© [1,2]Горбач О. І., [1]Храновська Н. М., [1]Скачкова О. В., [1,2]Сидор Р. І., [2]Позур В. К.

УДК 616-006-085:615. 37

[1,2]Горбач О. І., [1]Храновська Н. М., [1]Скачкова О. В., [1,2]Сидор Р. І., [2]Позур В. К.

ПОЄДНАННЯ ВАКЦИНИ НА ОСНОВІ ДЕНДРИТНИХ КЛІТИН ТА НИЗЬКИХ ДОЗ ДОКСОРУБІЦИНУ – ЕФЕКТИВНИЙ МЕТОД В БОРОТЬБІ З ПУХЛИННОЮ ІМУНОСУПРЕСІЄЮ

[1]Національний інститут раку (м. Київ)

[2]Київський національний університет імені Тараса Шевченка (м. Київ)

Дослідження проводили в рамках науково-дослідної роботи НДЛ експериментальної онкології Національного інституту раку України «Розробити метод комбінованої специфічної та неспецифічної імунотерапії в експерименті та визначити показання до його застосування в комплексному лікуванні хворих на злоякісні новоутворення» (шифр теми – В. Н. 14.01.07. 122-10, № державної реєстрації 0109U000439, 2010-2012 рр.).

Вступ. У зв'язку з недостатньою ефективністю основних методів лікування злоякісних новоутворень, у всьому світі активно йде пошук нових підходів протипухлинної терапії. Останнім часом активно розвивається напрямок хіміоімунотерапії (ХІТ), зокрема поєднання імунотерапії на основі дендритних клітин (ДК) та низьких доз хіміопрепаратів [10, 11].

На пізніх стадіях пухлинної прогресії у хворих спостерігається імунодефіцитний стан, що характеризується зниженням активності Т-лімфоцитів, природних кілерних клітин (ПКК), системи мононуклеарних фагоцитів, порушенням механізмів презентації антигенів, збільшення кількості супресорних клітин з фенотипом $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ та супресорних клітин мієлоїдного походження (MDSC) [2]. Більшість основних методів протипухлинної терапії (хірургія, променева терапія та хіміотерапія) також індукують клітинну імуносупресію. Пухлинна імуносупресія розвивається як на системному (порушення дозрівання лімфоцитів, недостатня активація ангиненпрезентуючих клітин (АПК), синтез протизапальних цитокінів), так і на локальному (підвищення кількості супресорних клітин в мікрооточенні (МО) пухлини, синтез протизапальних цитокінів, неповна активація ефекторних клітин) рівнях, що значно ускладнює створення ефективних імунотерапевтичних препаратів.

Пухлина та клітини її МО здатні секретувати ряд факторів, що допомагають пухлинним клітинам уникати імунної відповіді, до них відносять VEGF, Il-10, TGF-β, E2, розчинний фосфатидилсерин, Fas, FasL, micA, які чинять імуносупресорну дію та сприяють інвазії та метастазуванню пухлини [16, 12, 3]. В МО пухлини TGF-β, в основному, продукують MDSC [2] та Т-регуляторні клітини з фенотипом $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, а саме субпопуляція Th3 [14, 6]. TGF-β в МО пухлини інгібує продукцію ПКК ІФНγ і пригнічує антитіло-залежну клітинну цитотоксичність через фосфорилювання білку SMAD3 [15].

Дія низьких доз хіміопрепаратів має істотний вплив на МО пухлини за рахунок антиангіогенного ефекту, а не на проліферативну активність пухлинних клітин [18]. Показано, що під дією низьких доз хіміопрепаратів відбувається зменшення популяції $CD4^+CD25^+FoxP3^+$-клітин, що чинять імуносупресорну дію, за рахунок чого може значно посилюватися протипухлинна дія вакцини [7].

Метою роботи було дослідити вплив ХІТ на основі ДК-вакцини та доксорубіцину дозою 0,2 мг/кг на МО пухлини та імунну систему тварин на моделі мишиної саркоми-37 (С37).

Об'єкт і методи дослідження. В експерименті використано 40 мишей лінії СВА, самці вагою 18-22 г. та віком 1,5-2 місяці, розведення віварію Національного інституту раку. Всі процедури з тваринами проводили з дотриманням принципів гуманності, викладених у директиві Ради Європейського Союзу 86/609/ЕС «Про зближення законів, постанов та адміністративних положень держав ЄС з питань захисту тварин, що використовуються для експериментів та інших наукових цілей» від 24 листопада 1986 р.

В якості експериментальної пухлинної моделі використовували лінію пухлинних клітин саркома-37. Клітини вводили внутрішньом'язево в концентрації 2×10^6 клітин на тварину. Доксорубіцин в дозах 0,2 мг/мл вводили тваринам інтраперитонеально. ДК-вакцину вводили внутрішньовенно в орбітальний синус ока в концентрації $0{,}2 \times 10^6$ ДК на тварину, починаючи з 15-ї після перещеплення пухлини, три рази з інтервалом в 3-4 доби.

Тварини були розподілені на наступні групи:

– контрольна група (тварини з перещепленою С-37, n = 10);

– ДК (тварини з С-37, що отримували тільки ДК-вакцину на 15, 18 та 22 добу після перещеплення пухлини, n = 10);

– DOX (тварини з С-37, що отримували доксорубіцин (доза 0,2 мг/кг) на 7,8,9,10 та 11 добу після перещеплення пухлини, n = 10);

– ХІТ (тварини з С-37, що отримували ДК-вакцину на 15, 18 та 22 добу після перещеплення пухлини та доксорубіцин (доза 0,2 мг/кг) на 7,8,9,10 та 11 добу після перещеплення пухлини, n = 10).

Протягом експерименту проводили заміри об'єму первинної пухлини в трьох проекціях з інтервалом 2-3

доби, починаючи з 10-ї доби після перещеплення пухлинних клітин, та визначали її об'єм за формулою:

$$V = \frac{1}{6}\pi D_1 D_2 D_3$$, де

V – об'єм первинної пухлини;

D_{1-3} – проекції в яких вимірювали діаметр пухлини, см.

На 23 добу після перещеплення С-37 тварин евіталізували та проводили забір біологічного матеріалу для подальших імунологічних досліджень.

Отримання ДК-вакцини. В якості джерела ДК використовували спленоцити інтактних сингенних мишей. ДК отримували за методикою [9] з деякими модифікаціями. Всі маніпуляції з клітинами проводили з дотриманням правил асептики. Суспензію спленоцитів в концентрації 5x10^6/мл інкубували при 37 ^{0}C і 5 % CO_2 протягом доби в повному культуральному середовищі RPMI-1640. Клітини концентрували шляхом центрифугування протягом 15 хв. при 1000 об/хв. на градієнті щільності 14,5 % метризаміду. ДК «навантажували» пухлинними антигенами наступним чином: клітини інкубували в концентрації 1 x 10^6/мл в середовищі RPMI-1640 потягом 4 годин при 37 ^{0}C і 5 % CO_2 в присутності механомодифікованих ліофілізованих пухлинних клітин. Потім ДК відмивали, доводили концентрацію до 1 x 10^6/мл, та використовували в якості ДК-вакцини.

Визначення рівня експресії мРНК цитокінів. Частину селезінки або пухлини занурювали у 0,3 мл розчину RNA-later («Ambion», USA) для стабілізації РНК. Виділення тотальної РНК проводили методом кислотно-фенольної екстракції з використанням ПЛР-тест набору «Рибозоль-А» («AmpliSens», Росія), отриману РНК обробляли ДНКазою («Ambion», USA). Для отримання кДНК проводили реакцію зворотної транскрипції з використанням ПЛР-тест-набору «Реверта-L-100» («AmpliSens», Росія). Рівень експресії генів IFNγ, TGF-β, VEGF та FoxP3 визначали з допомогою ПЛР в режимі реального часу на приладі 7500 Real-Time PCR Systems («Applied Biosystems», USA) з використанням специфічних праймерів та суміші Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific, USA). Послідовності праймерів були підібрані експериментально з використанням програми Primer Express Software v3.0 («Applied Biosystems», USA) та синтезовані фірмою «Applied Biosystems», (USA). Рівень експресії генів оцінювали за допомогою методу ΔΔCt з нормуванням відносно експресії ендогенного контролю. В якості ендогенного контролю використовували рівень експресії house-keeping гену гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (GAPDH).

Статистичну обробку даних здійснювали, використовуючи t-критерій Стьюдента для параметричних та критерій Манна-Уїтні для непараметричних даних. Для визначення об'єму первинної пухлини застосовували дисперсійний аналіз для повторних вимірів. Всю статистичну обробку даних проводили в програмі Statistica 10.

Результати досліджень та їх обговорення. В ході експерименту встановлено, що максимальний пригнічуючий вплив на ріст пухлини було зареєстровано у тварин, що одержували комбіновану XIT. Так, у тварин, що отримували XIT зафіксовано достовірне зменшення об'єму пухлини порівняно як з контролем ($p < 0,01$), так і монотерапією ДК ($p < 0,01$) та DOX ($p < 0,01$), починаючи з 23 доби її росту. У тварин, що одержували терапію за схемами ДК, DOX1, не спостерігали статистично достовірного зменшення об'єму первинної пухлини порівняно з контрольною групою (**рис. 1**).

Подальші дослідження присвячені з'ясуванню механізмів впливу XIT на МО пухлини та імунну систему організму. Відомо, що протипухлинна активність хіміопрепаратів у низьких дозах реалізується переважно через їх вплив на МО пухлини, а не на саму пухлину [9]. Тому, враховуючи одержані результати, нашим наступним завданням було дослідити плив XIT на МО первинної пухлини.

У МО пухлини ми визначали рівень експресії мРНК протизапального цитокіну TGF-β та ангіогенного фактора VEGF, які сприяють росту та інвазії пухлини.

TGF-β є протизапальним супресорним цитокіном, який сприяє експансії Treg та підвищує в них продукцію транскрипційного фактору FoxP3, у результаті чого підвищується їх функціональна активність та розвивається пухлинно-асоційована імуносупресія. Крім того, TGF-β пригнічує проліферативну активність Т-лімфоцитів та ПКК [15]. Секретувати TGF-β здатні пухлинні клітини, фібробласти, пухлинно-асоційовані макрофаги, Т-рег та MDSC, які входять до МО пухлини [2, 17]. Нами встановлено достовірне зменшення рівня експресії мРНК TGF-β в пухлині у тварин всіх досліджуваних груп. Так, рівень експресії мРНК TGF-β в групі тварин, що одержували XIT, зменшується в 16.7 рази порівняно з контрольною групою, у групі тварин, що отримували ДК-вакцину – в 55,7 разів та у групі DOX – в 18.6 разів ($p < 0.01$) (**рис. 2 А**). З отриманих даних можна зробити висновок, що застосування ДК-вакцини та доксорубіцину як в режимі монотерапії,

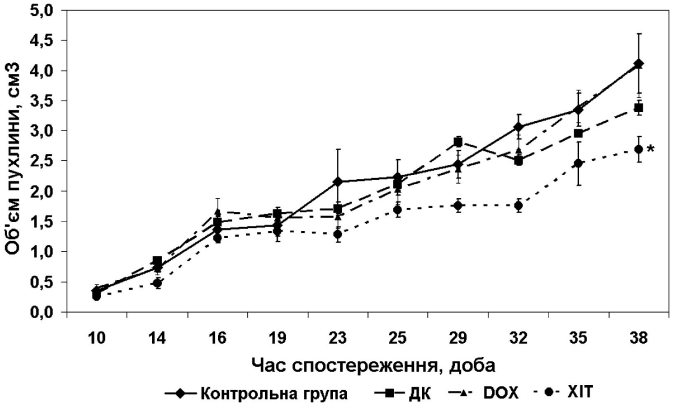

Рис. 1. Об'єм пухлини мишей лінії СВА з С-37, що отримували комбіновану XIT (* – $p < 0.01$ порівняно з контрольною групою).

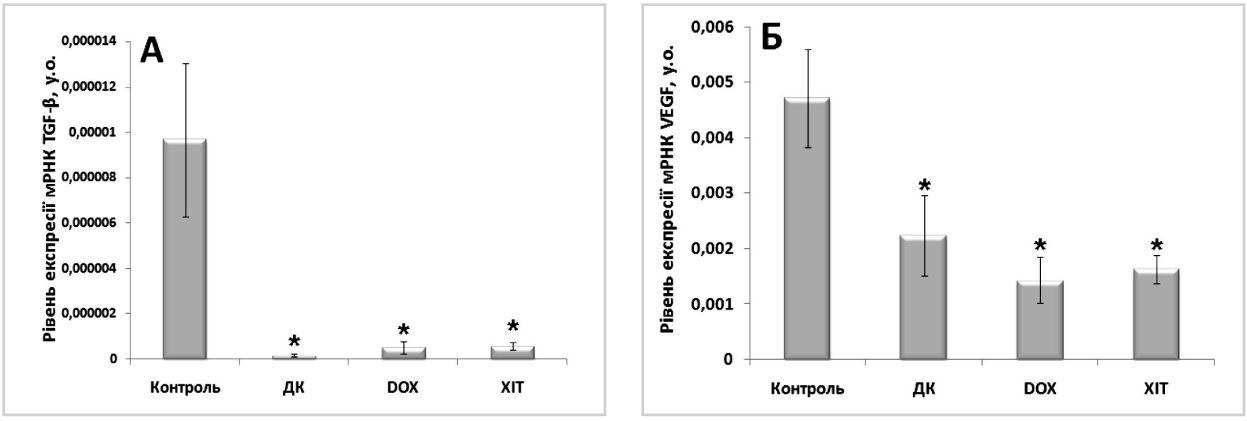

Рис. 2. Рівень експресії цитокінів в мікрооточенні пухлини С37 мишей лінії СВА: А – рівень експресії мРНК TGF-β; Б – рівень експресії мРНК VEGF (* – $p < 0.01$ порівняно з контрольною групою).

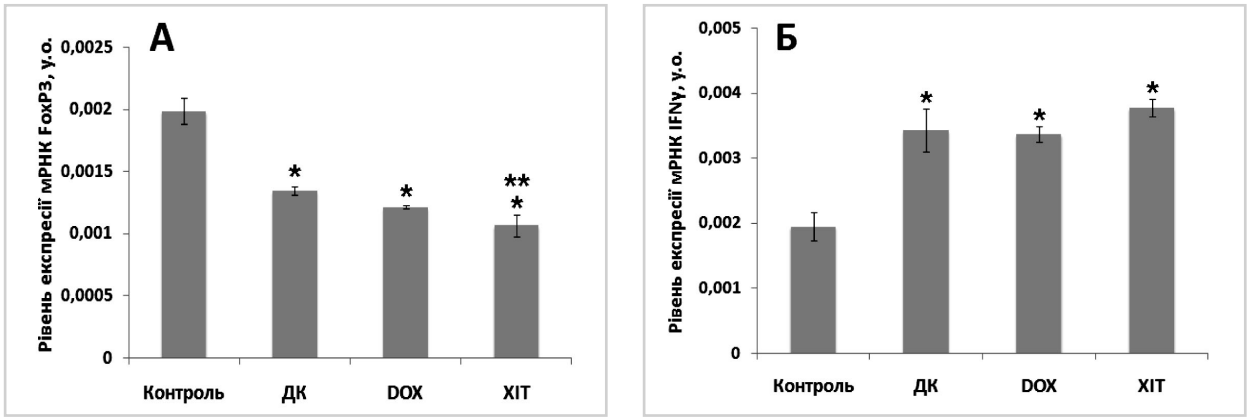

Рис. 3. Рівень експресії цитокінів спленоцитами мишей лінії СВА на 23 день після перещеплення пухлини С37: А – рівень експресії мРНК FoxP3; Б – рівень експресії мРНК IFNγ (* – $p < 0.01$ порівняно з контрольною групою; ** – $p < 0.05$ порівняно з групою ДК).

так і в комбінації викликає значне зменшення рівня експресії мРНК TGF-β клітинами МО пухлини.

VEGF, зв'язуючись з рецептором VEGFR2, запускає неопластичний ангіогенез в результаті чого збільшується щільність мікросудин, і малігнізована тканина отримує значно більше поживних речовин [1]. VEGF, пригнічуючи апоптоз, стимулює виживаність ендотеліальних клітин, відіграє важливу роль в мобілізації і міграції попередників ендотеліоцитів з кісткового мозку в ділянки ангіогенезу. VEGF також збільшує судинну проникність, інгібує диференціацію судинних клітин, активує тканинні фактори та міграцію моноцитів [1]. В МО пухлини VEGF здатні секретувати фібробласти, пухлинно-асоційовані макрофаги та власне пухлинні клітини. Результати досліджень показали, що у групі тварин, які отримували XIT, відбувається достовірне зменшення в 3 рази рівня експресії мРНК VEGF порівняно з контрольною групою тварин, $p < 0.01$ (**рис. 2 Б**). При застосуванні монотерапії ДК-вакциною рівень експресії мРНК VEGF зменшується в 2 рази ($p < 0.01$) та монотерапії доксорубіцином в дозі 0.2 мг/кг – в 3 рази ($p < 0.01$).

Відповідно до отриманих результатів можна зробити висновок, що застосування ДК-вакцини та доксорубіцину, як окремо так і в комбінації, сприяє значному зниженню рівня експресії мРНК VEGF, тим самим пригнічуючи продукцію VEGF пухлинними клітинами та її МО.

Т-рег відіграють ключову роль в імунній системі завдяки унікальній здатності контролювати імунну відповідь. Серед них виділяють популяцію Т-рег клітин з фенотипом $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, що пригнічують протипухлинний імунітет, тим самим сприяючи пухлинній прогресії. Значне збільшення кількості Т-рег клітин в організмі пухлиноносія може бути пов'язано з пригніченням пухлиноспецифічної протипухлинної імунної відповіді, що в свою чергу негативно впливає на ефективність XIT [19]. Для Трег клітин характерна наявність в ядрі ядерного фактору FoxP3, тому визначення рівня експресії мРНК даного фактору може свідчити про кількість даних клітин в тканині та їх функціональну активність.

В даному експерименті ми досліджували рівень експресії мРНК FoxP3 спленоцитами мишей на 23 день після трансплантації пухлинних клітин. У результаті відмічено достовірне зниження рівня експресії мРНК ядерного фактору у тварин всіх груп, що отримували терапію. У групі комбінованої XIT спостерігали максимальне зменшення рівня експресії мРНК, що становило на 46% менше порівняно з контрольною групою, $p < 0.01$. У групах тварин, що одержували монотерапію, також спостерігали статистично

достовірне зниження експресії мРНК FoxP3. У тварин, що отримували тільки ДК-вакцину, рівень експресії мРНК FoxP3 зменшується на 32% ($p < 0.01$), а в групі тварин, що отримували тільки доксорубіцин, – на 39% ($p < 0.01$) порівняно з контрольною групою тварин (**рис. 3 А**).

Таким чином, застосування доксорубіцину в дозі 0.2 мг/кг підсилює дію ДК-вакцини, сприяючи зниженню на 21% рівня експресії мРНК FoxP3 клітинами селезінки порівняно з групою тварин, що отримували тільки ДК-вакцину, $p < 0.05$. Можна припустити, що ДК-вакцини та низькі дози доксорубіцину при їх комбінованому застосуванні у тварин з пухлиною мають синергічну дію щодо зменшення кількості та активності Трег клітин з супресорною активністю.

ІФНγ відіграє ключову роль в протипухлинному імунітеті, підвищуючи активність ПКК, регулює проліферацію Т-клітин, модулює активність АПК, володіє антипроліферативним і проапоптичним ефектом, впливаючи на пухлини через JAK1 або JAK2/STAT1 сигнальні шляхи [8, 13]. Максимальне підвищення в 2 рази рівня експресії мРНК IFNγ спостерігали у тварин, що отримували ДК-вакцину в комбінації з доксорубіцином порівняно з контрольною групою, $p < 0.01$. Застосування тільки ДК-вакцини сприяє підвищенню рівня експресії мРНК IFNγ на 76% порівняно з контрольною групою тварин, $p < 0.01$. Також відмічено збільшення на 73% рівня експресії мРНК IFNγ спленоцитами тварин, що отримували доксорубіцин в дозі 0.2 мг/кг, порівняно з контрольною групою, $p < 0.01$ **(рис. 3. Б)**. З отриманих даних можна зробити висновок, що використання ДК-вакцини та доксорубіцину як в монотерапії, так і в комбінації, сприяє значному підвищенню рівня експресії мРНК IFNγ порівняно з групою тварин, що не отримували терапію. Проте при застосуванні комбінованої ХІТ відмічено більш вагомий вплив на експресію мРНК IFNγ, ніж при використанні монотерапії.

Застосування ХІТ, монотерапії ДК-вакциною або доксорубіцином сприяє значному зменшенню продукції ангіогенного фактору VEGF клітинами первинної пухлини та клітинами МО пухлини, завдяки чому не відбувається неоангіогенез і припиняється ріст пухлини. Комбінована ХІТ та монотерапія також позитивно впливає на МО пухлини, власне зменшуючи експресію протизапального цитокіну TGF-β, що свідчить про зменшення локальної імуносупресії.

У мишей ядерний фактор FoxP3 в основному експресується тільки Т-рег клітинами з фенотипом $CD4^+TCR\alpha\beta^+$, що володіють супресорною активністю [4, 5]. На фоні зменшення імуносупресії в МО пухлини, комбінована терапія сприяє значному зменшенню Т-рег клітин в селезінці, тим самим послаблюючи системну імуносупресію. Крім того, тварин всіх груп, де використовували терапію, відмічено значне підвищення експресії мРНК IFNγ. Тому можна припустити, що відбувається посилення протипухлинної активності імунної системи.

Виходячи з отриманих даних, можна зробити висновок, що додаткове застосування доксорубіцину в дозі 0.2 мг/кг перед застосуванням ДК-вакцини посилює пригнічуючий її вплив на ріст первинної пухлини, створює антиангіогенний ефект в зоні росту пухлини, зменшує імуносупресію в МО пухлини та посилює системну імунну відповідь, зменшуючи кількість та активність Т-рег клітин та посилюючи продукцію IFNγ.

Висновки.

1. Хіміоімунотерапія на основі ДК-вакцини та низьких доз доксорубіцину має суттєвий протипухлинний ефект при її застосуванні у тварин з перещепленою пухлиною.

2. Застосування ДК-вакцини та доксорубіцину в дозі 0.2 мг/кг в монотерапії та комбіновано чинить антиангіогенний ефект на первинну пухлину шляхом зменшення рівня експресії гену VEGF, послаблює локальну імуносуперсію, знижуючи експресію мРНК TGF-β в мікрооточенні пухлини.

3. Хіміоімунотерапія сприяє зниженню системної імуносупресії, знижуючи рівень експресії гену FoxP3 та суттєво посилює IFNγ-продукуючу здатність клітин селезінки.

Перспективи подальших досліджень. Одержані результати обґрунтовують доцільність комбінування ДК-вакцини з низькими дозами доксорубіцину. Подальше дослідження протипухлинного ефекту ДК-вакцини та низьких доз доксорубіцину призведе до створення ефективних схем комбінованої протипухлинної терапії, що дозволить в наступному проведденя клінічних досліджень даної терапії.

Література

1. Чехонин В. П. Роль VEGF в развитии неопластического ангиогенеза / В. П. Чехонин, С. А. Шеин, А. А. Корчагина [та ін.] // Вестник РАМН. – 2012. – №2. – С. 23-34.
2. Bunt S. K. Inflammation induces myeloid-derived suppressor cells that facilitate tumor progression. / S. K. Bunt, P. Sinha, V. K. Clements, J. Leips [et al.] // J. Immunol. – 2006. – Vol. 176, №1. – P. 284–290.
3. Lima L. G. Tumor-derived microvesicles modulate the establishment of metastatic melanoma in a phosphatidylserine-dependent manner / L. G. Lima, R. Chammas, R. Q. Monteiro [et al.] // Cancer Lett. – 2009. – Vol. 283, №2. – P. 168–175.
4. Mayer C. T. Lack of Foxp3+ macrophages in both untreated and B16 melanoma-bearing mice / C. T. Mayer, A. A. Kuhl, C. Loddenkemper [et al.] // Blood. – 2012. – Vol. 119. – P. 1314–1315.
5. Miyao T. Plasticity of foxp3(+) T cells reflects promiscuous foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells / T. Miyao, S. Floess, R. Setoguchi [et al.] // Immunity. – 2012. – Vol. 36. – P. 262–275.
6. Park H. B. Acquisition of anergic and suppressive activities in transforming growth factor-beta-costimulated CD4+CD25- T cells / H. B. Park, D. J. Paik, E. Jang, S. Hong [et al.] // Int. Immunol. – 2004. – Vol. 16, №8. – P. 1203–1213.
7. Penel N. Cyclophosphamide-based metronomic chemotherapy: After 10 years of experience, where do we stand and where are we going? / N. Penel, A. Adenis, G. Bocci // Critical Reviews in Oncology / Hematology. – 2012. – Vol. 82, №1. – P. 40-50.

8. Saha B. Gene modulation and immunoregulatory roles of interferon gamma / B. Saha, S. Jyothi Prasanna, B. Chandrasekar [et al.] // Cytokine. – 2010. – Vol. 50, № 1. – P. 1–14.
9. Shalin H. N. Dendritic Cell Protocols / H. N. Shalin. – Humana Press, 2010. – 446 p.
10. Sistigu A. Immunomodulatory effects of cyclophosphamide and implementations for vaccine design / A. Sistigu, S. Viaud, N. Chaput [et al.] // Semin Immunopathol. – 2011. – Vol. 33. – P. 369–383.
11. Slovin S. Chemotherapy and immunotherapy combination in advanced prostate cancer / S. Slovin // Clinical Advances in Hematology & Oncology. – 2012. – Vol. 10, № 2. – P. 90-100.
12. Solberg T. D. Correlation between tumor growth delay and expression of cancer and host VEGF, VEGFR2, and osteopontin in response to radiotherapy / T. D. Solberg, J. Nearman, J. Mullins [et al.] // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. – 2008. – Vol. 72, № 3. – P. 918–926.
13. Spadaro F. IFN-a cross-presentation in human dendritic cells by modulating antigen survival, endocytic routing, and processing / F. Spadaro, C. Lapenta, S. Donati [et al.] // Blood. – 2012. – Vol. 119. – P. 1407-1417.
14. Tang Q. Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function / Q. Tang, E. K. Boden, K. J. Henriksen, H. Bour-Jordan [et al.] // Eur. J. Immunol. – 2004. – Vol. 34, № 11. – P. 2996–3005.
15. Trotta R. TGF-beta utilizes SMAD3 to inhibit CD16–mediated IFNgamma production and antibody-dependent cellular cytotoxicity in human NK cells / R. Trotta, J. Dal Col, J. Yu, D. Ciarlariello [et al.] // J. Immunol. – 2008. – Vol. 181, № 6. – P. 3784–3792.
16. Tsujimoto H. Roles of inflammatory cytokines in the progression of gastric cancer: friends or foes? / H. Tsujimoto, T. Ono, T. Ichikura [et al.] // Gastric Cancer. – 2010. – Vol. 13, № 4. – P. 212–221.
17. Umemura N. Tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells are pleiotropic-inflamed monocytes/macrophages that bear M1- and M2-type characteristics / N. Umemura, M. Saio, T. Suwa [et al.] // J Leukoc Biol. – 2008. – Vol. 83, № 5. – P. 1136–1144.
18. Wang S. TRAIL and Doxorubicin Combination Induces Proapoptotic and Antiangiogenic Effects in Soft Tissue Sarcoma In vivo / S. Wang, R. Wenhong, L. Jeffery [et. al.] // Clin Cancer Res. – 2010. – Vol. 16, № 9. – P. 2591-2604.
19. Yang Z. Z. The role of Treg cells in the cancer immunological response / Z. Z. Yang, S. M. Ansell // Am. J. Immunol. – 2009. – Vol. 5, № 1. – P. 17–28.

УДК 616-006-085:615. 37

ПОЄДНАННЯ ВАКЦИНИ НА ОСНОВІ ДЕНДРИТНИХ КЛІТИН ТА НИЗЬКИХ ДОЗ ДОКСОРУБІЦИНУ – ЕФЕКТИВНИЙ МЕТОД В БОРОТЬБІ З ПУХЛИННОЮ ІМУНОСУПРЕСІЄЮ

Горбач О. І., Храновська Н. М., Скачкова О. В., Сидор Р. І., Позур В. К.

Резюме. Метою роботи було дослідити вплив XIT на основі ДК-вакцини та доксорубіцину дозою 0,2 мг/кг на мікрооточення пухлини та імунну систему тварин на моделі мишачої саркоми-37. Хіміоімунотерапія на основі ДК-вакцини та низьких доз доксорубіцину має суттєвий протипухлинний ефект при її застосуванні у тварин з перещепленою пухлиною. Застосування ДК-вакцини та доксорубіцину в дозі 0.2 мг/кг в монотерапії та комбіновано чинить антиангіогенний ефект на первинну пухлину шляхом зменшення рівня експресії гену VEGF, послаблює локальну імуносупресію, знижуючи експресію мРНК TGF-β в мікрооточенні пухлини. Хіміоімунотерапія сприяє зниженню системної імуносупресії, знижуючи рівень експресії гену FoxP3 та суттєво посилює IFN-γ-продукуючу здатність клітин селезінки. Одержані результати вказують на доцільність комбінування хіміо- та імунотерапевтичних методів при розробці більш ефективних підходів для профілактики рецидивів та метастазів у хворих на злоякісні новоутворення після основного лікування.

Ключові слова: ДК-вакцина, доксорубіцин, хіміоімунотерапевтичний режим, комбінована терапія, саркома-37.

УДК 616-006-085:615. 37

СОЧЕТАНИЕ ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК И НИЗКИХ ДОЗ ДОКСОРУБИЦИНА – ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД В БОРЬБЕ С ОПУХОЛЕВОЙ ИММУНОСУПРЕССИЕЙ

Горбач А. И., Храновська Н. Н., Скачкова О. В., Сидор Р. И., Позур В. К.

Резюме. Целью работы было исследовать влияние химиоиммунотерапии на основе ДК-вакцины и доксорубицина дозой 0,2 мг / кг на микроокружение опухоли и иммунную систему животных на модели мышиной саркомы-37. Химиоиммунотерапия на основе ДК-вакцины и низких доз доксорубицина имеет существенный противоопухолевый эффект при ее применении у животных с перевиваемою опухолью. Применение ДК-вакцины и доксорубицина дозой 0.2 мг/кг в монотерапии и совместно оказывает антиангиогенный эффект на первичную опухоль путем уменьшения уровня экспрессии гена VEGF, ослабляет локальную иммуносупрессию, снижая экспрессию мРНК TGF-β в микроокружении опухоли. Химиоиммунотерапия способствует снижению системной иммуносупрессии, снижая уровень экспрессии гена FoxP3 и существенно усиливает продукцию IFN-γ клетками селезенки. Полученные результаты указывают на целесообразность комбинирования химио- и иммунотерапевтических методов при разработке более эффективных подходов при профилактики рецидивов и метастазов у больных злокачественными новообразованиями после основного лечения.

Ключевые слова: ДК-вакцина, доксорубицин, саркома-37, химиоиммунотерапевтический режим, комбинированная терапия.

UDC 616-006-085:615. 37

Combination of Vaccine Based on Dendritic Cells and Low-Dose Doxorubicin as an Effective Method to Reduce Tumor Immunosuppression

Gorbach O. I., Khranovska N. M., Skachkova O. V., Sydor R. I., Pozur V. K.

Abstract. Immunodeficiency caused by T lymphocytes, natural killer cells and mononuclear phagocytes system decreased activities, antigen presentation mechanisms defection, increased number of T suppressor cells with CD4+ CD25+ Foxp3+ phenotype is observed in patients with later tumor progression stages. The tumor cells and their microenvironment are able to secrete factors that help tumor avoid immune response and promote invasion and metastasis. Low-dose chemotherapy has a significant effect on the tumor microenvironment by reducing angiogenesis and $CD4^+CD25^+FoxP3^+$-cells number. The aim of the study was to investigate the impact of chemoimmunotherapy based on DC vaccine and 0. 2 mg/kg dose doxorubicin on tumor microenvironment and immune system of animals in the murine sarcoma-37 model.

We have used sarcoma-37 cell line as an experimental tumor model. The tumor cells were injected intramuscularly in amount of $2x10^6$ cells per CBA mice. Doxorubicin at 0.2 mg/ml doses was injected intraperitoneally. DC vaccine was injected intravenously into the eye orbital sinus in concentration of $0,2x10^6$ DC per animal after 15th day of tumor transplantation, three times with 3-4 days interval.

Chemoimmunotherapy had significant antitumor effect in animals with transplanted tumor. Significant reduction in primary tumor volume was observed in chemoimmunotherapy treated animals group compared with control ($p < 0.01$), DC vaccine group ($p < 0.01$) and DOX group ($p < 0.01$). Also, 3 times VEGF mRNA expression level decrease was found compared to the control group, $p < 0.01$. Its level in splenocytes in DC vaccine group has reduced in 2 times ($p < 0.01$) and in doxorubicin group – in 3 times ($p < 0.01$). The TGF-β mRNA expression level in chemoimmunotherapy group decreased in 16. 7 times, in DC group – in 55.7 times and in DOX group – in 18.6 times compared to the control group, $p < 0.01$.

Maximal reduction of FoxP3 mRNA expression level on 46% ($p < 0.01$) compared with the control group was observed in splenocytes of combined therapy based on DC-vaccine and 0.2 mg/kg doxorubicin group. We have shown that its level in DC vaccine group decreased on 32% ($p < 0.01$) and in the doxorubicin group – on 39% ($p < 0.01$) compared with the control group. Administration of 0.2 mg/kg doxorubicin enhanced DC vaccine effect, decreasing the FoxP3 mRNA expression level on 21% in splenocytes compared to the DC vaccine group, $p < 0.05$.

We have found that in chemoimmunotherapy group IFN-γ mRNA expression level in splenocytes increased in 2 times compared with the control group, $p < 0.01$. DC vaccine administration increased IFN-γ mRNA expression level on 76% compared with the control group, $p < 0.01$. Its level increased on 73% in 0.2 mg/kg doxorubicin group in splenocytes compared to the control group, $p < 0.01$.

Application of DC vaccine and doxorubicin at 0.2 mg/kg dose as monotherapy and/or combined therapy had an antiangiogenic effect on primary tumor by VEGF gene expression reduction. It also reduced TGF-β mRNA expression in tumor microenvironment resulting in local immunosuppression diminishment. Chemoimmunotherapy helped to reduce systemic immunosuppression via FoxP3 expression decrease and IFN-γ-producing ability of spleen cells increase. Obtained results show the importance of chemo- and immunotherapeutic methods combining for the development of high effective approaches of recurrence and metastasis prevention after primary treatment for cancer patients.

Keywords: DC vaccine, doxorubicin, chemoimmunotherapeutic regimen, combined therapy, sarcoma-37.

Рецензент – проф. Кочина М. Л.

Стаття надійшла 12. 09. 2014 р.