

Eficacitatea antitumorală îmbunătățită a cisplatinei în combinație cu HemoHIM la șoarecii purtători de tumori

[Parcul Hae-Ran](#) ,[Eun-Jin Ju](#) ,[Sung-Kee Jo](#)  ,[Uhee Jung](#) ,[Sung-Ho Kim](#) și[Sung-Tae Yee](#)

[BMC Cancer](#) **9** , Număr articol: 85 (2009) | [Citați acest articol](#)

22k accesări | **32** Citate | **6** Altmetric | [Metrici](#)

Abstract

Fundal

Deși cisplatina este unul dintre cei mai eficienți agenți chimioterapeutici, cisplatina singură nu atinge un rezultat terapeutic satisfăcător. De asemenea, acumularea de cisplatină prezintă toxicitate pentru țesuturile normale. În acest studiu, am examinat posibilitatea HemoHIM atât de a îmbunătăți efectul anticancer cu cisplatină, cât și de a reduce efectele secundare ale cisplatinei la șoarecii purtători de melanom.

Metode

HemoHIM a fost preparat prin adăugarea fracției insolubile în etanol la extractul total de apă dintr-un amestec de 3 ierburi comestibile, Angelica Radix, Cnidium Rhizoma și Paeonia Radix. Efectele anticancer ale HemoHIM cu cisplatină au fost evaluate la șoarecii purtători de melanom. Am folosit un test de eliberare a Cr51 ^{pentru} a măsura activitatea celulei NK/Tc și ELISA pentru a evalua producția de citokine.

Rezultate

La șoarecii purtători de melanom, cisplatina (4 mg/kg BW) a redus dimensiunea și greutatea tumorilor solide, iar suplimentarea cu HemoHIM cu cisplatină a sporit scăderea atât a dimensiunii tumorii ($p < 0,1$) cât și a greutateii ($p < 0,1$). HemoHIM în sine nu a inhibat creșterea celulelor melanomului *in vitro* și nu a perturbat efectele cisplatinei *in vitro*. Cu toate acestea, administrarea HemoHIM a îmbunătățit atât activitatea celulelor NK, cât și a celulelor Tc la șoareci. Interesant, HemoHIM a crescut proporția de celule NK în splină. La șoarecii purtători de melanom tratați cu cisplatină, administrarea HemoHIM a crescut, de asemenea, activitatea celulelor NK și a celulelor Tc și secreția IL-2 și IFN- γ din splenocite, ceea ce părea să contribuie la eficacitatea sporită a cisplatinei de către HemoHIM. De asemenea, HemoHIM a redus nefrotoxicitatea, așa cum se vede prin distrugerea celulelor tubulare a rinichilor.

Concluzie

HemoHIM poate fi un supliment benefic în timpul chimioterapiei cu cisplatină pentru îmbunătățirea eficacității antitumorale și reducerea toxicității cisplatinei.

Chimioterapia a fost una dintre modalitățile terapeutice majore utilizate în mod obișnuit pentru tratamentul unei varietăți de pacienți cu cancer. Cu toate acestea, în multe cazuri, chimioterapia sau radioterapia singură nu pot obține un rezultat terapeutic satisfăcător, și anume remiterea completă a tumorilor, și induce efecte secundare severe la doze eficiente terapeutice.

Cisplatina (cis-diaminedicloroplatinum (II) sau CDDP), un medicament anticancer care conține platină, este unul dintre agenții citotoxici cei mai des utilizați pentru tratamentul unei varietăți de tumori maligne solide. În ciuda activității sale anticancer excelente, utilizarea clinică a cisplatinei este adesea limitată de efectele sale secundare nedorite, cum ar fi nefrotoxicitatea severă și hepatotoxicitatea [[1](#) , [2](#)]. Deși mecanismul precis pentru toxicitatea indusă de cisplatină nu este bine înțeles, cisplatina este preluată și acumulată de preferință în celulele hepatice și renale [[3](#)], ducând la creșterea producției de specii reactive de oxigen (ROS) și scăderea enzimelor antioxidante. [[4](#) – [7](#)]. Prin urmare, antioxidanții au fost administrați înainte de tratamentul cu cisplatină pentru a proteja împotriva nefrotoxicității [[8](#) – [10](#)].

Medicina complementară și alternativă definită de Centrul Național ca un grup de diverse sisteme medicale și de îngrijire a sănătății nu este în mod normal considerată medicină convențională [[11](#)]. Medicina complementară și alternativă nu inhibă creșterea tumorii. Aceste tratamente pot fi efectuate adjuvant sau în locul tratamentelor convenționale. Numeroase produse medicale pe bază de plante sunt promovate ca medicamente complementare și alternative. În plus, studiile științifice și medicale din Coreea, China și Japonia, și mai recent în Statele Unite, au arătat din ce în ce mai mult că polizaharidele derivate din plante au proprietăți imunoterapeutice puternice în ceea ce privește prevenirea și tratamentul cancerului [[12-19](#)] .

O nouă compoziție pe bază de plante, HemoHIM, a fost concepută prin adăugarea fracțiunii sale de polizaharidă într-un extract de apă fierbinte dintr-un amestec de plante constând din Angelica Radix, Cnidium Rhizoma și Paeonia Radix. Această compoziție a fost concepută pentru a proteja țesuturile de auto-reînnoire și pentru a promova o refacere a sistemului imunitar împotriva stresului oxidativ, cum ar fi iradierea [[20](#) , [21](#)].

Compoziția generală a HemoHIM a fost 60,4% carbohidrați, 6% proteine și 33,6% altele (datele nu sunt prezentate). Componentele de modulare a sistemului imunitar din HemoHIM au fost fracția insolubilă în etanol [[21](#)], iar conținutul de polizaharide din această fracțiune a fost de 40,9% ($\pm$ 3,8) (Datele nu sunt prezentate). În plus, componentele funcționale incluse în fracția solubilă în etanol a HemoHIM au fost acid galic [0,2% ($\pm$ 0,06)], acid clorogenic [0,33% ($\pm$ 0,05)], paeoniflorin [1,32% ($\pm$ 0,15)], nodakenina [0,58% ($\pm$ 0,04)] și acid benzoic [0,17% ($\pm$ 0,05)] (Datele nu sunt prezentate). În special, aceste 3 ierburi sunt enumerate ca materii prime în Codul alimentar din Coreea. În cele din urmă, s-a dovedit că HemoHIM este sigur pentru administrare pe termen lung (datele nu sunt afișate).

Capacitatea de supraveghere a celulelor tumorale a fost mediată nespecific de celule dendritice, macrofage și celule natural killer și a fost mediată în mod specific de celulele T, inclusiv celulele T citotoxice (Tc). S-a dovedit că atât celulele T, cât și celulele NK sunt celule efectoare anticancer [[22](#) , [23](#)]. De asemenea, s-a demonstrat că IFN-γ și IL-2 au activitate anticancer la animale [[24](#) , [25](#)].

În acest studiu, a fost evaluată posibilitatea ca HemoHIM să crească capacitatea de supraveghere imună a celulelor tumorale atât prin celulele NK, cât și prin celulele Tc la șoarecii purtători de melanom tratați cu cisplatină. De asemenea, am examinat efectul său protector împotriva nefrotoxicității induse de cisplatină la șoarecii purtători de melanom. Rezultatele noastre sugerează că HemoHIM poate fi un supliment benefic în timpul chimioterapiei cu cisplatină prin îmbunătățirea eficacității antitumorale și reducerea toxicității cisplatinei.

Metode

Animale

Cercetarea a fost aprobată și efectuată conform principiilor enunțate în „Legea privind îngrijirea animalelor”, elaborat de Ministerul Agriculturii și Pădurilor, Republica Coreea. S-au folosit șoareci femele C57BL/6 (H-2b) în vârstă de 8 săptămâni ⁽ The Orient Inc.; Charles River Technology; Seul, Coreea). Șoarecii au fost găzduiți în cuști de polycarbonat într-o condiție specifică fără patogeni și au fost hrăniți cu o dietă standard pentru animale și apă *ad libitum* .

Prepararea HemoHIM

Un amestec de 3 ierburi medicinale comestibile, Angelica Radix (rădăcină de *Angelica gigas* Nakai), Cnidii Rhizoma (rizom de *Cnidium officinale* Makino) și Paeonia Radix (rădăcină de *Paeonia japonica* Miyabe), a fost decoctat timp de 4 ore în apă clocotită pentru a obține un extract total (HIM-I). O jumătate din HIM-I a fost fracționată într-o fracțiune solubilă în etanol și într-o fracțiune de polizaharidă insolubilă în etanol printr-o precipitare în etanol 80%. HemoHIM a fost preparat prin adăugarea fracției de polizaharidă insolubilă în etanol la cealaltă jumătate de HIM-I.

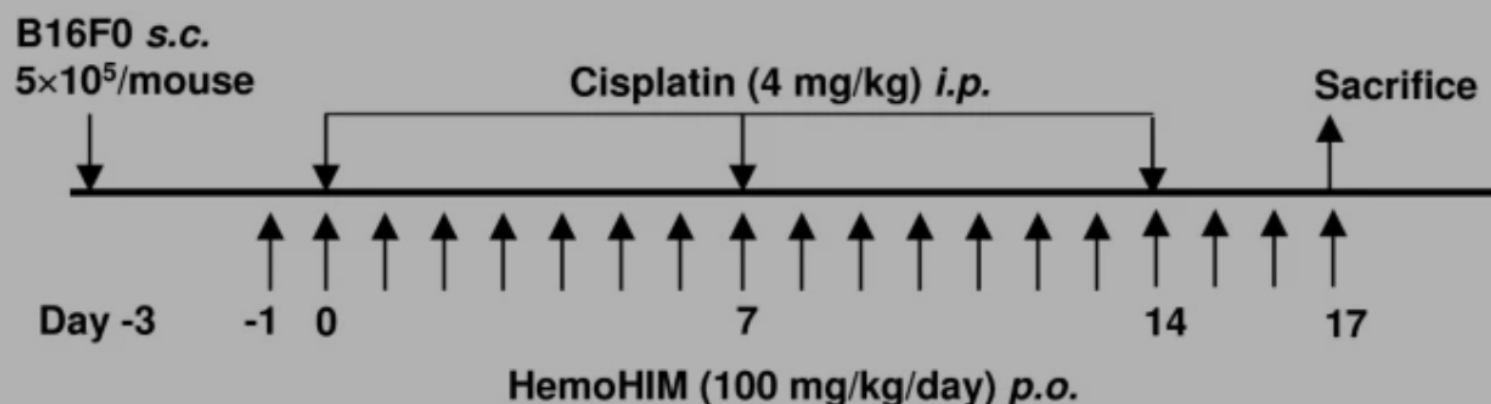
Cultura celulară

B16F0 (linia celulară de melanom; CRL-6322) și YAC-1 (leucemie indusă de virusul Molony; TIB-160) au fost achiziționate de la ATCC (Rockville, MD, SUA) și cultivate în RPMI 1640 suplimentat cu 10% ser fetal bovin (FBS, GIBCO BRL, Grand Island, SUA)), 2×10^{-2} M tampon HEPES, 2×10^{-3} M L-glutamină, 100 U/ml penicilină și 50 μg/ml streptomicina (GIBCO BRL). Toate celulele au fost crescute la 37°C într-o atmosferă umidificată conținând 5% CO₂ .

Injecția cu cisplatină și administrarea HemoHIM la modelul de șoareci purtători de tumori

Șoarecii au fost împărțiți aleatoriu în trei grupuri (Control, Cisplatin și Cisplatin+HemoHIM) și fiecare grup a fost format din douăzeci de șoareci. Melanomul B16F0 (5×10^5 celule /șoarece) a fost inoculat în regiunea femurală subcutanată stângă a șoarecilor cu 3 zile înainte de o injecție inițială de cisplatină. Cisplatina a fost injectată intraperitoneal la 4 mg/kg greutate corporală (BW) în zilele 0, 7 și 14 (în total trei injecții). Grupul experimental a fost intubat cu HemoHIM la o concentrație finală de 100 mg/kgB.W. de fiecare zi din ziua -1 până în ziua 16, în timp ce grupul de control a primit doar apă. Schema procedurii de administrare este rezumată în Fig. 1. În ziua 17 după injectarea inițială de cisplatină, toți șoarecii din fiecare grup au fost experimentați, respectiv, pentru a evalua greutatea tumorii sau dimensiunea tumorii. Mărimea tumorii a fost calculată după cum urmează: dimensiunea tumorii = $ab^{2/2}$, unde a și b sunt diametrele mai mari și, respectiv, mai mici.

Figura 1



Schema experimentală utilizată pentru evaluarea eficacității HemoHIM la șoarecii purtători de melanom care au fost injectați cu cisplatină. Celulele de melanom B16F0 (5×10^5 / șoarece) au fost inoculate în regiunea femurală stângă subcutanată a șoarecilor cu 3 zile înainte de o injecție inițială de cisplatină. Cisplatină a fost injectată intraperitoneal la 4 mg/kg BW, iar HemoHIM a fost administrat zilnic la 100 mg/kg BW din ziua -1 până în ziua 16. În ziua 17 după injectarea inițială de cisplatină, toți șoarecii din fiecare grup au fost experimentați, respectiv, pentru a evalua diferiți parametri.

Test de creștere a celulelor melanomului *in vitro*

Efectul cisplatinei și HemoHIM asupra numărului de celule viabile de melanom a fost evaluat de CCK-8 (WST-8; Dojindo Lab, Kumamoto, Japonia). Principiul care stă la baza evaluării viabilității celulare de către CCK-8 se bazează pe detectarea activității dehidrogenazei în celulele viabile, similar cu principiul MTT. Pe scurt, celulele de melanom au fost însămânțate pe plăci cu 96 de godeuri la o densitate de 7×10^3 celule per godeu în 100 μ l de mediu. După incubare timp de 24 de ore, celulele au fost tratate cu diferite concentrații de cisplatină și cu HemoHIM 100 μ g/ml timp de 24 de ore. După incubare, în fiecare godeu a fost adăugată o soluție de CCK-8. Celulele au fost incubate la 37°C timp de două ore și densitatea optică a fost măsurată folosind un cititor de microplăci (Dispozitive Moleculare) la 450 nm (-Ref. 570 nm).

Prepararea limfocitelor în splină

Splinele au fost îndepărtate aseptice de la șoareci și o singură suspensie celulară a fost preparată prin tocarea splinei. Limfocitele splinei au fost preparate printr-o centrifugare cu gradient de densitate pe o soluție Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, SUA). Toate suspensiile celulare au fost menținute în mediul RPMI 1640 suplimentat cu 10% ser fetal bovin (FBS), 2×10^{-2} M tampon HEPES, 2×10^{-3} M L-glutamină, 1×10^{-3} M piruvat, 100 U/ml penicilină, 50 μ g/ml streptomicina, 5×10^{-5} M de 2-mercaptoetanol și 1% aminoacid neesențial. Toate suplimentele au fost achiziționate de la GIBCO BRL (Grand Island, SUA).

Administrarea HemoHIM la modelul de șoareci purtători de tumori tratați cu MMC

În primul rând, melanomul B16F0 recoltat a fost inactivat prin tratament cu mitomicină C (MMC) (50 μ g/ml, incubare timp de 40 de minute la 37°C baie de apă). Melanomul B16F0 tratat cu MMC a fost inoculat intraperitoneal cu 1×10^6 celule /șoarece la 3 zile după o administrare inițială de HemoHIM. Grupul experimental a fost intubat cu HemoHIM la o concentrație finală de 100 mg/kgB.W. de fiecare zi din ziua -3 până în ziua 4, în timp ce grupul de control a primit doar apă. La zece zile după inocularea celulelor canceroase, limfocitele splinei au fost preparate ca celule efectoare pentru a măsura activitatea celulelor NK și a celulelor Tc prin testul de eliberare a ^{51}Cr .

Test pentru activitatea de ucidere a celulelor canceroase mediată de celulele NK și celulele citotoxice T (Tc).

Țintele tumorale YAC-1 sau țintele tumorale B16F0 au fost etichetate cu ^{51}Cr -cromat de sodiu (Amersham Pharmacia Biotech, Kangnam-ku, Seul, Coreea) la o doză de $40\text{ }\mu\text{Ci}/10^6\text{ celule}$ timp de 60 de minute pentru a măsura activitatea celulelor NK sau Tc activitatea celulară, respectiv. Celulele au fost spălate de trei ori în HBSS (Hank's Balanced Salt Solution; Sigma-Aldrich Co.) și resuspendate la o concentrație finală de $2 \times 10^5\text{ celule}/\text{ml}$. Douăzeci de mii de celule țintă și 10^6 sau $2 \times 10^6\text{ celule}$ efectoare ale splinei au fost placate în godeurile unei plăci de fund U cu 96 de godeuri. Plăcile au fost apoi incubate la 37°C timp de 4 ore în aer umidificat conținând 5% CO_2 . După o centrifugare la 350 g timp de 10 minute, 100 μl de supernatant au fost recoltați din fiecare godeu și au fost numărați timp de 1 min. într-un contor gamma (Wallac, Wellesley, MA, SUA). Procentul de liză a fost calculat după cum urmează: % liză = $\{[\text{CPM (experimental)} - \text{CPM (spontan)}]/[\text{CPM (maximum)} - \text{CPM (spontan)}]\} \times 100$.

Analiza citometriei în flux a celulelor NK și Tc în limfocitele splinei

Limfocitele splinei au fost colorate cu anticorpi marcați cu fluorescent sau anticorpi de control izotip în soluție salină tamponată cu fosfat (PBS). După colorare timp de 30 de minute, limfocitele au fost spălate de trei ori cu un mediu FACS proaspăt și apoi analizate prin citometrie în flux (Backman Coulter, Miami, Florida, SUA). O histogramă de fluorescență de cel puțin 50.000 de numărări a fost analizată în fiecare probă. Au fost utilizați următorii reactivi de la BD PharMingen (San Diego, CA, SUA): anti-NK1.1 conjugat cu PE și anti-CD8 conjugat cu FITC.

Condiție pentru producția de citokine *in vitro*

Limfocitele splinei ($2 \times 10^6\text{ celule}/\text{godeu}$) obținute de la șoareci au fost stimulate cu concanavalin A (ConA) la 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ timp de 1 sau 2 zile pentru a măsura nivelul IL-2 și IFN- γ în supernatant.

Anticorpi și testul imunosorbent legat de enzime (ELISA)

Pentru IL-2, clona JES6-1A12 a fost utilizată ca Ab de captură, iar JES6-5H4 marcat cu biotină a fost Ab de detectare. Pentru măsurătorile IFN- γ , clona R4-6A2 a fost utilizată ca Ab de captură, iar XMG1.2 marcat cu biotină a fost Ab de detectare. Toți anticorpii, precum și IFN- γ recombinant și IL-2 au fost achiziționați de la BD PharMingen (San Diego, CA, SUA). Citokinele au fost determinate prin metoda ELISA descrisă anterior [[26](#)].

Examinarea histopatologică a rinichilor prin colorare cu hematoxilină și eozină

Rinichiul de la șoareci din fiecare grup în ziua 17 după injectarea inițială de cisplatină a fost îndepărtat și fixat în formol tamponat 10% timp de 2 zile. Secțiunile încorporate în parafină (5 μm grosime) au fost colorate cu hematoxilină și eozină (H&E) pentru examinare histopatologică și observate la microscop cu lumină la mărimi $\times 200$.

Analiza statistica

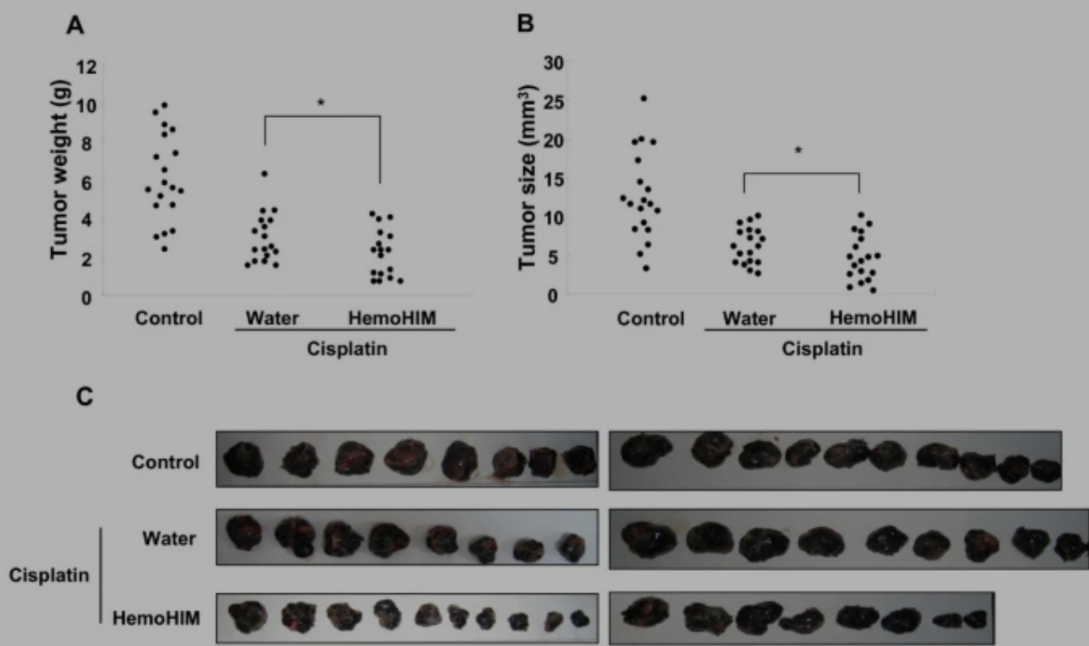
Datele au fost exprimate ca medie $\pm$ SD și o semnificație statistică a fost analizată prin utilizarea testului *t* Student . Diferențele cu o valoare *p* mai mică de 0,05 au fost considerate semnificative și considerabile cu o valoare *p* mai mică de 0,1.

Rezultate

HemoHIM îmbunătățește eficacitatea antitumorală a cisplatinei la șoarecii purtători de tumori

Pentru a evalua efectul HemoHIM asupra inhibării creșterii tumorii la șoarecii purtători de melanom B16F0 tratați cu cisplatină, am folosit un model de șoareci purtători de tumoră care a fost rezumat în Fig . După cum se arată în Fig. [2A](#) și [2B](#) , la 20 de zile după inocularea melanomului, greutatea și dimensiunea tumorii grupului de control fără tratament cu cisplatină și HemoHIM au fost de 6,093 g ($\pm$ 2,28) și respectiv 12,6 mm³ ($\pm$ 5,65). Cu toate acestea, în grupul injectat cu cisplatină, greutatea tumorii (2,97 g ($\pm$ 1,29)) și dimensiunea (6,3 mm³ ($\pm$ 2,32)) au fost reduse semnificativ în comparație cu grupul de control. Suplimentarea HemoHIM cu cisplatină a dus la o reducere suplimentară atât a greutății tumorii (2,22 g ($\pm$ 1,24)) cât și a dimensiunii (4,7 mm³ ($\pm$ 2,93)). Numai suplimentarea cu HemoHIM fără cisplatină nu a arătat nicio reducere a greutății tumorii [6,15 g ($\pm$ 1,238)] în comparație cu grupul de control (Datele nu sunt prezentate). Acest lucru sugerează că HemoHIM în sine nu a arătat un efect de reducere a creșterii tumorii. Fotografiiile sunt prezentate în Fig. [2C](#) .

Figura 2



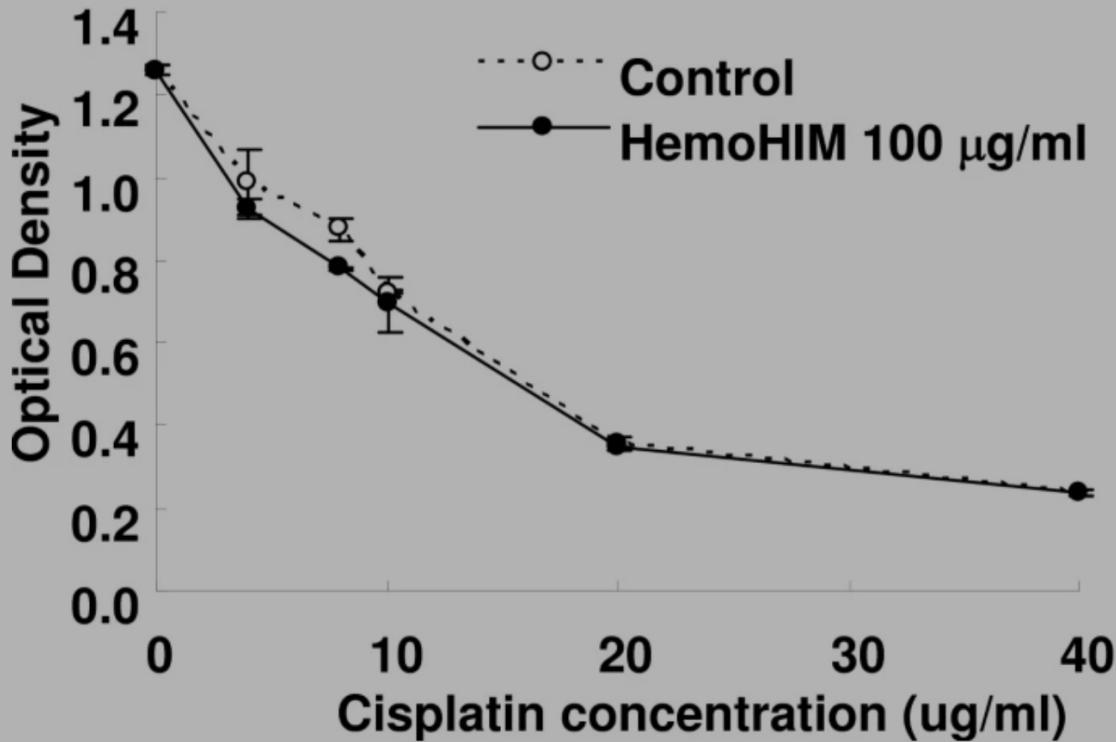
Inhibarea creșterii tumorii a fost îmbunătățită prin administrarea HemoHIM la șoarecii purtători de melanom, cărora li sa injectat cisplatină . Toți șoarecii executați așa cum este descris în figura 3 au fost sacrificați la 17 zile după injectarea inițială de cisplatină. Au fost măsurate greutatea **(A)** și dimensiunea **(B)** a tumorii . **(C)** Fotografii ale tumorii solide de melanom luate de la toți șoarecii din fiecare grup. Erau douăzeci de șoareci în fiecare grup. Datele arată media ± SD. * $p < 0,1$ comparativ cu grupul tratat numai cu cisplatină.

[Imagine la dimensiune completă >](#)

HemoHIM îmbunătățește activitatea celulelor NK și Tc, mai degrabă decât uciderea directă a celulelor canceroase

Efectul anticancer al cisplatinei depinde în principal de activitatea sa de deteriorare a ADN-ului, prin interacțiunea sa directă cu ADN-ul pentru a forma aducti ADN [27]. După cum se arată în Fig. 3 , cisplatin a inhibat creșterea celulelor melanomului într-o manieră dependentă de doză, cu IC_{50} la aproximativ 15 pg/ml. Cu toate acestea, HemoHIM în sine nu a inhibat creșterea melanomului *in vitro* (Datele nu sunt prezentate) și nici nu a perturbat funcționarea cisplatinei *in vitro* (Fig. 3).

Figura 3

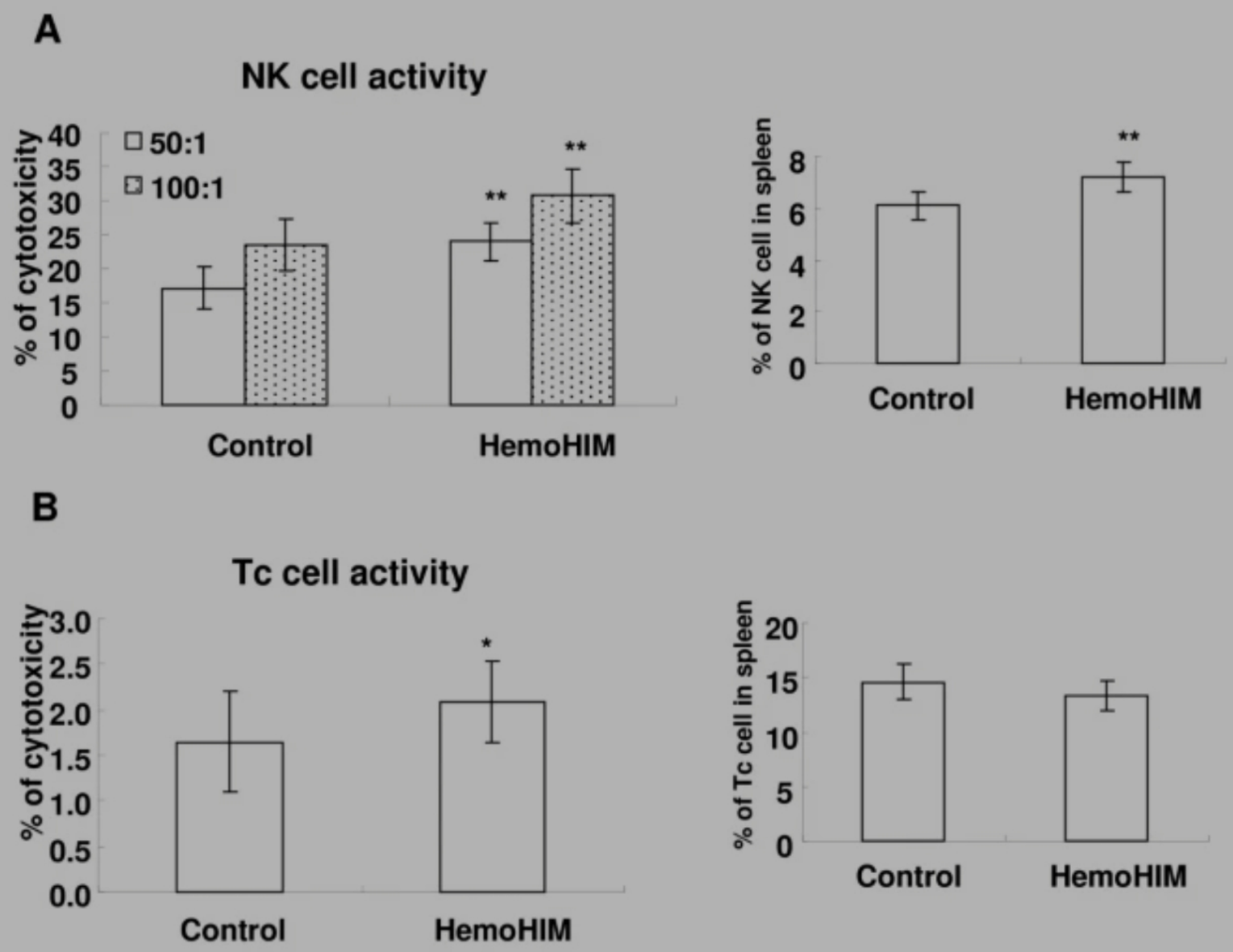


Efectul de inhibare a creșterii cisplatinei și HemoHIM asupra celulelor melanomului *in vitro* . Celulele de melanom au fost înșămânțate la o densitate de 7×10^3 ^{celule} per godeu. După incubare timp de 24 de ore, celulele au fost tratate cu diferite concentrații de cisplatină și cu HemoHIM 100 μg/ml timp de 24 de ore. După incubare, s-a adăugat o soluție de CCK-8 în fiecare godeu timp de 1 oră și apoi s-a măsurat densitatea optică.

[Imagine la dimensiune completă >](#)

Deoarece HemoHIM nu a ucis în mod direct celulele canceroase, ne-am gândit că activitatea celulelor imune care erau responsabile de supravegherea tumorii poate fi îmbunătățită de HemoHIM. Am investigat activitatea de ucidere a celulelor canceroase a celulelor NK și Tc, deoarece acestea sunt responsabile de imunitatea înnăscută și, respectiv, adaptativă împotriva tumorii. Pentru a investiga activitatea celulei Tc, am folosit șoareci care au fost imunizați cu celule de melanom tratate cu mitomicina C (MMC). După cum se arată în Fig. [4A](#) și [4B](#) , administrarea HemoHIM a îmbunătățit activitatea de ucidere a celulelor canceroase a celulelor NK și a celulelor Tc la șoarecii purtători de celule de melanom tratați cu MMC ($p < 0,05$ și, respectiv, $p = 0,06$). De asemenea, proporția de celule NK din limfocitele splinei a fost crescută prin administrarea HemoHIM ($p < 0,05$), dar nu și proporția de celule Tc. În special, aceste rezultate au fost importante deoarece celulele NK participă atât la imunitatea înnăscută, cât și la cea adaptivă și sunt considerate ca interfețe între sistemul imunitar înnăscut și cel adaptiv [[28](#)].

Figura 4

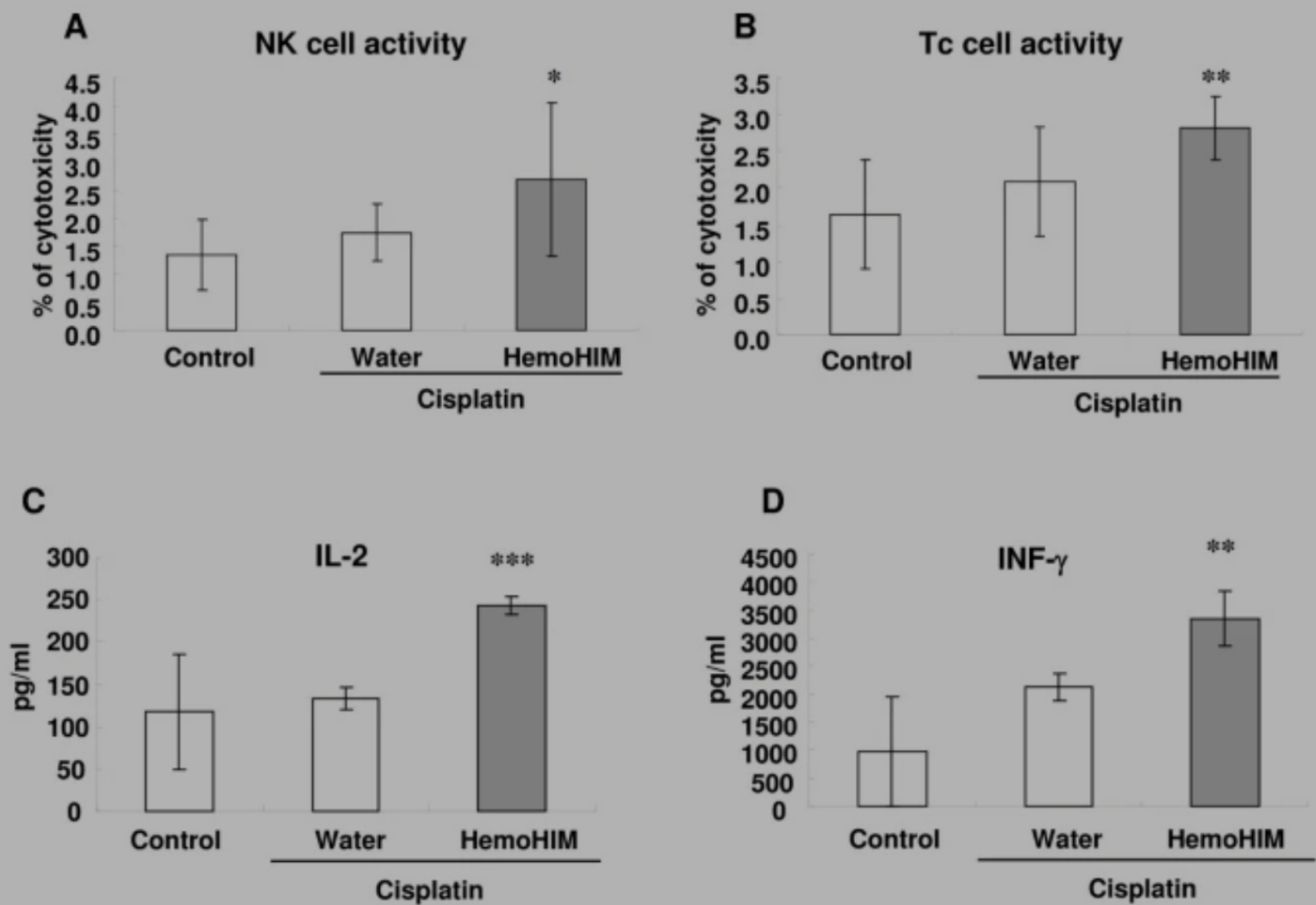


Efectul HemoHIM asupra activității de distrugere a celulelor canceroase a celulelor NK și a celulelor Tc . Șoarecii C57BL/6 au fost administrați oral cu HemoHIM (100 mg/kg BW) și injectați cu melanom B16F0 tratat cu MMC (1×10^6 celule /șoarece) în cavitatea peritoneală. La 10 zile după inocularea celulelor canceroase, activitatea de distrugere a celulelor canceroase a celulelor NK sau a celulelor Tc a fost determinată prin testul de eliberare a ^{51}Cr , așa cum este descris în *Materiale și Metode* . Au fost șase șoareci în fiecare grup. Datele arată media $\pm$ SD. * $p = 0,06$ și ** $p < 0,05$ în comparație cu apă administrată la șoareci.

Eficacitatea sporită a cisplatinei cu HemoHIM la șoarecii purtători de melanom s-a datorat creșterii secreției de IL-2 și IFN- γ și creșterii activității celulelor NK și Tc

Ca mecanisme pentru o eficacitate anticanceroasă îmbunătățită a cisplatinei în combinație cu HemoHIM la șoarecii purtători de celule melanom (Fig. 1), ne-am concentrat asupra activității celulelor NK și Tc, deoarece aceste celule joacă un rol important în supravegherea cancerului. După cum se arată în Fig. 5A și 5B , injecția de cisplatină singură la șoarecii purtători de melanom nu a sporit sau a scăzut activitatea celulelor NK și a celulelor Tc. Cu toate acestea, administrarea HemoHIM a îmbunătățit activitatea celulelor NK la șoarecii purtători de melanom care au fost tratați cu cisplatină ($p = 0,1$; Fig. 5A). În plus, activitatea celulelor Tc a fost îmbunătățită semnificativ prin administrarea HemoHIM ($p < 0,05$; Fig. 5B). Aceste date au sugerat că eficacitatea sporită împotriva cancerului a cisplatinei în combinație cu administrarea HemoHIM s-a datorat creșterii activității celulelor NK și Tc care sunt responsabile de supravegherea tumorii.

Figura 5



Administrarea HemoHIM promovează răspunsurile imune pentru supravegherea tumorii la șoarecii purtători de melanom care au fost injectați cu cisplatină . Toți șoarecii executați așa cum este descris în figura 3 au fost sacrificați la 17 zile după injectarea inițială de cisplatină. **(A)(B)** Activitatea de ucidere a celulelor canceroase a celulelor NK sau a celulelor Tc a fost determinată prin testul de eliberare a ⁵¹Cr așa cum este descris în *Materiale și Metode* . **(C) (D)** Limfocitele splinei au fost cultivate cu ConA (1 μg/ml). După 1 sau 2 zile, IL-2 și IFN-γ în supernatanții de cultură au fost măsurate prin ELISA așa cum este descris în *Materiale și Metode* . Au fost douăzeci și unu de șoareci în fiecare grup. Splinele a trei șoareci au fost reunite. Barele arată mediile ± SD ale experimentelor cu septuple. * p = 0,1, **p < 0,05 și ***p < 0,001 comparativ cu grupul tratat numai cu cisplatină.

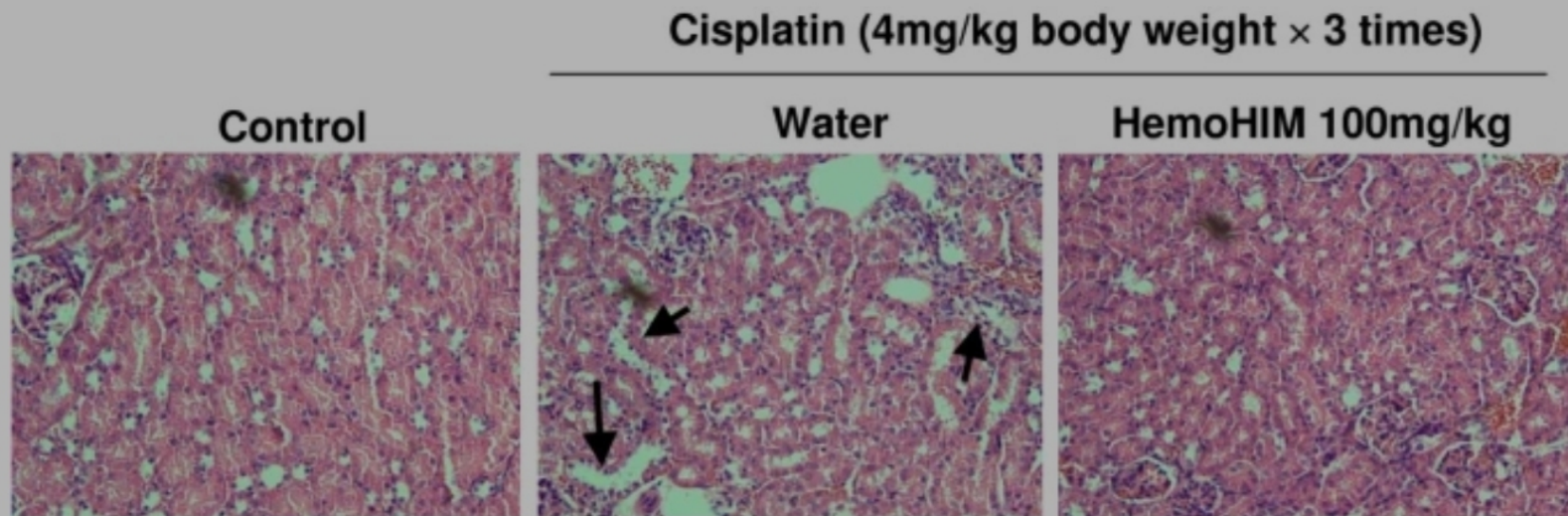
[Imagine la dimensiune completă >](#)

Macrofagele, celulele dendritice, celulele NK și celulele Tc care sunt capabile să recunoască, să se lege și, ulterior, să omoare celulele tumorale, au fost activate de citokine cum ar fi IL-2 și IFN-γ. În studiul nostru anterior, limfocitele tratate numai cu HemoHIM au îmbunătățit expresia IL-2 și IFN-γ *in vitro* (datele nu sunt prezentate). Într-adevăr, IL-2 și IFN-γ sunt activatori potenți ai celulelor NK și funcțiilor efectoare ale celulelor Tc. Prin urmare, am constatat dacă administrarea HemoHIM a îmbunătățit producția de IL-2 și IFN-γ la șoarecii purtători de melanom tratați cu cisplatină. Administrarea HemoHIM a îmbunătățit semnificativ producția de IL-2 (p < 0,001; Fig. [5C](#)) și IFN-γ (p < 0,05; Fig. [5D](#)) la șoarecii purtători de melanom tratați cu cisplatină.

HemoHIM scade nefrotoxicitatea indusă de cisplatină la șoarecii purtători de tumori

Reacțiile adverse nedorite ale cisplatinei apar în rinichi și ficat, datorită acumulării de cisplatină în aceste organe [[3](#)]. Deoarece unul dintre mecanismele toxicității induse de cisplatină este producția îmbunătățită de ROS în aceste organe, ne-am gândit că HemoHIM poate avea o activitate de captare radicală [[20](#) , [21](#)], reducând daunele induse de cisplatină. Studiile experimentale la animale au arătat că o doză minimă de cisplatină (5 mg/kg greutate corporală, ip) a fost suficientă pentru a induce nefrotoxicitate la șobolani [[29](#) , [30](#)]. În acest studiu, cisplatina a fost injectată la 4 mg/kg greutate corporală de trei ori o dată pe săptămână. Nefrotoxicitatea a fost evaluată folosind rinichi îndepărtați de la șoareci în ziua 17 după o injecție inițială de cisplatină, iar rezultatul reprezentativ al fiecărui grup este prezentat în Fig. [6](#) . La examenul histopatologic al rinichiului, cisplatina a distrus celulele tubulare renale (Fig. [6](#)). Cu toate acestea, administrarea HemoHIM a redus distrugerea celulelor tubulare renale de către cisplatină.

Figura 6



HemoHIM reduce afectarea renală indusă de cisplatină . Rinichiul de la șoareci din fiecare grup în ziua 17 după injectarea inițială de cisplatină a fost îndepărtat și fixat în formol tamponat 10% timp de 2 zile. Secțiunile încorporate în parafină (5 μm grosime) au fost colorate cu hematoxilină și eozină (H&E) pentru examinare histopatologică și observate la microscop cu lumină la mărimi × 200. Rezultatul prezentat aici este cortexul reprezentativ din fiecare grup. **(A)** Control, cortex (× 200), **(B)** Control cisplatină, cortex (× 200), distrugerea celulelor tubulare renale (marcate cu săgeți), **(C)** Cisplatin+HemoHIM, cortex (× 200).

[Imagine la dimensiune completă >](#)

HemoHIM este o compoziție pe bază de plante concepută pentru a proteja țesuturile de auto-reînnoire și pentru a promova refacerea sistemului imunitar împotriva stresului oxidativ precum iradierea. În acest studiu, am examinat posibilitatea HemoHIM atât de a spori efectul anticancer al cisplatinei, cât și de a reduce efectele sale secundare la șoarecii purtători de melanom. În studiile noastre anterioare, HemoHIM a fost testat pentru eficacitatea sa ca agent radioprotector [[20](#) , [21](#)]. De asemenea, am investigat efectul HemoHIM asupra restabilirii funcțiilor imune care au fost afectate la șoarecii în vârstă [[31](#)]. În plus, în studiul nostru anterior, am arătat că HemoHIM a accelerat recuperarea celulelor imune la șoarecii tratați cu ciclofosfamidă, care este un agent anticancer bine-cunoscut [[32](#)]. În acest studiu, spre deosebire de cisplatină, HemoHIM singur nu a ucis direct celulele canceroase. Cu toate acestea, rezultatele noastre au arătat că administrarea HemoHIM a îmbunătățit eficacitatea antitumorală a cisplatinei la șoarecii purtători de melanom.

Răspunsurile imune care sunt capabile de a ucide celulele tumorale constau din celule dendritice, macrofage, celule NK și celule Tc. Celulele Tc pot îndeplini o funcție de supraveghere prin recunoașterea și uciderea celulelor potențial maligne care exprimă peptide derivate din proteine celulare mutante sau proteine virale oncogene și prezentate în asociere cu molecule MHC de clasa I. Celulele NK ucid multe tipuri de celule tumorale, în special celulele care au expresia MHC de clasa I redusă și pot scăpa de uciderea de către celulele Tc [[33](#)]. Studiile *in vitro* folosind celule de la oameni și alte câteva specii de mamifere, precum și studiile *in vivo* la șoareci și șobolani, au sugerat de mult timp că celulele tumorale sunt recunoscute ca ținte ale celulelor NK [[34](#)]. De asemenea, celulele NK acționează ca celule reglatoare pentru a influența diferite alte tipuri de celule, cum ar fi celulele dendritice, celulele T helper (Th), celulele Tc și celulele B [[35](#)]. Multe studii pentru terapia imuno-cancerului s-au concentrat pe îmbunătățirea activității celulelor NK, precum și a celulelor Tc împotriva celulelor tumorale. În datele noastre, cisplatinul singur a scăzut dimensiunea tumorii, dar nu a îmbunătățit activitatea celulelor NK și a celulelor Tc (Fig. [5](#)). De asemenea, HemoHIM singur fără cisplatină nu a îmbunătățit activitatea acestor celule (datele nu sunt prezentate). Cu toate acestea, administrarea HemoHIM cu injecție de cisplatină crește activitatea celulelor NK și a celulelor Tc la șoarecii purtători de melanom (Fig. [5A](#) și [5B](#)), în timp ce dimensiunea tumorii a fost scăzută de cisplatină. Astfel, sugerăm că mecanismul de acțiune al cisplatinei și HemoHIM la șoarecii purtători de tumori diferă.

IL-2 și IFN- γ sunt activatori puternici ai funcțiilor celulelor NK și celulelor Tc. Din aceste motive, terapiile cu citokine ale tumorilor maligne folosind IL-2, IL-12 și IFN- γ au fost investigate pe larg în studii experimentale și clinice [[34](#)]. De asemenea, este bine cunoscut faptul că IL-2 și IFN- γ promovează proliferarea limfocitelor reactive tumorale, citotoxicitatea și, într-o oarecare măsură, secreția de citokine [[36](#) – [41](#)]. IFN- γ este o citokină imunoreglatoare pleiotropă care a fost utilizată pentru tratamentul clinic al anumitor tumori [[42](#) , [43](#)]. Cu toate acestea, aplicarea clinică a unor astfel de citokine a fost îngreunată în mare parte din cauza efectelor lor secundare nedorite [[44](#) , [45](#)]. În datele noastre, administrarea HemoHIM cu injecție de cisplatină a crescut secreția de IL-2 și IFN- γ la șoarecii purtători de melanom.

Deși cisplatina este un medicament anticancerigen foarte eficient împotriva mai multor tipuri de cancer, cisplatina este toxică pentru celulele hepatice și renale prin producerea de ROS [[1-4](#), 30]. Cu toate acestea, au fost efectuate multe studii pentru a contracara nefrotoxicitatea prin administrarea de antioxidanți [[8](#) – [10](#)]. Deoarece HemoHIM a fost conceput pentru a proteja țesuturile de auto-reînnoire și pentru a promova o refacere a sistemului imunitar împotriva stresului oxidativ [[20](#) , [21](#)], ne-am gândit că ar putea fi capabil să scadă leziunile renale induse de cisplatină. După cum era de așteptat, administrarea HemoHIM a redus nefrotoxicitatea, așa cum se observă prin distrugerea celulelor tubulare a rinichilor. Pe baza acestor rezultate generale, a fost stabilită posibilitatea HemoHIM atât de a spori efectul anticancer al cisplatinei, cât și de a reduce efectele sale secundare la șoarecii purtători de melanom. Cu toate acestea, eficacitatea protectoare a HemoHIM asupra leziunilor renale induse de cisplatină trebuie investigată în continuare.

Concluzie

În concluzie, deși modul în care administrarea HemoHIM scade afectarea renală indusă de cisplatină rămâne necunoscută, rezultatele noastre indică faptul că HemoHIM poate fi un agent complementar util în timpul chimioterapiei cu cisplatină prin creșterea eficacității antitumorale și reducerea toxicității cisplatinei.

Referințe

1. Winston JA, Safirstein R: Flux sanguin renal redus în insuficiența renală acută indusă de cisplatină timpurie la șobolan. Am J Physiol. 1985, 249: F490-F496.

[CAS](#) [PubMed](#) [Google Academic](#)

2. Chirino YI, Hernández-Pando R, Pedraza-Chaverí J: catalizatorul de descompunere a peroxinitritului ameliorează afectarea renală și nitrarea proteinelor în nefrotoxicitatea indusă de cisplatină la șobolani. BMC Pharmacol. 2004, 4: 20-29.

[Articol](#) [PubMed](#) [PubMed Central](#) [Google Academic](#)

3. Stewart DJ, Benjamin RS, Luna M, Feun L, Caprioli R, Seifert W, Loo TL: Distribuția de țesut uman a platinei după cis-diamminedicloroplatinum. Cancer Chemother Pharmacol. 1982, 10: 51-54.

[Articol](#) [CAS](#) [PubMed](#) [Google Academic](#)

4. Kim YK, Jung JS, Lee SH, Kim YW: Efectele antioxidanților și Ca ²⁺ în leziunile celulare induse de cisplatină în feliile corticale renale de iepure. Toxicol Appl Pharmacol. 1997, 146: 261-269.

[Articol](#) [CAS](#) [PubMed](#) [Google Academic](#)

5. Somani SM, Husain K, Whitworth C: Protecție dependentă de doză prin acid lipoic împotriva nefrotoxicității induse de cisplatină la șobolani; Sistem de apărare antioxidantă. Pharmacol Toxicol. 2000, 86: 234-241.

[Articol](#) [CAS](#) [PubMed](#) [Google Academic](#)

6. Ajith TA, Jose N, Janardhanan KK: Ameliorarea nefrotoxicității induse de cisplatină la șoareci prin extract de acetat de etil al unei ciuperci polipor, Phellinus rimosus. J Exp Clin Cancer Res. 2002, 21 (2): 213-217.

[CAS](#) [PubMed](#) [Google Academic](#)

7. Mora Lde O, Antunes LM, Francescato HD, Bianchi Mde L: Efectele glutaminei orale asupra nefrotoxicității induse de cisplatină la șobolani. Pharmacol Res. 2003, 47: 517-522.

[Articol](#) [PubMed](#) [Google Academic](#)

15. Matsuoka H, Yano K, Seo Y, Saito T, Tomoda H, Tsurumoto S: Utilitatea schimbării subgrupului de limfocite ca indicator pentru prezicerea timpului de supraviețuire și eficacitatea tratamentului cu imunopotențiatorul lentinan. Anticancer Res. 1995, 15: 2291-2296.

[CAS](#) [PubMed](#) [Google Academic](#)

16. Kim KH, Lee YS, Jung IS, Park SY, Chung HY, Lee IR, Yun YS: Polisacaridă acidă din Panax ginseng, Ginsan, induce celulele Th1 și citokinele macrofge și generează celule LAK în sinergie cu rIL-2. Planta Medica. 1998, 64: 110-115.

[Articol](#) [CAS](#) [PubMed](#) [Google Academic](#)

17. Ooi VE, Liu F: Imunomodularea și activitatea anticanceroasă a complexelor polizaharide-proteine. Curr Med Chem. 2000, 7: 715-729.

[Articol](#) [CAS](#) [PubMed](#) [Google Academic](#)

18. Song JY, Han SK, Son EH, Pyo SN, Yun YS, Yi SY: Inducerea activităților secretoare și tumoricide în macrofagele peritoneale de către ginsan. Int Immunofarmacol. 2002, 2: 857-865.

[Articol](#) [CAS](#) [PubMed](#) [Google Academic](#)

19. Zaidman BZ, Yassin M, Mahajna J, Wasser SP: Modulatori de ciuperci medicinali ai țintelor moleculare ca terapii pentru cancer. Appl Microbiol Biotechnol. 2005, 67: 453-468.

[Articol](#) [CAS](#) [PubMed](#) [Google Academic](#)

20. Park HR, Kim SH, Yee ST, Byun MW, Jo SK: Efectul unui amestec de plante (HIM-I) asupra protecției sistemului hematopoietic-imunitar și a țesuturilor de auto-reînnoire împotriva daunelor cauzate de radiații. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2005, 34: 605-612.

[Articol](#) [Google Academic](#)

21. Jo SK, Park HR, Jung UH, Oh H, Kim SH, Yee ST: Efectul protector al unui preparat din plante (HemoHIM) asupra țesuturilor de auto-reînnoire și a sistemului imunitar împotriva iradierii γ. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2005, 34: 805-813.

8. Husain K, Morris C, Whitworth C, Trammell GL, Rybak LP, Somani SM: Protecție prin ebselen împotriva nefrotoxicității induse de cisplatină: sistem antioxidant. Mol Cell Biochim. 1998, 178: 127-133.
- [Articol](#) [CAS](#) [PubMed](#) [Google Academic](#)
-
9. Ajith TA, Usha S, Nivitha V: Acidul ascorbic și α -tocoferolul protejează nefrotoxicitatea indusă de cisplatină la șoareci: un studiu comparativ. Clin Chim Acta. 2007, 375 (1-2): 82-86.
- [Articol](#) [CAS](#) [PubMed](#) [Google Academic](#)
-
10. Lee CK, Park KK, Lim SS, Park JHY, Chung WY: Efectele extractului de lemn dulce împotriva creșterii tumorii și a toxicității induse de cisplatină într-un model de xenogrefă de șoarece de cancer de colon. Biol Pharm Bull. 2007, 30: 2191-2195.
- [Articol](#) [CAS](#) [PubMed](#) [Google Academic](#)
-
11. Engel LW, Straus SE: Dezvoltarea terapiei: oportunități în cadrul medicinei alternative, complementare. Nat Rev Drug Discov. 2002, 1: 229-237.
- [Articol](#) [CAS](#) [PubMed](#) [Google Academic](#)
-
12. Moriya N, Miwa H, Orita K: Efectul antitumoral al lipopolizaharidei bacteriene (LPS) singur și în combinație cu lentinan asupra tumorilor MH-134 la șoarecii C3H/He. Acta Med Okayama. 1984, 38 (1): 49-55.
- [CAS](#) [PubMed](#) [Google Academic](#)
-
13. Hamuro J, Takatsuki F, Suga T, Kikuchi T, Suzuki M: Efecte antimetastatice sinergice ale lentinanului și interleukinei 2 cu tratamente pre și post-operatorii. Jpn J Cancer Res. 1994, 85: 1288-1297.
- [Articol](#) [CAS](#) [PubMed](#) [Google Academic](#)
-
14. Matsuyama H, Mangindaan RE, Yano T: Efectul protector al Schizophyllan și Scleroglucan împotriva Streptococcus sp. Infecția la coada galbenă (Seriola quinqueradiata). Acvacultura. 1992, 101: 97-203.
- [Articol](#) [Google Academic](#)

22. Kedar E, Klein E: Imunoterapia cancerului: sunt rezultatele descurajatoare? Pot fi îmbunătățite? Adv Cancer Res. 1992, 59: 245-322.

[Articol](#) [CAS](#) [PubMed](#) [Google Academic](#)

23. Hanson HL, Donermeyer DL, Ikeda H, White JM, Shankaran V, Old LJ, Shiku H, Schreiber RD, Alen PM: Eradicarea tumorilor stabilite prin imunoterapie adoptivă cu celule T CD8+. Imunitate. 2000, 13: 265-276.

[Articol](#) [CAS](#) [PubMed](#) [Google Academic](#)

24. Seder RA, Gazzinelli R, Sher A, Paul WE: Interleukina 12 acționează direct asupra celulelor T CD4+ pentru a îmbunătăți amorsarea producției de interferon γ și diminuează inhibarea interleukinei 4 a unei astfel de amorsări. Proc Natl Acad Sci USA. 1993, 90: 10188-10192.

[Articol](#) [CAS](#) [PubMed](#) [PubMed Central](#) [Google Academic](#)

25. Yoshida A, Koide Y, Uchijima M, Yoshida TO: IFN- γ induce expresia ARNm a IL-12 de către o linie celulară de macrofage murine, J774. Biochem Biophys Res Commun. 1994, 198: 857-861.

[Articol](#) [CAS](#) [PubMed](#) [Google Academic](#)

26. Park HR, Jo SK, Paik SG: Factori care efectuează răspunsul imun asemănător Th2 după iradierea gamma: producția scăzută de heterodimer IL-12 în celulele prezentatoare de antigen și expresia mică a receptorului IL-12 în celulele T. Int J Radiat Biol. 2005, 81: 221-231.

[Articol](#) [CAS](#) [PubMed](#) [Google Academic](#)

27. Dijt FJ, Fichtinger-Schepman AM, Berends F, Reedijk J: Formarea și repararea aductilor induși de cisplatină la ADN în fibroblaste umane normale și cu deficit de reparare cultivate. Cancer Res. 1988, 48: 6058-6062.

[CAS](#) [PubMed](#) [Google Academic](#)

28. Di Santo JP: Căile de dezvoltare a celulelor ucigașe naturale: o chestiune de echilibru. Annu Rev Immunol. 2006, 24: 257-286.

[Articol](#) [CAS](#) [PubMed](#) [Google Academic](#)

29. Boogaard PJ, Lempers EL, Mulder GJ, Meerman JHN: Acidul 4-metiltiobenzoic reduce nefrotoxicitatea cisplatinei la șobolani fără a compromite activitatea antitumorală. Biochem Pharmacol. 1991, 41: 1997-2003.

[Articol](#) [CAS](#) [PubMed](#) [Google Academic](#)

30. Ravi RS, Somini SM, Rybak LP: Mecanismul ototoxicității cisplatinei. Sistem antioxidant. Pharmacol Toxicol 1995, 76: 386-394.

[Articol](#) [CAS](#) [PubMed](#) [Google Academic](#)

31. Park HR, Jo SK, Jung UH, Yee ST: Restaurarea funcțiilor imune la șoarecii în vârstă prin suplimentarea cu o nouă compoziție pe bază de plante, HemoHIM. Phytother Res. 2008, 22 (1): 36-42.

[Articol](#) [CAS](#) [PubMed](#) [Google Academic](#)

32. Park HR, Jo SK, Jung UH, Kim SH, Yee ST: Efectul imunomodulator al unui nou preparat pe bază de plante (HemoHIM) la șoarecii tratați cu ciclofosfamidă. J Food Sci Nutr. 2006, 11: 54-60.

[Articol](#) [Google Academic](#)

33. Herberman RB: Imunoterapie împotriva cancerului cu celule natural killer. Seminarii de Oncologie. 2002, 29: 27-30.

[Articol](#) [CAS](#) [PubMed](#) [Google Academic](#)

34. Trinchieri G: Biologia celulelor natural killer. Adv Immunol. 1989, 47: 187-376.

[Articol](#) [CAS](#) [PubMed](#) [Google Academic](#)

35. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S: Funcțiile celulelor ucigașe naturale. Nat Immunol. 2008, 9: 503-510.

[Articol](#) [CAS](#) [PubMed](#) [Google Academic](#)

36. Boehm W, Thoma S, Leithauser F, Moller P, Schirmbeck R, Reimann J: respingere mediată de celule T, facilitată de IFN- γ a melanoamelor B16 murine. J Immunol. 1998, 161: 897-908.

[Google Academic](#)

37. Barth RJ, Mule JJ, Spiess PJ, Rosenberg SA: Interferonul γ și factorul de necroză tumorală au un rol în regresile tumorale mediate de limfocitele murine CD8 infiltrante tumorale. J Exp Med. 1991, 173: 647-658.

[Articol](#) [CAS](#) [PubMed](#) [Google Academic](#)

38. Ogasawara M, Rosenberg SA: Expresia îmbunătățită a moleculelor HLA și stimularea limfocitelor autologe care infiltrează tumori umane în urma transducției celulelor melanomului cu gene γ -interferon. Cancer Res. 1993, 53: 3561-3568.

[CAS](#) [PubMed](#) [Google Academic](#)

39. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Auguet M, Old LJ, Schreiber RD: Demonstrarea unui sistem de supraveghere a tumorii dependent de interferon- γ la șoarecii imunocompetenți. Proc Natl Acad Sci USA. 1998, 95: 7556-7561.

[Articol](#) [CAS](#) [PubMed](#) [PubMed Central](#) [Google Academic](#)

40. Boehm U, Klamp T, Groot JC, Howard JC: Răspunsuri celulare la interferon- γ . Annu Rev Immunol. 1987, 15: 749-795.

[Articol](#) [Google Academic](#)

41. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD: IFN gamma și limfocitele previn dezvoltarea tumorii primare și modelează imunogenitatea tumorii. Natură. 2001, 410: 1107-1111.

[Articol](#) [CAS](#) [PubMed](#) [Google Academic](#)

42. Cregan ET, Ahmann DL, Long HJ, Frytak S, Sherwin SA, Chan MN: Studiu de fază II al interferon-gamma recombinant la pacienții cu melanom malign diseminat. Cancer Treat Rep. 1987, 71: 843-844.

[Google Academic](#)

43. Aulitzky W, Gastl G, Aulitzky WL, Hewrold M, Kemmler J, Mull B, Frick J, Huber C: Tratamentul cu succes al carcinomului renal metastatic cu o doză activă biologic de interferon-γ recombinant. J Clin Oncol. 1989, 7: 1875-1891.

[CAS](#) [PubMed](#) [Google Academic](#)

44. Naglieri E, Gebbia V, Durini E, Lelli G, Abbate I, Selvaggi FP, Di Tonno P, Colucci G: imunoterapie standard cu interleukin-2 (IL-2) și interferon-alfa versus o asociere imunochimioterapică cu IL-2 și 4-epirubicină în carcinomul renal metastatic. Anticancer Res. 1998, 18 (3B): 2021-2026.

[CAS](#) [PubMed](#) [Google Academic](#)

45. Ridolfi R, Flamini E, Riccobon A, De Paola F, Maltoni R, Gardini A, Ridolfi L, Medri L, Poletti G, Amadori D: Imunoterapie adoptivă adjuvantă cu limfocite infiltrate tumorale și doze modulate de interleukin-2 la 22 de pacienți cu melanom, cancer colorectal si renal, dupa metastasectomie radicala, si la 12 pacienti avansati. Cancer Immunol Immunother. 1998, 46: 185-193.

[Articol](#) [CAS](#) [PubMed](#) [Google Academic](#)

Istoricul pre-publicării

Istoricul pre-publicării pentru această lucrare poate fi accesat aici: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/9/85/prepub>

[Descărcați referințe](#) ↓

Mulțumiri

Această activitate a fost realizată în cadrul unui grant (M-2007-008) din partea Programului R&BD Daedeok Innopolis și printr-un grant (2007-00091) din programul R&D nuclear de către Ministerul Educației, Științei și Tehnologiei din Coreea.

Informații despre autor

Autori și afilieri

Divizia de cercetare a radiațiilor pentru bio-tehnologie, Institutul de tehnologie avansată a radiațiilor, Jeongeup Campus din Coreea Institutul de Cercetare a Energiei Atomice (KAERI), 1266 Sinjeong-dong Jeongeup si Jeonbuk, 580-185, Coreea de Sud
Parcul Hae-Ran, Eun-Jin Ju, Sung-Kee Jo și Uhee Jung

Colegiul de Medicină Veterinară, Universitatea Națională Chonnam, Gwangju, 500-757, Coreea de Sud
Sung-Ho Kim

Departamentul de Biologie, Universitatea Națională Sunchon, Sunchon, 540-742, Coreea de Sud
Sung-Tae Yee

Autor corespondent

Correspondență cu [Sung-Kee Jo](#) .

Informații suplimentare

Interese concurente

Autorii declară că nu au interese concurente.

Contribuțiile autorilor

HRP a realizat HemoHIM, cultura celulară, testul Cr ⁵¹ -relaeas, experimente pe animale și a redactat manuscrisul. EJJ a efectuat cultura celulară, analiza ELISA și examenul histopatologic. UHJ, SHK și STY au participat la proiectarea studiului. SKJ a conceput studiul și a participat la proiectarea acestuia. Toți autorii au citit și au aprobat manuscrisul.

Fișierele originale trimise de autori pentru imagini

Mai jos sunt link-urile către fișierele originale trimise de autori pentru imagini.

Drepturi și permisiuni

Acces deschis Acest articol este publicat sub licență pentru BioMed Central Ltd. Acesta este un articol cu acces deschis este distribuit în conformitate cu termenii licenței de atribuire Creative Commons (<https://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), care permite utilizarea nerestricționată , distribuția și reproducerea pe orice suport, cu condiția ca opera originală să fie citată în mod corespunzător.

[Retipăriri și permisiuni](#)