

О. Г. Федорчук

ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ
ІМЕНІ Р. Є. КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ, КИЇВ**ІМУНОГЕННІ ВЛАСТИВОСТІ ВИСОКОАНГІОГЕННОГО ВАРІАНТА
КАРЦИНОМИ ЛЕГЕНІ ЛЬЮЇС: ЗВ'ЯЗОК З МЕТАСТАТИЧНИМ
ПОТЕНЦІАЛОМ**

Досліджено імуногенні властивості високоангіогенного (LLC/R9) і низькоангіогенного (LLC) варіантів карциноми легені Льюїс та проаналізовано їх зв'язок з метастатичним потенціалом. Показано, що LLC/R9, порівняно з LLC, активує антитілогенез у селезінці. Висловлено припущення, що низький рівень метастазування LLC/R9 частково зумовлений антитілозалежними цитотоксичними реакціями.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: високо- та низькоангіогенні пухлини, антитілогенез, антитілозалежна цитотоксичність.

ВСТУП. Із середини минулого століття розвиток пухлинного процесу нерозривно пов'язують з фізіологічними та патофізіологічними процесами організму-пухлиноносія. Біологічні властивості пухлинних клітин визначають характер взаємозв'язків між пухлиною та фізіологічними системами організму, результатом чого стає специфіка перебігу пухлинного процесу [1, 5, 8]. Відомо, що біологічні властивості пухлини позначаються значним чином і на функціях імунної системи. З одного боку, в процесі *in vivo* росту відбувається так звана імуноселекція пухлинних клітин: позитивної селекції зазнають клітини, здатні уникнути імунного нагляду, тобто низькоімуногенні [14, 18]. З іншого боку, пухлинні клітини виробляють низку чинників, що модулюють функції ефektorних клітин як уродженого, так і адаптивного імунітету, формуючи у такий спосіб сприятливе імунологічне мікрооточення пухлини [15, 21, 23]. У такому мікрооточенні можливим стає ріст навіть високоімуногенних пухлинних клітин.

Раніше нами було показано, що два варіанти карциноми легені Льюїс (LLC та LLC/R9) істотно відрізняються за своїм проліферативним, ангіогенним та метастатичним потенціалом. LLC/R9, порівняно з LLC, характеризується великою швидкістю росту первинної пухлини, високим ангіогенним та низьким метастатичним потенціалом. Зазначені біологічні особливості клітин LLC/R9 позначилися на їх чутливості до дії антиангіогенних чинників, © О. Г. Федорчук, 2012.

що було підтверджено високою ефективністю протипухлинної дії інгібіторів пухлинного ангіогенезу в мишей з перещепленою LLC/R9 [3, 6, 10, 12].

Метою даної роботи було провести порівняльний аналіз деяких показників імуногенності клітин карциноми легені Льюїс з різним ангіогенним та метастатичним потенціалом.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на мишах-самцях лінії C57/BL₆ віком 2–2,5 міс., масою 18–23 г розведення віварію ІЕПОР. Усі дослідження на тваринах було виконано згідно з правилами, прийнятими Етичним комітетом ІЕПОР.

Пухлинні клітини (LLC/R9, LLC) нарощували в середовищі RPMI (Sigma, США) з додаванням 10 % ЕТС (Sigma, США), 2 мМ L-глутаміну та 40 мкг/мл гентаміцину за стандартних умов і перещеплювали в м'язи стегна в кількості 1×10^6 на одну тварину в 0,1 мл фізіологічного розчину.

Було сформовано три групи тварин (у кожній групі по 9 тварин): експериментальну групу (миші з LLC/R9), групу позитивного контролю (миші з LLC), групу негативного контролю (миші без пухлин – інтактні тварини). В процесі росту LLC/R9 оцінювали масу та морфологію селезінки, відносний вміст мононуклеарних спленічних лейкоцитів та їх мітогеніндуковану проліферативну активність, а також загальний рівень сироваткових імуноглобулінів у мишей з LLC/R9. Додатково вивчали вплив спленектомії на рівень метастазування LLC/R9.

Для морфологічної характеристики селезінки виготовляли парафінові зрізи тканини товщиною 5 мкм і фарбували їх гематоксилін/еозином відповідно до стандартної методики з наступним мікроскопічним аналізом препаратів [16].

Для дослідження мітогеніндукованої проліферативної активності мононуклеарних спленічних лейкоцитів із суспензії спленоцитів виділяли мононуклеарні лейкоцити шляхом центрифугування у градієнті щільності фікол-верографін. Концентрацію клітин вносили в кількості 1×10^6 /лунку. Як мітогени використовували фітогемаглютинін (ФГА) (100 мкг/лунку) та ліпополісахарид *E. coli* (ЛПС) (5 мг/лунку). Мітогеніндуковану проліферативну активність оцінювали шляхом аналізу ДНК-статусу мононуклеарних спленічних лейкоцитів методом проточної цитофлуориметрії [9].

Аналіз сироваткового рівня імуноглобулінів проводили згідно з [19]. Для проведення імуноферментного аналізу як антиген використовували сироватку з крові мишей із LLC та LLC/R9. Як панель для калібрування застосовували мишачі імуноглобуліни класу G. Отримані результати реєстрували за допомогою фотометричного рідера (Awareness technology inc, США).

Спленектомію проводили під комбінованим наркозом каліпсовету та ефіру в асептичних умовах за 14 діб до перещеплення пухлинних клітин.

Статистичну обробку одержаних результатів було виконано за допомогою дескриптивних методів, нелінійного регресійного аналізу, t-критерію Стьюдента та u-критерію Вілкоксона з використанням програми "Statistica v.7.5".

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Проведені дослідження показали, що, починаючи вже з 14 доби росту пухлини LLC/R9, маса селезінки та її клітинність були у 2,2 і 4,4 раза (відповідно) більшими, ніж у тварин без пухлин, та в 1,8 і 3,2 раза (відповідно) більшими порівняно з мишами з LLC (табл.).

Таблиця – **Маса та клітинність селезінки мишей у динаміці росту LLC/R9**

Показник селезінки	Інтактні тварини	Миші з LLC/R9				Миші з LLC			
		доба після перещеплення пухлинних клітин							
		8	14	20	25	8	14	20	25
Маса, мг	101,0± 15,0	158,3± 24,3	225,0± 34,0*	258,0± 35,4*	240,7± 18,7*	127,3± 9,1	120,3± 7,2	144,6± 20,8	138,6± 31,5
Кількість спленоцитів, $\cdot 10^6$	110,2± 10,9	192,2± 19,9	255,0± 29,9*	337,5± 25,0*	298,2± 31,5*	121,7± 15,4	114,6± 10,1	150,2± 16,1	171,6± 30,8

Примітка. * – різниця з інтактними тваринами достовірна ($p < 0,05$).

Дослідження цитоморфологічних показників селезінки було мотивоване тим, що, згідно з [3], у тварин з ангіогенезозалежною пухлиною LLC/R9 спостерігалася прогресивна спленомегалія. Відомо, що спленомегалія може відбуватися не лише за рахунок активації процесів гематопоезу поза кістковим мозком, але і в результаті активації антитілогенезу. Селезінка – вторинний лімфоїдний орган, основною функцією якого є кооперативна взаємодія Т- і В-лімфоцитів у процесі Т-залежного антитілогенезу [22].

Проведені гістологічні дослідження показали, що спленомегалія у тварин з LLC/R9 супроводжується значною стимуляцією проліферативного пулу селезінки. Тому можна припустити, що знижений метастатичний потенціал пухлин LLC/R9, порівняно з LLC, значною мірою зумовлений підвищеною функціональною активністю В-клітинної ланки селезінки. Перевірка цієї гіпотези є основним акцентом даної роботи. Вивчення морфологічної будови селезінки тварин з вихідною пухлиною LLC не виявило змін у будові цього органа порівняно з інтактним контролем. Селезінка представлена клітинами білої та червоної пульпи, які мають чітку межу (рис. 1).

У селезінці мишей з LLC/R9 зустрічаються лише одиничні невеликі ділянки білої пульпи

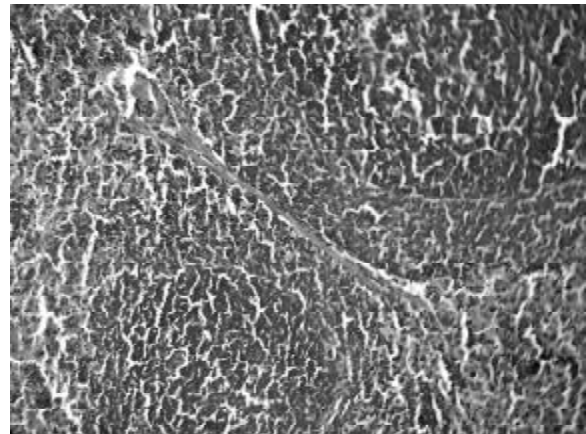


Рис. 1. Морфологічна будова селезінки мишей з LLC на 14 добу після перещеплення, $\times 200$.

(рис. 2, А). Основна частина органа представлена маленькими скупченнями клітин як білої, так і червоної пульпи, між якими не спостерігається чіткої межі, що характерна для морфологічної будови селезінки в нормі. Слід відмітити присутність значної кількості бластних клітин у всіх цих невеликих скупченнях лімфоїдної тканини (рис. 2, Б), що вказує на підвищену проліферативну активність В-клітинного пулу селезінки.

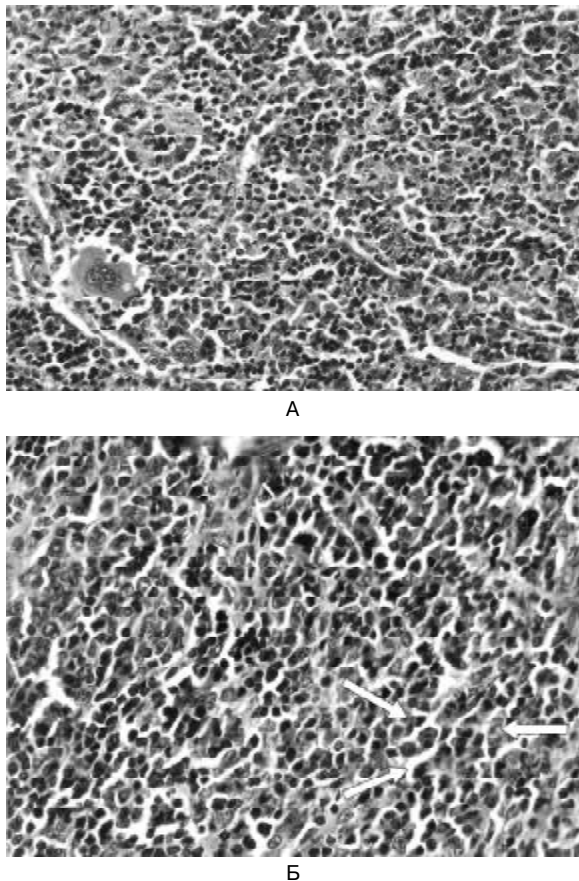


Рис. 2. Морфологічна будова селезінки мишей з LLC/R9 на 14 добу після перещеплення, x200.

На відміну від LLC/R9, у тварин з LLC бластні клітини визначаються лише в червоній пульпі. У білій пульпі вони зустрічаються лише в разі утворення вторинних фолікулів.

Додатковий доказ високої проліферативної активності В-клітинного пулу селезінки клітин тварин з високоангіогенним варіантом карциноми легені Льюїс отримано при дослідженні проліферативної відповіді мононуклеарних спленоцитів тварин-пухлиноносіїв на мітогени. Було використано два мітогени: бактеріальний ліпополісахарид, що є поліклональним активатором проліферації В-клітин [2], та фітогемаглютинін, який вважають активатором проліферації Т-клітин [11, 17]. Проліферативну активність мононуклеарних спле-

ноцитів оцінювали за відсотком клітин, що перебувають у S- та G2-M-фазах клітинного циклу (проліферативний індекс) [7]. За результатами наших досліджень, проведених на 14 добу після перещеплення пухлин, спонтанна проліферативна активність мононуклеарних спленоцитів мишей з високоангіогенним варіантом карциноми легені Льюїс була статистично достовірно вищою порівняно з такою у мишей з низькоангіогенними пухлинами і знаходилася на рівні інтактного контролю (рис. 3, А).

Дослідження проліферативної відповіді на стимуляцію ФГА (рис. 3, Б) показали, що проліферативний індекс мононуклеарних спленоцитів мишей був майже однаковим у всіх досліджуваних групах з незначною тенденцією до вищого рівня у тварин з LLC/R9.

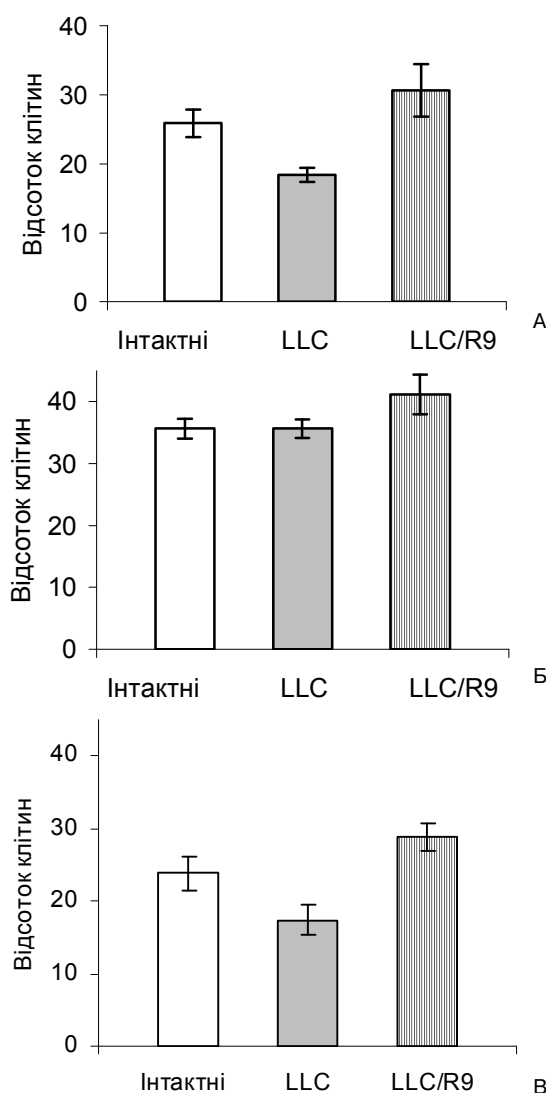


Рис. 3. Проліферативна відповідь мононуклеарних спленічних лейкоцитів на мітогени у мишей з високоангіогенним варіантом карциноми легені Льюїс: А – спонтанна проліферація; Б – ФГА-індукована проліферація; В – ЛПС-індукована проліферація.

Проліферативна активність мононуклеарних спленоцитів мишей з LLC/R9 у відповідь на стимуляцію ліпополісахаридом була вищою за відповідний показник в інтактних тварин та значно перевищувала аналогічний показник у мишей з LLC – на 63 % ($p < 0,05$, рис. 3, В).

Висока проліферативна активність В-клітинного пулу селезінки тварин з LLC/R9 узгоджувалася з високим сироватковим рівнем імуноглобулінів. Дослідження загального рівня циркулюючих імуноглобулінів (IgG) у сироватці крові мишей із трансплантованими клітинами карциноми легені Льюїс з різним ангиогенним потенціалом показали, що в мишей з високоангиогенним варіантом карциноми легені Льюїс цей показник був на 70 % ($p < 0,01$) вищим порівняно з таким у тварин з вихідним варіантом пухлини (рис. 4).

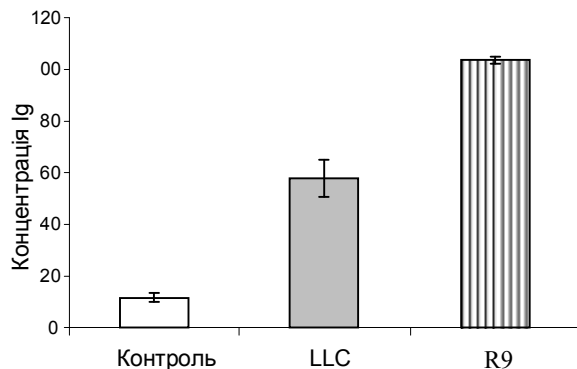


Рис. 4. Сироватковий рівень імуноглобулінів у мишей з високоангиогенним варіантом карциноми легені Льюїс.

Отримані результати дозволили висловити припущення, що приріст кількості антитіл у сироватці тварин-пухлиноносіїв, порівняно з інтактними тваринами, зумовлений активацією протипухлинного антитілогенезу, більш вираженого в мишей з високоангиогенним варіантом карциноми легені Льюїс. У такому випадку низький (порівняно з LLC) рівень

метастазування LLC/R9 може бути частково зумовлений реалізацією специфічного антитілозалежного протипухлинного імунітету. Відомо, що Ат беруть участь у протипухлинному імунітеті в реакціях антитілозалежної клітинної цитотоксичності (АЗКЦ) або комплементозалежної цитотоксичності (КЗЦ). АЗКЦ відбувається тоді, коли Fc-фрагмент Ат зв'язується з рецептором до Fc-фрагмента (FcRs), FcRI та FcRIII, що розміщений на поверхні ефektorних клітин, таких, як макрофаги, природні кілери або нейтрофіли. Клітини-ефектори руйнують пухлинні клітини шляхом ендо- або екзоцитозу. В КЗЦ-реакції фрагмент комплементу C1q зв'язується з Fc-фрагментом IgG у складі імунного комплексу на поверхні пухлинної клітини і викликає каскад протеолітичних реакцій, що призводить до загибелі клітини шляхом лізису або до її опсонізації з наступною активацією вже зазначених клітин уродженого імунітету [13, 19, 20].

Для перевірки висловленого припущення ми провели спленектомію в мишей за 14 днів до перещеплення високоангиогенного варіанта карциноми легені Льюїс з метою гальмування процесів антитілогенезу в цих тварин. Як контроль хірургічного втручання виконали лапаротомію без видалення селезінки.

Як показали результати досліджень, видалення селезінки у тварин із трансплантованим високоангиогенним варіантом карциноми легені Льюїс спричиняло істотне статистично достовірне зростання кількості легеневих метастазів і загального об'єму метастатичного ураження (рис. 5): середня кількість метастазів у мишей з видаленою селезінкою ($n=15$) була в 2,4 ($p < 0,01$) раза більшою, ніж у тварин, в яких виконали лапаротомію без видалення даного органа ($n=11$). Об'єм метастатичного ураження при цьому також був більшим у спленектомованих мишей – в 1,74 раза ($p < 0,05$).

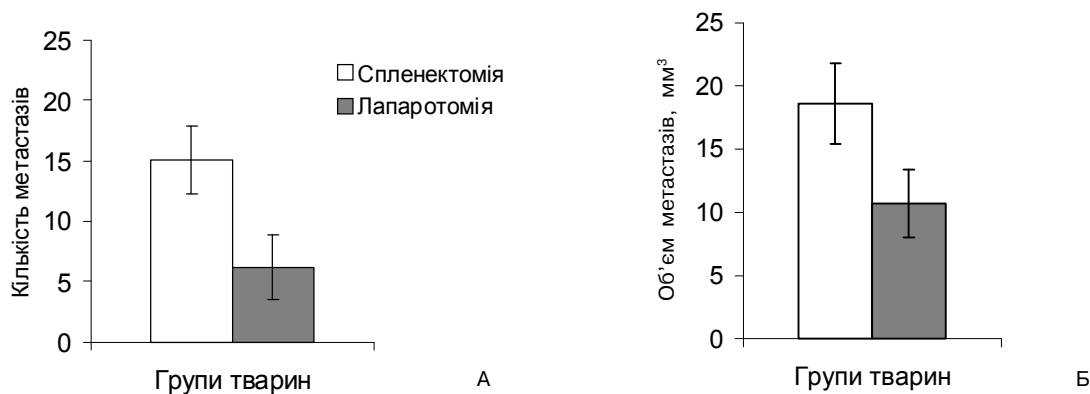


Рис. 5. Вплив спленектомії на рівень метастазування високоангиогенного варіанта карциноми легені Льюїс: А – кількість метастазів у легенях тварин-пухлиноносіїв; Б – об'єм метастатичного ураження.

ВИСНОВОК. Підвищення ангиогенного потенціалу клітин LLC/R9 супроводжується зростанням їх імуногенності, що проявляється здатністю активувати антитілогенез. Наслідком активації антитілогенезу є зниження метаста-

тичного потенціалу пухлини, ймовірно, зумовлене елімінацією циркулюючих пухлинних клітин у реакціях антитілозалежного клітинного і гуморального імунітету.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бережная Н. М. Иммунология злокачественного роста / Н. М. Бережная, В. Ф. Чехун. – К. : Наук. думка, 2005. – 791 с.
2. Вершигора А. А. Иммунология / А. А. Вершигора. – К. : Вища школа, 2005. – 597 с.
3. VEGF опосередковує особливості паранеопластичного синдрому у мишей з високоангиогенним варіантом карциноми легені Льюїс / О. Г. Федорчук, О. М. Пясковська, Л. М. Сківка [та ін.] // Вісник Луганського нац. університету ім. Т. Шевченка. – 2010. – № 10. – С. 23–29.
4. Диденко Г. В. Модификация противоопухолевой аутовакцины на основе продуктов метаболизма *B. Subtilis 7025* при помощи сорбентов и аутомикрофагов / Г. В. Диденко, О. С. Дворщенко, Г. С. Лисовенко // Эксперим. онкол. – 2003. – № 2. – С. 116–118.
5. Кавецкий Р. Е. Взаимодействие организма и опухоли / Р. Е. Кавецкий. – К. : Наук. думка, 1977. – 243 с.
6. Колесник Д. Л. Біологічні властивості модифікованого варіанту карциноми легені Льюїс, асоційовані з пухлинним ангиогенезом : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук / Д. Л. Колесник. – К., 2010. – 20 с.
7. Меньшиков В. В. Клиническая лабораторная диагностика // Частные аналитические технологии в клинической лаборатории. – М. : Лабинформ-РАМЛД, 1999. – С. 170–177.
8. Осинский С. Микрофизиология опухолей / С. Осинский, П. Ваупель. – К. : Наук. думка, 2009. – 253 с.
9. Хаитов Р. В. Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека : пособие для врачей лаборантов / Р. В. Хаитов. – М., 2001. – 51 с.
10. Analysis of growth kinetics and proliferative heterogeneity of Lewis lung carcinoma cells growing as unfed culture / O. N. Pyaskovskaya, D. L. Kolesnik, A. V. Kolobov [et al.] // Exp. Oncol. – 2008. – **30**, № 4. – P. 269–275.
11. Brenner D. Concepts of activated T cell death / D. Brenner, P. H. Krammer, R. Arnold // Crit. Rev. Oncol. Hematol. – 2008. – **66**, № 1. – P. 52–64.
12. Changes in VEGF level and tumor growth characteristics during Lewis lung carcinoma progression towards cis-DDP resistance / O. N. Pyaskovskaya, O. I. Dasyukevich, D. L. Kolesnik [et al.] // Exp. Oncol. – 2007. – **29**, № 3. – P. 197–202.
13. Fas ligand breaks tolerance to self-antigens and induces tumor immunity mediated by antibodies / A. K. Simon, A. Gallimore, E. Jones [et al.] // Cancer Cell. – 2002. – **2**, № 4. – P. 315–322.
14. Garcia-Lora A. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape / A. Garcia-Lora, I. Algarra, F. Garrido // J. Cell Physiol. – 2003. – **195**, № 3. – P. 346–355.
15. Immunology: the immune system in health & disease, 5 ed. / C. A. Janeway, P. Travers, M. Walport, M. Shlomchik. – N-Y : Garlandpress, 2002. – 732 p.
16. Kiernan J. A. Histological and histochemical methods: theory and practice / J. A. Kiernan. – Bloxham : Scion 4th ed., 2008. – 606 p.
17. Krammer P. H. Life and death in peripheral T cells / P. H. Krammer, R. Arnold, I. N. Lavrik // Nat. Rev. Immunol. – 2007. – **7**, № 7. – P. 532–542.
18. MHC class I antigens and immune surveillance in transformed cells / N. Aptsiauri, T. Cabrera, A. Garcia-Lora [et al.] // Int. Rev. Cytol. – 2007. – **256**. – P. 139–189.
19. Murine Fc receptors for IgG are redundant in facilitating presentation of immune complex derived antigen to CD8+ T cells in vivo / J. M. de Jong, D. H. Schuurhuis, A. Ioan-Facsinay [et al.] // Mol. Immunol. – 2006. – **43**, № 13. – P. 2045–2050.
20. Nimmerjahn F. Analyzing antibody-Fc-receptor interactions / F. Nimmerjahn, J. V. Ravetch // Methods Mol. Biol. – 2008. – № 415. – P. 151–162.
21. Schreiber R. D. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion / R. D. Schreiber, L. J. Old, M. J. Smyth // Science. – 2011. – **331**. – P. 1565–1570.
22. The role of B-cells for in vivo T-cell responses to a Friend virus-induced leukemia / K. R. Schultz, J. P. Klarnet, R. S. Gieni [et al.] // Science. – 1990. – **249**, № 4971. – P. 921–923.
23. Tumor immunoediting and immunosculpting pathways to cancer progression / J. M. Reiman, M. Kmiecik, M. H. Manjili, K. L. Knutson // Semin. Cancer Biol. – 2007. – **17**, № 4. – P. 275–287.

ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ВЫСОКОАНГИОГЕННОГО ВАРИАНТА КАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО ЛЬЮИС: СВЯЗЬ С МЕТАСТАТИЧЕСКИМ ПОТЕНЦИАЛОМ

Резюме

Исследованы иммунологические свойства высокоангиогенного (LLC/R9) и низкоангиогенного (LLC) вариантов карциномы легкого Льюис и проанализирована их связь с метастатическим потенциалом. Показано, что LLC/R9, по сравнению с LLC, активизирует антителогенез в селезенке. Высказано предположение, что низкий уровень метастазирования LLC/R9 частично обусловлен антителозависимыми цитотоксическими реакциями.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: высоко- и низкоангиогенные опухоли, антителогенез, антителозависимая цитотоксичность.

O. H. Fedorchuk
R. YE. KAVETSKYI INSTITUTE OF EXPERIMENTAL PATHOLOGY, ONCOLOGY
AND RADIOBIOLOGY OF NAS OF UKRAINE, KYIV

IMMUNOGENIC PROPERTIES OF HIGH-ANGIOGENIC LEWIS LUNG CARCINOMA: CORELATION WITH METASTATIC POTENTIAL

Summary

Immunogenic properties of high-angiogenic (LLC/R9) and low-angiogenic (LLC) variants of Lewis lung carcinoma were studied and their correlation with metastatic potential was analyzed. It was shown that LLC/R9, comparing to LLC, activates antibodygenesis in spleen. It was suggested that low level of LLC/R9 metastasis was particular stipulated by antibody-dependant cytotoxic reaction.

KEY WORDS: high- and low-angiogenic tumors, antibody generation, antibody-dependent cytotoxicity.

Отримано 03.11.11

Адреса для листування: О. Г. Федорчук, Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України, вул. Васильківська, 45, Київ, 03022, Україна, e-mail: fed6@mail.ru