0 (4,0-4,4) ¹	3,8 (3,8-4,8)	6,0 (5,0-6,6) ^{2,3}
МЛ	77,6 (75,6-82,0)	63,3 (62,6-66,8) ¹	83,6 (82,2-83,8) ²	72,8 (70,6-73,0) ^{2,3}
МФ	2,8 (2,8-3,0)	4,8 (4,8-5,8) ¹	1,0 (1,0-1,2) ^{1,2}	2,2 (2,0-2,4) ^{1,2,3}
РК	3,6 (3,4-4,0)	4,4 (4,0-4,6)	3,8 (3,4-3,8) ²	6,0 (5,6-6,2) ^{1,2,3}
ТК	0,2 (0,0-0,2)	0,2 (0,0-0,2)	0,2 (0,2-0,4)	0,2 (0,2-0,2)
Мозговые тяжи				
СЛ	5,2 (5,0-7,2)	7,0 (6,8-7,8)	8,8 (6,0-8,8)	6,8 (6,4-8,0)
МЛ	17,4 (17,4-17,8)	11,8 (11,4-12,2) ¹	14,8 (14,6-15,2) ^{1,2}	18,6(18,4-19,0) ^{2,3}
ИМ	1,4 (1,4-1,6)	1,2 (1,2-1,6)	1,4 (1,2-1,4)	2,0 (2,0-2,2) ^{1,2,3}
НПл	4,8 (4,8-5,2)	5,0 (5,0-7,0)	12,4 (11,2-13,8) ^{1,2}	10,4 (9,6-12,6) ^{1,2}
ЗПл	21,4 (20,6-24,0)	16,0 (15,2-17,6) ¹	21,4 (20,6-21,6) ²	21,8 (21,6-21,8) ²
МФ	2,8 (2,4-2,8)	6,0 (6,0-6,2) ¹	3,8 (3,6-4,0) ^{1,2}	2,6 (2,6-2,6) ^{2,3}
РК	3,2 (2,8-3,4)	6,0 (5,8-6,2) ¹	7,4 (7,2-8,0) ^{1,2}	7,0 (6,4-7,4) ^{1,2}
Митозы	0,2 (0,2-0,4)	0,6 (0,4-0,8)	0,2 (0,2-0,4)	0,4 (0,4-1,4)
НФ	0,2 (0,2-0,2)	0,2 (0,2-0,2)	0,2 (0,2-0,2)	0,0 (0,0-0,2)
Мозговые синусы				
СЛ	4,0 (3,8-4,6)	3,4 (3,0-4,0)	3,0 (3,0-3,8)	5,2 (5,0-5,6) ^{1,2,3}
МЛ	18,0 (16,8-18,8)	11,4 (10,4-11,8) ¹	10,2 (9,8-10,2) ¹	6,2 (5,2-6,2) ^{1,2,3}
ИМ	0,8 (0,8-0,8)	1,0 (1,0-1,2) ¹	0,4 (0,2-0,4) ^{1,2}	0,4 (0,2-0,4) ^{1,2}
НПл	4,8 (4,4-5,0)	3,6 (3,0-3,8) ¹	4,2 (3,8-4,4)	2,8 (2,8-2,8) ^{1,2,3}
ЗПл	14,2 (13,0-14,4)	9,2 (9,2-9,6) ¹	14,0 (13,0-14,4) ²	14,0 (13,0-14,4) ²
МФ	2,2 (2,0-2,4)	4,4 (4,4-5,4) ¹	2,4 (2,4-2,6) ²	2,4 (2,2-2,6) ²
РК	5,8 (4,8-6,0)	6,6 (6,0-6,6)	6,2 (5,2-6,2)	6,6 (6,6-6,6)
ТК	0,2 (0,2-0,2)	0,2 (0,0-0,2)	0,0 (0,0-0,4)	0,2 (0,2-0,2)
НФ	0,0 (0,0-0,4)	0,2 (0,0-0,2)	0,2 (0,2-0,4)	0,4 (0,0-0,6)

Примечание. $p < 0,05$. ИМ — иммунобласты, СЛ — средние лимфоциты, МЛ — малые лимфоциты, НПл — незрелые плазмоциты, ЗПл — зрелые плазмоциты, РК — ретикулярные клетки, МФ — макрофаги, ТК — тучные клетки, НФ — нейтрофилы. 1, 2, 3 — обозначено статистически значимое отличие от величины соответствующих экспериментальных групп.

После ХТ РМЖ взаимосвязь концентрации цитокинов в лимфе с клетками структурно-функциональных зон брыжеечных лимфатических узлов, по сравнению с РМЖ без лечения, указывает на влияние ХТ на местный иммунный ответ. На это может указывать уменьшение в герминативных центрах (см. табл. 1), по сравнению с РМЖ без лечения, количества, средних лимфоцитов и митотически делящихся клеток, макрофагов. При этом увеличено количество малых лимфоцитов в герминативных центрах и мозговых тяжах. В мозговых тяжах после ХТ возросло количество незрелых и зрелых плазматических клеток. В мозговых синусах также увеличено количество плазматических клеток.

После оперативного лечения РМЖ, по сравнению с ХТ РМЖ, в герминативных центрах увеличено количество иммунобластов в 2 раза, средних лимфоцитов – на 37, малых лимфоцитов - на 57%, митотически делящихся клеток - в 2 раза, макрофагов - в 2,5 раза. В паракортикальной зоне уменьшено количество малых лимфоцитов, увеличено количество средних лимфоцитов на 58% и макрофагов – на 38%. В мозговых тяжах возросло количество малых лимфоцитов на 26%, иммунобластов. В мозговых тяжах и синусах, до значений интактной группы, увеличено количество зрелых плазматических клеток. В мозговых синусах уменьшено количество малых лимфоцитов и незрелых плазматических клеток.

Таблица 2. Положительные связи клеток структурно-функциональных зон брыжеечных лимфатических узлов с цитокинами лимфы крыс с РМЖ, после оперативного лечения РМЖ (Опер) и после химиотерапии (ХТ) при $p < 0,05$. Приведен коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r).

Группы	Клетки	IL-1a	IL-5	IL-7	IL-12	IL-17	IL-18	GR O/K C	IFN γ	M-CSF	MIP-1a	MIP-3a	MC P-1
Герминативные центры вторичных лимфоидных узлов													
РМЖ	ИМ		-		-	-	-	0,95	-	-	-	-	-
	СЛ		-		-	-	-	-	-	-	0,9	-	-
	РК		-		0,95	-	-	-	-	-	-	-	-
	М		0,98		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Опер	МЛ	0,95	-		0,98	-	-	-	-	-	-	0,9	-
	РК	0,88							0,89				
ХТ	ИМ		-		-	-	-	-	-	-	0,98	-	-
	СЛ		-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
	МЛ		-		-	-	-	-	0,9	-	-	-	-
	МФ					-	-		0,98				
Паракортикальная зона													
РМЖ	МФ	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	0,95
	ТК	-	0,95		-	-	-	-	-	-	-	-	-
	РК	-	-		-	-	-	-	-	0,9	-	-	-
Опер	МЛ	-	-		-	-	-	-	0,9	-	-	-	-
Мозговые тяжи													
РМЖ	СЛ		-		-	-	-	-	-	-	0,9	-	-
	М		0,9		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Опер	НФ			0,89									
ХТ	ИМ		-		-	-	-	-	-	0,98	-	-	-
	ЗПл					0,98	-						
	М		-		-	-	-	-	0,98	-	-	-	-
	НФ		-		0,9	-	-	-	-	-	-	-	-
Мозговые синусы													
РМЖ	МЛ	-	-		-	-	-	0,9	-	-	-	-	-
	ИМ	-	-		-	-	-	-	0,89	-	-	0,89	-
	ЗПл	-	-		-	-	-	0,97	-	-	-	-	-
Опер	СЛ	-	0,98		-	-	-	0,98	-	-	-	-	-
	НФ	-	-		-	-	0,95	-	-	-	-	-	-
ХТ	ЗПл	-	-		-	-	0,9	-	-	-	-	-	-

Примечание. $p < 0,05$. ИМ — иммунобласты, СЛ — средние лимфоциты, МЛ — малые лимфоциты, М — митозы, РК — ретикулярные клетки, МФ — макрофаги, НП — незрелые плазмциты, ЗПл — зрелые плазмциты, НФ – нейтрофилы, ТК — тучные клетки.

О влиянии ХТ на местный иммунный ответ может также свидетельствовать корреляция IFN γ (см. табл. 2) с количеством малых лимфоцитов и макрофагов в герминативных центрах и митотически делящимися клетками (не имеют достоверных отличий от группы РМЖ) в мозговых тяжах. Эта зависимость может быть обусловлена действием IFN γ , который обладает иммуномодулирующим и противоопухолевым действием, усиливая цитотоксические реакции, опосредованные Т-лимфоцитами. При этом в Т-зависимой зоне возросло количество малых лимфоцитов. О влиянии ХТ на местный иммунный ответ также указывает корреляция MIP-1a с иммунобластами в герминативных центрах и взаимосвязь IL-17 со зрелыми плазматическими клетками в мозговых тяжах. Основное действие IL-17 заключается в активации нейтрофилов и макрофагов в месте воспаления, а также в усилении активности большинства цитокинов, особенно провоспалительных. К провоспалительным цитокинам относится и IL-12, который имеет корреляцию с нейтрофилами в мозговых тяжах. Также выявлена взаимосвязь IL-18 со зрелыми плазматическими клетками в мозговых синусах. IL-18 способствует преимущественной дифференцировке Т-хелперов 0 в Т-хелперы 1. Кроме того, IL-18 приводит к образованию GM-CSF и тем самым усиливает лейкопоз. По биологическим эффектам IL-18 является функциональным дублером и синергистом интерлейкина IL-12.

После оперативного лечения РМЖ (см. табл.2) обнаруженные корреляционные зависимости, могут быть обусловлены тотальной резекцией опухоли молочной железы, повышением иммуномодулирующего и противоопухолевого действия цитокинов. Об этом может свидетельствовать корреляция концентрации провоспалительных цитокинов IL-1a и IL-12 с малыми лимфоцитами, количество которых повышено в герминативных центрах вторичных лимфоидных узлов. Основная роль плеiotропного цитокина IL-1a заключается в инициации и поддержании воспаления, а IL-12 является ключевым цитокином для усиления клеточно-опосредованного иммунного ответа. На повышение активности иммунного ответа, по сравнению с ХТ РМЖ, могут также указывать взаимосвязь количества малых лимфоцитов герминативных центров с хемокином MIP-3a, проявляющим антимикробную, противовирусную и антипротозойную активность, отвечающим за индукцию миграции эффекторных или Т-клеток памяти и В-клеток, а также корреляция IFN γ с малыми лимфоцитами паракортикальной зоны. Об этом также может свидетельствовать взаимосвязь IL-5 и хемокина GRO/KC (определяющего хемотаксис иммунокомпетентных клеток) со средними лимфоцитами (количество которых увеличено) в мозговых синусах, а также увеличение количества малых лимфоцитов в мозговых синусах, на фоне восстановления количества зрелых плазматических клеток. При этом отмечаются также положительные связи количества нейтрофилов в мозговых тяжах с IL-7, а в мозговых синусах – с IL-18. Основной особенностью IL-18, во взаимодействии с IL-12, является индукция IFN- γ , а IL-7 является ключевым цитокином, регулирующим гомеостаз наивных и Т-клеток памяти.

Вывод: После оперативного лечения РМЖ, по сравнению с химиотерапией РМЖ, морфологические преобразования в брыжеечных лимфатических узлах свидетельствуют о повышении активности местного иммунного ответа. При сравнении эффекта оперативного лечения РМЖ с химиотерапией РМЖ обнаружены корреляции концентрации цитокинов лимфы со структурными изменениями в лимфатических узлах, которые могут быть обусловлены тотальной резекцией опухоли молочной железы, повышением активности местного иммунитета и противоопухолевого действия цитокинов.