

Н.І. Федосова¹
 О.М. Караман¹
 І.М. Восійкова¹
 Т.В. Симчич¹
 Г.В. Діденко¹
 А.В. Іванченко¹
 С.А. Андронаті²
 А.С. Редер²

¹Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ

²Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського НАН України, Одеса, Україна

Ключові слова: ксеногенна протипухлинна вакцина, індуктор ендогенного інтерферону, антиметастатична ефективність, меланома В-16, карцинома легені Льюїс, цитотоксична активність, цитокіни.

ПОРІВНЯННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ РІЗНИХ РЕЖИМІВ ЗАСТОСУВАННЯ КСЕНОГЕННОЇ ПРОТИПУХЛИННОЇ ВАКЦИНИ НА МОДЕЛЯХ МЕТАСТАТИЧНОГО ПУХЛИННОГО РОСТУ

Мета роботи: дослідження можливості підвищення ефективності протипухлинної вакцинотерапії за допомогою індуктора ендогенного інтерферону на метастазуючих моделях пухлинного процесу. **Об'єкт і методи:** дослідження проведено на мишах лінії C₅₇Bl/6, прооперованих з приводу меланоми В-16 або карциноми легені Льюїс (КЛЛ). Схеми експерименту та дози введення препаратів були однаковими для обох видів модельних пухлин. Ксеногенну протипухлинну вакцину (КПВ) (загальна концентрація білка [С] = 0,3 мг/мл) вводили підшкірно по 0,3 мл/мишу триразово з інтервалом в 3 доби після видалення пухлини. Індуктор ендогенного інтерферону (ІЕІ) вводили per os перед видаленням пухлини триразово (по 0,06 мг/мишу). Антиметастатичну активність оцінювали за індексом інгібіції метастазування. Імунологічне дослідження включало визначення цитотоксичної активності ефекторів клітинного імунітету та сироватки крові (МТТ-тест); рівня ІЛ-4, ІЛ-10, ІФН-γ (ІФА-метод). Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми StatSoft STATISTICA 7.0 з використанням t-критерію Стьюдента та коефіцієнтів кореляції (r). **Результати:** антиметастатична ефективність КПВ, розробленої на основі ембріональних ксеногенних антигенів та білоквмісного метаболіту *V. subtilis* з ММ 70 кДа, залежала від типу модельної пухлини та режиму введення препаратів: для меланоми В-16 більш ефективне введення КПВ в монорежимі; для КЛЛ — комбіноване застосування КПВ та ІЕІ. Отримані результати зумовлені цитотоксичною активністю клітин неспецифічної ланки імунітету: природних кілерних клітин і макрофагів (меланома В-16) або тільки макрофагів (КЛЛ). А також превалюванням в сироватці крові вакцинованих тварин вмісту цитокінів Т-лімфоцитів-хелперів 1-го типу, про що свідчить підвищення протягом всього терміну спостереження рівнів співвідношення ІФН-γ/ІЛ-4. Такий цитокіновий баланс, вірогідно, забезпечує повноцінне функціонування ефекторів клітинної ланки протипухлинного імунітету та зумовлює антиметастатичну дію досліджуваної вакцини. **Висновок:** одержані результати можуть становити експериментальне обґрунтування індивідуалізованого використання протипухлинних вакцин в монорежимі або в комбінації з ІЕІ при імунотерапії злоякісних новоутворень різної імуногенності в клінічній практиці.

Висока захворюваність населення (у тому числі й в Україні) на злоякісні новоутворення обґрунтовує актуальність досліджень, спрямованих на пошук нових методів лікування пацієнтів онкологічного профілю, а також вдосконалення та підвищення ефективності традиційних методів. Як відомо, розвиток пухлини супроводжується негативним системним впливом на організм хворого, зокрема на імунну систему. Хірургічне втручання, проведення хіміо- або променевої терапії також несприятливо впливають на стан системи імунітету, внаслідок чого розвивається її неспроможність забезпечити повноцінний захист від мінімальної

залишкової пухлинної хвороби [1, 2]. Тому не припиняється пошук засобів, застосування яких дозволило б ефективно гальмувати прогресування останньої. Формуванню повноцінної імунної відповіді сприяє включення в схему комбінованого лікування методів імунотерапії (зокрема цитокіно- та вакцинотерапії). Результати багатьох клінічних досліджень показали, що застосування вакцинотерапії (як неспецифічної, так і специфічної) зумовлює підвищення протипухлинної резистентності організму і, як наслідок, запобігає виникненню рецидивів пухлини, метастазів, веде до збільшення тривалості життя пацієнтів [3–6]. Вико-

ристання цитокінотерапії з метою підвищення ефективності лікування хворих онкологічного профілю зумовлене здатністю цитокінів впливати на різні стадії імунної відповіді, зокрема, за рахунок змін функціональної активності імунокомпетентних клітин. Тому цитокіни досить часто застосовуються в технологіях створення протипухлинних вакцин (ПВ) чи є їхніми компонентами [7–9]. Відомо, що інтерферон (ІФН) є одним із ключових модуляторів імунної відповіді. Численні експериментальні та клінічні дослідження присвячено вивченню дії ІФН при його комбінованому застосуванні разом з вакцинотерапією [10, 11]. Корекції імунного статусу можна досягти завдяки використанню не тільки екзогенного ІФН, але й індукторів ендogenous ІФН (ІЕІ) [12]. У науковій літературі є дані про гальмування росту експериментальних пухлин та зниження частоти метастазування при комбінованому використанні ІЕІ з протипухлинними препаратами [13, 14], але практично відсутні відомості про комбіноване застосування ІЕІ та ПВ.

Раніше нами на моделі меланоми В-16 була показана антиметастатична ефективність ксеногенної ПВ (КПВ) [15] та ІЕІ [16] при застосуванні в монорежимі. Метою цієї роботи є дослідження можливості підвищення ефективності протипухлинної вакцинотерапії за допомогою ІЕІ на метастазуючих моделях пухлинного процесу (меланома В-16, карцинома легені Льюїс — КЛЛ).

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведено на мишах-самках лінії $C_{57}Bl/6$ віком 2–2,5 міс (середня маса тіла — 20–22 г). Утримання тварин та роботу з ними проводили відповідно до загальноприйнятих міжнародних правил з біологічної етики та виконання робіт з експериментальними тваринами [17]. Антиметастатичну ефективність різних режимів застосування досліджуваних препаратів оцінювали з використанням двох моделей пухлинного росту — меланоми В-16 та КЛЛ. Обидві модельні пухлини метастазують в легені тварин практично у 100% випадків [18]; крім того, показано, що КЛЛ є однією з найбільш адекватних моделей раку легені людини [19].

Для індукції пухлин використовували клітини меланоми В-16 та КЛЛ, отримані з Клітинного банку ліній з тканин людини і тварин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології (ІЕПОР) ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Обидва штами підтримуються пасажами на мишах лінії $C_{57}Bl/6$. Пухлинні клітини вводили мишам в стопу правої задньої кінцівки в дозі $2,5 \cdot 10^5$ клітин в об'ємі 0,05 мл за стандартною методикою.

Проводили порівняльне дослідження антиметастатичної та імуномодулювальної активності КПВ (групи КПВ) та ІЕІ (групи ІЕІ) в монорежимі, а також їх комбінованого застосування (групи КПВ + ІЕІ) на обох пухлинних моделях. Схеми експерименту та дози введення препаратів були однаковими незалежно від виду модельної пухлини. В якості контрольних використовували інтактних

мишей (група «Інтактний контроль» — ІК) та прооперованих тварин, які не отримували лікування (група «Контроль операції» — КО).

Ліофілізований ІЕІ аміксин (Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського НАН України, Одеса) розводили *ex tempore* дистильованою водою і вводили тваринам *per os* перед видаленням пухлини (на 14; 15-ту та 17-ту добу після перещеплення) у разовій дозі 0,06 мг/мишу (3 мг/кг) [14].

На 18-ту добу після перещеплення (діаметр первинної пухлини $0,8 \pm 0,2$ см) проводили хірургічне видалення стопи з пухлиною під етамінал-натрієвим наркозом (40 мг/кг). Через 3 доби після операції починали введення КПВ, виготовленої за розробленою в ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України технологією на основі антигенів ембріональної нервової тканини щурів пізнього періоду гестації та білоквмісного метаболіту *B. subtilis* (ММ 70 кДа) [20]. Вакцину (загальна концентрація білку [С] = 0,3 мг/мл) вводили підшкірно по 0,3 мл/мишу ([С] = 0,09 мг/мишу на 1 ін'єкцію) триразово з інтервалом в 3 доби.

Для оцінки антиметастатичного ефекту розраховували індекс інгібіції метастазування (ІІМ, %) за формулою:

$$ІІМ = \left(1 - \frac{ЧМ \cdot ІМ}{ЧМ_к \cdot ІМ_к}\right) \cdot 100\%,$$

де ЧМ — частота метастазування у тварин дослідних груп;

ЧМ_к — частота метастазування у тварин групи КО;

ІМ — кількість метастазів у тварин дослідних груп;

ІМ_к — кількість метастазів у тварин групи КО.

Імунологічне обстеження тварин, яке проводили на 18; 32-гу і 37-му добу після операції (відповідно 36; 51-ша і 56-та доба пухлинного процесу), включало визначення цитотоксичної активності (ЦТА) виділених із селезінки неспецифічних (природні кілерні клітини — ПКК) та специфічних (цитотоксичні лімфоцити — ЦТЛ) клітин-ефекторів, ЦТА макрофагів (МФ) та сироватки крові (СК). ЦТА визначали у МТТ-тесті за стандартною методикою [21]. Як клітини-мішені використовували культуру клітин K_{562} (визначення ЦТА ПКК) та клітин меланоми В-16 або КЛЛ (визначення ЦТА ЦТЛ, МФ, СК). Індекс ЦТА (%) розраховували за формулою:

$$Індекс\ ЦТА = \left(1 - \frac{ОГ_{КЕ+КМ} - ОГ_{КЕ}}{ОГ_{КМ} - ОГ_{бланк}}\right) \cdot 100\%,$$

де ОГ_{КЕ} — оптична густина в контрольних лунках з клітинами-ефекторами;

ОГ_{КМ} — оптична густина в контрольних лунках з клітинами-мішенями;

ОГ_{КЕ+КМ} — оптична густина в дослідних лунках;

ОГ_{бланк} — оптична густина в лунках, де було лише середовище культивування.

Для порівняння активності ефекторів протипухлинного імунітету між тваринами дослідних і контрольних груп розраховували індекси модуляції (ІМ, %) досліджуваних імунологічних показників [22]:

$$IM = \left(\frac{ЦТА_{д} - ЦТА_{к}}{ЦТА_{к}} \right) \cdot 100\%$$

де ЦТА_д — індекс ЦТА відповідних ефекторів мишей дослідних груп;

ЦТА_к — індекс ЦТА відповідних ефекторів мишей контрольних груп.

Рівні цитокінів (інтерлейкін (ІЛ)-4, ІФН-γ та ІЛ-10) в пг/мл визначали в СК та супернатантах спленоцитів мишей за допомогою комерційних тест-систем BD OptEIA Set Mouse (BD Biosciences, США) згідно з інструкцією виробника. Вимірювання оптичної густини проводили при λ = 450 нм проти λ = 570 нм на автоматичному рідері StatFax 2100 (США).

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми StatSoft STATISTICA 7.0. Показники порівнювали з використанням *t*-критерію Стьюдента, статистично достовірною вважали різницю між ними при *p* < 0,05. Розраховували індекси кореляції (*r*) між показниками об'єму метастазів (мм³) та специфічної і неспецифічної ЦТА [23].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Показано, що антиметастатична ефективність досліджених препаратів відрізнялася залежно від моделі пухлинного росту (табл. 1). Хоча для всіх груп тварин розраховані ІМ були високими, у мишей з меланоною В-16 найбільш ефективним було триразове введення КПВ у монорежимі після видалення первинної пухлини (ІМ = 98,9%). Для КЛЛ результативнішим (ІМ = 98,7%) виявилось комбіноване застосування ІЕІ (до операції) та КПВ (після операції). Відомо, що меланома В-16 є високоімуногенною пухлиною [24], а КЛЛ — низькоімуногенною [18]. Ця відмінність може пояснювати особливості впливу КПВ та ІЕІ на метастазування кожної з пухлин.

Результати дослідження показників, що характеризують активність основних ефекторів протипухлинного імунітету, теж свідчили про наявність певних відмінностей відповіді на досліджені препарати на різних моделях пухлинного росту. Зокрема, як описано нами раніше [15, 16], застосування КПВ та ІЕІ в монорежи-

мі у мишей з меланоною В-16 зумовлювало підвищення порівняно з ІК ЦТА ефекторів неспецифічного протипухлинного імунітету (ПКК та МФ), а також збереження функціональної активності специфічних ЦТЛ. Тобто активованими виявлялися клітини лімфоцитарного і моноцитарно-макрофагального ряду.

Таблиця 1

Група тварин	Меланома В-16, %	КЛЛ, %
КПВ	98,9	87,1
ІЕІ	93,7	92,4
КПВ + ІЕІ	86,9	98,7

у мишей, прооперованих з приводу КЛЛ, відмічали дещо іншу картину (табл. 2). Триразове введення КПВ сприяло підтриманню досліджуваних показників на рівні ІК лише в ранні терміни після видалення первинної пухлини. Так, на 18-ту добу показники ЦТА ПКК, ЦТЛ та МФ суттєво не відрізнялися від таких у ІК та перевищували в 2 рази показники групи КО (*p* < 0,05). У подальшому (37-ма доба) спостерігали зниження активності ПКК та МФ до рівня невакцинованих мишей (КО). Доопераційне застосування ІЕІ без проведення вакцинації також виявляло активуючий вплив на ПКК, ЦТЛ та МФ на ранніх етапах спостереження, підтримуючи показники ЦТА цих клітин на рівні ІК (на 18-ту добу) або перевищуючи їх (на 32-ту добу). У віддалені терміни ЦТА ПКК та ЦТЛ знижувалася, ЦТА МФ зберігалась на рівні показників ІК. Протягом всього терміну спостереження відмічали поступове підвищення ЦТА СК. Тобто, на відміну від тварин з меланоною В-16, у мишей з КЛЛ застосування КПВ або ІЕІ в монорежимі не мало тривалого активуючого впливу на клітини лімфоцитарної ланки імунітету.

Результати дослідження змін у віддалені терміни пухлинного процесу (37-ма доба після операції) активності основних ефекторів протипухлинного імунітету при різних режимах введення КПВ наведено на рис. 1. Розраховані ІМ показують, на скільки відсотків кожний з показників більший або менший за аналогічний показник у мишей групи КО (показник КО щоразу приймали за 100%). Як видно (див. рис. 1, а), у прооперованих з приводу меланоми

Таблиця 2

ЦТА ефекторів специфічного і неспецифічного імунітету та СК мишей лінії С₅₇BL/6, оперованих з приводу КЛЛ

Група тварин	ЦТА, %				Вплив СК на	
	ПКК	ЦТЛ	МФ	СК	ЦТА ЦТЛ, %	ЦТА МФ, %
ІК	19,5 ± 1,7	27,7 ± 1,2	28,5 ± 3,7	6,5 ± 1,8	29,4 ± 2,4	18,2 ± 7,5
<i>18-та доба після операції</i>						
КО	8,8 ± 2,2 ¹	9,5 ± 1,7 ¹	14,7 ± 2,0 ¹	15,1 ± 7,0	14,9 ± 1,4 ¹	2,2 ± 1,0 ¹
КПВ	19,1 ± 0,7 ²	20,2 ± 3,0 ²	33,7 ± 0,4 ^{1,2}	2,1 ± 1,1	25,2 ± 3,3 ²	20,1 ± 4,7 ²
ІЕІ	18,5 ± 2,2 ²	15,5 ± 1,5 ²	23,5 ± 4,3	10,6 ± 3,4	18,5 ± 1,9 ¹	17,2 ± 1,9 ²
<i>32-га доба після операції</i>						
КО	21,6 ± 0,8	23,5 ± 1,0	34,2 ± 0,4 ¹	15,4 ± 2,4 ¹	32,7 ± 5,2	29,1 ± 1,3 ¹
КПВ	23,1 ± 2,2	22,8 ± 2,2	30,1 ± 1,4 ¹	20,3 ± 2,6 ¹	23,5 ± 1,2	20,6 ± 2,5 ²
ІЕІ	26,7 ± 1,0 ^{1,2}	28,8 ± 1,3	31,9 ± 2,2 ¹	16,7 ± 2,5 ¹	34,4 ± 1,2 ^{1,2}	31,1 ± 1,4 ¹
<i>37-ма доба після операції</i>						
КО	9,7 ± 2,1 ¹	8,2 ± 3,6 ¹	15,8 ± 2,1 ¹	17,2 ± 2,3 ¹	10,2 ± 4,9 ¹	3,0 ± 1,0 ¹
КПВ	14,6 ± 2,2	19,0 ± 4,0	14,3 ± 1,5 ¹	25,8 ± 2,1 ^{1,2}	14,9 ± 2,1 ¹	11,7 ± 1,7 ^{1,2}
ІЕІ	1,8 ± 0,6 ^{1,2}	15,7 ± 6,2	28,3 ± 2,6 ²	24,4 ± 4,7 ¹	13,8 ± 2,6 ¹	18,7 ± 5,5 ²

¹*p* < 0,05 порівняно з ІК; ²*p* < 0,05 порівняно з мишами групи КО.

В-16 мишей застосування КПВ в монорежимі забезпечувало суттєве підвищення ЦТА ПКК, МФ, ЦТЛ та СК протягом тривалого часу після завершення вакцинації. Комбінована схема введення препаратів (КПВ + ІЕІ) виявилася менш ефективною. Отримані результати узгоджуються з описаними вище показниками метастазування. Нагадаємо, що найвищий ПІМ був характерним саме для групи КПВ (див. табл. 1).

На моделі КЛЛ найбільший антиметастатичний ефект відмічали при комбінованому застосуванні КПВ та ІЕІ (див. табл. 1). Як видно з рис. 1, б, такий ефект, напевно, зумовлений головним чином значною активацією ефektorів моноцитарно-макрофагальної ланки імунітету. Активність ПКК та ЦТЛ підвищувалася меншою мірою та знаходилася на рівні ІК.

Описані особливості впливу КПВ або комбінації КПВ + ІЕІ на окремі ланки імунної системи за умов різної імуногенності модельних пухлин підтверджуються коефіцієнтами кореляції між об'ємом метастазів на 37-му добу після видалення пухлини та ЦТА клітин-ефektorів і СК у групах тварин з максимальним антиметастатичним ефектом (рис. 2). У мишей, прооперованих з приводу меланоми В-16, виявлено сильний негативний кореляційний зв'язок між об'ємом метастазів та ЦТА ПКК ($r = -0,95$), МФ ($r = -0,76$) і ЦТЛ ($r = -0,88$). Тобто антиметастатичний ефект вакцинації пов'язаний з активацією як специфічної, так і неспецифічної ланок імунітету. У тварин, прооперованих з приводу КЛЛ, відмічали сильний негативний кореляційний зв'язок об'єму метастазів з показником лише ЦТА перитонеальних МФ ($r = -0,73$).

Для більш детального пояснення отриманих результатів досліджено рівень цитокінів, які є ключовими в формуванні спрямованості імунної відповіді, в СК мишей відповідних груп. В табл. 3 наведено ІМ рівнів цитокінів у мишей, які отримували КПВ або КПВ + ІЕІ, стосовно відповідних показників групи ІК. Застосування КПВ в монорежимі у мишей з меланою В-16 призводило до суттєвого підвищення рівня ІФН та зниження вмісту ІЛ-4 в СК протягом всього періоду спостереження. Співвідношення ІФН- γ /ІЛ-4 достовірно перевищувало ($p < 0,05$) показники у тварин обох контрольних груп. При комбінованому застосуванні КПВ та ІЕІ досліджувані показники не відрізнялись суттєво від ІК. Водночас для мишей, прооперованих з приводу КЛЛ, аналогічні описаним вище достовірні зміни відмічали, навпаки, у тварин, яким вводили КПВ в комбінації з ІЕІ (див. табл. 3). Рівень цитокіну ІЛ-10 (який є супресивним для розвитку реакції клітинного імунітету) у мишей групи КО з меланою В-16 був достовірно підвищений на 18-ту добу, в групі КПВ + ІЕІ — на 37-му добу. У групі КПВ, де було зафіксовано максимально виражений антиметастатичний ефект, статистично суттєвого підвищення рівнів ІЛ-10 не визначено в жодній з термінів дослідження. У мишей з КЛЛ зафіксовано тривале і більш виражене (порівняно з моделлю меланоми В-16) підвищення рівня ІЛ-10: в групі КО — на 18-ту–32-гу добу, в групі КПВ — на 32-гу добу. У групі КПВ + ІЕІ

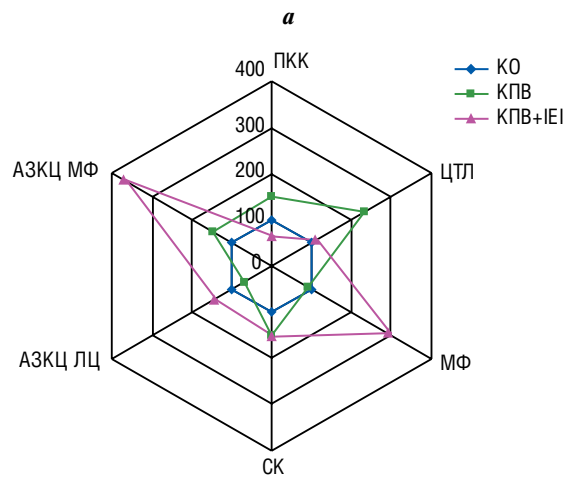
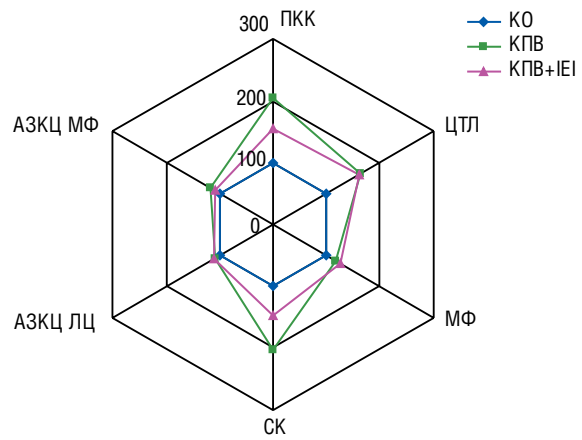


Рис. 1. Зміни показників ЦТА ефektorів протипухлинного імунітету мишей, прооперованих з приводу меланоми В-16 (а) та КЛЛ (б), за умов застосування КПВ або КПВ + ІЕІ. АЗКЦ — антитілозалежна клітинна цитотоксичність

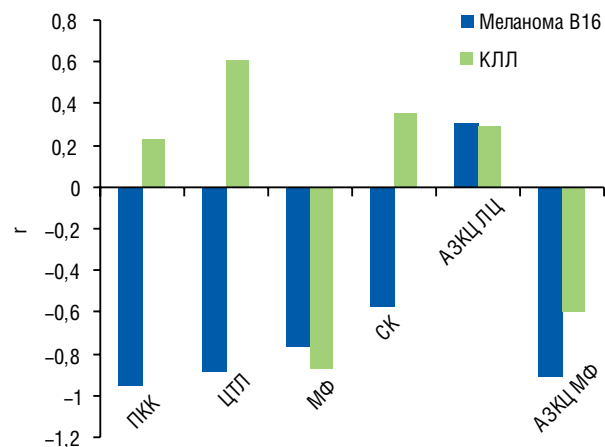


Рис. 2. Кореляція (r) між змінами дискретних імунологічних параметрів та об'ємом метастазів на 37-му добу після операції при застосуванні КПВ в монорежимі (В-16) або в комбінації з ІЕІ (КЛЛ). АЗКЦ — антитілозалежна клітинна цитотоксичність

збільшення вмісту ІЛ-10 в СК було менш вираженим і короткочасним (тільки на 18-ту добу).

Таким чином, незалежно від імуногенності модельної пухлини, виражений антиметастатичний

ІМ (%) рівнів цитокінів у СК дослідних мишей порівняно з показниками інтактних тварин

Показник	КО			КПВ			КПВ + ІЕІ		
	18-та доба	32-га доба	37-ма доба	18-та доба	32-га доба	37-ма доба	18-та доба	32-га доба	37-ма доба
Меланома В-16									
ІФН	360	-44	-	-	776	233	-	-	-
ІЛ-4	-	-	-	-	-14	-1	-	-	-
ІЛ-10	131	-100	-	-	-	-	-	-	90
ІФН/ІЛ-4	-	-51	-	-47	504	127	-	-	-
КЛЛ									
ІФН	-	-	132	65	114	-43	51	86	23
ІЛ-4	96	64	83	-	-	-44	83	-	-15
ІЛ-10	203	277	-	-	368	-	153	-	-
ІФН/ІЛ-4	-11	-	-	-	-	-	-	26	54

У табл. 3 наведено ІМ лише статистично змінених показників.

вплив досліджених режимів імунотерапії (КПВ — для тварин з меланою В-16, КПВ + ІЕІ — для тварин з КЛЛ) спостерігали на тлі вірогідного посилення імунної відповіді за Т-хелперами (Тх) 1-го типу (Тх1) (за співвідношенням ІФН/ІЛ-4) та зниження імуносупресії (за рівнем ІЛ-10).

Взаємна регуляція функціональної активності неспецифічних ефекторів (ПКК та МФ) опосередкована продукованими ними цитокінами. Зокрема, синтез активними МФ прозапальних цитокінів призводить до збільшення продукції ПКК ІФН- γ . За присутності останнього формується «класичний», або М1-фенотип МФ, прозапальні цитокіни якого сприяють диференціації Тх в Тх1. Як відомо, Тх1-клітинна відповідь відіграє значну роль у протипухлинному імунітеті [25, 26]. Згідно з одержаними результатами, КПВ не тільки індукує високу (ІМ = 776%) продукцію ІФН- γ в організмі мишей з високоімуногенною меланою В-16, але й підтримує підвищений вміст цього цитокіну в СК протягом тривалого часу. Тому інтерферогенна активність власне КПВ може бути одним із можливих механізмів показаного нами підсилення імунної відповіді до клітин меланоми В-16.

За низької імуногенності пухлинних клітин (модель КЛЛ) ефекти монотерапії КПВ менш виражені, але посилюються при застосуванні комбінації КПВ + ІЕІ. Вірогідний механізм цього може бути пов'язаний також з індукцією ІФН- γ . Відомо, що низька імуногенність пухлинних клітин часто асоціюється з порушенням експресії на них молекул головного комплексу гістосумісності. Одним із біологічних ефектів ІФН- γ є індукція на клітинах-мішенях експресії цих молекул, що сприяє більш ефективній презентації пухлинних антигенів імунокомпетентним клітинам [24]. Застосування КПВ у монорежимі у мишей з КЛЛ могло бути недостатнім для формування описаного феномену, а за умов поєднаного впливу КПВ та ІЕІ рівні ІФН- γ і, вірогідно, імуногенність клітин КЛЛ підвищувалася.

ВИСНОВКИ

1. Антиметастатична ефективність КПВ, розробленої на основі ембріональних ксеногенних антигенів та білоквмісного метаболіту *B. subtilis* з ММ 70 кДа, залежала від типу модельної пухлини та режиму введення препаратів: для меланоми В-16 більш ефектив-

не введення КПВ в монорежимі; для КЛЛ — комбіноване застосування КПВ та ІЕІ.

2. Отримані антиметастатичні ефекти зумовлені головним чином активністю клітин неспецифічної ланки імунітету: ПКК і МФ (меланома В-16) або тільки МФ (КЛЛ), ЦТА яких залишалася підвищеною порівняно з невакцинованими тваринами протягом всього періоду спостереження.

3. Для обох моделей пухлинного росту підвищення активності клітин лімфоцитарного та моноцитарно-макрофагального ряду супроводжувалося превалюванням у СК вмісту цитокінів Тх1 (ІФН- γ) над цитокінами Тх2 (ІЛ-4 та ІЛ-10), що забезпечувало повноцінне функціонування ефекторів клітинної ланки протипухлинного імунітету та значний антиметастатичний ефект відповідного режиму застосування КПВ.

4. Одержані результати можуть становити експериментальне обґрунтування індивідуалізованого використання ПВ в монорежимі або в комбінації з ІЕІ при імунотерапії злоякісних новоутворень різної імуногенності в клінічній практиці.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Schlom J, Arlen PM, Gully JL. Cancer vaccines: moving beyond current paradigms. Clin Cancer Res 2007; 13: 3776–82.
- Лесной ИИ, Сидор РИ, Храновская НН и др. Роль различных групп анальгетиков в безопасности периоперационного обезболивания онкохирургических больных. Біль, знеболювання і інтенсивна терапія 2016; (1): 61–70.
- Гриневич ЮА. Пути развития иммуноterapiи в онкологии. Обзор исследований, выполненных в Национальном институте рака 2016; (1(21)): 76–80.
- Ялгут СИ, Потехня ГП. Биотерапия опухолей. К.: Книга-Плюс, 2010. 472 с.
- Прохач НЭ. Иммунотерапия в лечении онкологических больных. Международный мед журн 2003; (2): 112–6.
- Бровкина АФ, Кешелава ВВ, Сологуб ВК и др. Ксеновакцинация в профилактике метастазов увеальной меланомы. Вестник РНЦРР 2011; (11) (http://vestnik.mncr.ru/vestnik/v11/papers/brovk_v11.htm).
- Posh C, Wehsengruber F, Bartsch, et al. Low dose inhalation of IL-2 bio-chemotherapy for treatment of pulmonary metastases in melanoma patients. Br J Cancer 2014; 110 (6): 1427–32.
- Itoh K, Yamada A, Mine T, Noguchi M. Recent advances in cancer vaccines: an overview. Jpn J Clin Oncol 2009; 39 (2): 73–80.
- Slingluff CL Jr, Petroni GR, Yamshchikov GV, et al. Immunologic and clinical outcomes of vaccination with a multipeptide melanoma peptide vaccine plus low-dose interleukin-2 administered either concurrently or on a delayed schedule. J Clin Oncol 2004; 22 (22): 4474–85.

10. Kameshima H, Tsuruma T, Kutomi G, *et al.* Immunotherapeutic benefit of α -interferon (IFN α) in survivin 2B-derived peptide vaccination for advanced pancreatic cancer patients. *Cancer Sci* 2013; **104** (1): 124–9.

11. Rizza P, Moretti F, Belardelli F. Recent advances on the immunomodulatory effects of IFN- α : implications for cancer immunotherapy and autoimmunity. *Autoimmunity* 2010; **43** (3): 204–9.

12. Чувиров ДГ, Ярицев МИ. Иммуномодуляторы в педиатрии. *Педиатрия* 2009; (1): 62–7.

13. Жильчук ВЕ, Воронцова АЛ, Кудрявцев ЮЙ та ін. Ефективність комплексної терапії хворих на рак молочної залози з використанням аутовакцини та інтерферону. *Вісн наук досліджень* 2009; (2): 36–8.

14. Sunkara PS, Prakash NJ, Rosenberger AL, *et al.* Potentiation of antitumor and antimetastatic activities of alpha-difluoromethylornithine by interferon inducers. *Cancer Res* 1984; **44** (7): 2799–802.

15. Fedosova NI, Voeykova IM, Karaman OM, *et al.* Cytotoxic activity of immune cells following administration of xenogeneic cancer vaccine in mice with melanoma B-16. *Exp Oncol* 2015; **37** (2): 130–4.

16. Федосова НІ, Караман ОМ, Воєйкова ІМ та ін. Ефективність неоад'ювантного застосування аміксину в якості засобу імунотерапії меланоми В-16 у мишей лінії С57ВL. *Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія* 2016; (6(95)): 46–51.

17. Кожем'якін ЮМ, Хромов ОС, Філоненко МА, Сайфетдінова ГА. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними. Київ, 2002. 179 с.

18. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США // Под ред: ЗП Софьиной, АВ Сыркина. М: Медицина, 1980. 79 с.

19. Kellar A, Egan C, Morris D. Preclinical murine models for lung cancer: clinical trial applications. *Bio Med Res Int* 2015; **2015** (2015): Art ID 621324, 17 p.

20. Потєбня ГП, Воєйкова ІМ, Юдіна ОЮ. Спосіб одержання протипухлинної вакцини (Україна). Патент на корисну модель № 78756 (UA); заявка № u201212402 від 30.10.2012; Опубл. 25.03.2013. Бюл. №6.

21. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; **65**: 55–63.

22. Ковбасюк СА, Юдин ВМ, Кравченко СП. Иммуномодулирующее влияние циклофосфана при различных схемах введения его мышам. *Цитология* 1985; (3): 316–21.

23. Сиденко АВ, Вишняков ВВ, Исаев СМ. Теория статистики. Учебник. М: МАКС-Пресс, 2011. 343 с.

24. Балдуева ИА. Иммунологические особенности взаимоотношения опухоли и организма при меланоме. *Практ онкол* 2001; (4 (8)): 37–41.

25. Paradkar PH, Joshi JV, Mertia PN, *et al.* Role of cytokines in genesis, progression and prognosis of cervical cancer. *Asian Pacific J Cancer Prevent* 2014; **15** (9): 3851–64.

26. Лямина СВ, Мальшев ИЮ. Полярзация макрофагов в современной концепции формирования иммунного ответа. *Фундаментальные исследования* 2014; (10 (5)): 930–5.

COMPARISON OF THE EFFICACY OF DIFFERENT REGIMENS OF XENOGENEIC CANCER VACCINE ON MODELS OF METASTATIC TUMOR GROWTH

N.I. Fedosova, O.M. Karaman, I.M. Voeykova, T.V. Symchych, G.V. Didenko, A.V. Ivanchenko, S.A. Andronati, A.S. Reder

Summary. Objective: study of the possibility of increasing the effectiveness of antitumor vaccine therapy with the help of endogene interferon induc-

tor (EII) on the metastatic models of the tumor process. **Object and methods:** the study was conducted on C₅₇Bl/6 mice, operated on the B-16 melanoma or Lewis lung carcinoma (LLC). Experiment scans and doses of drug administration were the same for both types of tumors model. Xenogeneic cancer vaccine (XCV) (total protein concentration [C] = 0.3 mg/ml) was administered subcutaneously at 0.3 ml/mouse, three times at 3-day intervals after tumor removal. EII was administered per os before tumor removal three times (0.06 mg/mouse). The antimetastatic activity was evaluated by the metastasis inhibition index. Immunological study included determination of cytotoxic activity of cellular immunity and blood serum effector (MTT-test); level of IL-4, IL-10, IFN- γ (IFA-method). Statistical processing of the results was performed using the Stat-Soft STATISTICA 7.0 program using Student's t-criterion and correlation coefficients (r). **Results:** the antimetastatic effectiveness of XCV, designed basing on the antigens of embryonic rat nervous tissue, depends on the type of tumor model and mode of drug administration: for melanoma B-16, XCV is the most efficient when administered in monomode; for Lewis lung carcinoma — when XCV is used combined with EII. The study on the activity of major effectors of antitumor immunity showed that these results are caused by cytotoxic activity of nonspecific immunity cells: natural killer cells and macrophages (melanoma B-16) or only macrophages (LLC), as well as by prevalence of cytokine content from the first type helper T-lymphocytes in the serum of vaccinated animals, which is evidenced by the increase of the IFN- γ /IL-4 ratio throughout the whole observation period. This cytokine balance is likely to ensure the full functioning of the cell antitumor immunity effectors providing the antimetastatic effect of the studied vaccine. **Conclusion:** the obtained results may constitute an experimental substantiation of the individualized use of cancer vaccines in monomode or in combination with EII in immunotherapy of malignant tumors of different immunogenicity in clinical practice.

Key Words: xenogeneic cancer vaccine, endogene interferon inductor, antimetastatic efficiency, melanoma B-16, Lewis lung carcinoma, cytotoxic activity, cytokines.

Адреса для листування:

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

Держано: 15.06.2017