

Cel: Celem pracy była ocena wpływu cyklofosfamidu (CYC) na wzrost komórek czerniaka, genetycznie modyfikowanych cDNA dla interleukiny-6 (IL-6) i Hyper-IL-6 (H6) *in vivo*.

Materiał i metody: W badaniach wykorzystano 6-tygodniowe myszy chimeryczne C57/BL6xC3H (samice, F1), którym podano podskórnie komórki ustalonej linii mysiego czerniaka B-78, modyfikowane genetycznie cDNA kodującym IL-6 (B-78/IL-6) i hybrydowe białko fuzyjne H-6 (B-78/H-6). Myszom z grupy kontrolnej (grupa I; n=7) wstrzyknięto wyjściowe komórki B-78 oraz dootrzewnowo 100 μ l PBS; myszy z grupy II (n=7) zaszczepiono komórkami B-78/IL-6+100 μ l PBS, a z grupy III (n=7) komórkami B-78/H-6+100 μ l PBS. Grupy doświadczalne podzielone zostały na podgrupy IA–IIIA oraz IB–IIIB (tab. 1.). Myszy z grup IA–IIIA (n=21) oraz z grup IB–IIIB (n=21) otrzymały dootrzewnowo 100 μ l cyklofosfamidu (odpowiednio, 100 mg/kg m.c. i 500 mg/kg m.c.), 2 dni przed zaszczepieniem wyjściowych i modyfikowanych genetycznie cDNA dla IL-6 i H-6 komórek B-78. Oceniano dynamikę wzrostu guza (co 7 dni od zaszczepienia) oraz średni czas przeżycia zwierząt. Analizowano ponadto cytotoksyczność komórek NK oraz profil subpopulacji limfocytów Th1/Th2 oraz Tc1/Tc2 w krwi obwodowej.

Wyniki: Wielkość guza u myszy zaszczepionych komórkami B-78/H-6 (grupa III) była istotnie mniejsza (dziej 35., >20 cm³) w porównaniu z grupą kontrolną (grupa I). Kombinowana terapia B-78/H-6 i CYC (100 mg/kg m.c.; grupa IIIA) nie spowodowała istotnych statystycznie zmian w dynamice wzrostu guza.

Najdłuższe średnie przeżycia (>100 dni, 57 proc.) notowano w grupie zwierząt, którym podano CYC w dawce 100 mg/kg m. c. i zaszczepiono komórkami B-78/H-6.

Zastosowanie kombinowanej terapii GMTV z CYC [B-78/IL-6 i B-78/H-6 + 100 mg/kg m.c. (grupy IIA, IIIA odpowiednio)] nie spowodowało znaczących różnic w poziomie nieswo-

Wpływ cyklofosfamidu na tumorogenność komórek czerniaka modyfikowanych genetycznie IL-6 i Hyper-IL-6

Effect of cyclophosphamide on tumorogenesis of the IL-6 and Hyper-IL-6 gene modified murine melanoma cells

Dariusz Iżycki¹, Sergiusz Nawrocki¹, Maria Łaciak¹, Katarzyna Gryska¹, Katarzyna Baksalary-Iżycka², Andrzej Mackiewicz¹

¹Zakład Immunologii Nowotworów i Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu,

²Instytut Stomatologii Akademii Medycznej w Poznaniu

Wykaz skrótów używanych w pracy

- B-78 – ustalona linia komórek czerniaka mysiego;
- CD – (*cluster of differentiation*) – grupa różnicowania;
- CTL – (*cytotoxic T-lymphocyte*) – cytotoksyczne limfocyty T;
- CYC – cyklofosfamid;
- DMEM – *Dulbeccos Modified Eagle's Medium*;
- EGFP – *Enhanced Green Fluorescent Protein*;
- FCS – *Fetal Calf Serum*;
- GMTV – (*gene modified tumor vaccine*) – genetycznie modyfikowana szczepionka komórkowa;
- H6 – Hyper-IL-6;
- IL – interleukina;
- i.p. – (*intraperitoneally*) – dootrzewnowo;
- MHC – (*Major Histocompatibility Complex*) – główny układ zgodności tkankowej;
- NK – (*natural killer*) limfocyty NK;
- s.c. – (*subcutaneously*) – podskórnie;
- sIL-6R – rozpuszczalny receptor dla IL-6;
- TGF β – (*Transforming Growth Factor β*) – czynnik transformujący wzrost nowotworu β .

statystycznie zmian w odsetku uzyskanych remisji i poprawie przeżycia chorych [1]. Opracowanie skutecznej strategii terapeutycznej, prowadzącej do wzmocnienia swoistej odpowiedzi przeciwczeraniakowej, jest najbardziej pożądanym celem współczesnej onkologii.

Cyklofosfamid (CYC) jest jednym z najczęściej stosowanych leków w terapii nowotworów. Ma on najszerszy zakres działania przeciwnowotworowego wśród środków alkilujących oraz stosunkowo niską toksyczność. Stosowany jest w terapii białaczek, chłoniaków, raka oskrzeli, płuc, żołądka, sutka, jajnika, jądra. Używany jest również w transplantologii oraz w leczeniu niektórych chorób o podłożu autoimmunologicznym [2–6]. Opisano wiele mechanizmów działania cyklofosfamidu, zarówno w badaniach na modelu zwierzęcym, jak i próbach klinicznych [7–11]. Jednym z najważniejszych jest nasilenie odpowiedzi przeciwnowotworowej poprzez nieswoiste blokowanie subpopulacji supresorowych/regulatorowych limfocytów T (CD4+CD25+) zarówno w modelu *in vitro*, jak i *in vivo* [12].

WSTĘP

Pomimo stosowania klasycznych form mono- i politerapii czerniaka złośliwego, obejmujących chirurgiczną cytoredukcję, chemioterapię oraz radioterapię, nie osiągnięto istotnych

istej cytotoksyczności komórek NK oraz profilu subpopulacji Th1/Th2 oraz Tc1/Tc2.

Wnioski: Zastosowanie niskich dawek CYC hamuje potencjał tumorigenny genetycznie modyfikowanych IL-6 i Hyper-IL-6 komórek mysiego czerniaka *in vitro*.

Słowa kluczowe: cyklofosfamid, terapia genowa, czerniak złośliwy.

Komórki T CD4+CD25+, poprzez syntezę i uwalnianie interleukiny-4 (IL-4), interleukiny-10 (IL-10) oraz TGF-beta, odpowiedzialne są za powstanie stanu immunosupresji i ucieczkę komórek rakowych spod nadzoru immunologicznego [13]. Aktywność biomodulacyjna cyklofosfamidu znalazła szczególne zastosowanie w kombinowanej terapii czerniaka złośliwego. Zastosowanie cyklofosfamidu w terapii złożonej z genetycznie modyfikowanych genem dla IL-2 komórek linii ustalonej mysiego czerniaka B-16 oraz niewielkimi dawkami IL-1 wydłużyło czas przeżycia zwierząt oraz zredukowało odległe przerzuty czerniaka w płucach [14]. Badacze sugerowali, że wykorzystanie niewielkich dawek CYC przed immunizacją genetycznie modyfikowaną szczepionką przeciwnowotworową (GMTV) doprowadziło do zahamowania aktywności komórek CD4+/CD25+ oraz wzrostu efektywności cytotoksycznej komórek NK i CTL. W klinicznych próbach terapii czerniaka użycie CYC wraz z autologicznymi komórkami czerniakowymi, allogenicznym lizatem komórek czerniaka (Melacine) czy poliwalentnym immunogenem (fragmenty autolub allogeniczných błon komórkowych skonjugowane z silikonowymi lub lateksowymi cząsteczkami) wydłużyło czas przeżycia chorych na zaawansowanego czerniaka. Efekt działania CYC w tym modelu polegał raczej na zahamowaniu supresorowej funkcji subpopulacji limfocytów T o fenotypie CD4+/CD25+, a nie na bezpośredniej aktywności przeciwnowotworowej [13].

Stosunkowo nieliczne dane literaturowe dotyczące zastosowania CYC w celu podniesienia efektywności terapii nowotworów wykorzystującej GMTV, potwierdzają jego doświadczalną i kliniczną wartość jako czynnika immunomodulacji przeciwnowotworowej. Jednak mechanizmy jego działania nie są dokładnie poznane.

Wcześniejsze badania, przeprowadzone w Zakładzie Immunologii Nowotworów Akademii Medycznej w Poznaniu wykazały, że immunizo-

wanie myszy genetycznie modyfikowanymi IL-6 i rozpuszczalnym receptorem dla IL-6 (sIL-6R) komórkami linii ustalonej mysiego czerniaka, B-78 zahamowało wzrost guza, przedłużyło czas przeżycia zwierząt oraz indukowało swoiste, efektorowe mechanizmy obronne [15, manuskrypt]. Ponadto zastosowanie mieszaniny komórek B-78 transdukowanych IL-6 i sIL-6R nasiliło przeciwnowotworowy efekt GMTV.

W przedstawionej pracy oceniano wpływ cyklofosfamidu na zahamowanie wzrostu komórek linii ustalonej mysiego czerniaka B-78, modyfikowanych genetycznie genami IL-6 i Hyper-IL-6 (H-6) w modelu *in vivo*.

MATERIAŁ I METODY

Konstrukcja wektorów retrowirusowych oraz transdukcja komórek docelowych

Do badań wykorzystano słabo immunogenną ustaloną linię komórek mysiego czerniaka B-78 (podtyp komórek B-16), którą utrzymywano w hodowli jednowarstwowej w pożywce DMEM (GIBCO, Edmonton, Canada), wzbogaconej Glutamax I (GIBCO), 10 proc. v/v FCS GIBCO) w 37°C, 5 proc. CO₂ w powietrzu. Docelowe komórki B-78 transdukowano retrowirusowym wektorem dwucistronowym podwójnej kopii niosącym cDNA ludzkiej IL-6 oraz H-6 (otrzymane od prof. Stefana Rose-John), jak opisano wcześniej [16-18]. Wysoka ekspresja swoistego RNA dla IL-6 oraz H-6 została potwierdzona w pozytywnie wyselekcjonowanych komórkach B-78 analizą Northern blot, a obecność syntetyzowanego białka IL-6 i H6 została potwierdzona testem ELISA (Genzyme, Cambridge, MA i R&D, Minneapolis, MN odpowiednio). Transdukowane komórki B-78-H1-IL-6 produkowały 12,4 ng/10⁶ komórek/24 godz. IL-6, a komórki B-78/H6 produkowały 14,1 ng/10⁶ komórek/24 godz. białka fuzyjnego H-6 (wg oceny sIL-6R) (dane nieprzedstawione).

W testach cytotoksyczności nieswoistej zastosowano docelowe dla

Background: The study was aimed at evaluating the effect of cyclophosphamide on the melanogenesis of the IL-6 and hyper-IL-6 gene modified murine melanoma cells.

Animals and Experimental Design: Sixty-three ($n=63$), six-week-old C57/BL6xC3H chimeric mice were injected with "wild" type or with interleukin-6 (IL-6) or Hyper-6 (H6) gene modified B-78 murine melanoma cells and/or cyclophosphamide. Control groups were injected s.c. with "wild" type (group I; $n=7$), IL-6 (group II; $n=7$), or H-6 (group III; $n=7$) gene modified B-78 murine melanoma cells (5×10^5 cells). In the experimental groups IA, IIA, and IIIA animals were intraperitoneally (i.p.) injected with cyclophosphamide (100 mg/kg) two days before inoculation of B-78 (group IA; $n=7$), B-78/IL-6 (group IIA; $n=7$) and B-78/H6 (group IIIA; $n=7$) melanoma cells (s.c.; 5×10^5 cells). In the experimental groups IB ($n=7$), IIB ($n=7$) and IIIB ($n=7$) combined treatment of B-78, B-78/IL-6 and B-78/H6 (respectively; s.c.; 5×10^5 cells) and cyclophosphamide (500 mg/kg; i.p., two days before inoculation of B-78 cells) was applied. We evaluated the kinetics of the tumor growth, mean survival time of the animals and immune response. The non-specific (NK cells) immunotoxicity as well as Th1/Th2 and Tc1/Tc2 shift were analyzed by flow cytometry.

Results: The kinetics of the tumor growth study revealed significant inhibition of tumor growth in group III mice (day 35, $<20 \text{ cm}^3$) treated with B-78/H6 mono-therapy. Application of combined B-78/IL-6 and B-78/H6 with cyclophosphamide (100 mg/kg; group IIIA) treatment resulted in significant extension of the survival and tumor growth inhibition. Flow cytometric analysis of the non-specific cytotoxicity showed no significant difference between control and experimental groups as well as in the Th1/Th2 and Tc1/Tc2 ratios.

Conclusions: Application of low doses of cyclophosphamide resulted in inhibition of the potency of tumor to grow in vivo.

Key words: cyclophosphamide, gene therapy, melanoma malignum.

mysich limfocytów NK komórki YAC-1 (ATCC), genetycznie modyfikowane cDNA, kodującym białko wskaźnikowe EGFP. Konstrukcję dwucistronowego wektora ekspresyjnego pMINV-EGFP, transdukcję komórek docelowych YAC-1 oraz selekcję pozytywnych klonów YAC-1/EGFP wykonano zgodnie z metodą opisaną wcześniej [19]. Wewnątrzcytoplazmatyczną ekspresję EGFP potwierdzono w mikroskopie fluorescencyjnym (Olympus IX70, Japonia).

Hodowla zwierząt i model doświadczalny

W badaniach wykorzystano 6-tygodniowe myszy chimeryczne C57/BL6xC3H (samice, F1, Instytut Immunologii Doświadczalnej im. Hirszfelda, Wrocław). Hodowlę prowadzono w zwierzętarni Zakładu Toksykologii Akademii Medycznej w Poznaniu. Zwierzęta zostały podskórnie zaszczepione komórkami wyjściowymi (5×10^5) linii ustalonej mysiego czerniaka B-78 oraz modyfikowanymi genetycznie cDNA kodującym interleukinę-6 (B-78/IL-6) i hybrydowe białko fuzyjne Hyper-IL-6 (B-78/H6). Kontrolną grupę I–III ($n=21$) stanowiły zwierzęta, którym

wstrzyknięto wyjściowe komórki B-78 (grupa I) lub genetycznie modyfikowane komórki B78/IL-6 (grupa II) i B-78/H6 (grupa III). Zwierzętom kontrolnym dootrzewnowo podano 100 μl PBS. Grupy doświadczalne podzielone zostały na 2 podgrupy IA–IIIA i IB–IIIB. Myszy z grup IA–IIIA ($n=21$) oraz z grup IB–IIIB ($n=21$) otrzymały dootrzewnowo cyklofosfamid (CYC) (Astra Medica, Szwajcaria) – 100 mg/kg m.c. i 500 mg/kg m.c., odpowiednio 2 dni przed zaszczepieniem wyjściowych i modyfikowanych genetycznie komórek B78 (tab. 1.). Oceniano średni czas przeżycia zwierząt oraz dynamikę wzrostu guza (ocena co 7 dni od zaszczepienia).

Cytotoksyczność komórek NK

Analiza cytotoksyczności komórek NK wobec docelowych komórek YAC-1 została wykonana w cytometrze przepływowym (EPICS, Coulter) za pomocą metody opisanej wcześniej [19]. Genetycznie modyfikowane EGFP komórki docelowe YAC-1 inkubowano (w obecności jodku propydyne) ze świeżymi limfocytami izolowanymi z krwi obwodowej zwierząt w 28. dniu (wirowanie w gradiencie

Tab. 1. Zestawienie grup zwierząt oraz zastosowana terapia genetycznie modyfikowanymi IL-6 i hyper-IL-6 komórkami mysiego czerniaka B-78 i cyklofosfamidem. Grupy kontrolne stanowiły zwierzęta, które otrzymały PBS

Table 1. Experimental groups and treatment with IL-6 and hyper-IL-6 gene modified B-78 melanoma cells and cyclophosphamide. Control groups I, II, and III received PBS instead of cyclophosphamide

Grupy doświadczalne	Komórki B-78 (s.c.)	Komórki B-78/IL-6 (s.c.)	Komórki B-78/H-6 (s.c.)	PBS 100 μl (i.p.)	CYKLOFOSFAMID (i.p.)	
					100 mg/kg	500 mg/kg
Grupa I ($n=7$)	+	–	–	+	–	–
Grupa II ($n=7$)	–	+	–	+	–	–
Grupa III ($n=7$)	–	–	+	+	–	–
Grupa IA ($n=7$)	+	–	–	–	+	–
Grupa IIA ($n=7$)	–	+	–	–	+	–
Grupa IIIA ($n=7$)	–	–	+	–	+	–
Grupa IB ($n=7$)	+	–	–	–	–	+
Grupa IIB ($n=7$)	–	+	–	–	–	+
Grupa IIIB ($n=7$)	–	–	+	–	–	+

– Gradisol – Polfa, Kutno) po zaszczepieniu wyjściowymi i genetycznie modyfikowanymi IL-6 i H-6 komórkami B-78. Po 4–6-godzinnej inkubacji (37°C w atmosferze 5 proc. CO₂ w powietrzu), dokonano pomiaru cytotoksyczności, w której oceniano następujące populacje komórkowe: 1) YAC-1/GFP, 2) YAC-1/IP, 3) YAC-1/GFP/IP. Z procentowej wartości regionów analitycznych obliczono aktywność cytotoksyczną komórek efektorowych NK za pomocą poniższego wzoru:

$$\frac{B1+B2}{100-B3} \times 100 = A\%, \text{ gdzie}$$

- A – aktywność cytotoksyczna,
 B1 – komórki GFP-/PI+ – komórki docelowe YAC-1 z częściowo uszkodzoną błoną komórkową,
 B2 – komórki GFP+/PI+ – zniszczone komórki docelowe YAC-1,
 B3 – komórki niewyznaczone,
 B4 – komórki docelowe YAC-1 nieuszkodzone.

Analizowano co najmniej 10 tys. komórek. Prawidłowe parametry dyskryminatora umożliwiły eliminację fragmentów komórek i zanieczyszczeń.

Cytofluorometryczna ocena ekspresji cytokin wewnątrzkomórkowych: profile Th1/Th2 i Tc1/Tc2

W celu cytofluorometrycznej oceny profilu subpopulacji limfocytów Th1, Th2 oraz Tc1 i Tc2 wykorzystano metodę opisaną wcześniej [20] z modyfikacjami. W skrócie, świeżo izolowane splenocyty od myszy, immunizowanych GMTV: B-78, B-78/IL-6 i B-78/H6 w kombinacji z cyklofosfamidem oraz grupy kontrolnej (bez cyklofosfamid) były inkubowane z PMA (50 ng/ml) i jonoforem A23187 (1 ug/ml) w obecności monoenzyny 2 μM przez 4 godz. Po 2-krotnym płukaniu, komórki były znakowane przeciwciałem przeciwko limfocytom CD4+ (FITC) i CD8+ (FITC) przez 30 min, utrwalone buforem CytoFix/CytoPerm, permeabilizowane buforem

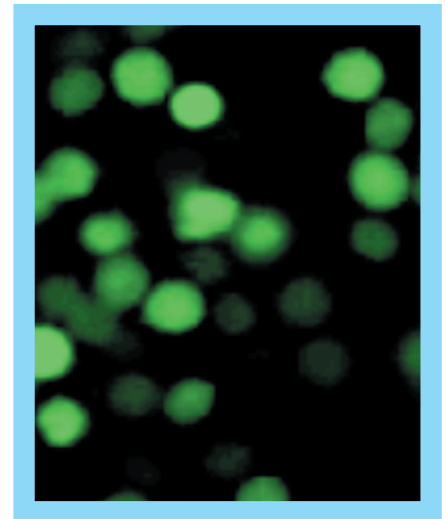
Perm/Wash i znakowane przeciwciałem przeciwko myszemu IFN-γ (PE) i IL-4 (PE). Oceniano jednoczesną ekspresję IFN-γ w splenocytach CD4+ i CD8+ (subpopulacje Th1 i Tc1 odpowiednio) oraz IL-4 w komórkach CD4+ i CD8+ (subpopulacje Th2 i Tc2 odpowiednio). Analizę cytometryczną wykonano za pomocą cytometru przepływowego EPICS (Coulter), wykorzystując protokół Software II.

WYNIKI

Dynamika wzrostu guza i średni czas przeżycia zwierząt

Średni czas przeżycia zwierząt zaszczepionych wyjściowymi komórkami B-78 wyniósł 5 tyg. Podanie cyklofosfamid zwierzętom tej grupy spowodowało wydłużenie średniego czasu przeżycia. Wstrzyknięcie komórek B78/IL6 spowodowało istotne przedłużenie czasu przeżycia (>60 dni, 60 proc. zwierząt). Dostarczenie komórek B78/IL-6 oraz B-78/H6 w kombinacji z CYC (100 mg/kg m.c.) istotnie wydłużyło czas przeżycia myszy (>60 dni, 100 proc. zwierząt; >60 dni, 100 proc. zwierząt, odpowiednio). Zastosowanie CYC w dawce 500 mg/kg m.c. (grupa IB–IIIB) spowodowało gwałtowne skrócenie czasu przeżycia zwierząt do 1–3 tyg., co sugeruje wystąpienie toksycznych skutków ubocznych związanych z użytą dawką CYC (ryc. 1.).

Największą dynamikę wzrostu guza zaobserwowano w grupie zwierząt, którym podano *dzikie* komórki B78 (dzień 35., >40 cm). Dostarczenie myszom CYC w dawce 100 mg/kg m.c. (grupa IA) nie spowodowało istotnych zmian w zahamowaniu wzrostu guza. Nie oceniano wzrostu guza w grupach IB, IIB i IIIB ze względu na krótki czas przeżycia myszy po zastosowaniu dawki CYC 500 mg/kg m.c. Dynamika wzrostu guza w grupie myszy zaszczepionych komórkami B-78/IL-6 (grupa II) była niższa (dzień 35., <15 cm³) w porównaniu z grupą myszy, którym podano wyjściowe komórki

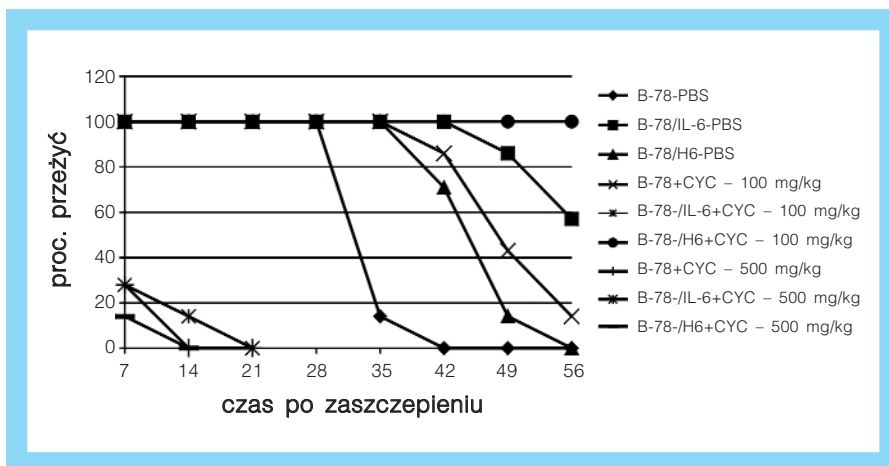


Ryc. 1. Analiza wewnątrzkomórkowej ekspresji EGFP w docelowych komórkach YAC-1, po selekcji G418 (500 μg/ml) wykazała >97 proc. pozytywnych komórek YAC-1/EGFP w zawiesinie **Fig. 1.** Fluorescence analysis of the EGFP – reporter gene expression into YAC-1 target cell line revealed >97% of positive YAC-1/EGFP cells in the culture

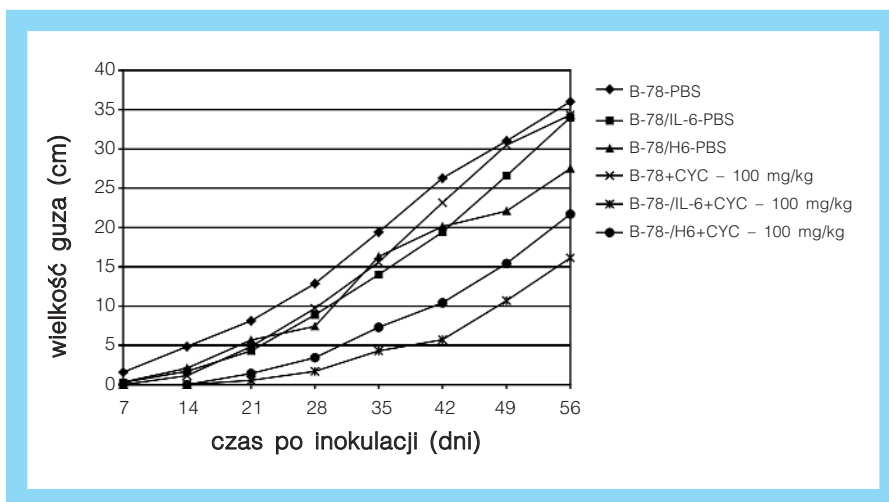
B-78, a dostarczenie cyklofosfamid w dawce 100 mg/kg m.c. (grupa IIA) istotnie zmniejszyło dynamikę wzrostu guza (dzień 35., <10 cm³) w porównaniu z grupą II. Objętość guza u myszy zaszczepionych komórkami B-78/H6 była istotnie mniejsza (dzień 35., <20 cm³) w porównaniu z grupą kontrolną (grupa I). Kombinowana terapia B-78/H6 i CYC (100 mg/kg m.c. grupa IIIA) spowodowała istotne statystycznie zahamowanie dynamiki wzrostu guza (ryc. 2.).

Cytofluorometryczna ocena cytotoksyczności komórek NK

Zastosowanie kombinowanej terapii GMTV z CYC [B78/IL-6 i B78/H6 + 100 mg/kg m.c. (grupy IIA, IIIA odpowiednio) nie miała wpływu na istotność różnic poziomu nieswoistej cytotoksyczności limfocytów NK izolowanych z krwi obwodowej (ryc. 3.). Ze względu na krótki czas przeżycia zwierząt, którym podano wyjściowe i modyfikowane genetycznie komórki B-78 oraz CYC w dawce 500 mg/kg m.c. (Grupy IB, IIB, IIIB) nie oceniano poziomu nieswoistej cytotoksyczności obwodowych komórek NK.



Ryc. 2. Średni czas przeżycia zwierząt zaszczepionych genetycznie modyfikowanymi IL-6 i hyper-IL-6 komórkami mysiego czerniaka B-78 i cyklofosfamidem. Obserwacje prowadzono od czasu inokulacji wyjściowych i modyfikowanych genetycznie komórek czerniakowych w 7-dniowych interwałach
Fig. 2. Mean survival time of mice vaccinated with IL-6 and hyper-IL-6 gene modified B-78 melanoma cells and cyclophosphamide. Observations were performed at 7-day intervals post-inoculation of the wild type and gene modified tumor cells



Ryc. 3. Kinetyka wzrostu guza u myszy zaszczepionych genetycznie modyfikowanymi IL-6 i hyper-IL-6 komórkami mysiego czerniaka B-78 i cyklofosfamidem
Fig. 3. Kinetics of the tumor growth in mice vaccinated with IL-6 and hyper-IL-6 gene modified B-78 melanoma cells and cyclophosphamide

Tab. 2. Wartości stosunków subpopulacji limfocytów Th1/Th2 oraz Tc1/Tc2 w splenocytach izolowanych z myszy poddanych mono- i kombinowanej terapii za pomocą genetycznie modyfikowanych IL-6 i hyper-IL-6 komórkami mysiego czerniaka B-78 i cyklofosfamidem
Table 2. Ratios of Th1/Th2 and Tc1/Tc2 T-cell subpopulations after vaccination with IL-6 and hyper-IL-6 gene modified B-78 melanoma cells and cyclophosphamide

Zaszczepione komórki		KONTROLA PBS		CYC - 100 mg/kg	
		Th1/Th2	Tc1/Tc2	Th1/Th2	Tc1/Tc2
B-78	5x10 ⁵ s.c.	1,07	0,97	1,09	1,12
B-78/IL-6	5x10 ⁵ s.c.	1,69	1,1	1,35	1,3
B-78/H6	5x10 ⁵ s.c.	1,44	1,08	1,16	1,25

Stosunek limfocytów Th1/Th2 i Tc1/Tc2

W grupach myszy, które zaszczepiono komórkami B-78/IL-6 zaobserwowano podwyższony stosunek subpopulacji limfocytów Th1/Th2

(1,69), natomiast w grupie zwierząt zaszczepionych komórkami B-78/H6 stosunek ten wyniósł 1,44.

Zastosowanie w kombinowanej terapii niskiej dawki CYC 100

mg/kg m.c. z komórkami B-78/IL-6 i B-78/H6 nie wpłynęło istotnie na zmianę stosunku limfocytów Th1/Th2 i Tc1/Tc2 w badanych grupach (tab. 2.). Ze względu na krótki czas przeżycia zwierząt w grupach, którym podano wyjściowe i modyfikowane genetycznie komórki B-78 oraz CYC w dawce 500 mg/kg m.c. (grupy IB, IIB, IIIB) nie oceniano stosunku subpopulacji limfocytów T: Th1/Th2 oraz Tc1/Tc2.

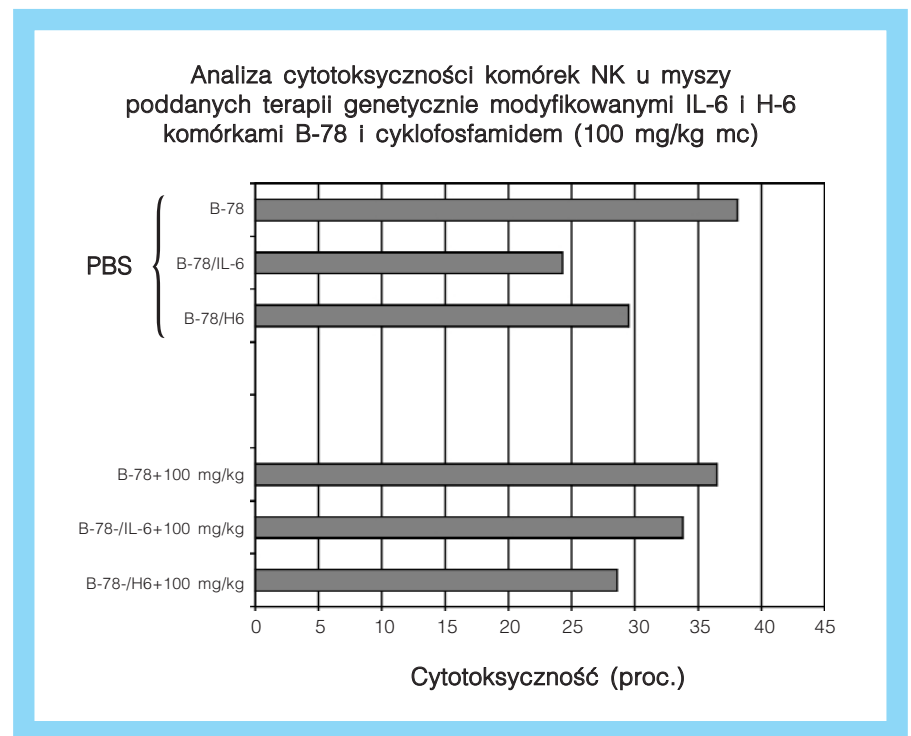
DYSKUSJA

Zidentyfikowanie i sklonowanie genów kodujących cytokiny immunostymulujące (IL-2, IL-6, IL-7, IL-12, IFN γ), cząsteczki kostymulujące (B7.1, B7.2), cząsteczki adhezyjne, chemokiny, czy antygeny zgodności tkankowej (MHC) umożliwiło stworzenie genetycznie modyfikowanych szczepionek komórkowych (GMTV). Czynniki immunostymulujące kodowane przez transgeny i produkowane przez komórki GMTV nie tylko aktywują na drodze parakrynowej komórki układu immunologicznego, ale dodatkowo zwiększają immunogenność samych komórek GMTV, poprzez modyfikację ich fenotypu (wzrost MHC klasy I i II) [21].

Wcześniejsze doniesienia literaturowe wykazały, że wprowadzenie genu dla IL-6 do komórek nowotworowych różnego pochodzenia hamowało rozwój guza, obniżało jego potencję formowania przerzutów oraz nasilało swoistą aktywację efektorowych komórek cytotoksycznych [22–25]. Transdukcja komórek mysiego włóknakomięsaka genem dla IL-6 znacząco zredukowała wzrost guza poprzez aktywację mechanizmów immunologicznych zależnych od komórek T [26]. W modelu odrzucania mysiego raka płuc Lewisa insercja cDNA dla IL-6 stymulowała długotrwałą odpowiedź immunologiczną, angażującą swoiste kłony cytotoksycznych komórek T CD8 oraz komórki NK. Wykazano ponadto, że indukcja odpowiedzi nie zależy od subpopulacji limfocytów T CD4+ [27].

W naszych wcześniejszych doświadczeniach wykazano, że podskórne zaszczepienie myszy genetycznie modyfikowanymi IL-6 słabo immunogennymi komórkami mysiego czerniaka B-78 istotnie wydłużyło czas przeżycia myszy, hamowało rozwój guza oraz indukowało swoistą, efektywną odpowiedź przeciwczeraniakową zależną od komórek CD4+. Wykazano również, że efektywność immunoterapii znacząco wzrosła, gdy zwierzęta zaszczepiono mieszaniną komórek B-78/IL-6 i komórek transdukowanych cDNA kodującym sIL-6R. Fluorocytometryczna analiza splenocytów izolowanych ze zwierząt, którym dostarczono kombinację komórek B78-/IL-6+B-78/sIL6-R wykazała podwyższoną ekspresję cytokin wewnątrzkomórkowych charakterystycznych dla subpopulacji komórek Th1 [15, 28, manuskrypt]. Ponadto, dzięki zastosowaniu dwucistronowych wektorów retrowirusowych podwójnej kopii (DCCMV), zawierających sekwencję *IRES*, uzyskano wysoką i stabilną ekspresję produktów transgenów IL-6 i sIL-6Rn zarówno na poziomie swoistego RNA, jak i funkcjonalnego białka. Warunkowało to efektywną stymulację subpopulacji limfocytów T gospodarza oraz indukcję swoistej i nieswoistej odpowiedzi przeciwczeraniakowej [29–31].

W przedstawionej pracy dokonano oceny wpływu cyklofosfamid na zahamowanie tumorigenności genetycznie modyfikowanych IL-6 i H-6 komórek mysiego czerniaka oraz dynamiki wzrostu guza *in vivo*. W tym celu zastosowano wyjściowe i genetycznie modyfikowane IL-6 i H-6 komórki linii ustalonej mysiego czerniaka B-78, którymi zaszczepiono myszy w kombinacji z PBS (kontrola) i CYC. Wykorzystanie policistronowego nośnika docelowych genów, wektora DCCMV, zapewniło wysoką i długotrwałą ekspresję transgenów na poziomie swoistego RNA oraz produkowanej interleukiny-6 oraz białka fuzyjnego H-6. H-6 jest heterodimerem, składającym się z IL-6



Ryc. 4. Cytotoksyczność nieswoista komórek NK izolowanych z krwi obwodowej myszy zaszczepionych wyjściowymi i genetycznie modyfikowanymi komórkami mysiego czerniaka B-78/IL-6 i B-78/H6 oraz cyklofosfamidem (100 mg/kg m.c.)

Fig. 4. Non-specific cytotoxicity of the peripheral blood NK to YAC-1/EGFP cells isolated from control mice and injected with gene modified B-78/IL-6 and B-78/H-IL-6 cells and cyclophosphamide

oraz rozpuszczalnego receptora dla IL-6, połączonych elastycznym łącznikiem polipeptydowym [32]. Wykazano, że białko fuzyjne H-6 jest 10–1 000 razy aktywniejsze niż kompleks pojedynczych białek IL-6 + sIL-6R oraz, że jego okres półtrwania w surowicy jest znacząco dłuższy, ze względu na zahamowanie internalizacji w komórkach docelowych [33]. Dowiedziono również wysoką aktywność proliferacyjną H-6 w stosunku do komórek hematopoetycznych szpiku oraz innych gp 130+ populacji komórkowych [34].

Stosunkowo niewiele wiadomo na temat aktywności przeciwnowotworowej białka hyper-IL-6. Wcześniejsza praca Ozbeka i wsp. wykazała, że chimeryczne białko H-6 może nasilać przeciwczeraniakową odpowiedź immunologiczną [35]. Podane podskórnie myszom C57BL/6 genetycznie modyfikowane genem H6 komórki mysiego czerniaka B16 zostały całkowicie odrzucone. Zaszczepienie myszy

transgenicznym FVB/BL/6 (stała ekspresja antagonisty dla receptora dla GM-CSF) komórkami B16/H6 doprowadziło tylko do częściowej eliminacji guza oraz zahamowania formowania przerzutów, co sugeruje udział, zależnych od GM-CSF wyspecjalizowanych komórek prezentujących antygen.

Przedstawione w pracy wyniki średniego czasu przeżycia zwierząt wykazały, że zaszczepienie myszy genetycznie modyfikowanymi komórkami B-78/H6 istotnie przedłużyło czas przeżycia w porównaniu z grupą kontrolną (B-78+PBS), a także z myszami, którym dostarczono komórki B-78/IL-6. Zastosowanie niskich dawek cyklofosfamid w kombinowanej terapii z komórkami B-78/IL-6 lub B-78/H6 doprowadziło do wydłużenia średniego czasu przeżycia zwierząt >60 dni u 100 proc. zwierząt. Ponadto wstrzyknięcie myszom komórek B-78/IL-6 lub B-78/IL-H6 oraz dostarczenie cyklofosfamid istotnie zahamowało dynamikę wzrostu czerniaka u badanych

zwierząt, w porównaniu z grupami, w których podano GMTV modyfikowane B-78/IL-6 i B-78/H6. W świetle doniesień literaturowych dwa niezależne mechanizmy mogą być zaangażowane w zahamowanie tumorogenności. Pierwszy jest prawdopodobnie oparty na bezpośredniej inhibicji aktywności proliferacyjnej komórek mysiego czerniaka [36, 37], drugi na zablokowaniu przez CYC aktywności subpopulacji limfocytów CD4+/CD25+, którym przypisuje się funkcję immunosupresyjną, promującą wzrost nowotworu [38, 39]. Nie wielkie różnice w kinetyce wzrostu guza pomiędzy myszami zaszczepionymi wyjściowymi komórkami B-78+PBS i B-78+100 mg/kg mc CYC wskazują raczej na udział drugiego z wymienionych mechanizmów.

Liczne badania wskazują na istotne znaczenie profilu uwalnianych cytokin na polaryzację odpowiedzi przeciwczeraniakowej, szczególnie w czasie prezentacji antygeny efektorowym komórkom T [40–42]. IL-6 uważana jest za jeden z najważniejszych immunomodulatorów regulujących orientację odpowiedzi immunologicznej poprzez indukcję efektorowych komórek Th1 lub Th2. Dowiedziono, że IL-6 indukowała różnicowanie naiwnych limfocytów T CD4+ w kierunku komórek efektorowych Th2 oraz silnie hamowała zależną od IL-12 polaryzację odpowiedzi immunologicznej w kierunku Th1 [43, 44]. Rola hyper-IL-6 w polaryzacji odpowiedzi przeciwczeraniakowej jest jak dotąd nieznana. W naszych badaniach wykazano, że zaszczepienie zwierząt GMTV-B-78/IL-6 oraz GMTV-B-78/H6 przesunęło profil odpowiedzi przeciwczeraniakowej w kierunku efektorowych komórek Th1 (GMTV-B-78/IL-6 – Th1: Th2 – 1,69; GMTV-B-78/H6-Th1: Th2 – 1,44). Z kolei zastosowanie kombinowanej, adoptywnej immunoterapii indukowało różnicowanie komórek efektorowych w kierunku limfocytów cytotoksycznych typu I. Analiza ekspresji wewnątrzkomórko-

wych cytokin w grupie myszy zaszczepionych komórkami B-78/IL-6 oraz B-78/H6 oraz cyklofosfamidem wykazała przesunięcie profilu subpopulacji limfocytów komórek T w kierunku efektorowych komórek cytotoksycznych Tc1 (B-78/IL-6 – Tc1: Tc2 – 1,3; B-78/H6 – 1,25 odpowiednio). Jest to zgodne z wcześniejszymi obserwacjami Chamoto i wsp. [45], którzy wykazali, że zastosowanie CYC w adoptywnej immunoterapii z użyciem izolowanych subpopulacji limfocytów Th1 nasiliło eradykację komórek chłoniaka A20 poprzez polaryzację odpowiedzi w kierunku komórek efektorowych Th1/Tc1.

Wyniki naszych badań potwierdzają przydatność kombinowanej immunoterapii z cyklofosfamidem w celu obniżenia tumorogenności czerniaka. Dalsze badania powinny wyjaśnić swoiste mechanizmy odpowiedzialne za zahamowanie wzrostu guza w mysim modelu odrzucania czerniaka, a także scharakteryzować swoiste subpopulacje komórkowe, biorące w nich udział. Szczególną uwagę należy poświęcić wpływowi H-6 na proliferację i kierunkowe różnicowanie komórek macierzystych i progenitorowych szpiku w subpopulacje komórkowe mogące mieć kluczowy wpływ na organizację przeciwczeraniakowej odpowiedzi immunologicznej.

PIŚMIENNICTWO

1. Nawrocki S, Mackiewicz A. *Terapia genowa nowotworów wyzwaniem XXI wieku*. Współczesna Onkologia 2000; 4: 190-4.
2. Stepkowski SM. *Molecular targets for existing and novel immunosuppressive drugs*. Expert Rev Mol Med 2000; 2: 1-23.
3. Young RC, Brady MF, Nieberg RK, et al. *Adjuvant treatment for early ovarian cancer: a randomized phase III trial of intraperitoneal 32P or intravenous cyclophosphamide and cisplatin – a gynecologic oncology group study*. J Clin Oncol 2003 Dec 1; 21 (23): 4350-5.
4. Fisher RI, Shah P. *Current trends in large cell lymphoma*. Leukemia 2003; 17 (10): 1948-60.
5. Notaro R, De Renzo A, De Rosa G, et al. *Multiple myeloma cured by*

- conventional chemotherapy: a report and a review*. Lymphoma 2002; 43 (4): 907-10.
6. Sandler AB. *Chemotherapy for small cell lung cancer*. Semin Oncol 2003; 30 (1): 9-25.
7. Rubio MT, Kim YM, Sachs T, et al. *Antitumor effect of donor marrow graft rejection induced by recipient leukocyte infusions in mixed chimeras prepared with nonmyeloablative conditioning: critical role for recipient-derived IFN-gamma*. Blood 2003; 102 (6): 2300-7.
8. Gold JE, Zachary DT, Osband ME. *Adoptive transfer of ex vivo-activated memory T-cell subsets with cyclophosphamide provides effective tumor-specific chemoimmunotherapy of advanced metastatic murine melanoma and carcinoma*. Int J Cancer 1995; 61 (4): 580-6.
9. Indrova M, Bubenik J, Mikyskova R, et al. *Chemoimmunotherapy in mice carrying HPV16-associated, MHC class I+ and class I-tumours: Effects of CBM-4A potentiated with IL-2, IL-12, GM-CSF and genetically modified tumour vaccines*. Int J Oncol 2003; 22 (3): 691-5.
10. Bass KK, Mastrangelo MJ. *Immunopotential with low-dose cyclophosphamide in the active specific immunotherapy of cancer*. Cancer Immunol Immunother 1998; 47 (1): 1-12.
11. Zhou H, Sequeira M, Goad ME, et al. *Efficacy and mechanisms of action of rmB7.2-Ig as an antitumor agent in combination with Adriamycin and Cytotoxin chemotherapy*. Clin Immunol 2001; 101 (3): 303-14.
12. Mitchell MS. *Immunotherapy as part of combinations for the treatment of cancer*. Int Immunopharmacol 2003; 3 (8): 1051-9.
13. Mitchell MS. *Combinations of anticancer drugs and immunotherapy*. Cancer Immunol Immunother 2003 Nov; 52 (11): 686-92.
14. Cao X, Zhang W, Wan T, et al. *Enhanced antitumor immune responses of IL-2 gene-modified tumor vaccine by combination with IL-1 and low dose cyclophosphamide*. J Exp Clin Cancer Res 1999; 18 (2): 173-9.
15. Mackiewicz A, Wiznerowicz M, Roeb E, et al. *Interleukin-6-type cytokines and their receptors for gene therapy of melanoma*. Ann N Y Acad Sci 1995; 762: 361-73.
16. Wiznerowicz M, Fong AZ, Hawley RG, Mackiewicz A. *Development of*

- a double-copy bicistronic retroviral vector for human gene therapy. *Adv Exp Med Biol* 1998; 451: 441-7.
17. Wiznerowicz M, Fong AZ, Mackiewicz A, Hawley RG. *Double-copy bicistronic retroviral vector platform for gene therapy and tissue engineering: application to melanoma vaccine development*. *Gene Ther* 1997; 4 (10): 1061-8.
 18. Gotze KS, Keller U, Rose-John S, Peschel C. *gp130-stimulating designer cytokine Hyper-interleukin-6 synergizes with murine stroma for long-term survival of primitive human hematopoietic progenitor cells*. *Exp Hematol* 2001; 29 (7): 822-32.
 19. Izzycki D, Gryska K, Grabarczyk P, et al. *Flow cytometric cytotoxicity assay with GFP gene modified target cells*. *Adv Exp Med Biol* 2001; 495: 429-34.
 20. *Immunofluorescent staining of intracellular cytokines for flow cytometric analysis*. Technical Protocols, Cytokine Analysis, BD Biosciences, BD Pharmingen, 2000; 1386.
 21. Wysocki PJ, Mackiewicz A. *Szczepionki czerniakowe*. *Współczesna Onkologia* 2003; 8: 626-9.
 22. Bubenik J, Simova J, Zeuthen J, et al. *Gene therapy of plasmocytoma: comparison of the therapeutic efficiency of tumor cells transduced with the interleukin-2, interleukin-4, or interleukin-6 genes*. *Folia Biol (Praha)* 1994; 40: 29-36.
 23. Tsuberi B, Naparstek E. *Modification of M1 cells by exogenous introduction of IL-6 gene: a model for gene therapy of acute and chronic myeloid leukemia in mice*. *Leukemia* 1995; 9 Suppl 1: S93-97.
 24. Cao X, Wang Q, Ju DW, et al. *Efficient induction of local and systemic antitumor immune response by liposome-mediated intratumoral co-transfer of interleukin-2 gene and interleukin-6 gene*. *J Exp Clin Cancer Res* 1999; 18: 191-200.
 25. Sun WH, Kreisle RA, Phillips AW, Ershler WB. *In vivo and in vitro characteristic of interleukin 6-transfected B16 melanoma cells*. *Cancer Res* 1992; 52: 5412-15.
 26. Mullen CA, Coale MM, Levy AT, et al. *Fibrosarcoma cells transduced with the IL-6 gene exhibited reduced tumorigenicity, increased immunogenicity, and decreased metastatic potential*. *Cancer Res* 1992; 52: 6020-4.
 27. Porgador A, Tzehoval E, Katz A, et al. *Interleukin 6 gene transfection into Lewis lung carcinoma tumor cells suppresses the malignant phenotype and confers immunotherapeutic competence against parental metastatic cells*. *Cancer Res* 1992; 52: 3679-86.
 28. Mackiewicz A, Wiznerowicz M, Roeb E, et al. *Soluble interleukin 6 receptor is biologically active in vivo*. *Cytokine* 1995; 7: 142-9.
 29. Izzycki D, Wiznerowicz M, Laciak M, et al. *Development of double copy dicistronic retroviral vectors for transfer and expression of glycosyltransferase genes*. *Adv Exp Med Biol* 435: 245-50.
 30. Wiznerowicz M, Fong AZ, Mackiewicz A, Hawley RG. *Double-copy bicistronic retroviral vector platform for gene therapy and tissue engineering: application to melanoma vaccine development*. *Gene Ther* 1997; 4 (10): 1061-8.
 31. Greene AL, Makriganis AP, Fitzpatrick L, Hoskin DW. *Anti-CD3-activated killer T cells: Interleukin-6 modulates the induction of major histocompatibility complex-unrestricted cytotoxicity and the expression of genes coding for cytotoxic effector molecules*. *J Interferon Cytokine Res* 1997; 17 (12): 727-37.
 32. Chebath J, Fischer D, Kumar A, et al. *Interleukin-6 receptor-interleukin-6 fusion proteins with enhanced interleukin-6 type pleiotropic activities*. *Eur Cytokine Netw* 1997; 8 (4): 359-65.
 33. Peters M, Blinn G, Solem F, et al. *In vivo and in vitro activities of the gp130-stimulating designer cytokine Hyper-IL-6*. *J Immunol* 1998; 161 (7): 3575-81.
 34. Fischer M, Goldschmitt J, Peschel C, et al. *I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion*. *Nat Biotechnol* 1997; 15 (2): 142-5.
 35. Ozbek S, Peters M, Breuhahn K, et al. *The designer cytokine hyper-IL-6 mediates growth inhibition and GM-CSF-dependent rejection of B16 melanoma cells*. *Oncogene* 2001; 20 (8): 972-9.
 36. Palomares T, Alonso-Varona A, Alvarez A, et al. *Interleukin-2 increases intracellular glutathione levels and reverses the growth inhibiting effects of cyclophosphamide on B16 melanoma cells*. *Clin Exp Metastasis* 1997; 15: 329-37.
 37. Kuwashima Y. *Cytomorphology of murine B16 melanoma in vivo after treatment with cyclophosphamide: evidence of "oncotic" cell death*. *Anticancer Res* 1996; 16: 2997-3000.
 38. Casares N, Arribillaga L, Sarobe P, et al. *CD4+/CD25+ regulatory cells inhibit activation of tumor-primed CD4+ T cells with IFN-gamma-dependent antiangiogenic activity, as well as long-lasting tumor immunity elicited by peptide vaccination*. *J Immunol* 2003; 171 (11): 5931-9.
 39. Wei WZ, Morris GP, Kong YC. *Anti-tumor immunity and autoimmunity: a balancing act of regulatory T cells*. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53 (2): 73-8.
 40. Muraile E, Leo O. *Revisiting the Th1/Th2 paradigm*. *Scand J Immunol* 1998; 47: 1-9.
 41. Coffman RL, von der Weid T. *Multiple pathway for the initiation of T helper 2 (Th2) responses*. *J Exp Med* 1997; 185: 373-5.
 42. Tsung K, Meko JB, Peplinski GR, et al. *IL-12 induces T helper 1-directed antitumor response*. *J Immunol* 1997; 158: 3359-65.
 43. Rincon M, Anguita J, Nakamura T, et al. *Interleukin (IL) -6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells*. *J Exp Med* 1997; 185: 461-9.
 44. La Flamme AC, Pearce EJ. *The absence of IL-6 does not affect Th2 cell development in vivo, but does lead to impaired proliferation, IL-2 receptor expression, and B cell responses*. *J Immunol* 1999; 162: 5829-37.
 45. Chamoto K, Kosaka A, Tsuji T, et al. *Critical role of the Th1/Tc1 circuit for the generation of tumor-specific CTL during tumor eradication in vivo by Th1-cell therapy*. *Cancer Sci* 2003; 94: 924-8.

ADRES DO KORESPONDENCJIdr med. **Dariusz Iżycki**

Zakład Immunologii Nowotworów
i Wielkopolskie Centrum Onkologii
ul. Garbary 15
61-866 Poznań
e-mail: dmizy@immuno.pl

*Praca finansowana przez KBN,
grant 4 PO 5 B 13714.*