

ХІМІОІМУНОТЕРАПЕВТИЧНИЙ РЕЖИМ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ ВАКЦИНИ НА ОСНОВІ ДЕНДРИТНИХ КЛІТИН ТА НИЗЬКИХ ДОЗ ЦИКЛОФОСФАМІДУ У МИШЕЙ З КАРЦИНОМОЮ ЛЕГЕНІ ЛЬЮЇС

Н.М. Храновська, О.В. Скачкова, О.І. Горбач, Н.М. Свергун,
Р.І. Сидор, Н.В. Іонкіна

Національний інститут раку (Київ)

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Вступ

Зростання частоти онкологічних захворювань, низький рівень виживання хворих з III-IV стадіями, недостатня ефективність традиційних методів лікування у цієї категорії хворих обумовлюють соціальну значимість даної проблеми. В останнє десятиріччя вже досягнуті успіхи в лікуванні хворих на злоякісні пухлини, в першу чергу, внаслідок прогресу лікарської терапії [8]. В той же час, досягнення молекулярної біології, імунології, поглиблене розуміння механізмів прогресії пухлини та взаємовідносин імунної системи і пухлини, а також розвиток біотехнології зумовили реальні перспективи покращання результатів лікування хворих на злоякісні пухлини за допомогою методів біотерапії [12,21].

Біотерапія є порівняно новим напрямком в лікуванні онкологічних хворих. Вона спрямована на досягнення протипухлинного ефекту за допомогою препаратів біогенного походження (цитокини, моноклональні антитіла), вакцин із використанням пухлиноасоційованих антигенів (ПАА), або за рахунок власних ресурсів організму, посилених за допомогою біопрепаратів [25].

Методи біотерапії залучають до протипухлинного захисту імунну систему, впливаючи на біологічні фактори, які контролюють процеси апоптозу та ангиогенезу [10, 17] та опосередковано впливають на стимуляцію різних ланок імунної системи, що забезпечує її протипухлинний ефект. Центральну роль в протипухлинній відповіді відводиться клітинному імунітету, що опосередкований природними кілерними клітинами (ПКК) та цитотоксичними Т-лімфоцитами (ЦТЛ) [8, 28].

Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології

Слід зазначити, що ефективність імунної відповіді на пухлину є темою інтенсивного обговорення та дослідження у світі. На теперішній час виділяють цілий ряд причин дефектності протипухлинного імунітету, одними з яких є низька експресія пухлиноасоційованих та МНС – антигенів на пухлинних клітинах, втрата цих антигенів в процесі пухлинної прогресії або їх екранування блокуючими антитілами, що ускладнює розпізнавання пухлинних клітин ЦТЛ, а також пригнічення дозрівання та функціональної активності професіональних антигенпрезентуючих клітин (АПК) – дендритних клітин (ДК) [3, 4]. В результаті, замість розвитку ефективної імунної відповіді має місце негативний результат Т-клітинної активації у вигляді індукції анергії та апоптозу реактивних Т-клітин, а також генерація регуляторних CD4⁺CD25⁺Foxp3 Т-лімфоцитів з супресорною активністю [20, 22].

Певною мірою вирішенню цих проблем сприяє застосування в протипухлинній імунотерапії ДК в якості клітинного ад'юванта. ДК є професіональними АПК, які відіграють ключову роль в запуску та детермінуванні типу імунної відповіді. Це обумовлено високим рівнем експресії на ДК МНС-молекул I та II класу та молекул костимуляції, а також продукцією цитокинів, які є другим необхідним сигналом для активації Т-клітин [26]. ДК здатні активувати клітини, що знаходяться у спокої і, що особливо важливо, «наївні» Т-лімфоцити. В багатьох експериментальних та клінічних дослідженнях показано, що навантажені пухлинним антигеном ДК стимулюють *in vitro* та *in vivo* найбільш потужну генерацію ЦТЛ [19, 15].

Останнім часом особливу увагу привертають дослідження з використанням комбінованих схем специфічної адаптивної імунотерапії та протипухлинних хіміопрепаратів [2, 9, 13]. З одного боку, деякі хіміопрепарати викликають так звану «імуногенну загибель» пухлинних клітин, що сприяє стимуляції локальної запальної реакції та залученню і дозріванню ДК, за рахунок чого відбувається ерадикація хіміорезистентних та стовбурових пухлинних клітин [16]. З іншого - підвищення ефективності протипухлинної вакцинації досягається за рахунок імуномодуючої дії хіміопрепаратів, тобто за рахунок модифікації деяких регуляторних взаємодій між клітинами імунної системи [6, 7]. Так, існує вагоме обґрунтування того, що попередня короткочасна деплеція регуляторних CD4⁺CD25⁺ FoxP3 Т-лімфоцитів є дуже ефективним підходом, який може значно посилити терапевтич-

Екологічна і клінічна імунологія та імуореабілітація

ні ефекти різних видів протипухлинної імунотерапії, особливо протипухлинної вакцинотерапії. Видалення CD4⁺CD25⁺FoxP3 - клітин шляхом введення циклофосфаміду (ЦФ) в низьких дозах супроводжується гальмуванням росту пухлини, а в деяких випадках і повною її регресією, робить пухлину чутливою до імунотерапії [14].

Разом з тим, перехід до клінічних випробувань хіміоімунотерапії обмежений рядом невирішених питань, пов'язаних з відсутністю обґрунтованих режимів та недостатнім розумінням механізмів індукції оптимальної імунної відповіді. У той же час доцільність імунотерапевтичних заходів, спрямованих на профілактику рецидивів і метастазів у онкологічних хворих, вимагає чітких обґрунтувань, що і визначило мету та завдання даної роботи.

Метою роботи є дослідження антиметастатичної та імуномодулюючої активності хіміоімунотерапевтичного режиму із застосуванням вакцини на основі ДК та низьких доз ЦФ в експерименті.

Матеріали і методи дослідження

В експериментальних дослідженнях були задіяні 70 мишей лінії C57Bl/6, самці вагою 18-22 г., віком 1,5-2 міс., розведення віварію Інституту молекулярної біології та генетики НАН України. В якості експериментальної моделі використовували карциному легені Льюїс (КЛ), яка активно метастазує в легені гематогенним шляхом. Штам був люб'язно наданий Клітинним банком ліній з тканин людини та тварин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім.Р.Є.Кавецького НАН України, який перещеплювали за загальноприйнятою методикою.

Пухлинні клітини КЛ вводили внутрішньовенно (в/в) мишам лінії C57Bl/6 в кількості 300×10^5 клітин/мишу. Хіміотерапію ЦФ починали на 7-му добу після перещеплення пухлини та вводили ЦФ всього 4 рази, щодено, загальна маса ЦФ на курс лікування складала 40 мг. ДК-вакцинотерапію починали на наступну добу після останнього введення циклофосфаміду. ДК-вакцини вводили в/в 3 рази кожні 3 доби. В якості джерела пухлинних антигенів (ПА) для навантаження ДК використовували механо-хімічномодифіковані ліофілізовані пухлинні клітини (м/м ЛФПК) КЛ в концентрації 0,05 мг/мл. Метод одержання м/м ЛФПК викладений в посиланні [28]. На 30 добу після перещеплення пухлини проводили підрахунок кількості та об'єму метастазів, а також забір біологічного матеріалу (клітини метастатичних вузлів у легенях, клітини селезінки)

для проведення молекулярно-генетичних та імунологічних досліджень. Схема експерименту представлена на рис. 1.



Рис. 1. Схема експерименту.

Кожна експериментальна група складалася з 10 мишей. Тварини були розподілені на такі групи:

- 1-й групі мишей вводили лише клітини КЛ, контроль КЛ;
- 2-й групі мишей вводили клітини КЛ + ЦФ;
- 3-й групі мишей вводили клітини КЛ + ДК;
- 4-й групі мишей вводили клітини КЛ + ЦФ + ДК.

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.

Для експериментальних досліджень в якості джерела ДК нами були використані спленоцити сингенних інтактних мишей. Такі ДК є мієлоїдними за походженням і, майже не відрізняються за своїми фенотиповими та функціональними властивостями від ДК, генерованих з моноцитів периферичної крові людини. ДК отримували з селезінки інтактних мишей лінії C57BL/6 з дотриманням правил асептики за наступною методикою [24].

Тканину селезінки подрібнювали в середовищі RPMI 1640 та фільтрували крізь нейлоновий фільтр для отримання однорідної клітинної суспензії. Клітини в концентрації 5×10^6 /мл інкубували при 37°C та 5% CO₂ протягом 24 годин в повному середовищі RPMI-1640 з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки, 200 ммоль/л глютаміну, 100 од/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину та 25 мМоль 5-меркаптоетанолу. Клітини, які не прикріпилися до пластику, концентрували та центрифугували 15 хв при 1000 об/хв в градієнті щільності 14,5% метризаміду. Більш ніж 80% інтерфазних клітин за морфологічними ознаками відносяться до ДК. ДК навантажували ПА наступним чином: інкубували в концентрації 1×10^6 /мл в повному поживному середовищі RPMI-1640 протягом 4 годин при

37 °C в атмосфері 5 % CO₂ в присутності м/м ЛПКЛ, потім ДК відмивали в розчині Рінгера шляхом центрифугування протягом 7 хв при 1000 об/хв. ДК-вакцину вводили в/в в концентрації 200 × 10³/мишу.

Антиметастатичний ефект комбінованої імунотерапії оцінювали за частотою метастазування пухлини. При цьому підраховували число та об'єм метастазів в легенях мишей. Об'єм метастатичної колонії розраховували за формулою:

$$V=0,52D^3,$$

де 0,52 – коефіцієнт;

V – об'єм метастатичної колонії;

D – її діаметр (мм).

Цитотоксичну активність (ЦА) ПКК селезінки мишей оцінювали з використанням проточної цитометрії. В якості клітин – мішеней використали дві перещеплювані лінії клітин - КЛ, адаптовану для росту на пластику (сингенна система мішень-ефектор), та мишачу лімфому ОН-1, одержану в ІЕПОР ім. Р.Є.Кавецького з трансплантованих лімфом, індукованих *Vac. megaterium* Н. у мишей лінії А (алогенна система мішень-ефектор).

Зрілість ДК та вміст субпопуляції Т-рег клітин селезінки визначали за рівнем експресії маркерів за допомогою моноклональних антитіл (МКАТ) анти CD86- FITC, CD 54- FITC, CD4- FITC, CD25- PE (BD, США) методом проточної цитометрії. Дослідження виконувалися на приладі FACS Calibur ("Becton Dickinson", США), що оснащений двома лазерами (довжиною хвилі 488 та 625 нм), з використанням програми CellQuest-PRO для комп'ютерів Макінтош для придбання та аналізу даних. Для виміру флюоресценції PE використовували вузькополосний фільтр 585/42 нм, флюоресценції ФІТЦ - 642/75 нм.

Для дослідження рівня експресії генів цитокінів частину селезінки або легені з метастатичним вузлом не пізніше, ніж через 30 хв після видалення поміщали в мікропробірки з 0,3 мл розчину RNA-later ("Ambion", США) для стабілізації РНК. Для виділення тотальної РНК методом кислотного фенольного екстракції використовували ПЛР-тест-набір "Рибозоль-А" ("AmpliSens", Росія). Для отримання кДНК проводили реакцію зворотної транскрипції з використанням ПЛР-тест-набору "Реверте-Л-100" ("AmpliSens", Росія). Отриманий зразок кДНК до постановки полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) зберігали при температурі мінус 70° С.

Рівень експресії генів IFN-γ, IL-4, IL-10, TNF-α, визначали за допомогою ПЛР з детекцією результатів в режимі реального часу на

приладі 7500 Real-Time PCR Systems ("Applied Biosystems", США) з використанням специфічних праймерів і флюорохрому SYBRGreen (C32H37N4S +) з піком поглинання λ_{max} = 488 нм та флюоресценцією λ_{max} = 522 нм. Послідовності праймерів були підібрані експериментально з використанням програми Primer Express® Software v3.0 ("Applied Biosystems", США) і синтезовані фірмою "Applied Biosystems" (США). Рівні експресії генів-мішеней оцінювали за допомогою методу ΔΔCt з нормуванням щодо експресії ендogenous контролю. Рівні експресії ендogenous контролю вчитали з рівнів експресії генів-мішеней. В якості ендogenous контролю використовували ген гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (GAPDH).

Для дослідження рівня експресії генів ростових факторів TGF-β та VEGF-α у клітинах метастатичних вузлів в легенях використовували напівкількісну оцінку рівня експресії мРНК за допомогою ПЛР. Умови ПЛР були підібрані нами експериментально. Ампліфікацію проводили на приладі Veriti 96 Well Thermal Cyclor (фірми «Applied Biosystems», США).

Електрофорез ПЛР-продуктів реакції проводили у ТЕ-буфері, з використанням гелів з 2% вмістом агарози (фірми «ДНК-технологія», Росія) при напрузі 5 V/см до міграції мітки бромфенолового синього на 2/3 довжини гелю. Денситометричний аналіз проводили за допомогою гел-документуючої системи «Molecular Imager GelDoc XR System» (фірми «BIO RAD», США) та програми Quantity One. В якості контролю використовували GAPDH, рівень експресії цього гену в клітині вважали за 100%.

Одержані результати обробляли статистично з використанням t-критерія Стьюдента. Вірогідними вважали значення при рівнях p<0,05. Закон нормального розподілу вибірок перевіряли за допомогою статистичних тестів Колмогорова-Смирнова.

Отримані результати та обговорення

Дослідження фенотипових особливостей ДК, що використовуються для створення протипухлинної вакцини.

Відомо, що дозрівання ДК є ключовим фактором в запуску імунної реакції, а використання незрілих ДК, навантажених ПА, в якості вакцини, призводить до формування імунологічної толерантності, що не сприяє формуванню протипухлинних імунних реакцій. Фенотип ДК свідчить про готовність клітин до виконання певних функцій: взаємодії з Т-клітинами, клітинами мікрооточення певних тканин, секреції цитокінів.

Ступінь зрілості ДК визначали за рівнем експресії поверхневих маркерів CD86 та CD54. Отримані дані свідчать про те, застосування м/м ЛФПК КЛ для навантаження ДК, стимулює значне дозрівання останніх. Так, рівень експресії CD86 (молекули костимуляції, що забезпечує взаємодію з Т-клітинним рецептором лімфоцитів) збільшувався в 4,4 рази, та становив ($33,00 \pm 5,00\%$) у порівнянні з контролем ($7,50 \pm 2,40\%$), $p < 0,01$. Також при застосуванні м/м ЛФПК спостерігалось збільшення рівня експресії CD54 (молекули адгезії, що підвищує здатність утворювати міжклітинні контакти), яка становила ($82,00 \pm 11,00\%$) у порівнянні з контролем ($57,00 \pm 2,00\%$), $p < 0,025$.

Аналізуючи одержані дані, можна зробити висновок, що ДК навантажені м/м ЛФПК, мають фенотип напівзрілих клітин і придатні для застосування в протипухлинній імунотерапії.

Дослідження антиметастатичного ефекту хіміоімунотерапії на основі ДК-вакцини та низьких доз ЦФ.

Для визначення антиметастатичного ефекту при застосуванні комбінованої імунотерапії на основі ДК та низьких доз ЦФ у тварин з КЛ в ході експерименту були досліджені кількість та об'єм метастазів. Результати досліджень представлені на рис. 2.

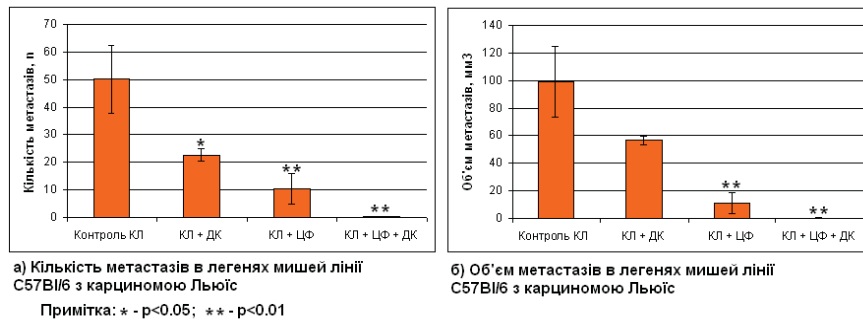


Рис. 2. Кількість та об'єм метастазів легенях мишей лінії С57В1/6 з карциномою Льюїс.

За результатами досліджень встановлено, що запропонований режим хіміоімунотерапії є вельми ефективним щодо гальмування процесу метастазування в легені тварин. Так, кількість метастазів у тварин, що отримували ЦФ та ДК, була найменшою з усіх досліджуваних груп і становила $0,22 \pm 0,15$ проти $50,14 \pm 12,26$ порівняно з контрольною групою, об'єм метастатичних вузлів

також був достовірно меншим порівняно з контролем і складав $0,28 \pm 0,19$ см³ проти $99,21 \pm 25,79$ мм³.

Вплив комбінованої хіміоімунотерапії на рівень експресії мРНК VEGF та TGF- β в метастатичних клітинах.

Для більш поглибленого вивчення механізмів дії комбінованої хіміоімунотерапії на перебіг карциноми Льюїс були проведені дослідження по вивченню молекулярно-генетичних змін у клітинах метастатичних вузлів мишей. Результати досліджень представлені на рис. 3.

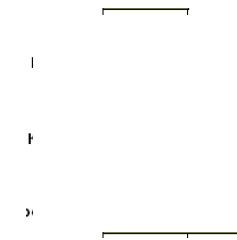


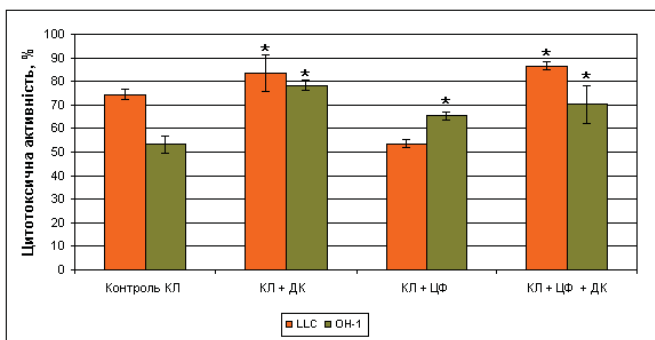
Рис. 3. Рівень експресії мРНК ростових факторів в клітинах метастатичних вузлів легень мишей лінії С57В1/6 з карциномою Льюїс.

Як показали результати досліджень, у тварин, що отримували комбіновану хіміоімунотерапію, спостерігалось деяке зменшення рівня експресії мРНК VEGF та суттєве зменшення рівня експресії TGF- β у порівнянні з контрольною групою тварин, $p < 0,025$. Застосування імунотерапії ДК-вакциною в монорежимі сприяло посиленню рівня експресії мРНК ростових факторів на рівні тенденції.

Відомо, що ЦФ в низьких дозах при застосуванні в метрорномному режимі має властивості антиангіогенного фактору, що одержало підтвердження в наших дослідженнях [5]. Так, в клітинах метастатичних вузлів тварин, що одержували ЦФ, мало місце суттєве пригнічення експресії мРНК як VEGF, так і TGF- β .

Дослідження змін в ЦА клітин селезінки під впливом комбінованої хіміоімунотерапії. Імунна відповідь організму на ПА, як і на будь-який інший антиген, складається з комплексу процесів, в яких

взаємодіють ефекторні та регуляторні механізми. Тому, для забезпечення максимальної ефективності регуляторні механізми повинні впливати на різні ланки імунітету, як на неспецифічну, основою якої є функціонування макрофагів і ПКК, так і на антигенспецифічну, переважно на її Т-ланку. Особливе значення мають ПКК, які здатні видаляти пухлинні клітини різних типів, особливо клітини, що мають знижений рівень експресії молекул МНС I та можуть уникати опосередкованого ЦТЛ лізису. Відомо, що зрілі ДК при контактній взаємодії індукують на ПКК експресію раннього маркера активації CD69 та посилюють їх цитолітичну активність. Окрім того, на ПКК опосередковано впливають цитокіни, які виділяють активовані лімфоцити (ІФН- γ , ІЛ-2, ІЛ-12), що утворюються після проведення ДК-вакцинотерапії, а також самі ДК, що продукують ІЛ-1 та TNF- α , посилюючи проліферацію ПКК, індуковану ІЛ-2 та ІЛ-12 [27, 11, 23]. Результати досліджень ЦА спленоцитів під дією хіміоімунотерапії представлені на рис. 4.



Примітка: * - $p < 0,05$

Рис. 4. Цитотоксична активність лімфоцитів селезінки мишей лінії C57Bl/6 з карциномою Льюїс.

При дослідженні ЦА спленоцитів було встановлено, що у тварин, які отримали комбіновану хіміоімунотерапію, відбувається значне її посилення, про що свідчать результати при дослідженні як у сингенній, $p < 0,05$, так і в алогенній системі, $p < 0,05$.

Вплив комбінованої схеми хіміоімунотерапії на кількісний та функціональний стан лімфоцитів різних субпопуляцій в селезінці мишей.

На даний час відомо, що для оцінки протипухлинної імунної відповіді необхідно визначати кількість та функціональний потенціал як цитотоксичних, так і супресорних клітин. Одним із найак-

туальніших напрямків є дослідження субпопуляції Т-регуляторних клітин (Т-рег). Дослідження останніх років показали, що популяція Т-рег ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) грає важливу роль у забезпеченні імунологічної ауто толерантності та негативному контролі як патологічних, так і фізіологічних імунних реакцій.

На даний час Т-рег лімфоцити розглядаються в якості основних індукторів імуносупресії в онкогенезі. Передбачається, що Т-рег клітини інгібують функції клітин, які беруть участь у протипухлинній імунній відповіді, та сприяють розвитку толерантності до пухлинних антигенів.

Т-рег клітини відіграють важливу роль у супресії імунної відповіді на ПАА. Зменшення чисельності Т-рег клітин, а також зниження їх функціональної активності (наприклад, у результаті застосування моноклональних антитіл до CD25, CTLA-4 та TGF- β) може призводити до індукції ефективного протипухлинного імунітету. Тому, визначення змін, що відбуваються в кількісному та функціональному стані Т-регуляторних лімфоцитів є дуже важливими для розкриття механізмів дії комбінованої хіміоімунотерапії на імунну систему пухлиноносія.

Таблиця 1

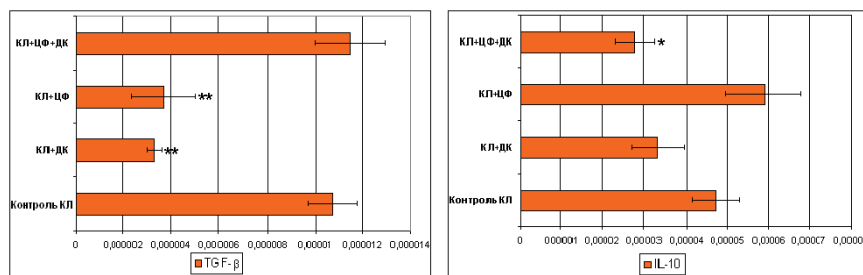
Кількість лімфоцитів різних субпопуляцій в селезінці мишей лінії C57Bl/6 з карциномою Льюїс

№	Група тварин	Кількість лімфоцитів	
		Активовані лімфоцити ($CD4^+25^+$), %	Регуляторні Т-лімфоцити ($CD4^+25^+high$), %
1	Контроль КЛ	$9,59 \pm 0,89$	$1,40 \pm 0,17$
2	КЛ + ЦФ	$3,27 \pm 0,31^*$	$0,99 \pm 0,13$
3	КЛ+ЦФ+IFN γ +ДК	$7,14 \pm 0,40^*$	$1,47 \pm 0,12$

Примітка: * - $p < 0,05$ в порівнянні з контролем.

Встановлено, що використання ЦФ в низькій дозі викликає значне зменшення кількості Т-рег лімфоцитів в селезінці мишей (табл. 1). Ці зміни відбуваються на фоні зменшення кількості активованих лімфоцитів з фенотипом $CD4^+25^+$. У тварин, які отримували комбіновану імунотерапію, виснаження Т-рег лімфоцитів виявлено не було. В даному випадку негативну дію ЦФ по відношенню до лімфоцитів, що несуть $CD4^+25^+$, проявлялося в набагато меншому ступені, хоча і було істотним.

Відомо, що основними продуцентами цитокінів з супресорними властивостями (IL-10 та TGF- β) є T-рег клітини. IL-10 та TGF- β відіграють ключову роль у негативній регуляції протипухлинної імунної відповіді за рахунок пригнічення активації і ефекторних функцій T-клітин та ПКК. Зниження рівня експресії IL-10 та TGF- β може бути результатом зменшення кількості T-рег лімфоцитів у селезінці мишей або зміни їх функціонального потенціалу і свідчити про усунення негативного впливу T-рег клітин на розвиток протипухлинної імунної відповіді. Результати дослідження представлені на рис. 5.



в) Рівень експресії мРНК TGF- β в лімфоцитах селезінки мишей лінії С57ВІ/6 з карциномою Льюїс.
г) Рівень експресії мРНК IL-10 в лімфоцитах селезінки мишей лінії С57ВІ/6 з карциномою Льюїс.
По осі абсцис - рівень експресії цитокінів. По осі ординат - групи тварин.
Примітка: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$

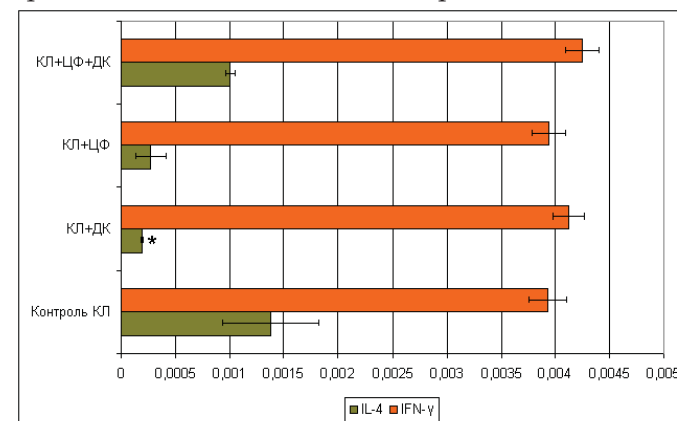
Рис. 5. Рівень експресії мРНК IL-10 та TGF- β в лімфоцитах селезінки мишей лінії С57ВІ/6 з карциномою Льюїс.

Встановлено, що у тварин, які отримували комбіновану хіміоімунотерапію, відбувається значне зниження секреції IL-10 в порівнянні з контрольною групою, $p < 0,05$. При дослідженні рівня експресії мРНК TGF- β були отримані наступні результати. В групах тварин, які отримували монотерапію ДК-вакциною або низькими дозами ЦФ, спостерігалось достовірне зменшення рівня експресії мРНК TGF- β , $p < 0,01$. В групі тварин, яка отримувала комбіновану хіміоімунотерапію, було відмічено несуттєве зростання рівня експресії мРНК TGF- β .

Рівень продукції ІФН- γ та ІЛ-4 при формуванні імунної відповіді в значній мірі визначає домінування певної субпопуляції лімфоцитів: Тх1 або Тх2 типу. Під впливом ІФН- γ інгібується продукція ІЛ-4, ІЛ-10, які є його антагоністами. Результати дослідження представлені на рис. 6.

Було встановлено, що в результаті застосування будь-якого методу терапії відбувається зниження рівня експресії мРНК ІЛ-4 в

спленоцитах тварин в порівнянні з контрольною групою, для груп з монотерапією ДК-вакциною або ЦФ - $p < 0,05$.



По осі абсцис - рівень експресії цитокінів. По осі ординат - групи тварин.
Примітка: * - $p < 0,05$

Рис. 6. Рівень експресії мРНК ІЛ-4 та ІФН- γ в лімфоцитах селезінки мишей лінії С57ВІ/6 з карциномою Льюїс.

Як видно з представлених даних, будь яка імунотерапевтична дія призводить до незначного збільшення рівня експресії мРНК ІФН- γ в порівнянні з групою, що не отримувала лікування. Таким чином, можна припустити, що під впливом імунотерапії відбувається підсилення клітино-опосередкованої ланки імунної системи, тобто імунної відповіді по Тх1 типу, який вважається більш ефективним для реалізації специфічного протипухлинного захисту.

Висновки

1. Встановлено, що режим хіміоімунотерапії, який включає ДК-вакцину та низькі дози ЦФ, має виражений антиметастатичний ефект у мишей лінії С57ВІ/6 з карциномою Льюїс.

2. При дослідженні молекулярно-генетичних механізмів дії комбінованої хіміоімунотерапії встановлено достовірне зменшення рівня експресії мРНК TGF- β у метастатичних клітинах КЛ, що може свідчити про зниження їх злоскісного потенціалу.

4. Застосування комбінованої хіміоімунотерапії ініціює зміни в імунному стані пухлиноносіїв, а саме достовірно призводить до активізації ЦА лімфоцитів як у сингеній, так і в аллогеній системах мішень-ефектор.

5. Доведено, що комбінована хіміоімунотерапія не впливає на кількісний склад Т-рег лімфоцитів, але пригнічує експресію гену ІЛ-10, що свідчить про зниження вираженості індукованої пухлиною імуносупресії.

6. Встановлено, що комбінована хіміоімунотерапія викликає зсув Т-клітинної імунної відповіді у бік Тх1-типу за рахунок зменшення рівня експресії гену ІЛ-4.

7. Одержані результати високої антиметастатичної активності та елімінації імуносупресивних факторів вказують на доцільність комбінування хіміо – та імунотерапевтичних методів, що дає змогу для створення більш ефективних підходів для профілактики розвитку метастазів та рецидивів у хворих на злоякісні новоутворення після основного лікування.

Література

1. Alfaro C. Pilot clinical trial of type 1 dendritic cells loaded with autologous tumor lysates combined with GM-CSF, pegylated IFN, and cyclophosphamide for metastatic cancer patients / C. Alfaro, J.L. Perez-Gracia, N. Suarez [e.a.] // *J. Immunol.* – 2011. – Vol. 187, № 11. – P. 6130-6142.
2. Apetoh L. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy / L. Apetoh, F. Ghiringhelli, A. Tesniere [e.a.] // *Nature Medicine.* – 2007. – Vol. 13, № 9. – P. 1050-1059.
3. Carolin D. Enhancement of antigen-specific Treg vaccination in vivo / D. Carolin, K. Wennholda, H. von Boehmer // *PNAS.* – 2010. – Vol. 107, № 37. – P. 16246-16251.
4. Doloff J.C. VEGF receptor inhibitors block the ability of metronomically dosed cyclophosphamide to activate innate immunity-induced tumor regression / J.C. Doloff, D.J. Waxman // *Cancer Res.* – 2012. – Vol. 72, № 5. – P. 1103-1115.
5. Ellebaek E. Metastatic melanoma patients treated with dendritic cell vaccination, Interleukin-2 and metronomic cyclophosphamide: results from a phase II trial / E. Ellebaek, L. Engell-Noerregaard, T.Z. Iversen [e.a.] // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2012. – Vol. 61, № 10. – P. 1791-1804.
6. Finn O.J. Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer / O.J. Finn // *Ann. Oncol.* – 2012. – Vol. 23, Suppl. 8. – P. VIII6-VIII9.
7. Hammerstrom A.E. Cancer immunotherapy: sipuleucel-T and beyond / A.E. Hammerstrom, D.H. Cauley, B.J. Atkinson [e.a.] // *Pharmacotherapy.* – 2011. – Vol. 31, № 8. – P. 813-828.
8. Ishikawa A. A phase I study of α -galactosylceramide (KRN7000) – pulsed dendritic cells in patients with advanced and recurrent non-small cells lung cancer / A. Ishikawa, S. Motohashi, E. Ishikawa [e.a.] // *Clinical cancer research.* – 2005. – Vol. 11. – P. 1910-1917.

9. Kaufman H.L. Vaccines for melanoma and renal cell carcinoma / H.L. Kaufman // *Seminars in Oncology.* – 2012. – Vol. 39, № 3. – P. 263-275.

10. Kuroki M. Biological response modifiers used in cancer biotherapy / M. Kuroki, S. Miyamoto, T. Morisaki [e.a.] // *Anticancer Res.* – 2012. – Vol. 32, № 6. – P. 2229-2233.

11. Michaud M. Autophagy-Dependent Anticancer Immune Responses Induced by Chemotherapeutic Agents in Mice / M. Michaud, I. Martins, A.O. Sukkurwala [e.a.] // *Science.* – 2011. – Vol. 334. – P. 1573-1577.

12. Moschella F. Unraveling cancer chemoimmunotherapy mechanisms by gene and protein expression profiling of responses to cyclophosphamide / F. Moschella, M. Valentini, E. Aricò [e.a.] // *Cancer Res.* – 2011. – Vol. 71, № 10. – P. 3528-3539.

13. Nguyen-Pham T.-N. Immunotherapy Using Dendritic Cells against Multiple Myeloma: How to Improve? / T.-N. Nguyen-Pham, Y.-K. Lee, H.-J. Kim [e.a.] // *Clin. Dev. Immunol.* – 2012. – Vol. 12. – P. 13.

14. Obeid M. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death / M. Obeid, A. Tesniere, F. Ghiringhelli [e.a.] // *Nature Medicine.* – 2007. – Vol. 13, № 1. – P. 54-61.

15. Palucka K. Cancer immunotherapy via dendritic cells / K. Palucka, J. Banchereau // *Nature Reviews.* – 2012. – Vol. 12. – P. 265-277.

16. Shashidharamurthy R. Immunotherapeutic strategies for cancer treatment: A novel protein transfer approach for cancer vaccine development / R. Shashidharamurthy, E.N. Bozeman, J. Patel [e.a.] // *Med. Res. Rev.* – 2012. – Vol. 32, № 6. – P. 1197-1219.

17. Shurin M.R. Dendritic Cells in Cancer / M.R. Shurin, R. Dsalter. - New York: Springer, 2009. – 396 p.

18. Somasundaram R. Intratumoral heterogeneity as a therapy resistance mechanism: role of melanoma subpopulations / R. Somasundaram, J. Villanueva, M. Herlyn // *Adv. Pharmacol.* – 2012. – № 65. – P. 335-359.

19. Son C.H. Improvement of antitumor effect of intratumoral injection of immature dendritic cells into irradiated tumor by cyclophosphamide in mouse colon cancer model / C.H. Son, D.Y. Shin, S.D. Kim [e.a.] // *J. Immunother.* – 2012. – Vol. 35, № 8. – P. 607-614.

20. Souza A.P. The immune system: endogenous anticancer mechanism / A.P. de Souza, C. Bonorino // *Front. Biosci.* – 2012. – № 4. – P. 2354-2364.

21. Teoh D. Antiangiogenic agents in combination with chemotherapy for the treatment of epithelial ovarian cancer / D. Teoh, A.A. Secord // *Int. J. Gynecol. Cancer.* – 2012. – Vol. 22, № 3. – P. 348-359.

22. Tuyaeerts S. Dendritic cell therapy for oncology roundtable conference / S. Tuyaeerts // *Journal of Immune Based Therapies and Vaccines.* – 2011. – Vol. 9, № 1. – P. 1-6.

23. Vande Woude G.F. *Advances in Cancer Research* / G.F. Vande Woude, G. Klein. - Elsevier Inc, 2008. - 238 p.

24. Vremec D. *The Surface Phenotype of dendritic cells Purified from mouse thymus and Spleen i Investigation of the CD8 Expression by a Sulponulation of Dendritic cells* / D. Vremec, M. Zobras, R. Scollay [e.a.] // *J. Exp. Med.* - 1992. - Vol. 176. - P. 47-58.

25. Yang T.J. *Anticancer therapy and apoptosis imaging* / T.J. Yang, A. Haimovitz-Friedman, M. Verheij // *Exp. Oncol.* - 2012. - Vol. 34, № 3. - P. 269-276.

26. Субпопуляція Granzуте-В*лимфоцитів у больных меланомой при вакцинотерапії / З. Кадагидзе, А. Борунова, Г. Чкадуа [та ін.] // *Иммунология.* - 2008. - № 2 - С. 87-94.

27. Сорочан П.П. *Регуляторные Т-клетки и новые стратегии противоопухолевой иммунотерапии* / П.П. Сорочан, И.А. Громакова, Н.Э. Прохач // *Международный медицинский журнал.* - 2009. - Т. 15, № 2 (58). - С. 85-89.

28. Специфічна імунотерапія в онкології / За ред. Ю.А. Гріневича. - Київ: Здорів'я, 2008. - 415 с.

Резюме

Храновська Н.М., Скачкова О.В., Горбач О.І., Свергун Н.М., Сидор Р.І., Іонкіна Н.В. Хіміоімунотерапевтичний режим із застосуванням вакцини на основі дендритних клітин та низьких доз циклофосфаміду у мишей з карциномною легені Льюїс.

Досліджено антиметастатичну та імуномодулюючу активність хіміоімунотерапевтичного режиму із застосуванням вакцини на основі дендритних клітин та низьких доз циклофосфаміду у мишей лінії С57В1/6 з карциномною легені Льюїс. Встановлено, що запропонований режим хіміоімунотерапії має виражену антиметастатичну активність. У метастатичних клітинах тварин, що отримували хіміоімунотерапію, встановлено достовірне зменшення рівня експресії мРНК TGF- β , що може свідчити про зниження їх злоякісного потенціалу. Застосування комбінованої хіміоімунотерапії ініціює зміни в імунному стані пухлиноносіїв, а саме призводить до суттєвої активації цитотоксичної активності лімфоцитів селезінки, пригнічення експресії гену IL-10, викликає зсув Т-клітинної імунної відповіді у бік Th1-типу за рахунок зменшення рівня експресії гену IL-4. Одержані результати вказують на доцільність комбінування хіміо- та імунотерапевтичних методів при розробці більш ефективних підходів для профілактики розвитку метастазів та рецидивів у хворих на злоякісні новоутворення після основного лікування.

Ключові слова: вакцина на основі дендритних клітин, циклофосфамід, хіміоімунотерапевтичний режим, антиметастатична активність, карцинома Льюїс, миші, рівень експресії мРНК, цитотоксична активність.

Резюме

Храновская Н.Н., Скачкова О.В., Горбач А.И., Свергун Н.Н., Сидор Р.И., Ионкина Н.В. Химиоиммунотерапевтический режим с применением вакцины на основе дендритных клеток и низких доз циклофосфамида у мышей с карциномой легкого Льюис.

Исследована антиметастатическая и иммуномодулирующая активность химиоиммунотерапевтического режима с применением вакцины на основе дендритных клеток и низких доз циклофосфамида у мышей линии С57В1/6 с карциномой легкого Льюис. Установлено, что предложенный режим химиоиммунотерапии обладает выраженной антиметастатической активностью. В метастатических клетках животных, получавших химиоиммунотерапию, установлено достоверное уменьшение уровня экспрессии мРНК TGF- β , что может свидетельствовать о снижении их злокачественного потенциала. Применение комбинированной химиоиммунотерапии инициирует изменения в иммунном статусе опухоленосителей, а именно приводит к существенной активации цитотоксической активности лимфоцитов селезенки, угнетению экспрессии гена IL-10, вызывает смещение Т-клеточного иммунного ответа в сторону Th1-типа за счет уменьшения уровня экспрессии гена IL-4. Полученные результаты указывают на целесообразность комбинирования химио- и иммунотерапевтических методов при разработке более эффективных подходов для профилактики развития метастазов и рецидивов у больных злокачественными новообразованиями после основного лечения.

Ключевые слова: вакцина на основе дендритных клеток, циклофосфамид, химиоиммунотерапевтический режим, антиметастатическая активность, карцинома Льюис, мыши, уровень экспрессии мРНК, цитотоксическая активность.

Summary

Khranovska N.M., Skachkova O.V., Gorbach O.I., Svergun N.M., Sidor R.I., Ionkina N.V. Chemo - immunotherapy regimen using vaccine based on dendritic cells and low-dose cyclophosphamide in mice with Lewis lung carcinoma.

Antimetastatic and immunomodulating activity of chemo - immunotherapy regimen using vaccine based on dendritic cells and low-dose cyclo-

Екологічна і клінічна імунологія та імунореабілітація

phosphamide C57BL/6 with Lewis lung carcinoma have been investigated. It was revealed that the proposed chemo- immunotherapy regimen has a pronounced antimetastatic activity. The significant decrease in mRNA expression TGF- β in metastatic cells of the animals treated with chemo - immunotherapy which may indicate a decrease in their malignant potential have been found. Chemo - immunotherapy application initiates the changes in tumor-bearers immunity, namely significantly leads to activation of cytotoxic activity of spleen lymphocytes, inhibition of IL-10 gene expression, cause shift of T-cell immune response towards Th1-type due to reduction in IL-4 gene expression. The obtained results indicate the feasibility of combining chemo - and immunotherapeutic methods in developing a more effective approaches for the prevention of metastasis and recurrence in patients with malignant neoplasm after primary treatment.

Key words: vaccine based on dendritic cells, cyclophosphamide, chemo - immunotherapy regimen, antimetastatic activity, Lewis lung carcinoma, mice, mRNA expression level, cytotoxic activity.

Рецензент: д.мед.н., проф. М.О. Пересадин

УДК 616.36-002.35.14:578.16.32

**ВПЛИВ СУЧАСНОГО КРЕМНЕЗЬОМНОГО
ЕНТЕРОСОРБЕНТУ «БІЛЕ ВУГІЛЛЯ» НА РІВЕНЬ
ЦИРКУЛЮЮЧИХ ІМУННИХ КОМПЛЕКСІВ ТА ЇХ
ФРАКЦІЙНИЙ СКЛАД У ХВОРИХ
НА ХРОНІЧНИЙ ТОКСИЧНИЙ ГЕПАТИТ,
СПОЛУЧЕНИЙ З ХРОНІЧНИМ НЕКАЛЬКУЛЬОЗНИМ
ХОЛЕЦИСТИТОМ ТА ОЖИРІННЯМ**

І.О. Шаповалова

ДЗ «Луганський державний медичний університет»

Вступ

Згідно статистичних даних, що стосуються огляду поширеності внутрішніх хвороб, відомо, що як в Україні, так і у світі в цілому спостерігається підвищення захворюваності на хронічний токсичний гепатит (ХТГ), в тому числі медикаментозного генеза [2, 9, 19, 21]. За результатами сучасних наукових досліджень встановлено, що виникнення ХТГ у теперішній час обумовлено не тільки гепатотоксичним впливом токсичних агентів в умовах виробництва, але й також поширеним застосуванням консервантів та барвників синтетичного походження у харчовій промисловості, частим вживанням лікарських засобів, які метаболізуються у печінці [8, 20]. За останні десятиріччя серед захворювань внутрішніх органів гастроентерологічного профілю також суттєво підвищилася питома вага хронічної патології жовчного міхура (ЖМ), частіше у вигляді хронічного некалькульозного холецистити (ХНХ) [2, 12, 13]. Відомо, що в Україні ХНХ є найбільш розповсюдженою хворобою не лише гепатобіліарної системи (ГБС), але й також системи органів травлення у цілому [17].

Перебіг хронічної патології ГБС, у тому числі ХНХ досить часто супроводжуються абдомінальним ожирінням (Ож) [7, 10, 17]. Відомо, що ожиріння внаслідок розвитку інсулінорезистентності негативно впливає на перебіг інших хвороб, зокрема ХНХ, та сприяє порушенням цукрового обміну [14, 18, 20].

Нами протягом певного часу проводяться дослідження в напрямку з'ясування основних патогенетичних ланок ХТГ, поєднаного з ХНХ та Ож, та розробляються раціональні підходи щодо удо-

Екологічна і клінічна імунологія та імуореабілітація