

фектов транскраниальної магнітної стимуляції (ТМС) у крис. Биофизические и информационные технологии в медицине: Мат-лы конф., Одесса, ноябрь 2002. — Одесса, 2002. — С. 16.

4. Роль черной субстанции в противосудорожных и антиагрессивных эффектах диазепема при фармакологическом киндлинге / А. А. Шандра, Л. С. Годлевский, А. М. Мазарати, Р. Ф. Макулькин // *Нейрофизиология*. — 1990. — Т. 22, № 4. — С. 482-485.

5. Шандра А. А., Годлевский Л. С., Брусенцов А. И. Киндлинг и эпилептическая активность. — Одесса: Аст-принт, 1999. — 272 с.

6. Gee K. W., Hollinger M. A., Lillam E. K. The effect of seizure kindled

by subconvulsant doses of pentylenetetrazol on dopamine receptor binding and dopamine-sensitive adenylate cyclase in the rat // *Exp. Neurol.* — 2001. — Vol. 74, N 1. — P. 265-275.

7. Kalivas P. W. Modulation of dopamine neurons by neuropeptides // *Neuroendocrinol. Lett.* — 1997. — Vol. 9, N 3. — P. 131-137.

8. Kornhuber J., Kornhuber M. E. Presynaptic dopaminergic modulation of cortical input to the striatum // *Life Sci.* — 1996. — Vol. 39, N 8. — P. 669-674.

9. Role of N-methyl-D-aspartic acid and cholecystokinin receptors in apomorphine-induced aggressive behaviour in rats / A. Lang, J. Harro, A. Soosaar et al. // *Naunyn Schmiede-*

bergs Arch. Pharmacol. — 1995. — Vol. 351, N 4. — P. 363-370.

10. Loscher W., Czuczwar S. J. Studies on the involvement of dopamine D-1 and D-2 receptors in the anticonvulsant effect of dopamine agonists in various rodent models of epilepsy // *Eur. J. Pharmacol.* — 1986. — Vol. 128, N 1. — P. 55-65.

11. Shaikh M. B., Siegel A. Neuroanatomical and neurochemical mechanisms underlying amygdaloid control of defensive rage behavior in rats // *Braz. J. Med. Biol. Res.* — 1994. — Vol. 27, N 12. — P. 2759-2779.

12. Siegel A., Schubert K. Neurotransmitters regulating feline aggressive behavior // *Rev. Neuroci.* — 1995. — Vol. 6, N 1. — P. 47-61.

УДК 671-001.4-022.7:611.018

Є. В. Кобольєв

ВПЛИВ ІМПУЛЬСНОГО МАГНІТНОГО ПОЛЯ НА АГРЕСИВНУ ПОВЕДІНКУ КІНДЛІНГОВИХ ЩУРІВ ЗА УМОВ МОДУЛЯЦІЇ АКТИВНОСТІ ДОФАМІНЕРГІЧНОЇ СИСТЕМИ МОЗКУ

В дослідях на щурах лінії Вістар, у яких відтворювали модель фармакологічного кіндлінгу за допомогою повторного використання коразолу підпороговою дозою (25,0 мг/кг, внутрішньоочеревинно), спостерігалось зниження порогу розвитку агресивної поведінки в тестах бійок пар тварин на електродній підлозі. Під впливом L-DOPA (100 мг/кг, в/очер) спостерігалось підвищення порогу агресивної поведінки щурів, тимчасом як галоперидол (0,5 мг/кг, в/очер) спричинював підвищення агресивності. Також підвищення порогу агресивності спостерігалось під впливом імпульсного магнітного поля (20 імпульсів). Сполучний вплив 10 імпульсами магнітного поля і L-DOPA (50,0 мг/кг, в/очер), які при самостійному використанні не спричинювали ефекту, супроводжувалося зниженням вираженості агресивної поведінки кіндлінгових щурів.

Ключові слова: імпульсне магнітне поле, коразол, кіндлінг, дофамін, галоперидол, агресивна поведінка.

UDC 671-001.4-022.7:611.018

Ye. V. Kobolyev

EFFECTS OF IMPULSES OF MAGNETIC FIELD UPON AGGRESSIVE BEHAVIOR IN KINDLED RATS UNDER CONDITIONS OF DOPAMINERGIC SYSTEM FUNCTIONAL STATE MODULATION

In Wistar rats kindled via repeated intraperitoneal corazol administration (25.0 mg/kg) the reduction of the threshold of aggressive reactions precipitation was seen in test of pairs of animals fighting on electrode floor. L-DOPA (100 mg/kg, i.p.) caused the heightening of the threshold of aggressive reactions of rats while haloperidol (0.5 mg/kg, i.p.) induced increased aggressiveness of animals. 20 magnetic field applied to animal brain impulses were followed by heightening of the threshold of aggressive behavior. Combined application of 10 impulses of magnetic field and L-DOPA (50.0 mg/kg, i.p.), which were not effective when applied separately, caused the decreasing of aggressive behavior of pharmacologically kindled rats.

Key words: impulse magnetic field, corazol, kindling, dopamin, haloperidol, aggressive behavior.

УДК 616-006-097

Н. М. Храновська, канд. біол. наук,

Ю. Я. Гріневич, д-р мед. наук., проф.,

С. І. Ігнатоля

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБГРУНТУВАННЯ МОЖЛИВОСТЕЙ ВИКОРИСТАННЯ СИНГЕННИХ ДЕНДРИТНИХ КЛІТИН ДЛЯ ПОСИЛЕННЯ ПРОТИПУХЛИННОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ОРГАНІЗМУ

Інститут онкології АМН України

За останні два десятиріччя детальні дослідження клітинних та молекулярних механізмів імунологічних процесів разом із новітніми досліджен-

нями спектра пухлинних антигенів (ПА) дали поштовх швидкому розвитку імунології пухлин та нових напрямків у конструюванні методів специфіч-

ної імунотерапії раку [1]. Отримання базисних фактів щодо розпізнавання різних структур клітинами імунної системи через кооперацію з

антигенами головного комплексу гістосумісності (МНС) послужило основою для детального дослідження механізмів презентації антигену та ролі антигенпрезентуючих клітин (АПК) у формуванні специфічних імунних реакцій [2].

Основними АПК імунної системи ссавців є дендритні клітини (ДК). Сьогодні вважається, що тільки ці клітини здатні одночасно активувати первинну та вторинну специфічні імунні відповіді, ініціювати формування ефективного протипухлинного імунітету. Їх унікальною функцією є здатність надавати імуногенну форму антигенам, які, самі по собі, не спроможні викликати імунну відповідь *in vivo*, і, що є виключно важливим, — відмінити пухлиноспецифічну супресію цитотоксичних Т-лімфоцитів.

Експериментальними та клінічними дослідженнями доведено здатність сингенних/ аутологічних ДК виступати в якості ефективних природних ад'ювантів для протипухлинних вакцин. Загальні принципи створення таких вакцин полягають в отриманні ефекту представлення пептидних фрагментів ПА в комплексі з молекулами МНС та стимуляції пухлиноспецифічної імунної відповіді. Для цього функціонально активні ДК інкубують із пухлинними антигенами, що є специфічним для пухлини, і такі ДК, навантажені ПА, реінфузують хворому [3; 4].

У цьому напрямку розвиваються нові підходи до створення протипухлинних вакцин залежно від підтипу ДК, доз, схем застосування, методів навантаження ДК пухлинними антигенами та шляхів їх введення в організм.

Найчастіше в клініці використовують аутологічні ДК, отримані з кістковомозкових клітин-попередників або моноцитів периферичної крові, а

також іноді ДК алогенного походження від здорових донорів. Однак, механізм індукції протипухлинної відповіді алогенними ДК ще залишається недостатньо вивченим і потребує подальшого дослідження.

Досі все ще не визначені найбільш ефективні шляхи введення ДК. Для досягнення протипухлинного ефекту їх вводять внутрішньовенно, підшкірно, інтрадермалью в метастатичні лімфовузли або перитуморально. При цьому досягається регресія пухлини та метастазів або формується протективний імунітет проти повторного зараження летальними дозами пухлинних клітин [5; 6]. Разом з тим, відомо, що шляхи введення ДК суттєво впливають на їх розподіл у лімфоїдній тканині, і це необхідно враховувати у кожній конкретній клінічній ситуації [7].

Мета нашої роботи — шляхом селективного дослідження оцінити вплив ДК, навантажених або ненавантажених ПА, при різних шляхах їх введення на перебіг перещеплюваних пухлин у мишей.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проводилися на 300 мишах лінії СВА, розведених у віварії Інституту онкології АМН України, та 150 мишей лінії С57ВІ/6, розведених у віварії Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця, віком 2–2,5 міс. Як модель експериментальних пухлин використовували саркому 37 (S37) мишей (асцитна форма), що характеризується високим злоякісним перебігом, та метастазуючу гематогенним шляхом карциному Льюїс (КЛ) (штами, що перещеплюються за загальноприйнятою методикою в лабораторії штамів ІЕПОР ім. Р. Є. Кавецького НАН України). Клітини S37 кількістю $0,5 \times 10^6$ на мишу в

0,5 мл забуференого фізіологічного розчину (ЗФР) вводили мишам лінії СВА внутрішньочеревно (в/ч). Для індукції КЛ пухлинні клітини кількістю $2,5 \times 10^5$ на мишу перещеплювали мишам лінії С57ВІ/6 в стопу задньої кінцівки об'ємом 0,05 мл. На 36-ту добу після перещеплення пухлинних клітин тваринам ампутували кінцівку з розвинутою пухлиною на рівні колінного суглоба. Операцію проводили під ефірним наркозом.

Дендритні клітини отримували із селезінки мишей ліній СВА та С57ВІ/6 з дотриманням правил асептики за методикою [8], яка передбачає виділення ДК із суспензії спленоцитів за допомогою градієнта щільності 14,5%-го метризаміду.

Лізат клітин S37 отримували шляхом 5 циклів заморожування (-20°C)/відтаювання (37°C) 1×10^7 /мл пухлинних клітин з подальшим центрифугуванням протягом 25 хв при 8000 об/хв і використовували як ПА. До частини ДК на 4 год додавали лізат клітин S37 або КЛ, що містив 0,5 мг/мл білка, кількість якого визначали за методом Бредфорда.

Відомо, що в селезінці мишей виявляють 2 субпопуляції ДК: перша — зрілі ДК, що розташовані в білій пульпі, які швидко гинуть шляхом апоптозу при контакті з Т-лімфоцитами, друга — знаходиться в маргінальній зоні і може дозрівати під дією різних стимулів [9]. З метою ініціації кінцевого дозрівання таких ДК їх культивували протягом 18 год у 100 нг/мл ліпополісахариду (ЛПС) (з *Escherichia coli* 0111:B4, "Sigma", США).

Після цього ДК вводили досліджуванім тваринам кількістю 2×10^5 клітин на мишу внутрішньовенно (в/в) (в орбітальний венозний синус), підшкірно (п/ш) або внутрішньочеревно (в/ч). Навантажені пухлинними антигенами ДК застосовували в сингенній ПА

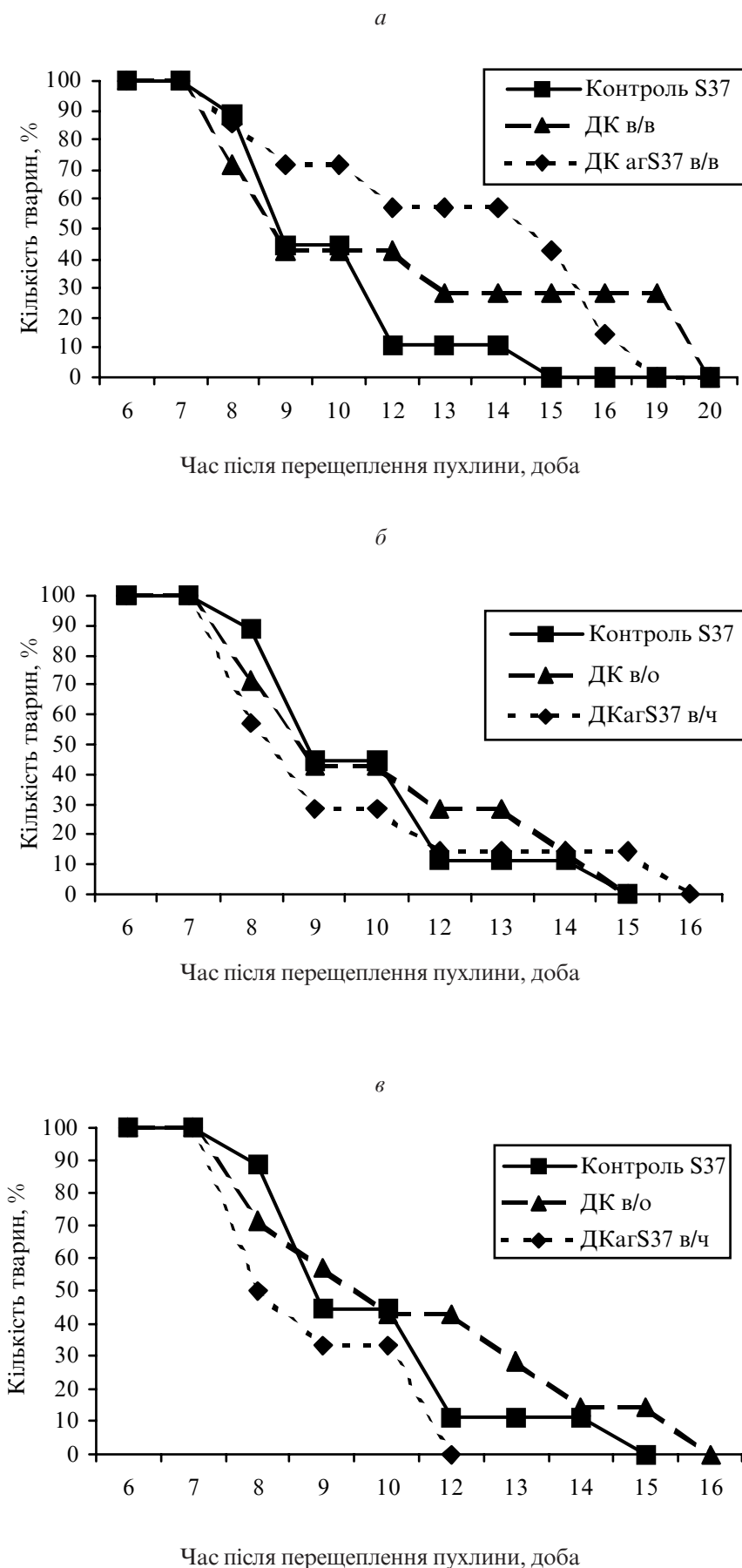


Рис. 1. Вплив сингенних ДК на тривалість життя мишей із саркомою 37

— перещеплювана пухлина системи.

Тварини були розподілені на групи таким чином:

1. Введення лише клітин S37 або КЛ. (Контроль S37 (КЛ)).

2. S37 (КЛ) + введення ДК, ненавантажених ПА, підшкірно (ДК, п/ш).

3. S37 (КЛ) + введення ДК, навантажених ПА, підшкірно (ДК агS37 (КЛ) п/ш).

4. S37 (КЛ) + введення ДК, ненавантажених ПА, внутрішньовенно, (ДК, в/в).

5. S37 (КЛ) + введення ДК, навантажених ПА, внутрішньовенно, (ДК агS37 (КЛ) в/в).

6. S37 + введення ДК, ненавантажених ПА, внутрішньочеревно, (ДК, в/ч).

7. S37 + введення ДК, навантажених ПА, внутрішньочеревно (ДК агS37 в/ч).

Протипухлинну ефективність ДК визначали у подальших експериментах: вводили сингенні ДК на 2-гу добу після перещеплення S37 (I експеримент).

Для дослідження впливу ДК на протипухлинну резистентність організму сингенні ДК вводили за 7, 14 та 21 добу до перещеплення S37 (II експеримент).

З метою вторинної профілактики метастазування сингенні ДК вводили на 3-тю добу після хірургічного видалення КЛ (III експеримент).

У рамках експериментів підраховували середню тривалість життя тварин, досліджували медіану їх виживаності (доба з моменту перещеплення пухлини, на яку виживаність тварин становить 50 %). Протиметастатичну ефективність ДК оцінювали, порівнюючи кількість та об'єм метастазів у легенях у контрольній та досліджуваних групах тварин з видаленою КЛ (дослідження проводили на 14-ту добу після операції).

Результати експериментів обробляли статистично з використанням t-критерію Стьюдента. Вірогідними вважали значення при рівнях $P < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення

Одним із завдань нашого дослідження було оцінити протипухлинну ефективність ДК при різних шляхах їх введення у тварин з перещеплюваною пухлиною.

Як показали результати досліджень I експерименту, найбільш виражений протипухлинний ефект досягається за умови в/в введення сингенних ДК (рис. 1). Так, введення невантажених та навантажених протипухлинними антигенами ДК приводило до подовження тривалості життя мишей з S37 на 46 та 29 % відповідно, $P < 0,05$. Медіани виживаності тварин становили 13 та 16 днів порівняно з 9 днями в контролі. Слід зазначити, що ніякої протипухлинної ефективності не було зареєстровано при п/ш та в/ч введенні ДК як навантажених, так і невантажених ПА. При в/ч введенні ДК тривалість життя тварин навіть дещо скорочувалася порівняно з контролем, особливо у разі застосування ДК, навантажених ПА (на 11 %). Виходячи з цього, у подальших дослідженнях в/ч шлях введення ДК нами не застосовувався.

Таким чином, на моделі S37 у мишей лінії СВА показано, що ДК сингенного походження проявляють протипухлинну активність лише при їх в/в застосуванні.

З метою дослідження можливості ДК формувати або посилювати протипухлинну резистентність організму тварин була проведена наступна II серія експериментів, у рамках якої мишам лінії СВА в/в або п/ш вводили ДК сингенного походження за 7, 14 або 21 добу до в/ч перещеплення S37.

При цьому формування протективного протипухлинного імунітету було зареєстровано знову лише при в/в застосуванні ДК. Слід зазначити, що введення ДК за 7 діб до перещеплення пухлини приводило

до збільшення тривалості життя тварин однаковою мірою як у разі застосування ДК, навантажених ПА, так і у разі невантажених, і, в середньому становило 41 % по відношенню до тривалості життя мишей у контролі, а медіана виживаності — 44 доби порівняно з 22 добами. При введенні ДК за 14 та 21 добу до перещеплення S37 посилення протипухлинної резистентності організму зареєстровано лише у разі застосування ДК, навантажених ПА. Так, збільшення тривалості життя тварин становило 22 та 7 % при застосуванні ДК за 14 та 21 добу до перещеплення S37 відповідно.

Навпаки, п/ш введення сингенних ДК супроводжувалося зменшенням тривалості життя тварин: у середньому — на 13 % у разі застосування ДК, невантажених лізатом пухлинних клітин, при застосуванні навантажених ДК — на 21 %. Таку ж тенденцію мали і показники медіани виживаності мишей.

Аналогічну закономірність дії ДК нами було відмічено і на моделі метастазуючої великої пухлини, коли їх вводили з метою попередження розвитку

гематогенного метастазування КЛ у легені після хірургічного видалення первинної пухлини (III експеримент) (рис. 2). Так, найбільшу антиметастатичну ефективність мало в/в введення ДК, навантажених ПА, — ІГМ становив 49 %. При в/в введенні невантажених ПА ДК зареєстровано менш виражене гальмування метастатичного процесу: ІГМ становив лише 25 %, однак в обох випадках різниця величин була невірогідною ($P > 0,05$) за рахунок значного відхилення даних від середнього значення.

Підшкірне введення ДК як навантажених, так і невантажених ПА, обумовило зворотний ефект. Разом із тенденцією до збільшення кількості метастатичних вузлів, що розвинулися в легенях, було зареєстровано збільшення їх об'єму в 2,7 та 2,0 разу відповідно ($P < 0,05$).

Таким чином, максимальна протипухлинна та антиметастатична резистентність у мишей з S37 та КЛ формується під впливом сингенних ДК, навантажених ПА, за умови їх в/в введення. Такі ДК при в/в введенні за 7, 14 або 21 добу (максимально — за 7 діб) до

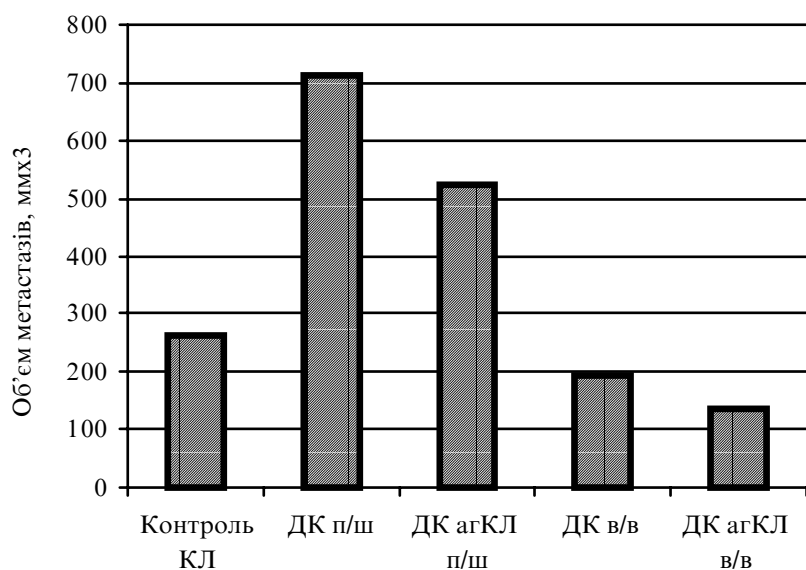


Рис. 2. Вплив сингенних ДК на об'єм метастазів КЛ у легенях у мишей С57Bl/6 після хірургічного видалення первинної пухлини

або на 2-гу добу після перещеплення S37 спричиняють формування протипухлинного імунітету, що проявляється у подовженні тривалості життя тварин з пухлиною, а при введенні на 3-тю добу після видалення первинної пухлини призводять до гальмування розвитку гематогенного метастазування в легені.

Отримані результати формування більш виражених проти- або пропухлинних реакцій в організмі під впливом сингенних ДК, навантажених ПА, порівняно з ненавантаженими, відповідно при в/в або п/ш їх введенні як на моделі S37, так і КЛ свідчать про їх антигенспецифічний характер. Швидше за все, ефективність ДК визначається їх міграційною поведінкою, зумовленою шляхом введення [7].

Результати проведених досліджень дозволяють зробити висновок про доцільність використання ДК сингенного

(аутологічного) походження при їх навантаженні ПА з метою підвищення ефективності хірургічного лікування онкологічних хворих. Найбільший ефект посилення протипухлинної резистентності може досягатися при введенні ДК в/в.

ЛІТЕРАТУРА

1. Rosenberg S. A. A new era of cancer immunotherapy: Converting theory to performance // *CA: Cancer J. Clin.* — 1999. — Vol. 49, N 2. — P. 70-73.
2. Novakovic S., Novakovic B. J. A brief overview of the tumor vaccines through the last decade // *Radiol. Oncol.* — 2002. — Vol. 36, N 1. — P. 53-62.
3. Москалева Е. Ю., Северин С. Е. Перспективы создания противоопухолевых вакцин с использованием дендритных клеток человека // *Иммунология.* — 2002. — № 1. — С. 8-15.
4. Гриневич Ю. А., Храповская Н. Н. Дендритные клетки и перспективы их использования в иммунотерапии больных со злокачественными новообразованиями (обзор литературы) // *Журн. АМН Украины.* — 2003. — Т. 9, № 4. — С. 736-753.

5. *Genetically modified dendritic cells prime autoreactive T cells through a pathway in dependent of CD40L and interleukin 12: Implications for cancer vaccines* / Yonghong Wan, J. Bramson, A. Pilon et al. // *Cancer Res.* — 2000. — Vol. 60, N 12. — P. 3247-3253.

6. *Dendritic cells/peptide cancer vaccines: clinical responsiveness and epitope spreading* / E. Ranieri, L. S. Kiersbead, H. Zarour, J. M. Kikwood // *Immunol. Invest.* — 2000. — Vol. 29, N 2. — P. 121-125.

7. *Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies* / M. A. Morse, R. E. Coleman, G. Akabani et al. // *Cancer Res.* — 1999. — Vol. 59, N 1. — P. 56-58.

8. *The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: Investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells* / D. Vremec, M. Zorbas, R. Scollay et al. // *J. Exp. Med.* — 1992. — Vol. 176. — P. 47-58.

9. *Dendritic cell maturation and antigen presentation in the absence of invariant chain* / P. Rovere, V. S. Zimmermann, F. Forquet et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1998. — Vol. 95, N 3. — P. 1067-1072.

УДК 616-006-097

Н. М. Храповська, Ю. Я. Гриневич, С. І. Ігнатюла

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБГРУНТУВАННЯ МОЖЛИВОСТЕЙ ВИКОРИСТАННЯ СИНГЕННИХ ДЕНДРИТНИХ КЛІТИН ДЛЯ ПОСИЛЕННЯ ПРОТИПУХЛИННОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ОРГАНІЗМУ

Представлені результати експериментальних досліджень протипухлинної та антиметастатичної ефективності сингенних селезінкових ДК на моделях перещеплюваних пухлин у мишей. Виявлено, що максимальну протипухлинну й антиметастатичну ефективність мають ДК, навантажені сингенним пухлинним антигеном (ПА), за умови їх внутрішньовенного (в/в) введення. У разі превентивного в/в введення відносно перещеплення пухлини такі ДК сприяють формуванню протипухлинного імунітету у тварин, що проявляється подовженням тривалості їх життя.

Ключові слова: дендритні клітини, карцинома Льюїс, саркома 37, протипухлинна й антиметастатична ефективність.

UDC 616-006-097

N. M. Khranovska, Yu. Ya. Grinevich, S. I. Ignatolya

EXPERIMENTAL GROUND OF POSSIBILITIES FOR USE OF SYNGENEIC DENDRITIC CELLS FOR POTENTIATION OF ANTICANCER RESISTANCE OF ORGANISM

Findings of experimental studies of anticancer and antimetastatic efficacy of syngeneic splenic dendritic cells (DC) on models of inoculated tumors in mice are presented. It is found that maximal anticancer and antimetastatic effect have DC, loaded with syngeneic tumor antigen at their intravenous (i/v) administration. In case of their preventive i/v administration respectively to inoculation of tumor such DC promote formation of protective anticancer immunity in animals with tumors that results in prolongation of their survival.

Key words: dendritic cells, Lewis' carcinoma, sarcoma 37, anticancer and antimetastatic efficacy.