

## ... КРІОБІОЛОГІЯ ...

УДК: 616-092:615.361.36.013.014.41

### СОСТОЯНИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ МЫШЕЙ С ГЕНЕТИЧЕСКИ ДЕТЕРМИНИРОВАННЫМ РАЗВИТИЕМ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ КЛЕТОК ФЕТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ

Н.А.Бондарович, М.В.Останков, М.А.Сироус, Л.В.Останкова, А.Н.Гольцев

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков, Украина)  
cryopato@rambler.ru*

Проведено исследование состояния лимфогемопоэтического комплекса (ЛГК), в том числе его составного компонента – иммунной системы (ИС) мышей линии СЗН в период манифестации онкопатологии (возраст 13 месяцев). Этим мышам в возрасте 6 месяцев были введены аллогенные криоконсервированные (кКФП) или нативные (нКФП) клетки фетальной печени (КФП). Показано, что оба вида клеток корригировали структурно-функциональные характеристики ЛГК и снижали частоту развития опухоли. Выявлены определенные различия проявления эффекта кКФП в сравнении с нКФП.

Ключевые слова: *рак молочной железы, клетки фетальной печени, иммунная система, криоконсервирование.*

#### Введение

В общем перечне смертности населения земного шара злокачественные опухоли занимают лидирующее место, что указывает на необходимость первоочередного решения данной проблемы. Такой порядок вещей может быть обусловлен рядом причин, в том числе загрязнением окружающей среды, влиянием радиационных и других факторов, вызывающих аномалии развития и функционирования генетического аппарата. В свою очередь это приводит к нарушениям в ИС, выступающим в качестве предрасполагающего фактора развития злокачественного бластомного роста (Барышников, 2003).

Развитие опухолевого процесса сопряжено и ассоциировано с общей иммунодепрессией организма, преимущественную значимость в которой играет искажение функции клеточного звена ИС, особое место в котором занимают Т-клетки с супрессорной активностью, увеличение количественных и качественных характеристик которых создает благоприятные условия для роста опухоли (Creemers, Bentvelzen, 1977). Успешной экспериментальной моделью для изучения состояния ИС при опухоленосительстве, а также оценки эффективности противоопухолевой терапии, являются мыши линии СЗН с генетически детерминированным развитием рака молочной железы (РМЖ), вызываемого вирусом ММТВ (mammary tumour virus – вирус рака молочной железы) (Bittner, 1936). В качестве такого вида терапии могут выступать клетки фетальной печени (КФП), продуцирующие ряд биологически активных веществ, являющихся модуляторами иммуногемопоэза (Гольцев и др., 2003; Sennikov et al., 2001). В связи с применением КФП при лечении различных заболеваний, включая и патологию аутоиммунного генеза (Гольцев и др., 2003), возникла необходимость создания запасов и использования криоконсервирования ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) с целью долгосрочного хранения биообъектов. При этом необходимо учитывать, что криотехнологии могут выступать в роли модификатора биообъекта на молекулярном и клеточном уровнях, улучшая по ряду параметров их терапевтическую эффективность (Гольцев и др., 2003; Бондарович и др., 2006).

На основании сказанного выше, цель данной работы состояла в сравнительном изучении модификации органов ЛГК и частоты развития РМЖ у мышей линии СЗН в возрасте 13 месяцев после превентивной терапии (в 6 месяцев) криоконсервированными (кКФП) или нативными (нКФП) клетками фетальной печени.

#### Материалы и методы

Исследование проводили на мышках–самках линий СЗН и СВА (контрольные мыши) массой 22–27 г в возрасте 13 месяцев. Опытным мышам линии СЗН в 6 месяцев вводили внутривенно кКФП или нКФП в дозе  $5 \times 10^6$ /мышь, взятые у плодов (15 суток гестации) мышей линии С57В1. Контрольных и опытных мышей содержали в условиях вивария Института проблем криобиологии и криомедицины

(ИПКК) НАН Украины на стандартном пищевом рационе. Экспериментальную работу выполняли в соответствии с «Общими этическими принципами экспериментов на животных», одобренными I национальным конгрессом по биоэтике (Общие этические принципы ..., 2001), а также согласно положениям «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Commission of European Communities ..., 1986). Забой животных проводили путем декапитации под эфирным наркозом.

Криоконсервирование КФП осуществляли в пластиковых ампулах Nunc по 2 мл на установке УОП-6 производства ИПКК НАН Украины по двухэтапной программе со скоростью замораживания  $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до  $-25^{\circ}\text{C}$  на I этапе и последующим погружением в жидкий азот ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). В качестве криопротектора был выбран 10%-ный водный раствор диметилсульфоксида. Оттаивание ампул проводили на водяной бане при температуре  $40-41^{\circ}\text{C}$  в течение 45–50 сек (Гольцев и др., 1995). Сохранность клеток определяли по методу суправитального окрашивания трипановым синим (Гольцев и др., 1993) и бромистым этидием (Dankberg, Persidsky, 1976). Эффективность метода криоконсервирования КФП была ранее подтверждена рядом функциональных тестов (Гольцев и др., 1993). Критерием оценки развития РМЖ служили клинические, цитологические и иммунологические показатели (Меньшиков, 1987).

У опытных и контрольных мышей общепринятыми методами оценивали показатели крови: количество лейкоцитов и эритроцитов, содержание гемоглобина и СОЭ, лейкограмму; определяли массу тела и органов ЛГК, количество клеток в них; цитограмму тимуса, селезенки, лимфатических узлов и костного мозга (КМ) оценивали на мазках-отпечатках, окрашенных азури II-эозином, при подсчете 500 клеток в световом микроскопе (ЛОМО),  $\times 900$  (Меньшиков, 1987).

ИС изучали путем идентификации иммунокомпетентных клеток (ИКК) методом непрямой флуоресценции с использованием моноклональных антител (Caltac США) к Ia, CD3, CD4, CD8 антигенам (АГ) в люминисцентном микроскопе (ЛЮМАМ),  $\times 400$  (Лимфоциты, 1990); цитотоксическую активность клеток селезенки – нерадиометрическим методом (Пастер и др., 1989); адгезивную способность и фагоцитарную активность клеток перитонеальной полости (ПП), а также количество мелкодисперсных иммунных комплексов (мЦИК) в периферической крови в соответствии с описанными ранее методами (Меньшиков, 1987).

Полученные данные статистически обрабатывали по методу Стьюдента (Ашмарин, Воробьев, 1972) с применением компьютерной программы Excel.

### Результаты и обсуждение

Мыши линии СЗН являются удобной моделью для изучения причин и особенностей развития РМЖ, индуцируемого вирусом MMTV (Bittner, 1936). На примере MMTV, который является одним из онкогенных вирусов, в работе (Gonzburg, Salmons, 1992) наиболее четко продемонстрировано значение условий, необходимых для индукции опухолевого процесса. Помимо онкогенных свойств, которые выражаются развитием опухоли в возрасте 12–13 месяцев, вирус активно вмешивается в физиологическое течение процессов на уровне ИС. По данным (Varibaud et al., 1999), уже на 6-ой день после инъекции вируса наблюдается мощная миграция дендритных клеток в лимфатические узлы, что, по мнению авторов, может играть ключевую роль в раннем инфицировании MMTV. Как показано в исследовании (Luther et al., 1997), начало реакции зародышевых (герминальных) центров лимфоидных фолликулов, праймированных MMTV, приходится на 10–12-ый день с момента заражения. На 15-ый день наблюдалась полная опосредованная vSAG (virus super antigen – суперантиген вируса) делеция зрелых  $\text{CD4}^+$  и  $\text{CD8}^+$  клеток (Jude et al., 2003). Учитывая данные об участии Т-лимфоцитов в регуляции пролиферативной активности клеток в различных тканях организма (Донцов, 1998), можно предположить, что делеция Т-клеток при такой ситуации вызовет нарушения и на уровне целостного организма. В 13 месяцев на эти изменения накладываются нарушения в ЛГК, индуктором которых является сама опухоль.

Действительно, исследования, проведенные в данной работе, показали, что у мышей линии СЗН в 13 месяцев во всем организме наблюдаются системные изменения, очевидно, связанные, в определенной степени, с иммуногенными свойствами самой опухоли, действием продуцируемых ею биологически активных веществ, а также с особенностью инфицирования вирусом. Во-первых, это касалось показателей крови и выразилось повышением СОЭ, лейкоцитозом (рис. 1а) с выраженным нейтрофилезом и сдвигом влево (рис. 1б). В то же время количество эритроцитов и содержание гемоглобина несколько снижалось (рис. 1а).

В лейкограмме среди нейтрофильных гранулоцитов с неизменной структурой (рис. 2а), встречались клетки с фрагментированными ядрами (рис. 2б), отмечено появление больших гранулоцитарных лимфоцитов (БГЛ) (рис. 2в), бластных (рис. 2г) и атипичных клеток с крупным ядром, 1–2 ядрышками и светлой цитоплазмой (рис. 2д).

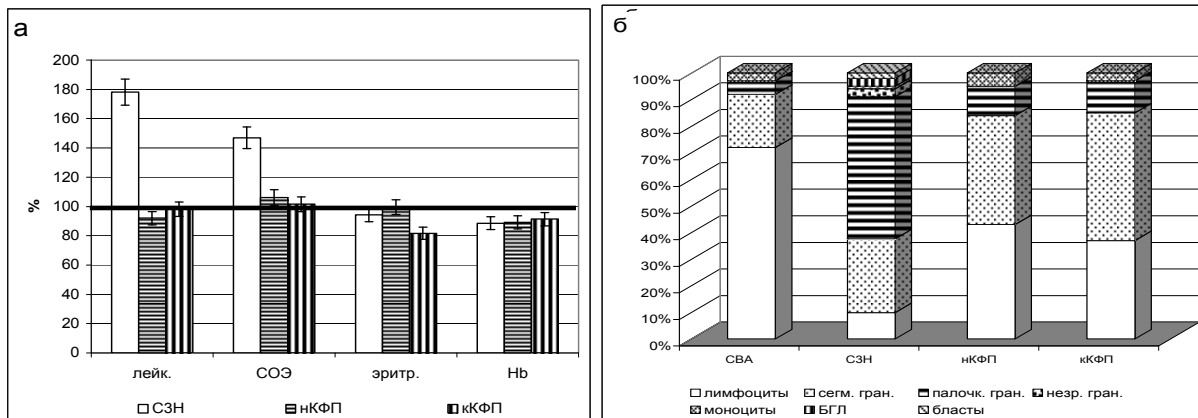


Рис. 1. Показатели крови (а) (за 100% приняты показатели мышей линии СВА) и лейкограмма (б) мышей линии СЗН до и после введения кКФП или нКФП (лейк. – лейкоциты; эритр. – эритроциты; сегм. гран., палочк. гран., незр. гран. – сегментоядерные, палочкоядерные, незрелые гранулоциты)



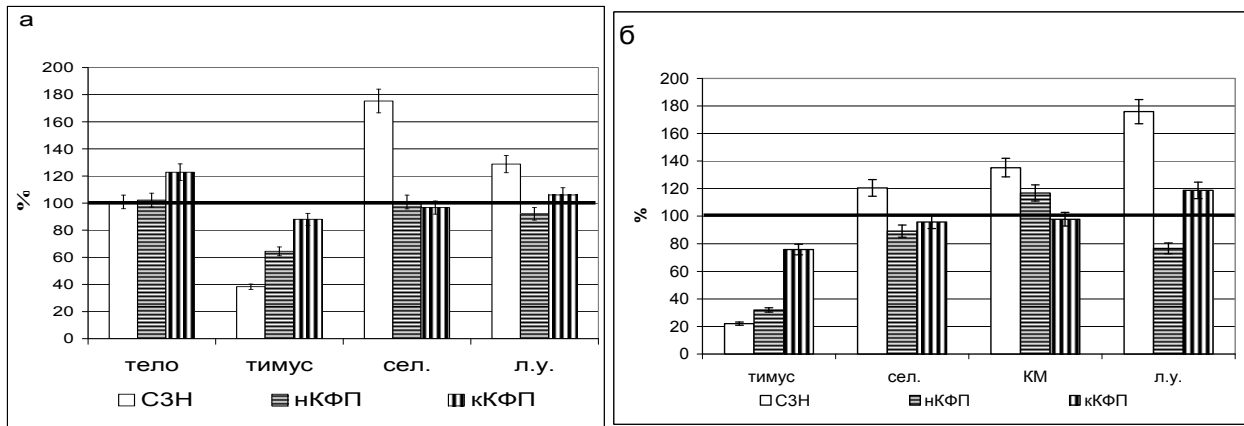
Рис. 2. Клетки крови мыши с развитием МЖ: нейтрофильный гранулоцит (а), нейтрофильный гранулоцит с фрагментированным ядром (б), большой гранулоцитарный лимфоцит (в), бласт (г), атипичная клетка (д). Окраска азур II-эозином,  $\times 900$

Такого рода изменения в крови подчеркивают развитие воспалительного процесса (Альперн, 1959) как ответ организма на появление вирусных и опухолевых антигенов.

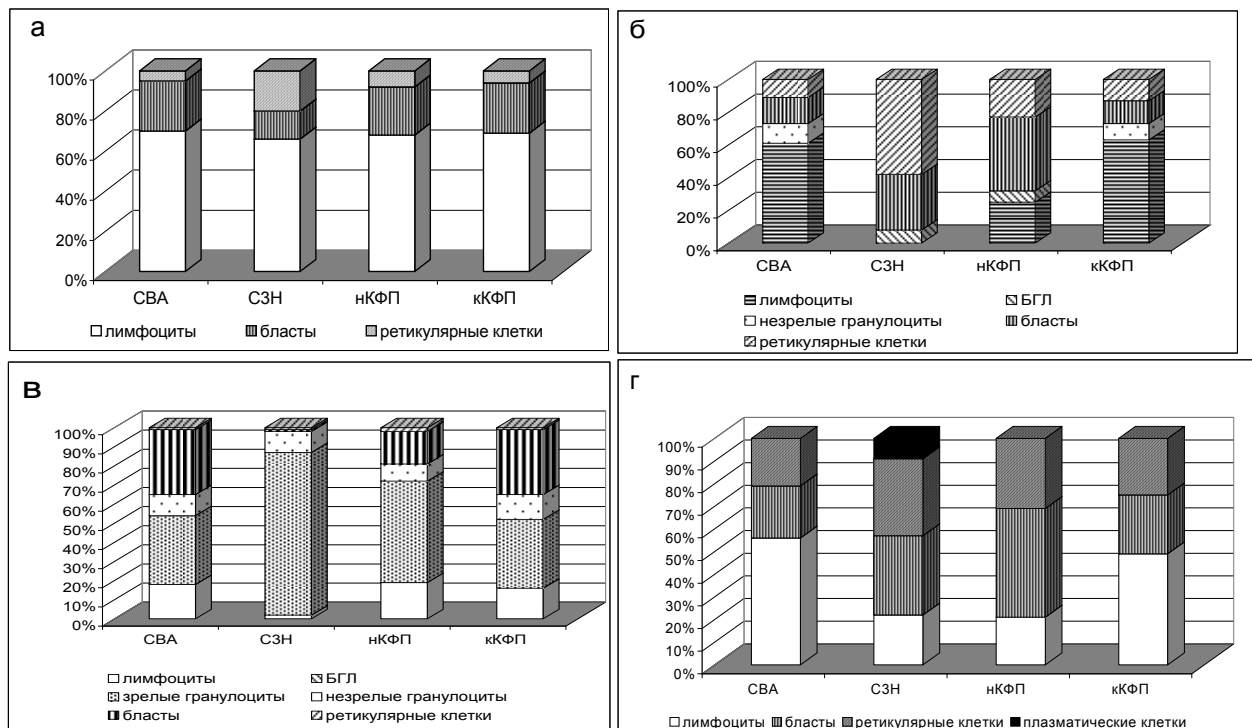
В условиях развития МЖ по-разному изменялось состояние ЛГК и ИС. Так, в тимусе наблюдали снижение количества клеток и его массы (рис. 3а, б). По данным (Ohm et al., 2003), это может быть связано с ингибцией миграции в тимус клеток предшественников Т-лимфоцитов из костного мозга, что обусловлено влиянием субстанций растущей опухоли, например, фактора роста эндотелия сосудов. Не менее значимым объяснением наблюдаемой атрофии тимуса может быть причастность к этому самого вируса. В работе Барнет и сотр. (Barnett et al., 1999) отмечается, что у мышей с развитием МЖ в основе атрофии тимуса лежит элиминация тимоцитов, опосредованная собственно экспансией вируса ММТV. Т-лимфоциты, несущие Т-клеточные рецепторы со специфическим  $V\beta$  доменом, взаимодействуя с эндогенным вирусным суперантигеном как поверхностной молекулой в тимусе, подвергаются клональной делеции, подобно физиологически протекающей селекции с явлениями апоптоза тимоцитов.

Напротив, в селезенке в этот период отмечалась выраженная гипертрофия (рис. 3а, б), увеличение количества ретикулярных и бластных клеток (рис. 4б). Еще в большей степени наблюдали увеличение количества клеток в КМ (рис. 3б), сопровождающееся гранулоцитарной гиперплазией (рис. 4в). Такая феноменология, по-видимому, обусловлена повышенной продукцией на определенных этапах развития онкопатологии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (Melani et al., 2003). В пользу этого, вероятно, свидетельствует и выраженная бластная реакция в лимфатических узлах (рис. 4г), хотя к этому могут быть причастны и другого рода события.

По данным Д.Файнк (Finke et al., 2001), на одном из этапов инфицирования вирусом ММТV происходит когнатное взаимодействие В-клеток с Т-лимфоцитами. Под действием продуцируемых Т-клетками цитокинов В-клетки мигрируют в лимфатические узлы и трансформируются в плазмобласты, часть из которых затем формирует плазматические клетки.



**Рис. 3.** Масса (а) и количество клеток (б) в органах ЛГК мышей линии СЗН до и после введения кКФП или нКФП (за 100% приняты показатели мышей линии СВА) (сел. – селезенка; л.у. – лимфатические узлы)



**Рис. 4.** Цитограмма тимуса (а), селезенки (б), костного мозга (в), паховых лимфатических узлов (г) мышей линии СЗН до и после введения кКФП или нКФП

В ПП при развитии РМЖ снижалось количество клеток примерно в два раза, причем среди оставшихся в два раза по сравнению с контролем увеличивалась концентрация клеток с адгезивным потенциалом (рис. 5а). Изменение этого показателя может иметь отношение к изменению пролиферативной активности и устойчивости к апоптозу этих клеток. Как было показано Ф.Аоуджит и соавт. (Aoudjit, Vuori, 2000), экспрессия интегринов, например, играет не только главенствующую роль в реализации адгезивной способности и хоминге клеток, но также является «предвестником» увеличения интенсивности их пролиферации наряду с ингибцией процессов апоптоза. Другими словами, повышение степени экспрессии молекул адгезии в данном случае является логическим ответом меньшего количества оставшихся клеток к началу пролиферации. Известно, что степень экспрессии различного класса молекул адгезии находится под контролем цитокинового профиля организма. Следовательно, трансформация адгезирующей способности клеток ПП является следствием модуляции цитокинового профиля при развитии РМЖ, что может изменять и другие функции клеток. Действительно, на этом фоне отмечена ингибция фагоцитарной их активности, что выражалось снижением показателей ФИ и ФЧ (рис. 5б).

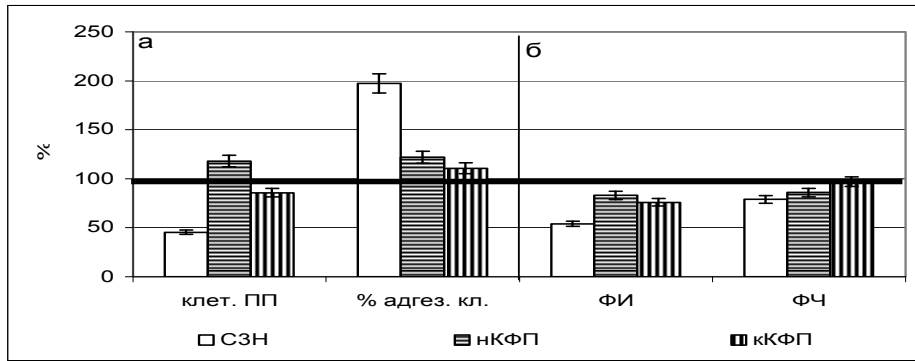


Рис. 5. Содержание, адгезирующая способность (а) и фагоцитарная активность (ФИ – фагоцитарный индекс, ФЧ – фагоцитарное число) клеток ПП до и после введения кКФП или нКФП (за 100% приняты показатели мышей линии СВА) (клет. ПП – количество клеток ПП; % адгез. кл. – % адгезирующих клеток)

Наиболее значимыми признаками начала развернутого течения патологии являются изменения в гуморальном и клеточном звеньях иммунитета. В частности, было существенно увеличено содержание патогенных мЦИК в сыворотке крови (рис. 6), что характерно для начальной стадии интоксикации организма и обычно отражает степень выраженности течения онкологического процесса (Teshima et al., 1977, Сараева и др., 1974).

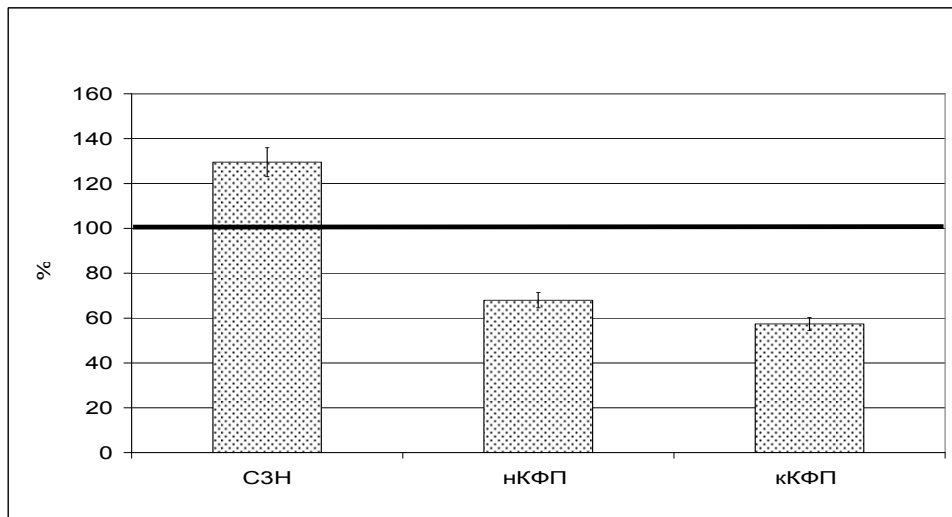
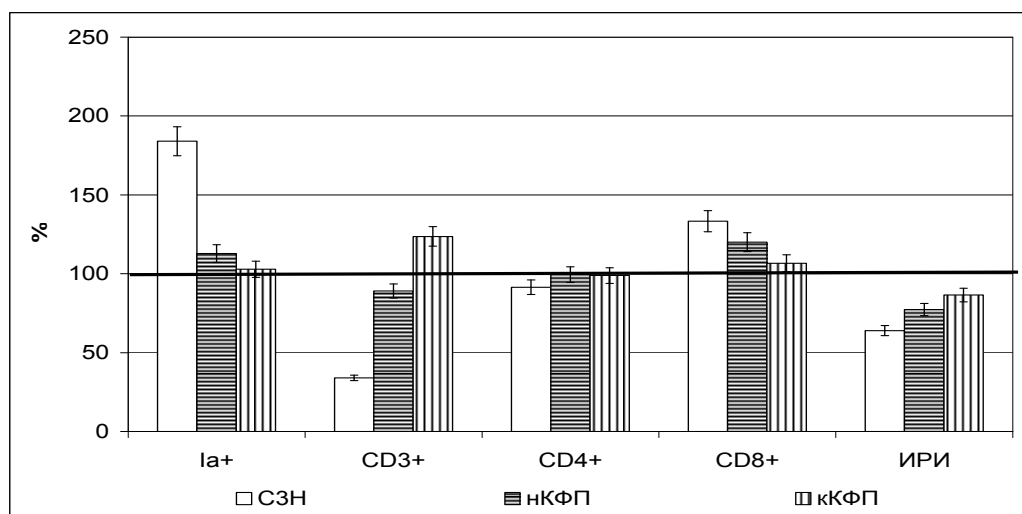


Рис. 6. Содержание мЦИК в крови до и после введения кКФП или нКФП (за 100% приняты показатели мышей линии СВА)

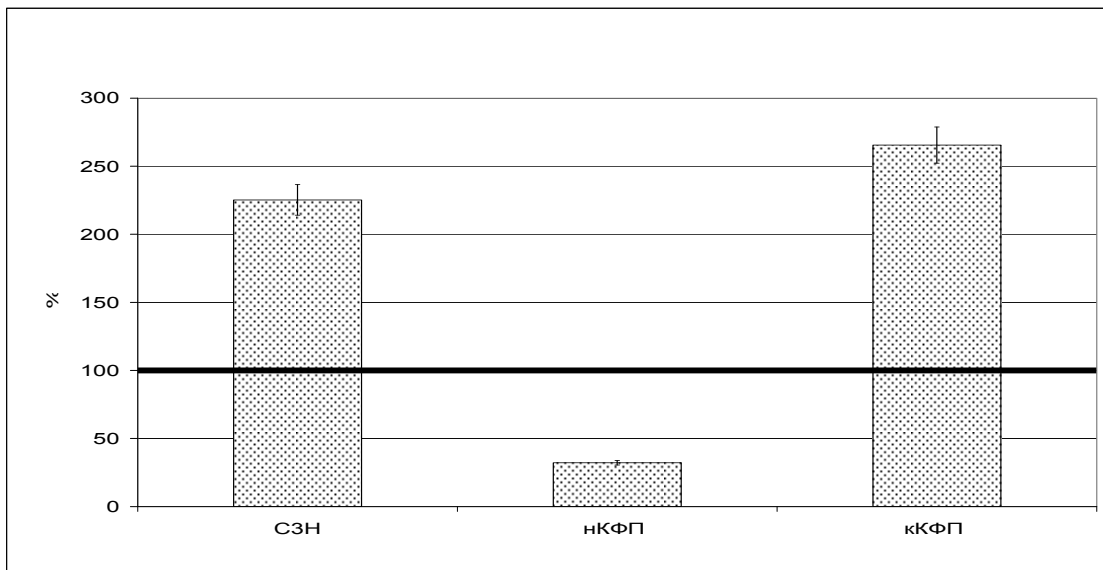
При исследовании клеточного звена иммунитета мышей-опухоленосителей было установлено увеличение содержания клеток, экспрессирующих Ia-маркер на фоне снижения общего количества  $CD3^+$  клеток (рис. 7). Кроме того, отмечено нарушение физиологического баланса соотношения субпопуляций  $CD4^+$  и  $CD8^+$  клеток и снижение иммунорегуляторного индекса – ИРИ за счет повышения концентрации последних (1,6 у СЗН и 2,3 – СВА) (рис. 7). Это согласуется с данными литературы (Bachmann et al., 1995) и является характерным признаком экспансии в организме злокачественного бластогенеза (Creemers, Bentvelzen, 1977). Общая оценка изменений показателей ИС при развитии РМЖ выявила корреляцию увеличения содержания  $Ia^+$  клеток с повышением содержания  $CD8^+$  клеток и снижением концентрации  $CD4^+$  клеток. Такого рода дисбаланс основных популяций и субпопуляций клеточного звена иммунитета при развитии РМЖ проявлялся изменением и других индексов их соотношения. Так, индекс соотношения  $Ia^+/CD3^+$  клеток у мышей линии СЗН составлял 6,1 (у СВА – 1,12),  $Ia^+/CD4^+$  – 1,44 (СВА – 0,71),  $Ia^+/CD8^+$  – 2,3 (СВА 1,67),  $CD3^+/CD4^+$  – 0,24 (СВА – 0,63),  $CD3^+/CD8^+$  – 0,377 (СВА – 1,48).

Изменение количественного содержания регуляторных Т-клеток, особенно повышение концентрации  $CD8^+$  лимфоцитов, действительно имеет отношение к возникновению ассоциированной с опухолью иммуносупрессии и усилению ее роста (Creemers et al., 1984). Наряду с этим, вклад в иммуносупрессию могут вносить продуцирующие трансформирующий фактор роста- $\beta$  (ТФР- $\beta$ ) Т-хелперы 2-го (Тх2) и 3-го типа (Тх3), относительное увеличение которых наряду со снижением общей популяции Т-хелперов при развитии опухоли отмечалось в ряде работ (Held et al., 1992, Czarneski et al., 2001). Такое увеличение авторы объясняют опосредованной MMTV активацией спленоцитов мышей СЗН/HeN, что приводит к гиперпродукции интерлейкина-10 (ИЛ-10), способного подавлять функцию Тх1 клеток (Held et al., 1992). Нельзя также не отметить и то, что все предложенные нами индексы, в которых сопоставляли показатель Ia, значительно превышали контрольные. Ia структура у мышей является аналогом антигенов главного комплекса гистосовместимости II класса (Ройт и др., 2000). Вместе с тем, известно, что эти молекулы, являясь обязательным атрибутом профессиональных антигенпрезентирующих клеток (Хаус et al., 2000), могут экспрессироваться и на некоторых клетках вне иммунокомпетентной сферы при развитии многих аутоиммунных заболеваний (АИЗ) (Zantut-Wittmann et al., 1999). Следовательно, полученные нами результаты еще раз подтверждают точку зрения, что развивающаяся в организме онкопатология может быть отнесена к одной из форм АИЗ (Jiskra et al., 2004).



**Рис. 7. Фенотипическая характеристика клеток селезенки мышей линии СЗН до и после введения кКФП или нКФП (за 100% приняты показатели мышей линии СВА)**

Особую диагностическую и прогностическую значимость изменения противоопухолевой защиты организма имеют клетки ИС с естественной киллерной активностью (ЕК) (van den Brink et al., 1991). Их количественные и качественные характеристики существенно изменяются в процессе развития опухоли (Rahal et al., 1992). Так, полученные данные о цитотоксических свойствах клеток селезенки при развитии РМЖ указывают на увеличение их функциональной активности (рис. 8). Это может свидетельствовать о развитии ответной реакции организма на появление опухолевых антигенов и, что более важно, указывать на возможность сохранения в этот период определенных звеньев компенсаторного потенциала организма. В последнем случае это весьма важно, поскольку во многих работах такого профиля указывается, что эффективность любого рода терапии рака определяется именно степенью сохранности противоопухолевого потенциала организма.



**Рис. 8. Цитотоксическая активность клеток селезенки до и после введения кКФП или нКФП (за 100% приняты показатели мышей линии СВА)**

Проведение «превентивной» противоопухолевой терапии по-разному отражалось на состоянии различных систем организма мышей линии СЗН. После введения как кКФП, так и нКФП была отмечена положительная динамика изменения показателей, характеризующих интенсивность развития воспалительного процесса: СОЭ, количества лейкоцитов и лимфоцитов в крови, а в случае применения кКФП – даже нормализация некоторых из этих показателей (рис. 1а, б). Противовоспалительная активность КФП может реализоваться при участии различных факторов, продуцируемых фетальной печенью, например  $\alpha$ -фетопротейна, трансформирующего фактора роста- $\beta$  (ТФР- $\beta$ ), ИЛ-10 и других (Sennikov et al., 2001).

Эффект коррекции состояния ЛГК животных (рис. 3а, б) определялся не только видом применяемого препарата, но и органом, в котором прослеживались эти изменения. Так, масса и количество клеток в тимусе, оставаясь ниже контрольных значений, более выражено приближались к ним при введении кКФП (рис. 3а, б). Данный факт достаточно интересен и подтверждает полученные нами ранее результаты, свидетельствующие об изменении функциональных характеристик КФП после криовоздействия (Гольцев и др., 2003).

Почти в равной степени кКФП и нКФП улучшали показатели массы и количества клеток в селезенке. Более того, после введения кКФП ее клеточный состав был почти таким же, как в контроле, тогда как после введения нКФП состоял преимущественно из бластных клеток (рис. 4б). Терапевтический эффект после введения обоих препаратов наблюдали и в лимфатических узлах, что выражалось в приближении к контрольным значениям массы (рис. 3а) и содержания клеток в органе (рис. 3б), а кроме того, в снижении бластной реакции при введении кКФП (рис. 4г). По-иному изменялась цитограмма КМ (рис. 4в), хотя и в этом случае корректирующий эффект был более выражен после введения кКФП. Практически в одном ключе и с положительной динамикой процесса оба типа КФП изменяли показатели состояния клеток ПП, особенно содержания среди них адгезирующих клеток (рис. 5а, б).

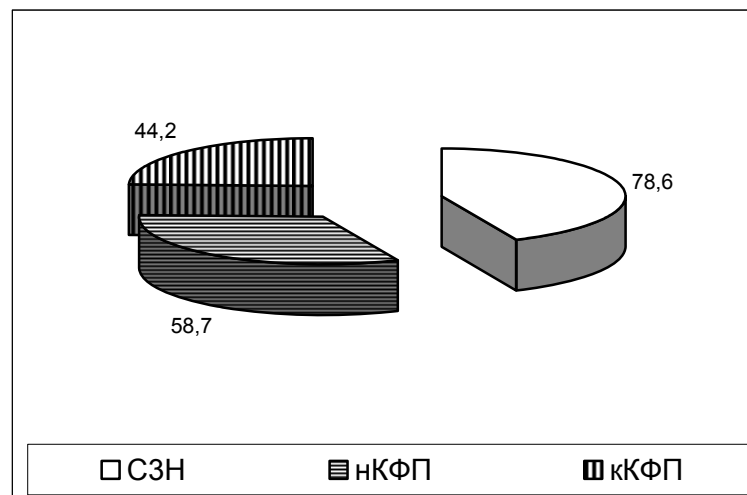
В гуморальном звене иммунитета наиболее манифестным после введения КФП было снижение уровня мЦИК (рис. 6). Судя по представленным на рис. 5б данным, это связано со способностью препаратов стимулировать фагоцитарную активность клеток макрофагально-фагоцитарной системы, ответственных за элиминацию ЦИК из крови (Смердова, Косова, 2000). Возникающие в условиях избытка опухолевого антигена мЦИК представляют серьезную опасность для организма не только по причине нарушения коммуникационных взаимодействий ИКК, но и высокой способности активировать комплемент и усиливать воспалительный процесс (Lachmann, Peters, 1982). В этом смысле можно говорить о детоксикационном эффекте превентивно введенных КФП и рассматривать его как эффект КФП, направленный на минимизацию опухолевого процесса.

Оценка общего содержания и соотношения определенных популяций и субпопуляций ИКК может служить одним из критериев эффективности проведенной иммунотерапии. Представленные на рис. 7 данные свидетельствуют о том, что у леченных животных наиболее выражено приближались к контрольным значениям показатели содержания  $Ia^+$  клеток. В свете сказанного выше, это связано не только с коррекцией ИС вообще, но и минимизацией степени выраженности аутоиммунного

процесса в частности (Сараева и др., 1974). Учитывая взаиморегулирующую активность разных форм ИКК, ясно, что этому способствует и положительная динамика изменения содержания общих Т-лимфоцитов ( $CD3^+$ ), а также их регуляторных субпопуляций с маркерами  $CD4$  и  $CD8$ . Как результат, отмечено улучшение практически всех исследуемых индексов. Так, индекс соотношения  $Ia^+/CD3^+$  клеток после введения кКФП составлял 0,93, после нКФП – 1,43 (СВА – 1,125; СЗН – 6,1);  $CD3^+/CD4^+$  клеток после введения нКФП составлял 0,56, кКФП – 0,79 (СВА – 0,63; СЗН – 0,24);  $CD3^+/CD8^+$  клеток составлял после введения кКФП – 1,717, нКФП – 1,1 (СВА – 1,48; СЗН – 0,377). Судя и по этим показателям, корректирующий эффект в большей степени проявляли кКФП.

Существенным является и факт разнонаправленного действия КФП на функцию ЕК. Введение кКФП еще в большей степени стимулировало их активность, тогда как нКФП – ингибировало до уровня, значительно меньшего контрольного (рис. 8). Этот феномен является еще одним доказательством того, что криоконсервирование модифицирует структурно-функциональное состояние биообъекта вообще и КФП в частности (Гольцев и др., 1995). В данном случае холодный фактор может либо селективно элиминировать (ингибировать функцию) присутствующих в общем пуле КФП естественных супрессоров (Schmidt-Wolf, Dejbakhs-Jones, 1992), которые проявляют активность в отношении ЕК, либо в разной степени изменять функцию различных популяций цитокин-продуцирующих клеток трансплантата, что, соответственно, меняет характер ответа на эту ситуацию субстратов ИС реципиента (Гольцев и др., 2003).

Логическим подтверждением проявления корректирующего эффекта разных видов КФП в отношении ЛГК вообще и ИС в частности являются результаты, представленные на рис. 9, которые свидетельствуют о том, что введение КФП снижало частоту развития РМЖ (кКФП – на 36%, нКФП – на 22%).



**Рис. 9.** Частота развития опухоли у мышей линии СЗН до и после введения кКФП или нКФП

Терапевтический эффект КФП может реализоваться через механизм каскадно развивающихся процессов, которые, как и для других препаратов эмбриофетоплацентарного комплекса, достаточно подробно описаны (Грищенко, Гольцев, 2002). Кроме того, специфика реализации некоторых эффектов может также определяться непосредственно антибластомной активностью синтезируемых фетальной печенью интерферона- $\gamma$ , фактора некроза опухоли, фетопротеина- $\alpha$  и других субстанций (Dudich et al., 1999).

#### Выводы

1. Превентивное введение КФП, корректируя состояние ИС мышей линии СЗН, снижает частоту развития опухоли.

2. Более выраженный иммунокорректирующий и противоопухолевый эффект наблюдался после введения кКФП. Данный факт свидетельствует о способности криоконсервирования выступать в роли модификатора функционального состояния биообъекта, реализующего в более выраженной форме в организме реципиента активацию противоопухолевой защиты.

#### Литература

Альперн Д. Е. Воспаление (Вопросы патологии). – М.: Медицина. – 1959. – 237с.



- Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы микробиологических исследований. – Л.: Медицина, 1972. – 180с.
- Барышников А.Ю. Взаимоотношение опухоли и иммунной системы организма // Практическая онкология. – 2003. – Т.4, №3. – С.127–130.
- Бондарович Н.А., Останкова М.В., Гольцев К.А. и др. Изменение лимфогемопоэтического комплекса у мышей с ускоренным старением и возможные пути его коррекции // Сб. науч. трудов конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы геронтологии и гериатрии». – Киев, 2006. – С. 24–25.
- Гольцев А.Н., Луценко Е.Д., Останкова Л.В. и др. Мембранные структуры, определяющие фенотипические характеристики и функциональное состояние кроветворных клеток; возможная их модификация под действием факторов криоконсервирования. Часть I // Проблемы криобиологии. – 1995. – №3. – С. 19–30.
- Гольцев А.Н., Останкова Л.В., Дубрава Т.Г. и др. Функциональная активность криоконсервированных клеток (КОЕс) в зависимости от компонентного состава миелотрансплантата // Проблемы криобиологии. – 1993. – №4. – С. 34–39.
- Гольцев А.Н., Рассоха И.В., Луценко Е.Д. и др. Межклеточные взаимодействия в иммунокомпетентной сфере при ревматоидном артрите после применения гемопоэтических клеток эмбриональной печени // Проблемы криобиологии. – 2003. – №3. – С. 45–53.
- Грищенко В.И., Гольцев А.Н. Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения // Проблемы криобиологии. – 2002. – №1. – С. 54–84.
- Донцов В.И. Регуляция лимфоцитами клеточного роста соматических тканей и новая иммунная теория старения // Профилактика старения. – 1998. – №1. – С. 34–45.
- Лимфоциты. Методы / Под ред. Дж.Клауса. – М.: Мир, 1990. – 395с.
- Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования. Справочник. – М.: Медицина, 1987. – 368с.
- Общие этические принципы экспериментов на животных. Материалы первого национального конгресса по биоэтике (тезисы докладов и выступлений). – Киев: НАНУ, 2001. – 16с.
- Пастер Е.У., Овод В.В., Позур В.К., Викоть Н.Е. Иммунология. Практикум. – К.: Вища школа, 1989. – 304с.
- Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. – М.: Мир, 2000. – 592с.
- Сараева З.М., Терещенко И.П., Кашулина М.М. Аутоантитела у интактных мышей линии С57ВL и С3НA и динамика их изменения в процессе опухолевого роста // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 1974. – №4. – С. 62–65.
- Смердова М.А., Косова Е.Ю. Ревматоидный фактор в лабораторной диагностике // Информационный бюллетень Новости «Вектор-Бест». – 2000. – Т.3, №17. – С. 27–32.
- Aoudjit F., Vuori K. Engagement of the 21 integrin inhibits Fas ligand expression and activation-induced cell death in T cells in a focal adhesion kinase-dependent manner // Blood. – 2000. – Vol.95. – P. 2044–2051.
- Bachmann M.F., Oxenius A., Mak T.W., Zinkernagel R.M. T cell development in CD8<sup>-/-</sup> mice. Thymic positive selection is biased toward the helper phenotype // J. Immunol. – 1995. – Vol.155. – P. 3727–3733.
- Baribaud F., Maillard I., Vacheron S. et al. Role of dendritic cells in the immune response induced by the mouse mammary tumor virus superantigen // J. Virol. – 1999. – Vol.73. – P. 8403–8409.
- Barnett A., Mustafa F., Wrona T.J. et al. Expression of mouse mammary tumor virus superantigen mRNA in the thymus correlates with kinetics of self-reactive T-cell loss // J. of Virology. – 1999. – Vol.73, №8. – P. 6634–6645.
- Bittner J.J. Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice // Science. – 1936. – Vol.84. – P. 162–169.
- Creemers P., Bentvelzen P. The role of T-supressor cells in MTV-directed cellular immunity // Eur. J. Cancer. – 1977. – Vol.13, №1. – P. 261–267.
- Creemers P., Brodt P., Lala P.K. An analysis of host T-cell subsets based on Lyt antigenic markers during the development of spontaneous C3H mammary carcinomas // Cell. Immunol. – 1984. – Vol.84, №2. – P. 427–432.
- Comission of European Communities Council Directive of 24 November 1988 on the approximation of law: regulation of and administrative provision of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes 1986 / 609/EES ISSN 037806978 .
- Czarneski J., Meyers J., Peng T. et al. Interleukin-4 up-regulates mouse mammary tumor virus expression yet is not required for in vivo virus spread // Journal of Virology. – 2001. – Vol.75, №23. – P. 11886–11890.
- Dankberg F., Persidsky M.D. A test of granulocyte integrity and phagocytic function // Cryobiology. – 1976. – Vol.13. – P. 430–432.
- Dudich E., Semenкова L., Dudich I. et al.  $\alpha$ -Fetoprotein causes apoptosis in tumor cells via a pathway independent of CD95, TNFR1 and TNFR2 through activation of caspase-3-like proteases // Eur. J.

- Biochem. – 1999. – Vol.266. – P. 750–761.
- Finke D., Baribaud F., Diggelmann H. et al. Extrafollicular plasmablast B cells play a key role in carrying retroviral infection to peripheral organs // J. Immunology. – 2001. – Vol.166. – P. 6266–6275.
- Gonzburg W.H., Salmons B. Factors controlling the expression of mouse mammary tumour virus // Biochem. J. – 1992. – Vol.283. – P. 625–632.
- Jiskra J., Límanová Z., Barkmanová J. et al. Autoimmune thyroid diseases in women with breast cancer and colorectal cancer // Physiol Res. – 2004. – Vol.53, №6. – P. 693–702.
- Jude B.A., Pobezinskaya Y., Bishop J. et al. Subversion of the innate immune system by a retrovirus // Nat. Immunol. – 2003. – Vol.4. – P. 573–578.
- Held W., Shakhov A.N., Waanders G. et al. An exogenous mouse mammary tumor virus with properties of Mls-1a (Mtv-7) // J. Exp. Med. – 1992. – Vol.175. – P. 1623–1633.
- Lachmann P.J., Peters D.K. Clinical aspects of immunology. – U.K., Oxford: Blackwell, 1982. – 360p.
- Luther S.A., Gulbranson-Judge A., Acha-Orbea H., MacLennan I.C.M. Viral superantigen drives extrafollicular and follicular B cell differentiation leading to virus-specific antibody production // J. Exp. Med. – 1997. – Vol.185. – P. 551–562.
- Melani C., Chiodoni C., Forni G., Colombo M.P. Myeloid cell expansion elicited by the progression of spontaneous mammary carcinomas in c-erbB-2 transgenic BALB/c mice suppresses immune reactivity // Blood. – 2003. – Vol.102, №6. – P. 2138–2145.
- Ohm J.E., Gabrilovich D.I., Sempowski G.D. et al. VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression // Blood. – 2003. – Vol.101, №12. – P. 4878–4886.
- Rahal M.D., Reinisch E., Osmond D.G. Changes in the populations of null, NK1.1+, and Thy1lo lymphocytes in the bone marrow of tumor-bearing mice: effect of indomethacin treatment // Cell. Immunol. – 1992. – Vol.139, №1. – P. 218–228.
- Schmidt-Wolf I.G.H., Dejbakhs-Jones S. T-cells subsets and supressor cells in human bone marrow // Blood. – 1992. – Vol.80, №12. – P. 3242–3250.
- Sennikov S.V., Krysov S.V., Injelevskaya T.V. et al. Production of cytokines by immature erythroid cells derived from human embryonic liver // European Cytokine Network. – 2001. – Vol.2, №12. – P. 274–279.
- Teshima H., Wanebo H., Pinsky C., Day N.K. Circulating immune complexes detected by '251-Clq deviation test in sera of cancer patients // The J. of Clinic. Investigation. – 1977. – Vol.59. – P. 1134–1142.
- van den Brink M.R., Palomba M.L., Basse P.H., Hiserodt J.C. In situ localization of 3.2.3+ natural killer cells in tissues from normal and tumor-bearing rats // Cancer Research. – 1991. – Vol.51, №18. – P. 4931–4936.
- Xaus J., Comalada M., Barrachina M. et al. The expression of MHC class II genes in macrophages is cell cycle dependent // The Journal of Immunology. – 2000. – Vol.165. – P. 6364–6371.
- Zantut-Wittmann D.E., Boechat L.H.B., Pinto G.A. et al. Autoimmune and non-autoimmune thyroid diseases have different patterns of cellular HLA class II expression // Sao Paulo Med. J. – 1999. – Vol.117, №4. – P. 316–322.

**СТАН ЛІМФОГЕМОПОЕТИЧНОГО КОМПЛЕКСУ МИШЕЙ З ГЕНЕТИЧНО ДЕТЕРМІНОВАНИМ РОЗВИТКОМ РАКА МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ ПІСЛЯ ВИКОРИСТАННЯ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ КЛІТИН ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ**

**М.О.Бондарович, М.В.Останков, М.А.Сіроус, Л.В.Останкова, А.М.Гольцев**

Проведено дослідження стану лімфогемопоетичного комплексу (ЛГК), у тому числі і його складового компонента – імунної системи (ІС) мишей лінії С3Н в період маніфестації онкопатології (вік 13 місяців). Цим мишам у віці 6 місяців були введенні алогенні кріоконсервовані (кКФП) або нативні (нКФП) клітини фетальної печінки (КФП). Показано, що обидва види клітин коригували структурно-функціональні характеристики ЛГК і знижували частоту розвитку пухлин. Виявлено визначені розходження прояву ефекту кКФП у порівнянні з нКФП.

Ключові слова: *рак молочної залози, клітини фетальної печінки, імунна система, кріоконсервування.*

**STATE OF IMMUNE SYSTEM OF MICE WITH GENETICALLY DETERMINED DEVELOPMENT OF  
BREAST CANCER AFTER APPLICATION OF CRYOPRESERVED FETAL LIVER CELLS**  
N.A.Bondarovich, M.V.Ostankov, M.A.Sirous, L.V.Ostankova, A.N.Goltsev

Lymphohemopoietic complex (LHC) state was studied including as its component immune system (IS) of C3H mice during the period of oncopathology manifestation (aged 13 months). These mice aged 6 months were introduced with allogeneic cryopreserved or native cells of fetal liver. It has been shown that both cell types corrected structural and functional characteristics of LHC and reduced the frequency of tumor development. There have been revealed the differences in manifestation of cryopreserved fetal liver cells if compared those native.

Key words: *breast cancer, fetal liver cells, immune system, cryopreservation.*

---

Представлено І.Л.Диким

Рекомендовано до друку А.В.Некрасовою