

О.М. Караман
 Н.І. Федосова
 І.М. Восійкова
 Г.В. Діденко
 В.В. Сарнацька
 Л.О. Юшко
 О.М. Пясковська
 Г.П. Потебня
 В.Г. Ніколаєв
 Г.І. Соляник

Інститут експериментальної
 патології, онкології
 і радіобіології
 ім. Р.Є. Кавецького
 НАН України, Київ, Україна

Ключові слова:

паранеопластичний синдром,
 пухлиноасоційована анемія,
 карцинома легені Льюїс LLC/
 R9, протипухлинні вакцини,
 ефективність, протипухлинна
 резистентність.

ПРОЯВИ ПУХЛИНО- АСОЦІЙОВАНОЇ АНЕМІЇ У МИШЕЙ З КАРЦИНОМОЮ ЛЕГЕНІ ЛЬЮЇС НА ФОНІ ЗАСТОСУВАННЯ ПРОТИПУХЛИННИХ ВАКЦИН

Вивчення механізмів формування паранеопластичного синдрому (ПнС) та пошук підходів до його корекції залишаються актуальними. **Мета роботи:** дослідити можливість корекції деяких проявів ПнС, зумовлених ростом високоангіогенної карциноми легені Льюїс, за допомогою протипухлинних вакцин (ПВ) на основі антигенів високо- (LLC/R9) або низькоангіогенного (LLC) штампів карциноми легені Льюїс, а також оцінити протипухлинні та імунологічні ефекти ПВ. **Об'єкт і методи:** дослідження проведено на мишах-самцях лінії C₅₇Bl/6 із перещепленою карциномою LLC/R9. ПВ виготовляли з клітин LLC (ПВ-LLC) або з LLC/R9 (ПВ-LLC/R9); як ад'ювант використовували білоквмісний метаболіт *B. subtilis* B-7025 70 кДа. Введення ПВ (4-разово підшкірно) розпочинали на 12-ту добу пухлинного росту. Оцінювали стандартні параметри пухлинного росту; на 33-тю добу визначали рівень метастатичного ураження легень та проводили імунологічне обстеження тварин (масові та клітинні параметри тимуса і селезінки, показники периферичної крові (за допомогою гематологічного аналізатора), цитотоксичну активність (ЦТА) в МТТ-тесті клітинних і гуморальних чинників неспецифічного та специфічного протипухлинного захисту). **Результати:** застосування обох ПВ підвищувало виживаність мишей з LLC/R9: на 30-ту добу пухлинного росту у групах вакцинованих тварин цей показник становив 100,0% проти 71,4% у контрольній. Достовірне зменшення кількості та об'єму метастазів (відповідно в 1,7 та 1,8 рази; $p < 0,05$) фіксували лише у групі «ПВ-LLC». Обидві вакцини не запобігали розвитку пухлиноасоційованої анемії та спленоменгалії. Введення ПВ-LLC сприяло підвищенню ЦТА природних кілерних клітин ($p < 0,05$ порівняно з інтактним контролем); запобігало негативному впливу пухлини на характеристики тимуса, на специфічну ЦТА спленоцитів, а також ЦТА макрофагів у присутності сироватки крові. **Висновки:** одержані дані створюють передумови для розробки показань до використання ПВ з урахуванням проявів ПнС.

ВСТУП

Завдяки досягненням в галузі онкології та онкобіології, зокрема взаємодії пухлини з організмом, збагатилися уявлення про патогенез, діагностику та лікування паранеопластичних синдромів (ПнС), однак питання щодо вивчення механізмів його формування та корекції все ще важливі й актуальні [1–3]. Хоча однозначного визначення терміна «паранеопластичний синдром» немає, в більшості джерел літератури ПнС визначають як клініко-лабораторні зрушення, що виникають при злоякісних пухлинах і зумовлені неспецифічними реакціями різних органів та систем на продукцію пухлиною біологічно активних речовин (гормонів, пептидів, цитокінів тощо) [3–5]. ПнС — це сукупність неспецифічних для пухлинного росту симптомів та синдромів, які можуть з'являтися до початку клінічних проявів пухлинного процесу або в період пухлинної прогресії. На сьогодні описано близько

70 можливих ПнС, перелік яких щорічно поповнюється [1, 3, 6]. Частота виникнення ПнС варіює від 7 до 60%, підвищуючись при прогресуванні пухлинного процесу до 50–75% [1, 7]. Автори роботи [6] здійснили спробу описати відносну частоту паранеопластичних та клінічних синдромів при пухлинах конкретних локалізацій, що, на думку авторів, полегшить діагностику злоякісних пухлин. Найбільш часто ПнС реєструють у хворих зі злоякісними новоутвореннями системи крові, а також карциномами, зокрема при дрібноклітинному раку легені, раку яєчника, пухлинах шлунково-кишкового тракту, раку щитоподібної залози, нирки та надниркової залози тощо [1–3, 6, 8, 9]. Приблизно у 30% хворих зі злоякісним процесом ПнС зумовлений гормональною дисфункцією, а в інших випадках відмічають гематологічні, шкірні, ревматоїдні та неврологічні порушення [7]. Гематологічні порушення, які асоційовані з пухлинним процесом, часто виражаються роз-

витком анемії, нейтрофільного або еозинофільного лейкоцитозу, лейкомоїдними реакціями, тромбоцитозом або тромбоцитопенією [6, 10].

Як відомо, пухлиноасоційована анемія зумовлює несприятливий прогноз, погіршує стан хворих [10], а за умови, що рівень гемоглобіну < 90 г/л, є прямим протипоказанням до проведення спеціального протипухлинного лікування [11]. Для корекції пухлиноасоційованої анемії у хворих онкологічного профілю застосовують переважно еритропоетини. На сьогодні показано, що біологічна дія еритропоетинів полягає не лише в стимуляції червоного ростка та диференціюванні клітин крові. Еритропоетини — плейотропні фактори росту, для яких притаманна антиапоптотична дія на різноманітні клітини та тканини, у тому числі злоскісні, що і зумовлює високі ризики стимуляції пухлинного процесу при їх застосуванні [12]. Тому пошук безпечних, в аспекті стимуляції пухлинного процесу, засобів для корекції пухлиноасоційованої анемії залишається актуальною проблемою експериментальної та клінічної онкології. Зазначене неможливо здійснити без використання метастатичних експериментальних пухлинних моделей із різними проявами ПнС.

Так, у мишей з модельною пухлиною LAC1 (аденокарцинома легені 1, що виникла у миші лінії BALB/c у результаті дії онкогенної для легень речовини — уретану) симптоматика ПнС включала анемію, нейтрофілію, кахексію, спленомегалію та атрофію тимуса [13]. Причому автори роботи відзначають важливість LAC1 як експериментальної моделі для вивчення прогресії пухлин, ПнС та онкоімунологічних досліджень.

В Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології (ІЕПОР) ім. Р.Є. Кавецького Національної академії наук (НАН) України з карциноми легені Льюїс (LLC, первинний штам) у системі *in vivo* отримано штам карциноми легені Льюїс LLC/R9 [14], який характеризується високою швидкістю росту первинної пухлини, високим ангіогенним та низьким метастатичним потенціалом, а також формуванням на ранніх стадіях пухлинного росту ПнС [15, 16]. Симптоматика ПнС, зумовленого LLC/R9, включає виражену анемію, що проявляється у суттєвому зниженні вмісту еритроцитів, рівня гемоглобіну та гематокриту на фоні розвитку екстремедулярного гемопоєзу (сплено- та гепатомегалії), а також інволюцією тимуса. Поява симптомів ПнС у тварин з LLC/R9 корелює з підвищеним рівнем циркулюючого фактора росту ендотелію судин (VEGF) [16]. Проведено дослідження щодо можливості корекції асоційованої з ростом LLC/R9 анемії за допомогою поліфенолів винограду [17] та сорбентів [18]. Так, застосування поліфенолів винограду (пероральне 3-тижневе введення) сприяло збільшенню кількості еритроцитів, тромбоцитів, рівня гемоглобіну, нормалізувало масові та клітинні параметри селезінки, печінки та тим-

уса, однак не впливало на ріст і метастазування LLC/R9 [17]. Введення мишам із LLC/R9 вуглецевого гранульованого HSGD сорбента (протягом 2 тиж, загальна доза 0,625 мг/кг) коригувало прояви паранеопластичної анемії та тромбоцитопенії, покращувало морфологічну структуру та функцію печінки, зменшувало об'єм метастазів, але не чинило впливу на кількість метастазів та об'єм первинної пухлини [18]. Слід зауважити, що поліфеноли винограду та сорбенти хоча і здатні коригувати деякі прояви ПнС, їх дія є неспецифічною. Враховуючи, що ПнС (зокрема пухлиноасоційована анемія) опосередковується гуморальними факторами як пухлинної, так і імунної природи (продукуються ефекторними клітинами протипухлинної імунної відповіді) [1, 7, 10], видається доцільним використання для його корекції негематотоксичних засобів, що, з одного боку, направлені на інгібування росту первинної пухлини, а з іншого — на активацію та/або модуляцію ефекторів протипухлинного захисту, зокрема протипухлинних вакцин (ПВ). Показано, що застосування у мишей із резистентною до цисплатину карциномою легені Льюїс ПВ, виготовленої з клітин такої пухлини та цитотоксичного лектину *B. subtilis* B-7025, суттєво гальмує ріст пухлин і розвиток метастазів на 52 та 87,8% відповідно [19]. Однак питання щодо можливості корекції ПнС за допомогою ПВ залишаються недослідженими.

Метою цієї роботи було дослідити можливість корекції деяких проявів ПнС, що зумовлені ростом високоангіогенної карциноми легені Льюїс (LLC/R9), за допомогою ПВ, виготовлених на основі антигенів високоангіогенної карциноми легені Льюїс або на основі її вихідного низькоангіогенного штаму, а також оцінити протипухлинні та імунологічні ефекти таких вакцин.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Робота виконана на експериментальному матеріалі.

Експериментальні тварини. Використовували статевозрілих мишей-самців лінії C₅₇Bl/6 (вік 2–2,5 міс, маса тіла 20–23 г), одержаних із розплідника віварію ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Утримання тварин та роботу з ними здійснювали відповідно до загальноприйнятих міжнародних правил з біоетики щодо проведення робіт з експериментальними тваринами [20, 21].

Пухлинні штами та ПВ. У дослідженнях використовували два різні за ангіогенним потенціалом штами експериментальних пухлин карциноми легені Льюїс — вихідний низькоангіогенний штам LLC та високоангіогенний штам LLC/R9. Низькоангіогенний штам LLC був наданий Клітинним банком тканин людини і тварин ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Високоангіогенний штам LLC/R9 був отриманий зі штаму LLC дикого типу шляхом 9-кратних послідовних цис-діаміндихлорплатини

(цис-ДДП) циклів у системі *in vivo* [14]. Обидва пухлинні штами використовували як джерело пухлинних антигенів при приготуванні ПВ. Вакцини виготовляли, як описано в [22]; в обох випадках як ад'ювант використовували білоквісний метаболіт *B. subtilis* з м.м. 70 кДа [23]. Отримані вакцини стандартизували за білком ([C] = 0,3 мг/мл) та зберігали при -20°C .

Для моделювання пухлинного процесу використовували високоангіогенний штам LLC/R9. Пухлинні клітини LLC/R9 культивували *in vitro* у середовищі RPMI («Sigma», США) із додаванням 10% телячої ембріональної сироватки, 2 мМ L-глутаміну і 40 мг/мл гентаміцину при 37°C з 5% CO_2 , після чого вводили внутрішньом'язово по $1 \cdot 10^6$ клітин на мишу в 0,1 мл розчину Хенкса.

Схема експерименту, експериментальні групи. Введення ПВ розпочинали на 12-ту добу пухлинного росту підшкірно по 0,3 мл/мишу ([C] = 0,09 мг/мишу на 1 ін'єкцію) з подальшими введеннями на 15-ту, 22-ту та 29-ту доби пухлинного росту (всього 4 введення). Сформовано 4 групи: інтактні тварини (група «ІК», $n = 4$); невакциновані миші з LLC/R9 — контроль пухлинного росту (група «КПР», $n = 12$); миші з LLC/R9, яким вводили вакцину LLC/R9 (група «ПВ-LLC/R9», $n = 12$); миші з LLC/R9, яким вводили вакцину LLC (група «ПВ-LLC», $n = 12$).

Упродовж усього періоду спостереження оцінювали показники виживаності тварин з пухлиною та стандартні параметри пухлинного росту: частоту виникнення пухлин, розміри пухлинного вузла (об'єм в мм^3), кількість та об'єм метастазів [24].

На 33-тю добу росту LLC/R9 проводили імунологічне обстеження мишей, яке включало визначення індексу маси та кількості клітин селезінки і тимуса, дослідження показників периферичної крові, оцінку цитотоксичної активності (ЦТА) гуморальних та клітинних параметрів протипухлинної резистентності.

Визначення клітинності селезінки і тимуса проводили стандартним методом суправітального фарбування з трипановим синім [25].

Дослідження показників периферичної крові проводили за допомогою автоматичного гематологічного аналізатора «PCE-210» («Erma», Японія). Периферичну кров отримували шляхом декапітації мишей, збираючи її у мікропробірки з ЕДТА (~ 40 мкл). Визначали загальну кількість лейкоцитів, абсолютну та відносну кількість лімфоцитів, моноцитів і гранулоцитів; кількість еритроцитів; рівень гемоглобіну.

Імунологічні дослідження. Визначення активності природних кілерних клітин (ПКК), цитотоксичних Т-лімфоцитів (ЦТЛ), макрофагів (МФ), сироватки крові (СК) та вплив останніх на активність МФ, а також рівень антитілозалежної клітинної цитотоксичності (АЗКЦ) оцінювали в цитотоксичних тестах *in vitro* за допомогою МТТ-тесту [26].

Клітини-ефектори (КЕ) виділяли з селезінки (для оцінки активності ПКК і ЦТЛ), використовую-

ючи диференційне центрифугування суспензії клітин селезінки на градієнті щільності фікол-верографіну ($\rho = 1,076$), або з перитонеальної порожнини (для оцінки активності МФ) за стандартними методами [25]. Клітинами-мішенями (КМ) для оцінки ПКК-активності слугували клітини ПВ-чутливої лінії К-562, для оцінки ЦТА МФ, ЦТЛ, СК та впливу останніх на активність МФ і рівень АЗКЦ — клітини LLC/R9. Співвідношення ефекторів і мішеней становило 5:1. СК мишей досліджуваних груп додавали до КМ LLC/R9 в об'ємі 1:10. Термін інкубації становив 16 год в атмосфері з 5% CO_2 при 37°C . Використовували МТТ в концентрації 5 мг/мл («Sigma», США), термін інкубації — 4 год. Оптичну густину вимірювали при $\lambda = 545$ нм проти $\lambda = 630$ нм на мікро ELISA reader («StatFax-2100», США).

Індекси цитотоксичності (ЦТА) для всіх реакцій визначали за формулою:

$$\text{Індекс ЦТА} = \left[1 - \frac{OG_{KE+KM} - OG_{KE}}{OG_{KM} - OG_{\text{бланк}}} \right] \times 100\%, \text{ де}$$

OG_{KE} — оптична густина в контрольних лунках з КЕ;
 OG_{KM} — оптична густина в контрольних лунках з КМ;

OG_{KE+KM} — оптична густина в дослідних лунках;
 $OG_{\text{бланк}}$ — оптична густина в лунках, де було лише середовище культивування.

Для порівняння показників вакцинованих мишей з відповідними показниками контрольних груп («ІК», «КПР») обчислювали індекси модуляції (ІМ) [27].

$$IM = \frac{ICTA_D - ICTA_K}{ICTA_K} \times 100\%, \text{ де}$$

$ICTA_D$ — індекс ЦТА відповідних ефекторів мишей дослідних груп;

$ICTA_K$ — індекс ЦТА відповідних ефекторів мишей групи «ІК» або «КПР».

Статистичний аналіз. Статистичну обробку результатів проводили з використанням методів варіаційної статистики за допомогою програми OriginPro 7.0 і StatSoft STATISTICA 7.0. Для оцінки достовірності відмінностей показників досліджуваних груп використовували U-критерій Манна — Уїтні та t-критерій Стьюдента. Різницю між показниками вважали статистично достовірною при $p < 0,05$ [28].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті проведеного дослідження показано, що жодна з досліджуваних вакцин (ПВ-LLC/R9 та ПВ-LLC) не впливала на кінетику росту LLC/R9: розмір пухлинного вузла у вакцинованих тварин не мав суттєвих відмінностей від показників невакцинованого контролю в жодній із термінів спостереження (рис. 1). Однак в обох групах вакцинованих тварин відмічали підвищення показника виживаності: на 30-ту добу пухлинного росту у групах «ПВ-LLC/R9» та «ПВ-LLC» виживаність становила 100% проти 71,4% у невакцинованому контролі

Таблиця 1

Показники метастазування LLC/R9 у невакцинованих і вакцинованих мишей

Група тварин	Кількість метастазів	Об'єм метастазів, мм ³
КПР	47,2 ± 9,5	68,6 ± 19,7
ПВ-LLC/R9	38,8 ± 3,7	59,1 ± 10,6
ПВ-LLC	28,4 ± 4,5*	38,8 ± 9,1*

*p < 0,05 порівняно з групою «КПР» (за U-критерієм Манна – Уїтні).

(рис. 2). Слід зазначити, що у групі «ПВ-LLC» реєстрували достовірне зменшення кількості та об'єму метастазів в 1,7 та 1,8 раза відповідно (p < 0,05 порівняно з відповідними показниками невакцинованих тварин групи «КПР»). Застосування у мишей з LLC/R9 вакцини, виготовленої з клітин LLC/R9, не забезпечувало такого антиметастатичного захисту (табл. 1). Отримані нами дані щодо відсутності впливу на розмір первинної пухлини та невисокого антиметастатичного ефекту узгоджуються з даними літератури, що ефективність застосування різних імунотерапевтичних засобів (зокрема ПВ) суттєво зростає за умов максимального видалення пухлин [29], хоча відсутність стимулюючої, стосовно пухлини та метастазів, дії сконструйованих вакцин дає підставу для подальшого дослідження їх впливу на асоційовані з ростом LLC/R9 паранеопластичні прояви.

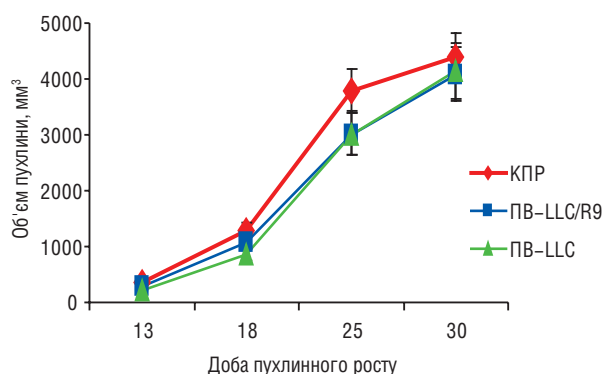


Рис. 1. Кінетика росту LLC/R9 у невакцинованих і вакцинованих мишей

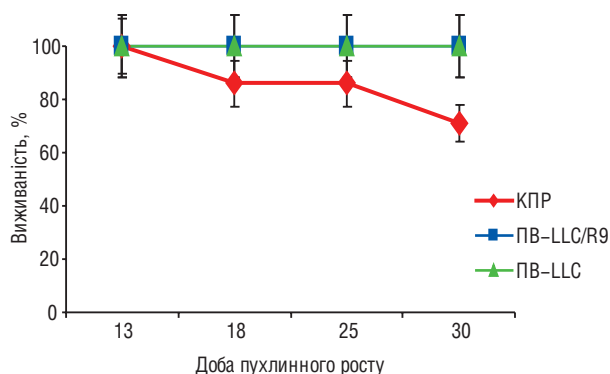


Рис. 2. Вживаність невакцинованих і вакцинованих мишей з LLC/R9

Жодна з досліджуваних вакцин не зменшувала проявів асоційованої з ростом LLC/R9 анемії. Так, у невакцинованій групі «КПР» фіксували достовірне зменшення порівняно з інтактними тваринами кількості еритроцитів та рівня гемоглобіну на 58,1 та 58,8% відповідно (p < 0,05) (табл. 2). У групі «ПВ-LLC» кількість еритроцитів та рівень гемоглобіну були на 57,4 та на 56,0% нижчі за показники інтактних мишей (p < 0,05) та не відрізнялися від показників невакцинованих тварин групи «КПР». У групі «ПВ-LLC/R9» зазначені показники були достовірно нижчі за такі інтактних мишей та групи «КПР», відповідно на 68,7 і 67,0% (p < 0,05) та на 25,3 і 19,7% (p < 0,05). Таким чином, застосування вакцини, виготовленої з клітин LLC, не запобігло розвитку у мишей з LLC/R9 пухлиноасоційованої анемії, а введення вакцини, виготовленої з клітин LLC/R9, навіть поглиблювало її.

Також у вакцинованих тварин відмічали достовірне збільшення кількості лейкоцитів (p < 0,05 порівняно з інтактним контролем); причому у групі «ПВ-LLC/R9» — за рахунок абсолютного і відносного лімфоцитозу, а у групі «ПВ-LLC» — за рахунок абсолютного моно- та гранулоцитозу (див. табл. 2). Як відомо, лейкоцитоз, моноцитоз, гранулоцитоз — гематологічні зрушення, які асоційовані з пухлинним процесом [10], хоча за умов введення вакцин можуть бути наслідком їх дії.

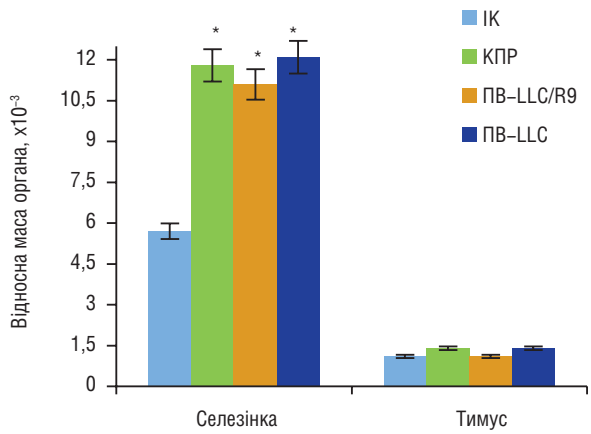
Одними із проявів зумовленого ростом LLC/R9 ПнС була спленомегалія та інволюція тимуса [16]. Так, достовірне 2-кратне збільшення маси селезінки фіксували як у невакцинованому КПР, так і у групах вакцинованих тварин (рис. 3, а). Достовірне зменшення кількості клітин на 1 мг тимуса спостерігали у групах «КПР» та «ПВ-LLC/R9» (p < 0,05 порівняно з інтактним контролем), а у групі «ПВ-LLC» цей показник був на рівні інтактних тварин (p < 0,05 порівняно з показниками «КПР» та «ПВ-LLC/R9»)

Таблиця 2

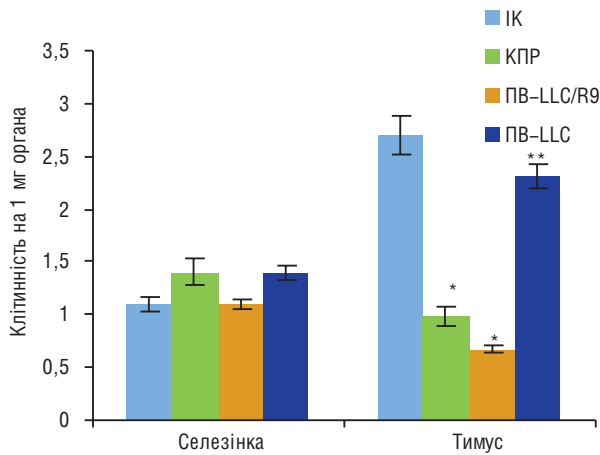
Показники периферичної крові інтактних мишей та невакцинованих і вакцинованих тварин з LLC/R9 на 33-тю добу пухлинного росту

Показник	Групи тварин			
	ІК	КПР	ПВ-LLC/R9	ПВ-LLC
Загальна кількість лейкоцитів, 10 ⁹ /л	12,1 ± 1,4	22,2 ± 6,2	25,1 ± 4,1 ¹	19,1 ± 2,1 ¹
Кількість лімфоцитів, 10 ⁹ /л	8,95 ± 1,34	12,03 ± 1,21	21,27 ± 2,87 ^{1,2}	12,43 ± 2,21
Кількість моноцитів, 10 ⁹ /л	1,40 ± 0,14	4,67 ± 2,66	2,20 ± 0,86	3,43 ± 0,16 ¹
Кількість гранулоцитів, 10 ⁹ /л	1,75 ± 0,07	5,47 ± 2,68	1,60 ± 0,67	3,27 ± 0,20 ¹
Кількість лімфоцитів, %	73,9 ± 2,3	57,9 ± 10,9	85,4 ± 4,1 ¹	64,2 ± 4,7 ³
Кількість моноцитів, %	11,7 ± 0,4	19,0 ± 5,5	8,4 ± 2,2	18,3 ± 3,0 ³
Кількість гранулоцитів, %	14,5 ± 2,0	23,2 ± 5,8	6,3 ± 1,8 ^{1,2}	17,5 ± 1,9 ³
Кількість еритроцитів, 10 ¹² /л	10,29 ± 0,38	4,31 ± 0,20 ¹	3,22 ± 0,35 ^{1,2}	4,38 ± 0,39 ¹
Рівень гемоглобіну, г/л	128,0 ± 11,3	52,7 ± 2,2 ¹	42,3 ± 2,9 ^{1,2}	56,3 ± 4,0 ^{1,3}

¹p < 0,05 порівняно з групою «ІК»; ²p < 0,05 порівняно з групою «КПР»; ³p < 0,05 порівняно з групою «ПВ-LLC/R9».



а



б

Рис. 3. Масові (а) та клітинні (б) параметри селезінки і тимуса інтактних та невакцинованих і вакцинованих мишей з LLC/R9 на 33-тю добу пухлинного росту (* $p < 0,05$ порівняно з показниками групи «ІК»; ** $p < 0,05$ порівняно з показниками групи «КПР»)

(рис. 3, б). Таким чином, введення вакцини, виготовленої з клітин LLC, запобігало спровокованій розвитком пухлини інволюції тимуса. Зниження клітинності тимуса у групі «ПВ-LLC/R9» зумовлене, швидше за все, міграцією лімфоцитів із тимуса у периферичну кров вакцинованих мишей.

Результати дослідження імунологічних показників невакцинованих і вакцинованих мишей з LLC/R9 на 33-тю добу після перещеплення пухлини порівняно з відповідними параметрами інтактних тварин наведено на рис. 4. Як видно, результатом введення вакцини, виготовленої з клітин вихідного штаму LLC, було достовірне підвищення ЦТА ПКК (ІМ становив 92%, $p < 0,05$ порівняно з інтактним контролем) та збереження активності СК і їх позитивний вплив на ЦТА МФ (див. рис. 4). Жодна з вакцин не впливала на активність ЦТЛ, МФ та ефекторів АЗКЦ: зазначені параметри були достовірно нижчими за показники інтактних тварин. Слід відмітити, що при порівнянні ЦТА ЦТЛ та ефекторів АЗКЦ вакцинованих тварин груп «ПВ-LLC/R9» і «ПВ-LLC» з відповідними показниками тва-

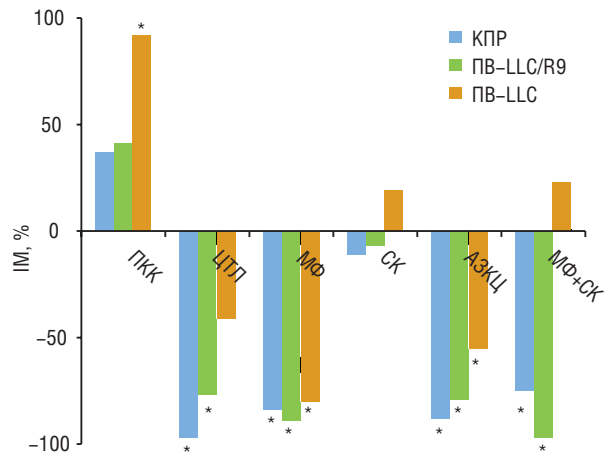


Рис. 4. Зміни клітинних і гуморальних реакцій протипухлинної резистентності у невакцинованих і вакцинованих мишей з LLC/R9 на 33-тю добу пухлинного росту порівняно з інтактними тваринами (* $p < 0,05$)

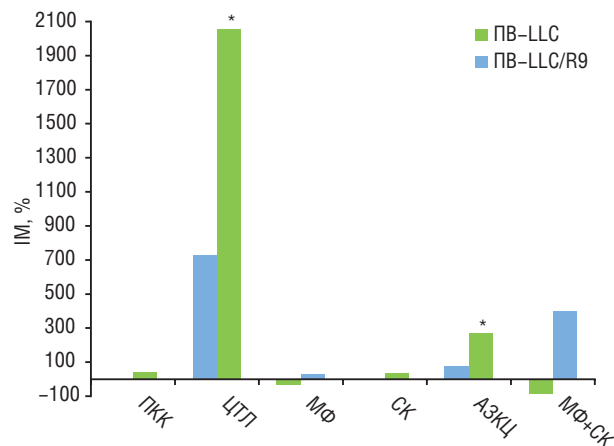


Рис. 5. Зміни клітинних і гуморальних реакцій протипухлинної резистентності у вакцинованих мишей з LLC/R9 на 33-тю добу пухлинного росту порівняно з показниками групи «КПР» (* $p < 0,05$)

рин групи «КПР» відмічали їх підвищення (ІМ для групи «ПВ-LLC/R9» становили 729 і 76%, для групи «ПВ-LLC» — 2057 і 271% ($p < 0,05$) відповідно) (рис. 5). Тобто застосування обох вакцин певною мірою запобігало імуносупресивному впливу пухлини, що проявлялося у менш вираженому, порівняно з тваринами групи «КПР», зниженні активності ЦТЛ та ефекторів АЗКЦ. Слід відмітити, що імунологічні ефекти вакцини, виготовленої з клітин вихідного штаму LLC, були більш позитивними порівняно з дією вакцини, виготовленої з клітин високоангіогенної LLC/R9.

Таким чином, застосування вакцини, виготовленої з клітин високоангіогенної LLC/R9, не впливало на розмір первинної пухлини та не чинило антиметастатичної дії, що узгоджується з відсутністю коригуючого впливу на прояви пухлиноасоційованої анемії, із запобіганням розвитку спленомегалії та зменшення кількості клітин на 1 мг тимуса. Застосування вакцини, виготовленої з клітин вихідного штаму LLC, не впливало на розмір первинної

пухлини та прояви пухлиноасоційованої анемії, однак зменшувало кількість та об'єм метастазів, що добре узгоджується з підвищеною цитотоксичністю ефекторів неспецифічного клітинного імунітету (зокрема ПМК), відсутністю в СК факторів, які пригнічують активність МФ, та підвищеною порівняно з тваринами групи «КПР» ЦТА спленоцитів стосовно клітин LLC/R9. У вакцинованих мишей групи «ПВ-LLC» також важливим є результат збереження на фоні пухлинного росту кількості клітин тимуса, інволюція якого у мишей з пухлинами розвивається за наявності спленомагалії та гранулоцитозу в периферичній крові [30]. Інволюція тимуса відбувається у мишей з пухлинами, ріст яких характеризується підвищеною секрецією VEGF, який може посилювати апоптоз тимоцитів, а також впливати на міграцію, адгезію, екстравазацію клітин імунної системи [30, 31]. Можна припустити, що введення ПВ-LLC тваринам з високоангіогенним варіантом карциноми легень Льюїса впливає як на рівень циркулюючого VEGF, так і на інші проангіогенні цитокини. Таке припущення потребує подальшого дослідження з визначенням у СК вакцинованих мишей рівня VEGF, інтерлейкінів-1, -4, -6, -10, інтерферону гамма, фактора некрозу пухлин альфа, які можуть також впливати на формування пухлиноасоційованої анемії [10].

Одержані дані створюють передумови для розробки показань до застосування ПВ з урахуванням проявів ПНС.

Роботу виконано в рамках цільової програми наукових досліджень ВВФМБ НАН України «Функціональна геноміка і метаболоміка в системній біології» (номер державної реєстрації теми 0112U002196; 2012–2016 рр.).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. **Boyardzisz M, Lieberman FS, Geskin LJ, et al.** Paraneoplastic syndromes. In: *Cancer: principles and practice of oncology*. 8th ed. *VT DeVita, TS Lawrence, SA Rosenberg*, editors. New York: Lippincott, Williams & Wilkins, 2008: 2343–62.
2. **Peloso LC, Gerber DE.** Paraneoplastic syndromes: an approach to diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 2010; **85** (9): 838–54.
3. **Bilynsky BT, Dzhuz MB, Litvinyak RI.** The conceptual and clinical problems of paraneoplastic syndrome in oncology and internal medicine. *Exp Oncol* 2015; **37**: 82–8.
4. **Manger B, Schett G.** Paraneoplastic syndromes in rheumatology. *Nat Rev Rheumatol* 2014; **10** (11): 662–70.
5. **Hirokawa M.** Paraneoplastic autoimmune disorders. *Japan J Cancer Chemother* 2010; **37**: 980–3.
6. **Григорович НА, Кашкан ТМ, Дорофтиенко СФ.** Частота встречаемости симптомов и синдромов злокачественных новообразований (материалы для разработки экспертных систем в онкологии). *Мед Новости* 2014; (1): 61–5.
7. **Дворников АС.** К вопросу о патогенезе паранеопластических процессов. *Вестн новых мед технол* 2011; **XVIII** (2): 515–6.
8. **Gandhi L, Johnson BE.** Paraneoplastic syndromes associated with small cell lung cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 2006; **4** (6): 631–8.
9. **Williamson BT, Foltz L, Leitch HA.** Autoimmune syndromes presenting as a paraneoplastic manifestation of myelodysplastic syndromes: clinical features, course, treatment and outcome. *Hematol Rep* 2016; **8** (2): 6480.
10. **Лаврова ВС, Чернова ЕН, Карпова ГВ и др.** Дизрегуляторные процессы в системе крови при заболевании раком. *Бюлл Сиб Мед* 2006; (2): 75–84.
11. **Schwartz RN.** Anemia in patients with cancer: incidence, causes, impact, management, and use of treatment guidelines and protocols. *Am J Health Syst Pharm* 2007; **64**: S5–S13.
12. **Debeljak N, Solár P, Sytkowski AJ.** Erythropoietin and cancer: the unintended consequences of anemia correction. *Front Immunol* 2014; **5**: Article 563: 1–14.
13. **Piegari M, Ortiz S, Díaz Mdel P, et al.** Characterization of a murine lung adenocarcinoma (LAC1), a useful experimental model to study progression of lung cancer. *J Exp Ther Oncol* 2011; **9** (3): 231–9.
14. **Пясковська ОМ, Соляник ГІ, Федорчук та ін.** Спосіб отримання модифікованого варіанта карциноми легень Льюїса. Пат № 48525 Україна, МПК G 01 N 33/15. № u2009 08956; заявл 28.08.2009; опубл 25.03.2010, Бюл № 6.
15. **Pyaskovskaya ON, Dasyukevich OI, Kolesnik DL, et al.** Changes in VEGF level and tumor growth characteristics during Lewis lung carcinoma progression towards cis-DDP resistance. *Exp Oncol* 2007; **29** (3): 197–202.
16. **Fedorchuk OG, Pyaskovskaya OM, Skivka LM, et al.** Paraneoplastic syndrome in mice bearing high-angiogenic variant of Lewis lung carcinoma: Relations with tumor derived VEGF. *Cytokine* 2012; **57** (1): 81–8.
17. **Пясковська ОМ, Горбик ГВ, Якишибаєва ЮР та ін.** Корекція пухлино-асоційованої анемії поліфенолами винограду. *Фармакол лікарськ токсикол* 2014; (1 (37)): 91–8.
18. **Sarnatskaya VV, Nikolaev VG, Yushko LA, et al.** Effect of enterosorption on paraneoplastic symptom manifestation in mice with highly angiogenic variant of Lewis lung carcinoma. *Exp Oncol* 2015; **37** (4): 255–61.
19. **Potebnya GP, Voejkova IM, Lisovenko GS, et al.** Antitumor and antimetastatic activities of vaccine prepared from cisplatin-resistant Lewis lung carcinoma. *Exp Oncol* 2009; **31** (4): 226–30.
20. **Кожем'якін ЮМ, Хромов ОС, Філоненко МА, Сайфетдінова ГА.** Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними. К: Авіцена, 2002. 179 с.
21. Council Directive 2010/63/EU of 22 september 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official J Eur Commun* 2010; **276**: 33–79.
22. **Потебня ГП, Лісовенко ГС, Черемшенко НЛ, та ін.** Спосіб одержання протипухлинної аутовакцини Пат. № 57869 Україна. Заявл 15.06.2001; опубл 15.07.2003; Бюл № 7.
23. **Діденко ГВ.** Розробка протипухлинних аутовакцин на основі білковмісних метаболітів *B. subtilis* В-7025 та їх вплив на окремі реакції протипухлинного імунітету (експериментальні дослідження) [автореф дис... канд біол наук]. Київ: 2008. 19 с.
24. **Балицкий КП, Шмалько ЮП.** Стресс и метастазирование злокачественных опухолей. К.: Наукова думка, 1987. 244 с.
25. **Клауса Дж.** Лимфоциты. Методы. М: Мир, 1990. 395 с.
26. **Mosmann T.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; **65**: 55–63.
27. **Ковбасюк СА, Юдин ВМ, Кравченко СП.** Иммуномодулирующее влияние циклофосфана при различных схемах введения его мышам. *Цитология* 1985; (3): 316–21.
28. **Сиденко АВ, Вишняков ВВ, Исаев СМ.** Теория статистики. Учебник. М: МАКС-Пресс, 2011. 343 с.
29. **Finn OJ.** Cancer immunology. *N Engl J Med* 2008; **358** (25): 2704–15.
30. **Киселева ЕП.** Механизмы инволюции тимуса при опухолевом росте. *Успехи совр биол* 2004; **124** (6): 589–601.
31. **Киселева ЕП, Крылов АВ, Старикова ЭА, Кузнецова СА.** Фактор роста сосудистого эндотелия и иммунная система. *Успехи совр биол* 2009; **129** (4): 336–47.

MANIFESTATIONS OF TUMOR-ASSOCIATED ANEMIA IN MICE WITH LEWIS LUNG CARCINOMA AT THE BACKGROUND OF USE OF CANCER VACCINES

O.M. Karaman, N.I. Fedosova, I.M. Voyeykova,
H.V. Didenko, V.V. Sarnatska, L.O. Yushko,
O.M. Pyaskovska, H.P. Potebnya, V.G. Nikolaev,
G.I. Solyanik

Summary. The study of the mechanisms of paraneoplastic syndrome (PNS) formation and the search for the ways of its correction remains actual. **Aim:** to study possible correction of some PNS manifestations caused by the development of high angiogenic Lewis lung carcinoma using cancer vaccines (CaV) on the basis of high angiogenic (LLC/R9) or low angiogenic (LLC) strains of Lewis lung carcinoma, and also to assess antitumor and immunologic effects of CaV. **Object and methods:** the study was performed on male C₅₇Bl/6 mice with transplanted LLC/R9. CaV was prepared from LLC cells (CaV-LLC) or LLC/R9 cells (CaV-LLC/R9); 70 kD protein-containing metabolite of *B. subtilis* B-7025 was used as an adjuvant. Administration of CaV (4 times, subcutaneously) has been started on the 12th day of tumor growth. Standard parameters of tumor growth were assessed; on the 33rd day the level of lung metastasis was assessed, and immunologic examination of the animals was performed (weight and cellular parameters of thymus and spleen, peripheral blood indexes (using hematologic analyzer), cytotoxic

activity (CTA) of cellular and humoral elements of un-specific and specific antitumor immunity with the use of MTT test). **Results:** the use of both CaV increased the survival of mice with LLC/R9: on the 30th day of tumor growth in the groups of vaccinated animals this index was equal to 100.0% versus 71.4% in the control group. Significant decrease of the quantity and volume of metastases (by 1.7-fold and 1.8-fold, respectively, $p < 0.05$) was registered just in «CaV-LLC» group. Both vaccines did not prevent the development of tumor-associated anemia and splenomegaly. Administration of Cav-LLC resulted in the increase of CTA of natural killer cells ($p < 0.05$ compared with intact control); prevented negative influence of the tumor on characteristics of thymus, specific CTA of splenocytes, and CTA of macrophages in the presence of blood serum. **Conclusions:** the obtained results create a background for the development of the indications for CaV usage with consideration of PNS manifestations.

Key Words: paraneoplastic syndrome, tumor-associated anemia, Lewis lung carcinoma LLC/R9, cancer vaccine, effectiveness, anticancer resistance.

Адреса для листування:

Караман О.М.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології, онкології
і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України
E-mail: immunomod@ukr.net

Одержано: 18.11.2016