

УДК:616-006.04.602:575.853

Світліна Г. М.^{1,2}, Калмикова О. О.¹, Шелест Д. В.¹, Скачкова О. В.³, Гарманчук Л. В.¹, Шаблій В. А.²¹Навчально-науковий центр «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Київ, Україна²Інститут клітинної терапії, Київ, Україна³Національний інститут раку, Київ, Українаe-mail: anja.onishchenko@gmail.com

КЛІТИННА ІМУННА ВІДПОВІДЬ У ЩУРІВ З 1,2-ДИМЕТИЛГІДРАЗИН-ІНДУКОВАНИМ РАКОМ ТОВСТОЇ КИШКИ ПІСЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ КЛІТИН ПЛАЦЕНТИ

РЕЗЮМЕ

В статті описано стан імунної системи на пізній стадії 1,2-диметилгідрозин (ДМГ)-індукованого раку товстої кишки та після введення мультипотентних клітин з плаценти (ПМК). Індекси маси селезінки та тимуса не відрізнялися між групами інтактних щурів та тварин з ДМГ-індукованими пухлинами, а також не було виявлено змін після наступного введення їм ПМК. Крім того, не було виявлено різниці в спонтанній або стимульованій фагоцитарній активності перитонеальних макрофагів у здорових щурів або тварин з ДМГ-індукованим раком товстої кишки (з введенням або без ПМК). Проте проліферація Т-клітин селезінки була нижчою у щурів з раком, незалежно від введення ПМК. Також не було виявлено ніяких змін в розподілі за клітинним циклом проліферуючих клітин селезінки після стимуляції ліпополісахаридом. Наші дані показують відсутність активної реакції перитонеальних макрофагів і клітин селезінки на середній та пізній стадії раку товстої кишки. Крім того, застосування ПМК не призводить до суттєвої протипухлинної імунної відповіді.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: 1,2-диметилгідрозин, рак товстої кишки, плацентарні мультипотентні клітини, імунна відповідь.

На сьогоднішній день значна увага привернута до запалення як одного з основних факторів ризику в розвитку раку товстої кишки [1-3]. Сучасні дослідження зосереджені на оцінці змін в активності імунної системи на різних стадіях розвитку раку. Одним з нових підходів до стимулювання протипухлинної імунної відповіді є застосування терапії з використанням плацентарних мультипотентних клітин (ПМК), в основі якої лежить імуномодулюючий ефект клітин плаценти при внутрішньовенному введенні [4, 5].

Дослідження ролі асоційованих з пухлиною макрофагів у розвитку раку товстої кишки проводяться досить давно, але в якій мірі загальна активність макрофагів змінюється на різних стадіях раку, залишається незрозумілим. Активовані макрофаги, як відомо, виробляють прозапальні цитокіни і посилюють клітинну цитотоксичність. Проте активовані макрофаги пухлини можуть стимулювати розвиток нових судин і її прогресування [6]. Таким чином, дані щодо ролі і участі тканинних макрофагів в розвитку раку товстої кишки досить суперечливі. Ілюструючи неоднозначність сьогоденного розуміння участі макрофагальної системи в патогенезі раку, асоційовані

з пухлиною макрофаги продемонстрували здатність до стимуляції росту пухлини, ангиогенезу і метастазування на ортотопічній мишичній моделі, [7] а в інших дослідженнях зменшували метастазування раку товстої кишки [6]. Мало даних щодо залучення перитонеальних макрофагів в імунну відповідь на пізніх стадіях раку товстої кишки. Проте активація перитонеальних макрофагів на ранній стадії раку товстої кишки і раку шлунка може пригнічувати ріст пухлини [8].

Клітини селезінки реагують на патогени, що потрапляють в кров, та відіграють важливу роль в імунологічному нагляді [9]. В селезінці знаходяться компартменти вродженої та адаптивної імунної системи, що забезпечують як негайну реакцію на проникнення мікробів, так і антиген-специфічну імунну відповідь [10]. Проте як саме лімфоцити селезінки реагують на перебіг раку товстої кишки або трансплантацію алогенних стовбурових клітин при ньому, залишається невідомим.

Пухлини товстої кишки на середній та пізній стадіях можуть уникати розпізнавання та елімінації імунною системою [11]. Вважається, що їх втеча від імунної відповіді залежить як від змін самих пухлинних клітин, так і дефектів в функціонуванні імунокомпетентних клі-

тин [12-14]. Плацента відіграє основоположну роль в підтриманні толерантності материнського організму щодо плоду під час вагітності, тому можна припустити, що клітини, присутні в плацентарній тканині, можуть мати імуномодулюючі властивості [5, 15]. Припускають, що застосування ПМК може сприяти запуску імунної реакції на пухлину товстої кишки. Крім того, ПМК є алогенними для реципієнта, тому зміни в активності клітин імунної системи будуть досить очікувані. ПМК мають деякі переваги для клінічного застосування: відсутність етичних обмежень, безболісність процедури, можливість отримання великої кількості стовбурових клітин з низькою імуногенністю [16, 17]. На додаток, ПМК характеризуються низькою експресією молекул головного комплексу гістосумісності МНС класу II, що дає можливість застосовувати їх при алогенній трансплантації [18].

Для кращого розуміння механізмів залучення імунної системи на пізній стадії раку та впливу на ці процеси трансплантованих мультипотентних клітин плаценти ми змодельовали розвиток пухлини товстої кишки у щурів шляхом хімічної індукції з використанням 1,2-диметилгідразину (ДМГ) та дослідили у них показники клітинно-імунітету.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

ВИДІЛЕННЯ І КУЛЬТИВУВАННЯ ПМК ЩУРІВ

Всі експерименти на тваринах були проведені відповідно до міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Європейська конвенція, Страсбург, 1986) та ст. 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№3447-IV, 21.02.2006), а також стандартам біологічної безпеки. Експериментальний протокол був схвалений комітетом з біоетики навчально-наукового центру «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (протокол № 8, 03.04.14).

Вагітні самки щурів виводились з експерименту на 21-й день вагітності шляхом асфіксії з використанням діоксиду вуглецю. Вилучали плаценти від плодів чоловічої статі (n = 10). Щурячі плаценти промивали в збалансованому сольовому розчині Хенкса, який містив 2,5 мг/мл амфотерицину В, 50 мг/мл стрептомицину і 100 од/мл пеніциліну (Sigma, США). Ворсинчасту тканину розсікали на шматочки розміром приблизно 1-5 мм³ за допомогою хірургічних ножиць і пінцетів, а потім промивали у збалансованому сольовому розчині Хенкса. Фрагменти тканини вносили в чашки для культивування клітин. Для сприяння міграції клітин з тканини на поверхню культурального флакона додавали середовище DMEM з високим вмістом глюкози, яке містило 10 % фетальної сироватки корів (ФСК). Первинні культури культивували в CO₂-інкубаторі в умовах зволоженого повітря з 5 % CO₂ при температурі +37 °C. Поживне середовище змінювали двічі на тиждень. При досягненні 90 % конфлюентності моношару клітини обробляли сумішшю розчинів 0,05 % трипсину та 0,02 % EDTA. Отриману суспензію клітин вносили в культуральний флакон з розрахунку 5•10³ клітин/см².

Для підтвердження мультипотентності отримані з плаценти клітини було спрямовано до диференціювання (n = 3) в остеогенному та адипогенному напрямках, а також визначено експресію поверхневих маркерів, властивих мезенхімальним стовбуровим клітинам. Остеогенне середовище, в яке вносили клітини 3-го пасажу і культивували їх протягом 21 доби, складалося з DMEM та містило 10⁻⁷ М дексаметазону (Sigma, США), 10 мМ β-гліцерофосфату (Sigma, США) і 0,1 мМ аскорбат-2-фосфату (Sigma, США). Мінералізований матрикс виявляли фарбуванням 1 % розчином алізаринового червоного. Диференціювання клітин в адипогенному напрямку проводили в середовищі DMEM з додаванням 10 % ФБС, 1 мкМ дексаметазону (Sigma, США), 0,5 мМ ізобутил-метилксантину (Sigma, США), 0,06 мМ індометацину (Sigma, США) і 5 мкг/мл інсуліну (Biochrom, США) протягом 21 доби. Жирові включення виявляли фарбуванням Oil Red O. Як контроль були використані клітини, культивовані протягом того ж терміну в живильному середовищі без факторів диференціювання. Імунофенотипування було проведене з використанням наступних антитіл: PE Mouse Anti-Rat CD90/Mouse CD90.1 (Cat. No. 551401, Becton Dickinson, США), APC-Cy7 Mouse Anti-Rat CD45 (кат. № 561586, Becton Dickinson, США) та FITC CD44 [OX-50] (кат. № GTX76381, GeneTex, США) відповідно до інструкцій виробника. Для дослідження експресії CD29 суспензію клітин фіксували у 2 % забуференому параформальдегіді 20 хв з наступною пермеабілізацією у 0.3 % сапоніні 30 хв, та інкубували з антитілом Integrin beta-1/CD29 [EP1041Y], C-term rabbit monoclonal antibodies (кат. № GTX61413, GeneTex, США) в титрі 1:50. Alexa Fluor 405 conjugate Goat anti-Rabbit IgG (кат. № A-31556, Invitrogen, США) в титрі 1:700 було використано в якості вторинного антитіла. Проточну цитометрію проводили з використанням клітинного сортера BD FACSAria (Becton Dickinson, США). Отримані культури успішно диференціювалися в двох мезодермальних напрямках та мали імунофенотип CD90⁺CD44⁺CD29^{low}CD45⁻, що є підтвердженням мультипотентності виділених з плаценти клітин.

ДИЗАЙН ЕКСПЕРИМЕНТУ IN VIVO

Експерименти проводились на 2-місячних самцях щурів-альбіносів Wistar (n = 122), масою 180-200 г, отриманих з Центрального віварію Навчально-наукового центру «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка. ДМГ (Sigma, США) розчиняли у фізіологічному розчині NaCl (ФР) і доводили до pH 6,5 за допомогою 2 М NaOH безпосередньо перед використанням. Для індукції розвитку пухлини щурам (n = 107) підшкірно раз на тиждень упродовж 20 тижнів вводили 20 мг/кг маси тіла ДМГ в 0,1 мл фізіологічного розчину [19]. Контрольна група (n = 10) отримувала тільки фізіологічний розчин. На рис. 1 показаний протокол введення ДМГ. Фізіологічний розчин або ПМК 3 пасажу вводили внутрішньовенно на 20-му тижні моделювання (n = 59). (табл. 1). На 20-му тижні моделювання 10 випадково обраних щурів виводили з експерименту шляхом асфіксії з використанням діоксиду вуглецю для морфологічного та гістологічного підтвердження утворення пухлин, еквівалентних стадії T1-2N0-1M0 колоректального раку у людини

Табл. 1.
Експериментальні групи тварин.

Примітки:
ДМН – 1,2-диметилгідразин,
ФР – фізіологічний розчин NaCl,
ПМК – плацентарні мультипотентні клітини.

ГРУПА	КІЛЬКІСТЬ ТВАРИН	ДМН-ІНДУКОВАНІЙ РАК ТОВСТОЇ КИШКИ	ВВЕДЕННЯ	ТЕРМІН ВИВЕДЕННЯ З ЕКСПЕРИМЕНТУ, ТИЖД.
Інтактні щури	1	+	-	20
Інтактні щури +ФР, 1 тижд.	5	-	ФР	21
Інтактні щур + ФР, 5 тижд.	5	-	ФР	25
ДМН щури + ФР, 1 тижд.	5	+	ФР	21
ДМН щури + ФР, 5 тижд.	9	+	ФР	25
ДМН щури + ПМК, 1 тижд.	5	+	ПМК	21
ДМН щури + ПМК, 5 тижд.	10	+	ПМК	25

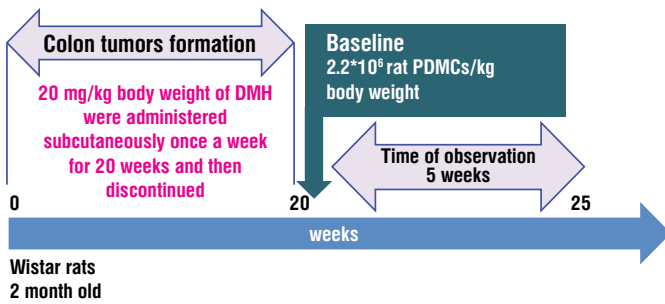
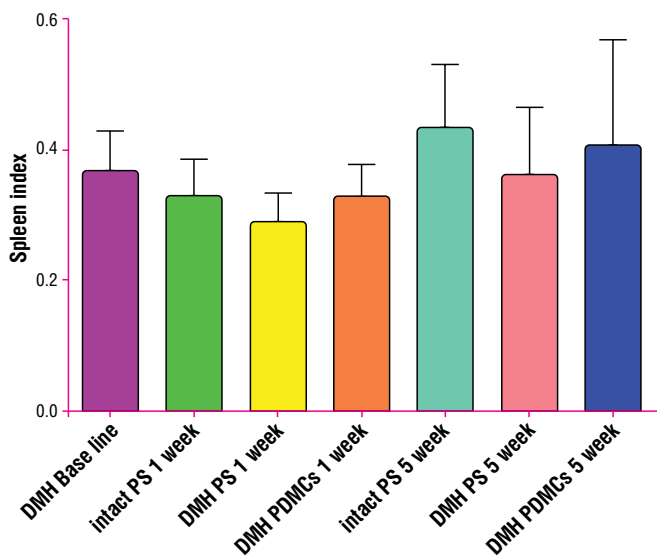


Рис. 1. Схема експерименту. DMH – 1,2-диметилгідразин, PDMCs – плацентарні мультипотентні клітини.

Усіх щурів зважували щотижня. Індеси маси тимуса і селезінки були обчислені відповідно до формули: індекс маси тимуса або селезінки = маса тимуса або селезінки (мг) / маса тіла (г) [16].

ІНДУКОВАНА ПРОЛІФЕРАЦІЯ Т- І В-ЛІМФОЦИТІВ В СЕЛЕЗІНЦІ

Селезінки промивали у середовищі RPMI-1640 з додаванням антибіотиків (100 мкг/мл стрептоміцину і 100 од/мл пеніциліну); гомогенізували і фільтрували через фільтр з розміром пор 100 мкм. Клітини селезінки в кількості $5 \cdot 10^6$ /мл інкубували протягом трьох днів при стандартних умовах культивування в середовищі RPMI-1640 (HyClone, США), яке містило 10 % ФСК, 2 мМ глутаміну, 100 мкг/мл стрептоміцину, 100 од/мл пеніциліну, 25 мМ 2-меркаптоетанолу (Sigma, США). Т-клітини стимулювали фітогемаглютиніном (ФГА) в дозі 30 мкг/мл, а В-клітини стимулювали за допомогою ліпополісахариду (ЛПС) в дозі 100 мкг/мл (Sigma, США). Після цього 10^6 клітин на пробу центрифугували при 300x g протягом 10 хв, ресуспендували в 1 мл гіпотонічного буферу для лізису, що містив 0,1 % цитрату натрію, 0,1 % Тритону Х-100, 5 мкг/мл пропідіум йодиду та інкубували протягом 30 хв. Вміст ДНК в лімфоцитах вимірювали за допомогою проточної цитометрії з використанням цитометра FACS Calibur (BD Biosciences, США). Гістограми клітинного циклу були проаналізовані за допомогою програмного забезпечення Mod Fit LT 3.0 (Verity Software House, США). Індекс стимуляції (IC) розраховували як відношення кількості мітоген-стимульованих проліферуючих клітин до кількості нестимульованих проліферуючих клітин.



ПРОЦЕДУРА ВИДІЛЕННЯ ПЕРИТОНЕАЛЬНИХ МАКРОФАГІВ

Перитонеальні макрофаги щурів збирали в холодному фосфатно-сольовому буфері (ФСБ). Еритроцити лізували в 0,9 % NH_4Cl буфері для лізису. FITC-мічені клітини *St. aureus* (10^9 /мл) були додані до $2 \cdot 10^6$ макрофагів; суміш інкубували протягом 30 хв при $+37^\circ\text{C}$.

Макрофаги без *St. aureus* були використані в якості негативного контролю. 2 мл холодного ФСБ додавали до кожної суспензії, клітини осаджували центрифугуванням при 300x g протягом 5 хв і ресуспендували в 0,4 мл 4 % забуференого формальдегіду. Дані проточної цитометрії отримані з використанням цитометра FACS Calibur (BD Biosciences, США), обладнаного синіми і червоними лазерами, та проаналізовані за допомогою програмного забезпечення Cell Quest-PRO.

ОЦІНКА СТИМУЛЬОВАНОЇ АКТИВНОСТІ NADPH ОКСИДАЗИ ПЕРИТОНЕАЛЬНИХ МАКРОФАГІВ

Спонтанну та індуковану активність перитонеальних макрофагів вимірювали за допомогою тесту відновлення нітросинього тетразолію (НСТ). Для виявлення спонтанної активності (СА) NADPH-оксидази НСТ був доданий до макрофагів в лунки 96-лункового планшета (0,1 мл 0,2 % НСТ додавали до $1 \cdot 10^5$ макрофагів в 0,1 мл середовища). Для виявлення стимульованої активності (СТА) 20 нМ форбол-міристат-ацетату було додано до складу розчину НСТ. Клітини інкубували в стандартних умовах ($+37^\circ\text{C}$, 5 % CO_2) протягом 1 год. Планшети центрифугували при 300x g протягом 10 хв, надосадову рідину обережно видаляли і додавали в кожну лунку 0,2 мл 100 % етанолу. Планшети повторно центрифугували і накопичений формазан вивільняли шляхом ресуспендування клітинного осаду в 0,1 мл 100 мМ гідроксиду калію і 0,1 мл ДМСО на лунку. Оптичну щільність вимірювали за допомогою фотометра NanoDrop Multiscan Spectrum 2000 (Thermo Scientific, США) на довжині хвилі 540 нм. Відсоток спонтанної активності був розрахований за формулою: (абсорбція при СТА – абсорбція при СА) \times 100 % / абсорбція при СА.

СТАТИСТИЧНИЙ АНАЛІЗ

Статистичну обробку даних проводили з використанням однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA з апостеріорним тестом (post-hoc Tukey's test) для виявлення достовірних відмінностей між групами та представляли у вигляді $M \pm SD$. Відмінності вважали статистично значимими при $p < 0,05$.

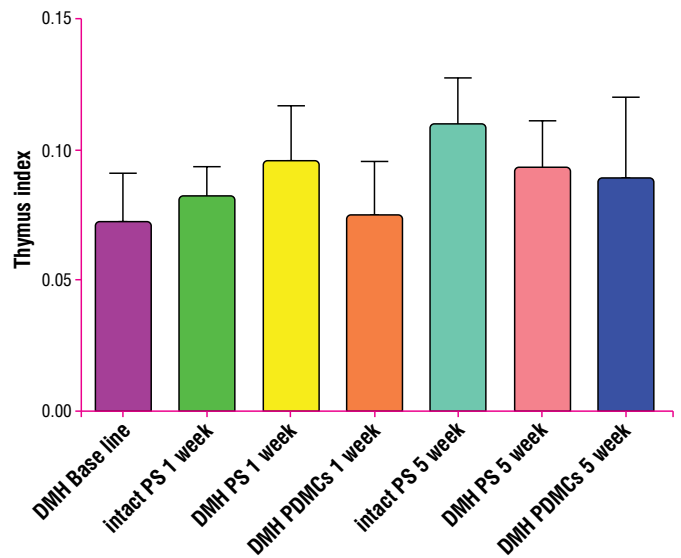


Рис. 2. Індеси маси селезінки та тимуса в експериментальних групах. DMH – 1,2-диметилгідразин, PS – фізіологічний розчин NaCl, PDMCs – плацентарні мультипотентні клітини.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Маса тіла і органів імунної системи у щурів з ДМГ-індукованим раком товстої кишки не залежить від застосування ПМК

Маса тіла інтактних контрольних щурів збільшувалася протягом усього періоду спостереження (до 25-го тижня після моделювання раку), в той час як маса щурів з ДМГ-індукованим раком почала знижуватися через 16 тижнів після індукції. До моменту введення ПМК (20 тижнів після введення ДМГ) середня маса щурів у контрольній і дослідній групі з пухлинами значно відрізнялися (табл. 2). Важливо відзначити, що введення ПМК не призводило до нормалізації маси тіла.

Індекси маси селезінки та тимуса не відрізнялися у інтактних щурів, тварин з ДМГ-індукованим раком + ФР та щурів з пухлинами, яким вводили ПМК на 21-му і 25-му тижні експерименту (рис. 2), демонструючи, що ні розвиток раку товстої кишки, ні подальше введення ПМК безпосередньо не впливають на масу основних органів периферичної імунної системи. На противагу нашим спостереженням на щурах, в інших подібних роботах показано, що індекс маси селезінки у мишей з гепатоцелюлярною карциномою був значно вищим, ніж в групі нормальних тварин [21]. З іншого боку, попередні дослідження продемонстрували, що маса тимуса в групі тварин-носіїв пухлин була значно нижчою, ніж в контрольній групі, і що селезінка при цьому не бере участі в реалізації імунологічної відповіді на прогресування раку [22, 23].

ФАГОЦИТАРНА АКТИВНІСТЬ І СТИМУЛЬОВАНА АКТИВНІСТЬ НАDRH-ОКСИДАЗИ ПЕРИТОНЕАЛЬНИХ МАКРОФАГІВ

Активізація макрофагів необхідна для встановлення контролю над запаленням і прогресуванням захворювань. Антиген-неспецифічні ефекторні клітини, які включають натуральні кілери, макрофаги, нейтрофіли і дендритні клітини, відіграють важливу роль в протипухлинному захисті [24, 25]. Було показано, що стійке системне інгібування активності вищевказаних ефекторних клітин може сприяти розвитку раку і метастазуванню. [26]. ПМК пригнічують проліферацію алореактивних лімфоцитів у змішаній культурі лімфоцитів [15, 27, 28, 29]. Залежно від методу виділення ПМК спостерігається пригнічення або стимулювання проліферативної відповіді Т-лімфоцитів *in vitro* [15]. В той же час на ПМК експресуються молекули МНС-I, але вони не експресують МНС-II (HLA-DR), тому можуть бути використані для алогенних трансплантацій [18, 29, 30].

Таблиця 2. Зміни маси тіла експериментальних тварин.

ГРУПА	СЕРЕДНЯ МАСА ТІЛА, Г					
	1-Й ТИЖД.		20-Й ТИЖД.		25-Й ТИЖД.	
	М	SD	М	SD	М	SD
Інтактні щури + ФР (n = 15)	139,8	30,0	354,4	10,1	387,5	12,9
ДМН-щури + ПМК (n = 48)	155,9	23,8	329,6*	5,7	332,1*	7,0
ДМН-щури + ПМК (n = 59)	155,9	25,5	315,4*	6,5	313,0*	7,7

Примітки: ДМН – 1,2-диметилгідразин, ФР – фізіологічний розчин NaCl, ПМК – плацентарні мультипотентні клітини. * – достовірні відмінності ($p \leq 0.05$) в порівнянні з інтактними тваринами.

Таким чином, ми вирішили дослідити чи призведе пухлина товстої кишки та супутнє застосування ПМК *in vivo* до мобілізації імунокомпетентних клітин в черевну порожнину. Як видно на рис. 3, немає суттєвої різниці в спонтанній і стимульованій активності макрофагів у щурів з раком товстої кишки на пізніх стадіях в порівнянні з контрольними інтактними тваринами. Крім того, не спостерігається ніякого ефекту протягом п'яти тижнів після введення ПМК як в експериментальній, так і в контрольній інтактних групах.

Ранні роботи на моделі карциноми Льюїса у мишей показали, що розвиток пухлини не впливає на спонтанну фагоцитарну активність перитонеальних макрофагів. Однак, всупереч нашим даними, в цих експериментах стимульована фагоцитарна активність перитонеальних макрофагів була підвищеною [31-33]. Можна припустити, що перитонеальні макрофаги не беруть участі в канцерогенезі товстої кишки на пізніх стадіях і не реагують на введення алогенних ПМК.

ІНДУКОВАНА ПРОЛІФЕРАЦІЯ Т- І В-ЛІМФОЦИТІВ СЕЛЕЗІНКИ

Для оцінки функціональної активності Т- і В-лімфоцитів селезінки спленоцити культивували в стерильних умовах у поживному середовищі, яке містило фітогемаглютинін (ФГА) або ліпополісахарид (ЛПС) відповідно. Рак товстої кишки на пізніх стадіях негативно позначився

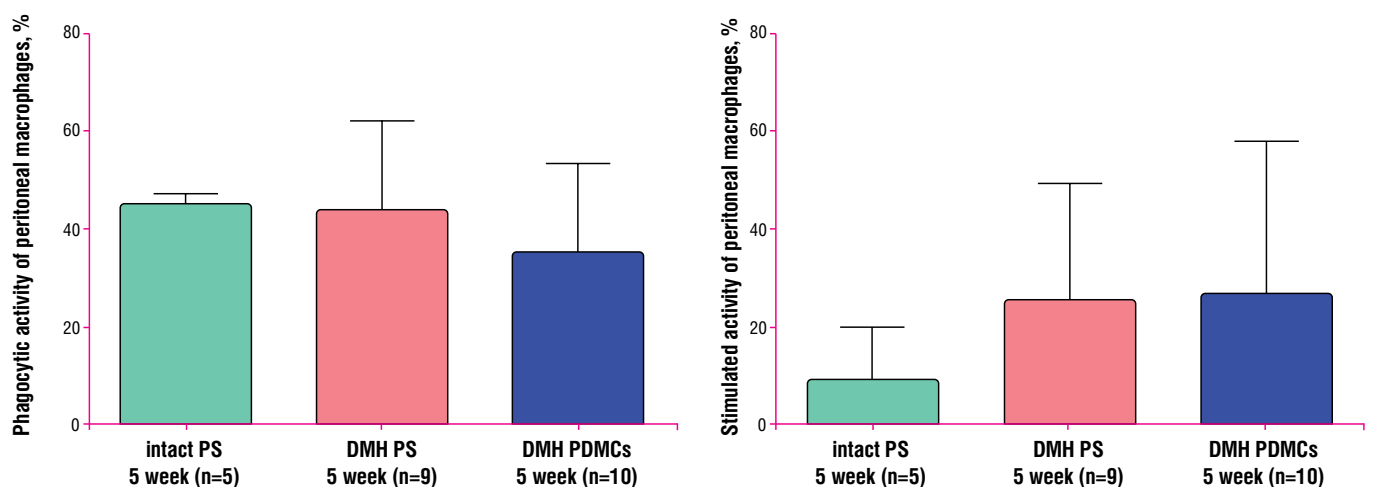


Рис. 3. Фагоцитарна активність перитонеальних макрофагів в експериментальних групах. ДМН – 1,2-диметилгідразин, PS – фізіологічний розчин NaCl, PDMCs – плацентарні мультипотентні клітини.

на проліферативному статусі як Т-, так і В-клітин. У щурів з ДМГ-індукованими пухлинами була знижена проліферативна активність нестимульованих лімфоцитів. Як видно на **рис. 4, А**, у тварин з раком зменшувався відносний вміст лімфоцитів в S і G2/M фазах клітинного циклу, в той час як кількість лімфоцитів в фазі G0/G1 була збільшена у порівнянні з інтактними контрольними тваринами. Введення ПМК не впливало на проліферативний потенціал лімфоцитів. Крім того, у щурів з ДМГ-індукованими пухлинами рівень проліферації Т-клітин був нижчим (**рис. 4, В**) та достовірно не змінювався після введення ПМК. Цікаво, що хоча проліферативний статус Т-клітин і був зниженим, ми не виявили будь-яких змін в рівнях В-клітинної проліферації (**рис. 4, С**). Подібно до наших результатів, в дослідженнях інших авторів не було виявлено будь-яких достовірних відмінностей в профілях

клітинного циклу лімфоцитів селезінки у тварин з моделлю гепатоцелюлярної карциноми [34].

Рак товстого кишківника негативно впливав на проліферацію Т-клітин у щурів, а введення їм ПМК суттєво не змінювало проліферацію як Т-, так і В-лімфоцитів і макрофагів. Крім того, ми виявили значне зниження проліферації ФГА-стимульованих Т-клітин, отриманих від тварин з раком через 25 тижнів після введення ДМГ, в порівнянні з Т-клітинами, отриманими через 20 тижнів (**рис. 4, В**). На відміну від цього, чітко простежувались зміни клітинного циклу нестимульованих Т-клітин в цій групі і на 25-му, і на 20-му тижні після індукції пухлин. Зростання проліферативної активності Т-клітин у тварин паралельної інтактної групи на 25 тижнів проти 20 тижнів може вказувати на залежність цього показника від віку.

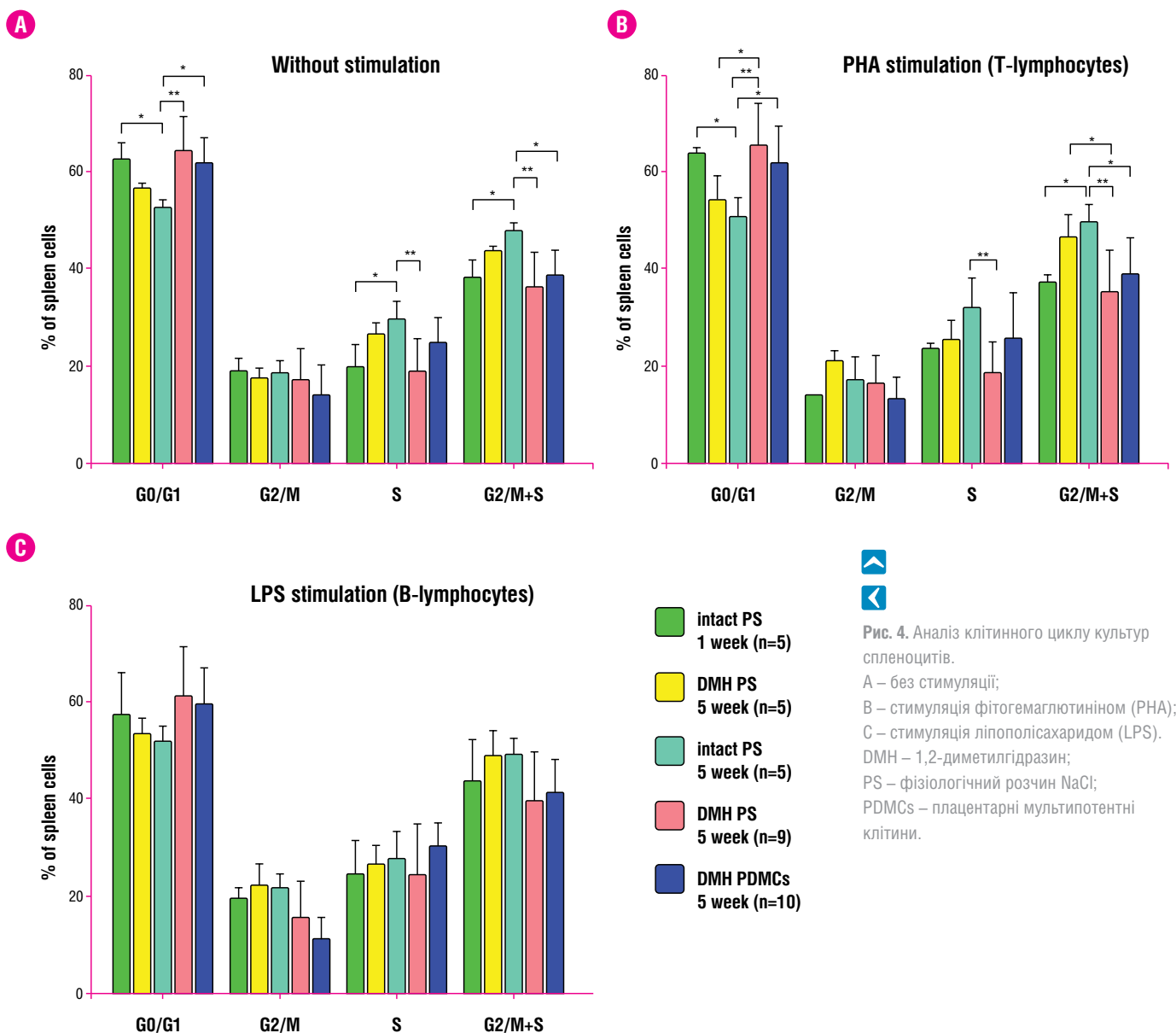


Рис. 4. Аналіз клітинного циклу культур спленоцитів. А – без стимуляції; В – стимуляція фітогемаглютиніном (PHA); С – стимуляція ліпополісахаридом (LPS). DMH – 1,2-диметилгідразин; PS – фізіологічний розчин NaCl; PDMCs – плацентарні мультипотентні клітини.

ВИСНОВКИ

Показники імунної системи у щурів з диметилгідразин-індукованим раком товстої кишки в середні та пізні строки після індукції змінюються. Індeksi маси селезінки і тимуса не відрізнялися у інтактних тварин після введення ДМГ та у тварин з ДМГ-індукованим раком, незалежно від введення плацентарних мультипотентних клітин, хоча маса тіла при раку зменшувалась. Наявність раку товстої кишки з введенням або без ПМК не впливала на спонтанну нестимульовану фагоцитарну активність перитонеальних макрофагів. Проте відзначено пригнічення проліферації спленоцитів в групі тварин з пухлинами. Більш того, клітинно-опосередкований імунітет був пригнічений у щурів з раком товстого кишківника незалежно від введення ПМК. Також не було виявлено ніяких змін в профілі клітинного циклу стимульованих ліпополісахаридом В-клітин селезінки. Цей результат виявився несподіваним, оскільки відомо про дозозалежне інгібування в умовах співкультування плацентарними стовбуровими клітинами проліферації алогенних Т-клітин, стимульованих фітогемаглютиніном [18], в той час як в нашому дослідженні не було ніяких змін в проліферації лімфоцитів при введенні ПМК.

Таким чином, введення ПМК не стимулює функціональну активність імунної системи на середніх та пізніх стадіях раку товстої кишки, ймовірно, через відсутність безпосереднього контакту з лімфоцитами в селезінці. Наші результати можуть доповнити існуючі дані про системну імунну реакцію перитонеальних макрофагів та лімфоцитів селезінки на пізніх стадіях типового перебігу диметилгідразин-індукованого колоректального раку в щурів, а також при введенні їм стовбурових клітин плаценти.

ЛІТЕРАТУРА

1. Krzystek-Korpacka M. Profiles of circulating inflammatory cytokines in colorectal cancer (CRC), high cancer risk conditions, and health are distinct. Possible implications for CRC screening and surveillance [Text] / M. Krzystek-Korpacka, D. Diakowska, B. Kapturkiewicz, et al. // Cancer Lett. – 2013. – Vol. 337, № 1. – P. 107-14.
2. Risk factors for ulcerative colitis-associated colorectal cancer in a Hungarian cohort of patients with ulcerative colitis: results of a population-based study [Text] / L. Lakatos, G. Mester, Z. Erdelyi, et al. // Inflamm Bowel Dis. – 2006. – Vol. 12, № 3. – P. 205-11.
3. Prognostic value of circulating cytokines for stage III colon cancer [Text] / W. S. Lee, J. H. Baek, D. H. You, et al. // J Surg Res. – 2013. – Vol. 182, № 1. – P. 49-54.
4. Paludan C., Edinger J. W., Harbacheuski R., Murray R. A., Hariri R. J. Immunomodulation using placental stem cells. US Patent, no US 20150140044 A1, 2015.
5. Evangelista M. Placenta-derived stem cells: new hope for cell therapy? [Text] / M. Evangelista, M. Soncini, O. Parolini // Cytotechnology. – 2008. – Vol. 58, № 1. – P. 33-42.
6. van der Bij G. J. Tumor infiltrating macrophages reduce development of peritoneal colorectal carcinoma metastases [Text] / G. J. van der Bij, M. Bögels, S. J. Oosterling, et al. // Cancer Lett. – 2008. – Vol. 262, № 1. – P. 77-86.
7. Macrophages promote tumour growth and liver metastasis in an orthotopic syngeneic mouse model of colon cancer [Text] / J. Kruse, W. von Bernstorff, K. Evert, et al. // Int J Colorectal Dis. – 2013. – Vol. 28, № 10. – P. 1337-49.
8. Activation of human peritoneal immune cells in early stages of gastric and colon cancer [Text] / W. L. Olszewski, U. Kubicka, W. Tarnowski, et al. // Surgery. – 2007. – Vol. 141, № 2. – P. 212-21.
9. Cesta M. F. Normal structure, function, and histology of the spleen [Text] / M. F. Cesta // Toxicol Pathol. – 2006. – Vol. 34, № 5. – P. 455-65.
10. Mebius R. E. Structure and function of the spleen [Text] / R. E. Mebius, G. Kraal // Nat Rev Immunol. – 2005. – Vol. 5, № 8. – P. 606-16.
11. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape [Text] / G. P. Dunn, A. T. Bruce, H. Ikeda, et al. // Nat Immunol. – 2002. – Vol. 3, № 11. – P. 991-8.
12. Inflammatory colonic carcinogenesis: a review on pathogenesis and immunosurveillance mechanisms in ulcerative colitis [Text] / M. Scarpa, I. Castagliuolo, C. Castoro, et al. // World J Gastroenterol. – 2014. – Vol. 20, № 22. – P. 6774-85.
13. Down-regulation of HLA class II and costimulatory CD86/B7-2 on circulating monocytes from melanoma patients [Text] / S. Ugurel, D. Uhlig, C. Pföhler, et al. // Cancer Immunol Immunother. – 2004. – Vol. 53. – P. 551-59.
14. The host-tumor immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction [Text] / S. Chouaib, C. Asselin-Paturel, F. Mami-Chouaib, et al. // Immunol Today. – 1997. – Vol. 18. – P. 493-97.
15. Biological, immunological and regenerative characteristics of placenta-derived mesenchymal stem cell isolated using a time-gradient attachment method [Text] / W. Yuan, C. Zong, Y. Huang, et al. // Stem Cell Res. – 2012. – Vol. 9, № 2. – P. 110-23.
16. Manufacturing of human placenta-derived mesenchymal stem cells for clinical trials [Text] / Brooke G, Rossetti T, Pelekanos R, et al. // Br J Haematol. – 2009. – Vol. 144, № 4. – P. 571-9.
17. Oliveira M. S. Placental-derived stem cells: Culture, differentiation and challenges [Text] / M. S. Oliveira, J. B. Barreto-Filho // World J Stem Cells. – 2015. – Vol. 7, № 4. – P. 769-75.
18. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells derived from human placenta tissue [Text] / S. Vellasamy, P. Sandrasaigaran, S. Vidyadaran, et al. // World J Stem Cells. – 2012. – Vol. 4. – P. 53-61.
19. Perše M. Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats [Text] / M. Perše, A. Cerar // J Biomed Biotechnol. – 2011. – P. 473964.
20. Immunomodulatory activity in vitro and in vivo of polysaccharide from *Potentilla anserina* [Text] / J. R. Chen, Z. Q. Yang, T. J. Hu, et al. // Fitoterapia. – 2010. – Vol. 81, № 8. – P. 1117-24.
21. Effect of spleen lymphocytes on the splenomegaly in hepatocellular carcinoma-bearing mice [Text] / J. J. Fang, Z. Y. Zhu, H. Dong, et al. // Biomed Environ Sci. – 2014. – Vol. 27, № 1. – P. 17-26.
22. The incidence, pathology and transplantation of hepatomas in CBA mice [Text] / J. G. Sharp, A. C. Riches, V. Littlewood, et al. // J Pathol. – 1976. – Vol. 119, № 4. – P. 211-20.
23. Role of the spleen in immunosuppression of gastric cancer: predominance of suppressor precursor and suppressor inducer T cells in the recirculating spleen cells [Text] / T. Toge, K. Kuroi, H. Kuninobu, et al. // Clin Exp Immunol. 1988. – 74. – Vol. 3. – P. 409-12.

24. Билинский Б. Т. Иммунологические механизмы естественной противоопухолевой резистентности [Текст] / Б. Т. Билинский, Н. А. Володько, Я. В. Шпарык // Киев: Наукова думка, 1991. – 245 с.
25. Меджитов Р. Врожденный иммунитет [Текст] / Р. Меджитов, Ч. Джаневей // Казанский медицинский журнал. – 2004. – Том 85, № 3. – С. 161-7.
26. Quail D. F. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis [Text] / D. F. Quail, J. A. Joyce // Nat Med. – 2013. – Vol. 19, № 11. – P. 1423-37. doi: 10.1038/nm.3394
27. Human placenta-derived mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation and support the culture expansion of cord blood CD34⁺ cells: a comparison with human bone marrow-derived mesenchymal stem cells [Text] / X. Luan, G. Li, G. Wang, et al. // Tissue Cell. – 2013. – Vol. 45, № 1. – P. 32-8.
28. Surface expression of HLA-G is involved in mediating immunomodulatory effects of placenta-derived multipotent cells (PDMCs) towards natural killer lymphocytes [Text] / K. J. Liu, C. J. Wang, C. J. Chang, et al. // Cell Transplant. – 2011. – Vol. 20, № 11-12. – P. 1721-30.
29. Mesenchymal stem cells derived from human placenta suppress allogeneic umbilical cord blood lymphocyte proliferation [Text] / C. D. Li, W. Y. Zhang, H. L. Li, et al. // Cell Res. – 2005. – Vol. 15, № 7. – P. 539-47.
30. Placental mesenchymal stem cells of fetal and maternal origins demonstrate different therapeutic potentials [Text] / Y. Zhu, Y. Yang, Y. Zhang, et al. // Stem Cell Res Ther. – 2014. – Vol. 5, № 2. – P. 48.
31. Deryagina V. P. Phagocyte functional activity and production of nitric oxide compounds in mouse models of tumor xenografts [Text] / V. P. Deryagina, N. I. Ryzhova, I. S. Golubeva // Vestnik RONTs im. N. N. Blokhina RAMN. – 2011. – Vol. 22, № 2. – P. 49-57.
32. Influence Allogeneic Mesenchymal Stem Cells on the Tumour Growth Parameters and Metastatic Potential in the Transplantable Carcinoma Lung Lewis [Text] / L. V. Kladnytska, V. V. Nikulina, L. V. Garmanchuk, et al. // Journal of Animal and Veterinary Sciences. – 2014. – Vol. 1, № 1. – P. 1-5.
33. The biological properties of tumor cells in c57bl/6 mice with transplantable lewis lung carcinoma with influence of allogeneic mesenchymal stem cells [Text] / L. V. Kladnytska, A. Y. Mazurkevych, L. V. Garmanchuk, et al. // The Animal Biology. – 2015. – Vol. 17, № 2. – P. 82-88.
34. Effect of spleen lymphocytes on the splenomegaly in hepatocellular carcinoma-bearing mice [Text] / J. J. Fang, Z. Y. Zhu, H. Dong, et al. // Biomed Environ Sci. – 2014. – Vol. 27, № 1. – P. 17-26.



СТАТТЯ НА САЙТІ
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Автори підтверджують відсутність можливих конфліктів інтересів.

Надійшла до редакції 09.03.2016 р.

Прийнята до друку 27.05.2016 р.