

Корисна модель відноситься до галузі експериментальної медицини і може використовуватися в онкологічній практиці з метою профілактики розвитку рецидивів та метастазів після основного лікування хворих на злоякісні новоутворення.

Одним з основних методів лікування злоякісних пухлин є хірургічне втручання (1). Але при використанні тільки цього методу часто неможливо досягти повного виліковування хворих, оскільки воно не завжди забезпечує попередження метастазування або розвитку рецидивів злоякісного новоутворення. Застосування хіміотерапевтичного лікування, різних видів опромінення в цілях профілактики подальшого розвитку процесу теж не у всіх випадках ефективне (2). Останнім часом перспективним методом лікування хворих на злоякісні новоутворення вважається протипухлинна вакцинотерапія. Вакцинація має за мету включити механізм імунної системи - Т-лімфоцити, здатні до цитотоксичної дії по відношенню до пухлинних клітин-мішеней (3).

Перші протипухлинні вакцини були створені на принципах класичної інфекційної імунології та базувалися на використанні опромінених, або девіталізованих іншими шляхами пухлинних клітин (4). Однак, введення сингенних пухлинних клітин тваринам - пухлиноносіям з метою індукції специфічної протипухлинної реакції не завжди супроводжується гальмуванням пухлинного росту, а в ряді випадків може його стимулювати. По-перше, даний факт може бути обумовлений низькою імуногенністю пухлинних антигенів та порушенням механізму їх презентації. По-друге, пухлина здатна викликати місцеву або системну імуносупресію зі зниженням активності лімфоцитів (5). В зв'язку з цим, використання ад'ювантів для модуляції та посилення імунної відповіді вважається необхідним.

В якості «природних» ад'ювантів для створення протипухлинних вакцин нового покоління використовують антигенпрезентуючі клітини (АПК) - дендритні клітини (ДК), отримання яких стало можливим завдяки розвитку методів генної інженерії та біотехнології. Вважається, що ці клітини мають універсальну здатність перетворювати антиген в суперантиген, надаючи пухлинним антигенам імуногенну форму, презентувати його Т-лімфоцитам і, таким чином, найбільш активно індукувати розвиток специфічної протипухлинної імунної відповіді (6). Вже отримані експериментальні докази того, що більш ефективний протективний протипухлинний імунітет виникає після вакцинації ДК, навантаженими пухлинним антигеном, у зрівнянні з вакцинацією деактивованими пухлинними клітинами (7).

Найближчим аналогом даної заявки є робота, в якій автори пропонують спосіб протипухлинної вакцинотерапії шляхом застосування механохімічно модифікованих ліофілізованих сингенних пухлинних клітин (ЛСПК) для інгібування пухлинного процесу та процесу метастазування у тварин з перещепленою пухлиною [Влияние механохимически модифицированных сингенных опухолевых клеток на рост и процессы метастазирования карциномы Льюис и меланомы В 16/ В. Э. Орел, Ю. А. Гриневич, М. И. Данко и соавт. // Доповіді Національної академії наук України. -1998. -№10. С.183-188]. ЛСПК механомодифікували шляхом їх обробки на мікрівібромліні, в результаті чого досягалася дезінтеграція морфологічної структури нежиттєздатних ЛСПК, модуляція їх антигенної структури, та вироблення факторів, що активують або інгібують пухлинний ріст та процеси метастазування.

Позитивними характеристиками найближчого аналога є:

- використання в якості засобу протипухлинної імунотерапії механомодифікованих ЛСПК, антигени яких є більш імуногенні;

- експериментальна перевірка протипухлинних властивостей на декількох моделях пухлинного процесу;

- розкриття деяких властивостей одержаних механомодифікованих ЛСПК, зокрема, морфологічних, та імуномодуючих.

До недоліків найближчого аналога можна віднести:

- використання ЛСПК у тварин із первинною пухлиною;

- відсутність дослідження впливу ЛСПК на стан тих ланок імунної системи, які безпосередньо приймають участь у реалізації протипухлинного ефекту;

- відсутність використання ад'юванту;

- невисокий протипухлинний та аниметастатичний ефект.

В основу корисної моделі поставлена задача створити спосіб протипухлинної імунотерапії дендритними клітинами шляхом застосування ДК, навантажених механомодифікованими ЛСПК в якості пухлинного антигену (ПА), що дозволить стимулювати протипухлинну резистентність організму та гальмувати розвиток рецидивів та метастазів.

Поставлена задача вирішується наступним чином.

Реалізація заявленого способу передбачає виконання 2-х підготовчих етапів.

I. ДК отримують з селезінки інтактних мишей лінії С57BL/6 з дотриманням правил асептики (9). Для чого тканину селезінки подрібнюють в середовищі RPMI 1640 та фільтрують крізь нейлоновий фільтр для отримання однорідної клітинної суспензії. Клітини в концентрації 5×10^6 /мл інкубують при 37°C та 5% CO₂ протягом 24 годин в повному середовищі RPMI-1640 з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки, 200ммоль/л глютаміну, 100од/мл пеніциліну, 100мкг/мл стрептоміцину та 25мМоль 5-меркаптоетанолу. Клітини, які не прикріпилися до пластику, концентрують та центрифугують 15хв. при 1000об/хв. в градієнті щільності 14,5%-го метризаміду. Більш ніж 80% інтерфазних клітин за морфологічними ознаками відносяться до ДК.

II. ЛСПК та механомодифіковані ЛСПК отримують за допомогою наступної біоінженерної технології.

Первинну пухлину у тварин з карциномою Льюїс (КЛ) видаляють з дотриманням правил асептики на 14-15 добу після її перещеплення. Отримують зависть пухлинних клітин шляхом механічної дезінтеграції пухлини та м'якого продушування крізь капронове сито в середовищі 199. Отриману зависть відмивають в середовищі 199 шляхом 2-х разового центрифугування при 1500об/хв. протягом 10хв. Пухлинні клітини заморожують до мінус 20°C в чашках Петрі. Товщина шару в чашках Петрі не перевищує 5-8мм. Заморожені пухлинні клітини піддають вакуумній сублімаційній сушці протягом 24 годин в камері ліофілізатора. Максимальне розрідження під час ліофілізації становить 0,66ПА. Частину отриманих ЛСПК ресуспендують в фізіологічному розчині і використовують в якості ПА для навантаження ДК (в концентрації 0,5мг/мл культурального середовища). Іншу частину ЛСПК піддають механомодифікації на мікрівібромліні MMVE-0,005 (Гефест, Росія). Для цього ЛСПК

масою 10мг поміщають в камеру з шарами, що мелють. Тривалість обробки складає 5 хвилин, інтенсивність підводу механічної енергії - 20Вт/г. Механомодифіковані ЛСПК ресуспендують в фізіологічному розчині і використовують в такому ж режимі, що і звичайні ЛСПК.

Наступний етап - безпосереднє виконання заявленого способу.

До частини отриманих ДК (концентрація клітин 1×10^6 /мл в повному поживному середовищі RPMI-1640) додають ЛСПК чи механомодифіковані ЛСПК в зазначеній вище концентрації. Час інкубації ДК при 37°C в атмосфері 5%-го CO₂ з будь-яким ПА становить 4 години. Частину ДК інкубують з дотриманням таких же умов, але без додавання ПА в середовище культивування.

Після цього ДК відмивають в розчині Рінгера шляхом центрифугування протягом 7хв. при 1000об/хв. Отримані ДК ресуспендують в розчині Рінгера і використовують в якості протипухлинних вакцин в наступному режимі.

Завись клітин КЛ ($2,5 \times 10^5$ /мишу) в об'ємі 0,05мл вводиться під шкіру подушечки стопи задньої кінцівки мишам лінії C57BL/6. На 28 добу після перещеплення пухлинних клітин проводиться ампутація кінцівки з пухлиною на рівні колінного сугаву під ефірним наркозом.

Мишам з КЛ через добу після видалення первинної пухлини внутрішньовенне (в/в) вводять ДК у кількості 2×10^5 /мишу в об'ємі 0,2мл. Всього 3 ін'єкції з інтервалом 3 доби.

Тварини розподіляють на наступні групи:

- 1 група: контроль КЛ
- 2 група: КЛ+ДК, ненавантажені ПА,
- 3 група: КЛ+ДК, навантажені ЛСПК,
- 4 група: КЛ+ДК, навантажені механомодифікованими ЛСПК.
- Група інтактних тварин

Тварин декапітують під ефірним наркозом через 3 тижні після операції (на 51 добу після початку експерименту), забирають легені та селезінку для досліджень.

Вплив ДК на ріст і метастазування КЛ оцінюють по частоті метастазування. При цьому, підраховують число та об'єм метастазів в легенях мишей. Об'єм метастатичної колонії розраховують за формулою:

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

де 0,52 - коефіцієнт,
V-об'єм,
D - діаметр (мм).

Розраховують також індекс гальмування метастазування (ІГМ) з використанням загальноприйнятого метода за формулою:

$$ІГМ = \frac{[K - D]}{K} \times 100\%,$$

де K - та D - середній об'єм метастазів на мишу в контрольній та дослідній групі.

Функціональну активність спленоцитів мишей оцінюють з використанням протокової цитометрії (10). В якості барвника для клітин-мішеней використовують флуоресцентний барвник 5-,6-карбоксифлуоресцеїндиацетатсукцинілмідил (КФДА), який утворює міцний ковалентний зв'язок з внутрішньоклітинними білками і у використаній нами концентрації (0,125мкг/мл) не впливає на життєздатність клітин. В якості клітин-мішеней використовують перещеплювану лінію клітин мишачої лімфоми ОН-1, одержану в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України з трансплантованих лімфом, індукованих Вас. Megaterium H. у мишей лінії А.

Пофарбовані таким чином клітини-мішені змішують з клітинами - ефекторами у співвідношенні 1:50 та інкубують протягом 18год. Після чого зразки фарбуються йодистим пропідієм (PI) (2,5мкг/мл) для визначення кількості вбитих в ході реакції клітин-мішеней.

Протоковометричні аналізи проводять на приладі FACScan ("Becton Dickinson", США), що обладнаний аргонним лазером з довжиною хвилі 488нм, з використанням програми CellQuest для комп'ютерів Macintosh для отримання і аналізу даних. Для виміру флуоресценції PI використовують вузькополосний фільтр 585/42нм, флуоресценції КФДА - 642/75нм.

Результати експериментів обробляють статистичне з використанням t-критерію Стюдента. Вірогідними вважають значення при рівнях $p < 0,05$.

Дані впливу ДК, не навантажених та навантажених ЛСПК або механомодифікованими ЛСПК, на процеси метастазування КЛ у прооперованих мишей лінії C57BL/6 подані в таблиці 1.

Таблиця 1

Вплив ДК на процес метастазування КЛ
у мишей лінії C57BL/6 після видалення первинної пухлини

Група тварин	Кількість метастазів	Об'єм метастазів мм ³	ІГМ %
1. Контроль КЛ	20,65±2,18	638,85±60,27	
2.ДК	13,00±2,05 ^x	419,96±160,56	34
3. ДК ЛСПК	13,86±2,66 ^x	372,77±88,75 ^x	42
4. ДК механомодифіковані ЛСПК	9,50±2,74 ^x	219,44±47,92 ^x	66

Примітка.

^x - вірогідна відмінність від показників в групі контроль КЛ, $p < 0,05$.

Результати досліджень свідчать, що ДК суттєво гальмують процес метастазування КЛ в легені у мишей лінії С57В1/6. При в/в способі введення ДК, навантажених ЛСПК, ІГМ склав 42%, ненавантажених - 34%. Механомодифікація ЛСПК дозволяє посилити антиметастатичні властивості ДК: кількість та об'єм метастатичних колоній зменшуються в 1,5 та 1,7 рази порівняно із показниками у тварин, які отримували ДК, навантажені звичайними ЛСПК. ІГМ при цьому збільшується до 66%.

Дані впливу ДК на цитотоксичну активність спленоцитів мишей С57В1/6 з КЛ представлені в таблиці 2.

Встановлено, що у тварин під впливом КЛ значно знижується функціональна активність клітин, які являють собою основу природньої протипухлинної резистентності організму.

Таблиця 2

Вплив ДК на цитотоксичну активність спленоцитів мишей лінії С57В1/6 з КЛ

Група тварин	Цитотоксична активність спленоцитів, %
Інтактні тварини	25,20±1,15
1. Контроль КЛ	15,62±4,09 ⁰
2. ДК	26,67±7,17
3. ДК ЛСПК	32,00±3,65 ^x
4. ДК механомодифіковані ЛСПК	34,17±2,42 ^{0x}

Примітки:

- 1.⁰ - вірогідна відмінність від показників в групі інтактних тварин, $p < 0,05$;
- 2.^x - вірогідна відмінність від показників в групі контроль КЛ, $p < 0,05$.

Так, цитотоксична активність клітин селезінки у них знижувалася до (15,62±4,09)% з (25,20±1,15)% у інтактних тварин, $p < 0,05$.

Введення ДК прооперованим тваринам сприяє суттєвому підвищенню цитотоксичної активності спленоцитів, що асоціюється з антиметастатичним ефектом. В групі тварин, яким вводили ДК, навантажені механомодифікованими ЛСПК, значення цитотоксичності спленоцитів, як і пригнічення метастатичного ураження легенів, було максимальним.

Таким чином, механізмом антиметастатичної дії ДК, навантажених ПА, є активація цитотоксичної функції природних та Т-кілерних клітин.

ДК, навантажені механомодифікованими ЛСПК, мають суттєво виражений антиметастатичний та імуномодулюючий ефект при введенні в/в. Тому, запропонований спосіб імунотерапії ДК є більш ефективним, ніж існуючі. До того ж даний спосіб дозволяє уникнути застосування витратних методів, що використовуються для підвищення імуногенності ПА при навантаженні ДК.

Джерела інформації:

1. Справочник по онкологии / Под ред. С. А. Шалимова, Ю. А. Гриневича, Д. В. Мясоедова.- К.: Здоров'я, 2000. - 559с.
2. Гриневич Ю. А. Основные принципы использования иммунотерапии при лечении больных со злокачественными новообразованиями. // Онкология. - 2001.-Т.3, №2-3. - С.216-219.
3. Rosenberg Steven A. A new era of cancer immunotherapy: Converting theory to performance // CA: Cancer J.Clin. - 1999. - 49. N2. - P.70-73.
4. Гриневич Ю. А., Храновская Н. Н. Дендритные клетки и перспективы их использования в иммунотерапии больных со злокачественными новообразованиями (обзор литературы) // Журнал АМН Украины. - 2003. - Т.9, №4. - С.736-753.
5. Балдуева И.А. Противоопухолевые вакцины // Практ. онкол. - 2003.- Т.4. - №3. - С.157-166.
6. Whiteside T. L. and Odoux C. Dendritic cell biology and cancer therapy // Cancer Immunology. - Volume 53. - Number 3. - 2004. - P.240-248.
7. Experimental study of induced in vivo anticancer immune responses by vaccination of tumor with dendritic cells using pulse lysate / Yang Hongyan, Zhang Yiguo, Dong Ziming et. al. // J. Henan. Med. Univ. - 1999. - 34, N1. - P.23-26.
8. Влияние механохимически модифицированных сингенных опухолевых клеток на рост и процессы метастазирования карциномы Льюис и меланомы В 16./ В. Э. Орел, Ю. А. Гриневич, М. И. Данко и др. // Доповіді Національної академії наук України. - 1998. - №10. - С.183-188 (найближчий аналог).
9. The Surface Phenotype of dendritic cells Purified from mouse thymus and Spleen: Investigation of the CD8 Expression by a Subpopulation of Dendritic cells. / Vremec D., Zobras M., Scollay R. et. al. // J.Exp.Med. - 1992. - V.176. - P.47-58.
10. Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека. Методические рекомендации. - М. - 2001. - 53с.