

О.Б. Белова
Ю.Д. Винничук
Е.А. Кирнасовская
Д.Ф. Руденко
И.Г. Савинская
В.А. Шляховенко
Н.М. Бережная

Институт экспериментальной
патологии, онкологии
и радиобиологии
им. Р.Е. Кавецкого
НАН Украины, Киев Украина

Ключевые слова:
противоопухолевые вакцины,
лимфокинактивированные
клетки, перевивная
МХ-рабдомиосаркома,
резистентность.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время активно разрабатываются и применяются при злокачественных опухолях различные методы иммунотерапии (ИТ). В зависимости от механизмов действия ИТ подразделяют на неспецифическую с применением лимфокинактивированных киллерных клеток (ЛАК), цитокинов, белков теплового шока и т.д.; специфическую, при которой используют, в основном, различные противоопухолевые вакцины (ПВ), содержащие опухолюассоциированные антигены. Адоптивная ЛАК-терапия — введение в организм больного аутологичных активированных *in vitro* ЛАК; их механизм действия обусловлен прямой цитотоксичностью для опухолевых клеток (ОК), синтезом и выделением биологически активных веществ, в частности цитокинов [1–3]. Основной механизм действия ПВ — индукция и поддержание специфического иммунного ответа [4, 5].

Очень часто основной причиной терапевтических неудач в лечении больных раком является формирование резистентности опухолей к различным химиопрепаратам (ХП). Ранее было проведено изучение чувствительности таких опухолей к действию различных видов ИТ. В частности, при изучении эффективности ЛАК-терапии с учетом чувствительности опухолей к ХП установлено, что резистентные опухоли проявляют повышенную чувствительность к действию ЛАК как *in vitro*, так и *in vivo* [6, 7]. В последующем была изучена и эффективность *in vivo* вакцинотерапии, ЛАК-терапии, а также их сочетания. Были сделаны следующие выводы: эффективность всех видов ИТ более выражена по отношению к химиорезистентным опухолям;

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИММУНОТЕРАПИИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОПУХОЛИ К ДОКСОРУБИЦИНУ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Резюме. Проанализированы результаты изучения эффективности различных видов иммунотерапии мышей с резистентной и чувствительной к доксорубицину перевивной МХ-рабдомиосаркомой. В исследованиях были использованы 2 аутовакцины, полученные при помощи разных биотехнологий, и адоптивная иммунотерапия с помощью лимфокинактивированных киллерных клеток (ЛАК). Показано, что все виды иммунотерапии были более эффективны по отношению к доксорубицинрезистентной опухоли; более выражена эффективность ЛАК-терапии. Сравнительная оценка эффективности аутовакцин показала преимущество неиммобилизованной вакцины.

при ИТ мышей с чувствительными опухолями более эффективной оказалась ПВ; мышей с резистентными опухолями — ЛАК-терапия [8].

Для повышения эффективности гликопептидной ПВ, которая использовалась нами ранее, была осуществлена ее иммобилизация на поверхности микрочастиц двуокиси кремния. Этот носитель выбран в связи с известными данными, что двуокись кремния, особенно в мелкодисперсном состоянии, является активатором системы иммунитета и может быть использована в качестве адьюванта [9–11]. В результате были получены 2 гликопептидные вакцины, обладающие различными механизмами противоопухолевого действия, что обусловлено их различной структурой.

Цель настоящего исследования — сравнительное изучение эффективности ЛАК- и вакцинотерапии (ВТ) с использованием 2 вакцин, полученных при помощи различных биотехнологий (неиммобилизованной и иммобилизованной), по отношению к животным с чувствительной и резистентной к доксорубицину МХ-рабдомиосаркомой, что в дальнейшем может быть использовано для обоснования выбора метода ИТ в зависимости от чувствительности опухолей к ХП в клинической практике.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на мышях линии BALB/c массой 15–20 г разводки экспериментальной базы Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины. В качестве модели опухолевого роста использовали полученный нами штамм клеток перевивной МХ-рабдомиосаркомы, резистентной

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

к доксорубину и клетки МХ-рабдомиосаркомы, чувствительной к доксорубину.

ЛАК получали путем инкубации лимфоцитов лимфатических узлов мышей с опухолью с рекомбинантным интерлейкином (ИЛ)-2 (3 млн клеток и 1000 МЕ РИЛ-2) на протяжении 2 ч при 37 °С. Лимфоциты получали от сингенных мышей с опухолями на 7–11-е сутки после перевивки с учетом уровня экспрессии рецептора к ИЛ-2 (CD25), который определяли методом непрямой иммунофлуоресценции. ЛАК-терапию проводили, начиная с 7-х суток после перевивки ОК (на этапе появления опухолевого узла), в течение 5 дней; ЛАК вводили в область опухоли в количестве 3 млн в 0,2 мл культуральной среды [7].

ПВ получены из гомогената ОК. Первая — методом контролируемого ферментного гидролиза, в результате чего образовывались короткие олигопептиды; на этапе очистки выделяли фрагменты, обогащенные углеводными остатками, с молекулярной массой 50 кДа. При создании второй вакцины использовались те же аутологичные гликопептиды, которые были иммобилизованы на поверхности микрочастиц (10–15 мк) двуокиси кремния в весовом соотношении 1 : 1. Иммуногенность ПВ определяли в относительных единицах, эквивалентных количеству ОК. Технология изготовления гликопептидной вакцины запатентована в Украине, получено разрешение на ее испытание [10, 11]. Ранее эффективность действия этой вакцины была изучена в условиях опухолевого роста на других моделях [8, 9]. ПВ вводили мышам интраперитонеально в объеме 0,2 мл после перевивки опухоли (7-е сутки) трехкратно с интервалом 5 сут.

Животные с резистентными и чувствительными опухолями были распределены на группы (до 20 в каждой) в зависимости от вида ИТ: 1-я — адоптивная ЛАК-терапия; 2-я — ВТ-1 с применением неиммобилизованной ПВ; 3-я — ВТ-2 с применением иммобилизованной на двуокиси кремния ПВ; 4-я — животные, которые не получали какой-либо терапии (контроль). Все эксперименты были проведены в соответствии с принятыми в Украине нормами биоэтики работы с животными.

Эффективность перечисленных видов ИТ оценивали по проценту торможения роста опухоли и выживаемости животных. Статистическую обработку полученных результатов исследования проводили согласно общепринятым методам с использованием программы Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительная оценка полученных результатов позволила установить следующее. Выживаемость мышей с чувствительной к доксорубину опухолью в условиях как ЛАК-терапии, так и терапии ПВ практически не отличалась от контроля: 80–85% животных в группах погибало в период с 30-х по 40-е сутки после перевивки опухоли и только в единичных случаях (терапия ПВ), продолжительность жизни достигала 55–65 сут (рис. 1).

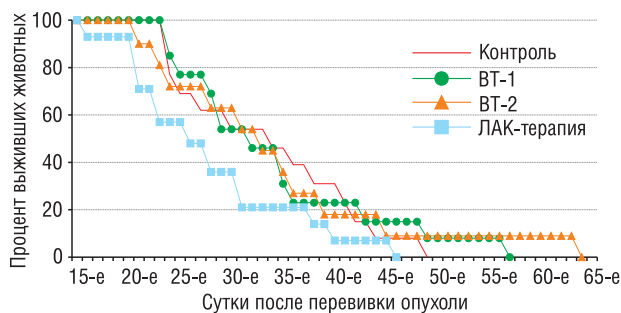


Рис. 1. Выживаемость мышей с чувствительной к доксорубину МХ-рабдомиосаркомой под влиянием различных видов ИТ

В процессе роста доксорубинчувствительных опухолей его торможения наблюдали с 7-х по 21-е сутки после перевивки опухоли. Исследования показали явное преимущество неиммобилизованной ПВ; эффективность иммобилизованной ПВ оказалась достоверно ниже (рис. 2).

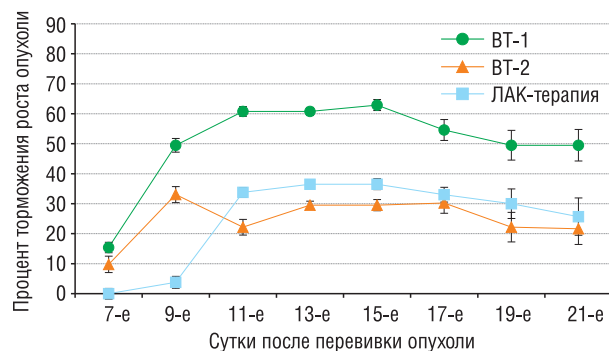


Рис. 2. Динамика роста опухоли у мышей с чувствительной к доксорубину МХ-рабдомиосаркомой под влиянием различных видов ИТ

Начиная с 9-х суток после перевивки различие в торможении роста опухоли между группами животных, которым проводили терапию указанными ПВ, составляло 17%, в дальнейшем достигало 35% (11-е сутки) и сохранялось на уровне 30–25% до окончания наблюдений. Сравнивая эти данные с эффективностью ЛАК-терапии, можно также отметить выраженное преимущество терапии неиммобилизованной ПВ.

Несколько иная картина наблюдалась при проведении указанных видов ИТ при резистентных к доксорубину опухолях. Эффективность адоптивной ЛАК-терапии при доксорубинрезистентных опухолях была значительно выше по сравнению с эффективностью обеих ПВ, что иллюстрируют показатели как торможения роста опухоли, так и выживаемости животных (рис. 3, 4). Анализируя выживаемость мышей с резистентными опухолями, получавших различную ИТ, следует отметить, что наиболее высокую эффективность наблюдали в группе животных после проведения ЛАК-терапии. Кривая выживаемости мышей, вакцинированных иммобилизованной ПВ, практически не отличается от контроля; применение неиммобилизованной ПВ несколько повышает ее (см. рис. 3).

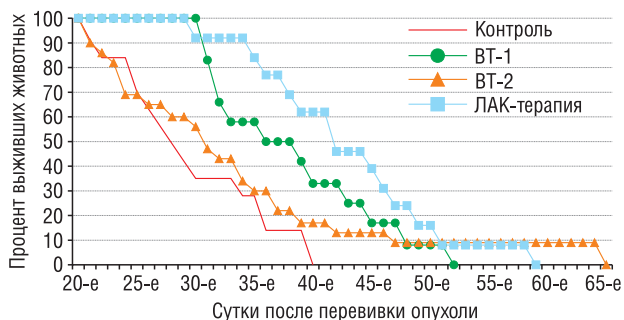


Рис. 3. Выживаемость мышей с резистентной к доксорубину МХ-рабдомиосаркомой под влиянием различных видов ИТ

Еще более демонстративными оказались данные по торможению роста опухоли (см. рис. 4). Различия в этом показателе между группами животных, которым применялись указанные ПВ, достигали 45% (17-е сутки после перевивки) и не опускались ниже 20% до конца наблюдений. Наряду с этим эффективность ЛАК-терапии оказалась достоверно выше по сравнению с обеими видами ВТ и была особенно выражена к концу срока наблюдения (см. рис. 4).

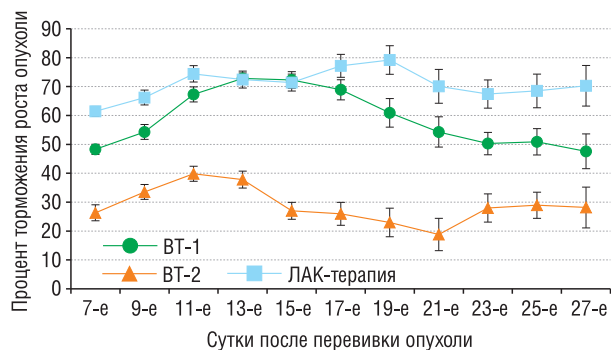


Рис. 4. Динамика роста опухоли у мышей с резистентной к доксорубину МХ-рабдомиосаркомой под влиянием различных видов ИТ

Таким образом, наши исследования еще раз показали явные преимущества применения адоптивной ЛАК-терапии по отношению к химиорезистентным опухолям; параллельное исследование эффективности двух ПВ по отношению к резистентным и чувствительным к доксорубину опухолям свидетельствует о преимуществе неиммобилизованной ПВ.

При анализе представленных результатов возникают определенные сложности прежде всего потому, что сегодня в литературе практически отсутствуют работы по сравнительному изучению разных видов ИТ по отношению к химиорезистентным опухолям. Кроме того, не в полной мере выяснены механизмы формирования резистентности. Современные представления об этом процессе позволяют выделить два основных механизма: повышенная экспрессия белков, которые, выполняя роль насоса, активно выводят цитостатики из клетки (Pgp, MRP, LRP, глутатионтрансфераза и др.); блокирование апоптоза при мутациях *p53*, гиперэкспрессии антиапоптотических молекул, снижении экспрессии рецепторов, включающих апоптоз и др. [12–15]. Резистентность может развиваться как по первому, так и второму пути,

а также при включении обоих механизмов, что зависит от многих факторов, в частности гистогенеза и локализации опухоли, фенотипа ОК, механизма действия цитостатиков и др. На фоне сложностей, связанных с изучением формирования резистентности, существует также недостаток информации о повышенной чувствительности резистентных опухолей к действию ИТ. Некоторые авторы объясняют выраженное противоопухолевое действие адоптивной ЛАК-терапии повышением экспрессии молекул адгезии, например ICAM-1, усилением продукции цитокинов этими клетками и др. [16–18].

В работах, опубликованных нами ранее, были представлены данные о разработке условий повышения противоопухолевого действия ЛАК в отношении клеток резистентных и чувствительных опухолей. Из этих данных следовало, что условия оптимизации действия ЛАК в отношении чувствительных и резистентных опухолей различаются [8]. Рассматривая неоднозначность эффективности иммобилизованной и неиммобилизованной ПВ, следует иметь в виду, что они индуцируют иммунологический ответ с помощью различных механизмов: распознавание антигенов неиммобилизованной ПВ происходит с участием антигенов II класса ГКГС при обязательном процессинге антигена антигенпредставляющими клетками, в то время как иммобилизованной — с участием антигенов I класса ГКГС и распознаванием цитотоксическими Т-лимфоцитами [19, 20]. Обобщая результаты предыдущих и представленных в настоящей работе исследований можно сделать заключение, что ЛАК, с учетом возможности оптимизации их действия, при соблюдении необходимых требований, могут быть использованы для адоптивной ИТ химиорезистентных опухолей.

ВЫВОДЫ

Адоптивная ЛАК-терапия и терапия ПВ, полученными с помощью разных биотехнологий, более эффективны по отношению к доксорубин-резистентным опухолям, в сравнении с чувствительными.

Наибольшей эффективностью (сравнительная оценка) при применении по отношению к доксорубин-резистентным опухолям отличается ЛАК-терапия; в отличие от этого терапия доксорубин-чувствительных опухолей наиболее эффективна при применении неиммобилизованной ПВ.

Работа выполнена при поддержке программы Национальной Академии Наук Украины «Особенности функционирования онкогена» (грант № 0102U003228).

ЛИТЕРАТУРА

1. Бережная НМ, Ковальчук ЕВ. ЛАК-феномен (фенотип клеток, механизм действия и условия его реализации). Иммунология 1995; 2: 12–6.
2. Kiselevskii MV. Adoptive immunotherapy in malignant tumors. Vestn Ross Akad Med Nauk 2003; 1: 40–4.

3. **Dudley ME, Rosenberg SA.** Adoptive cell transfer therapy. *Semin oncol* 2007; **34**: 524–31.
4. **Балдуева ИА.** Противоопухолевые вакцины. *Практическая онкология* 2004; **4**: 157–66.
5. **Parmiani G, Castelli C, Dalerba P, et al.** Cancer immunotherapy with peptide-based vaccines: What have we achieved? Where are we going? *J Nat Cancer Inst* 2002; **94**: 805–18.
6. **Berezhnaya NM, Kovalchuk EV, Vinnichuk YD, et al.** Experimental immunotherapy of mice with transplanted MC-rhabdomyosarcoma resistant to doxorubicin. *Exp Oncol* 2004; **26**: 63–7.
7. **Berezhnaya NM, Vinnichuk UD, Konovalenko VD, et al.** The sensitivity of chemoresistant human tumor explants to lysis by activated and nonactivated autologous lymphocytes: a pilot study. *Exp Oncol* 2005; **27**: 303–7.
8. **Berezhnaya NM, Vinnichuk YuD, Belova OB.** The use of doxorubicin at low doses for elevation of LAK-activity toward explants and cells of MC-rhabdomyosarcoma and B16 melanoma resistant to doxorubicin. *Exp Oncol* 2008; **30**: 52–5.
9. **Шляховенко ВО, Мосієнко ВС, Казак ВВ та ін.** Протипухлинна аутовакцина на основі глікопептидів пухлинних клітин. *Онкологія* 2004; **6** (3): 180–4.
10. **Шляховенко ВО, Потебня ГП, Мосієнко ВС та ін.** Спосіб одержання протипухлинної аутовакцини. Патент на винахід № 57608 Україна. Опубл 16.03.2003.
11. **Шляховенко ВО, Тацієв РК, Ашраф Авад Ель Карім та ін.** Спосіб одержання протипухлинної аутовакцини. Декларативний патент на винахід. 70240А 15.09.2004.
12. **Ставровская АА.** Клеточные механизмы множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток. *Биохимия* 2000; **65**: 112–6.
13. **Chen Y, Simon SM.** *In situ* biochemical demonstration that P-glycoprotein is a drug efflux pump with broad specificity. *J Cell Biol* 2000; **148**: 863–70.
14. **Sarkadi B, Homolya L, Szakacs G, et al.** Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnate defense system. *Physiol Rev* 2006; **86**: 1179–236.
15. **Jasinski M, Figlerowicz M.** Plant ABC transporters — the family with tradition. *Postepy Biochem* 2006; **52**: 296–302.
16. **Liebau C, Merk H, Schmidt S, et al.** Interleukin-12 and interleukin-18 change ICAM-1 expression, and enhance natural killer cell mediated cytolysis of human osteosarcoma cells. *Cytokines Cell Mol Ther* 2002; **7**: 135–42.
17. **Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, et al.** Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2008; **8**: 299–308.

18. **Rosenberg SA.** Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 2001; **411**: 380–4.

19. **Pernis B.** Silica and the immune system. *Acta Biomed Ateneo Parmense* 2005; **76**: 38–44.

20. **Masse D, Josien R, Mefflah K.** Increased vaccination efficiency with apoptotic cells by Silica-induced dendritic-like cells. *Cancer Res* 2002; **62**: 1050–6.

EFFICACY OF IMMUNOTHERAPY DEPENDING ON THE TUMOR'S SUSCEPTIBILITY TO DOXORUBICIN (EXPERIMENTAL STUDY)

O.B. Belova, Y.D. Vinnichuk, E.A. Kirnasovskaya, D.F. Rudenko, I.G. Savinskaya, V.A. Shlyakhovenko, N.M. Berezhnaya

Summary. *The paper presents findings of the study of the efficacy of various types of immunotherapy in mice with inoculated doxorubicin-resistant and doxorubicin-susceptible MC-rhabdomyosarcoma. Two autovaccines were used which were obtained with the help of different biotechnologies and adoptive immunotherapy utilizing LAK cells. It is shown that all types of immunotherapy were more efficient with respect to doxorubicin resistant tumor; efficacy of LAK therapy is more pronounced. Comparative assessment of the efficacy of autovaccines showed that non-immobilized vaccine is more preferable.*

Key Words: anti-tumor vaccines, lymphokine activated killer cells, inoculated MC-rhabdomyosarcoma, drugresistance.

Адрес для переписки:

Бережная Н.М.
03022, Киев, ул. Васильковская, 45
Институт экспериментальной патологии,
онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого
НАН Украины
E-mail: berezh@onconet.kiev.ua