

INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. L. HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK



ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr inż. Jagoda Mierzejewska

**Wpływ zastosowania komórek dendrytycznych
transdukowanych lentiwirusowymi nośnikami genów
IL-12 i IL-18 na aktywację odpowiedzi przeciwnowotworowej
w modelu mysiego raka jelita grubego MC38**

PROMOTOR

dr hab. Elżbieta Pajtasz-Piasecka, prof. PAN

Zakład Onkologii Doświadczalnej
Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej

Wrocław, 2022 rok

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania:

*Pani Promotor, **prof. Elżbiecie Pajtasz-Piaseckiej***

za wysiłek włożony w rozwój moich umiejętności,

za cierpliwość, wyrozumiałość, poświęcony czas

oraz za nieocenioną pomoc w przygotowaniu niniejszej rozprawy.

dr hab. Joannie Rossowskiej

za pomoc i dzielenie się swoją wiedzą i umiejętnościami.

Podziękowania kieruję również do moich Koleżanek

Agnieszki Szczygieł, Katarzyny Węgierek-Ciury,

Natalii Anger-Góry i Anny Wróblewskiej

za otrzymaną pomoc, motywację do dalszego działania,

życzliwość i wspaniałe towarzystwo.

Moim Najbliższym

za wyrozumiałość, cierpliwość i wsparcie.

Badania były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu grantowego „Preludium” pt.:

„Wpływ zastosowania komórek dendrytycznych kotransdukowanych lentiwirusowym nośnikiem genów IL-12 i IL-18 na aktywację odpowiedzi przeciwnowotworowej w modelu mysiego raka jelita grubego MC38”

nr projektu: 2015/17/N/NZ4/02834

kierownik projektu: mgr inż. Jagoda Mierzejewska

opiekun naukowy projektu: dr hab. Elżbieta Pajtasz-Piasecka, prof. PAN

W ramach pracy opublikowano:

Mierzejewska J, Węgierek-Ciura K, Rossowska J, Szczygieł A, Anger-Góra N, Szermer-Olearnik B, Geneja M, Pajtasz-Piasecka E. *The Beneficial Effect of IL-12 and IL-18 Transduced Dendritic Cells Stimulated with Tumor Antigens on Generation of an Antitumor Response in a Mouse Colon Carcinoma Model.* J Immunol Res. 2022 Mar 25;2022:7508928.

Spis treści

Spis treści.....	5
Wykaz skrótów	9
Streszczenie	11
Abstract	12
1. Wstęp	13
1.1. Komórki dendrytyczne jako profesjonalne komórki prezentujące antygen	13
1.1.1. Biologia komórek dendrytycznych.....	13
1.1.2. Migracja komórek dendrytycznych.....	15
1.2. Aktywacja limfocytów T przez komórki dendrytyczne.....	16
1.2.1. Polaryzacja odpowiedzi komórkowej przez komórki dendrytyczne	17
1.2.1.1. <i>Limfocyty Th1 i interferon γ</i>	17
1.2.1.2. <i>Limfocyty Th2 i interleukina 4</i>	18
1.2.1.3. <i>Limfocyty Treg i interleukina 10</i>	19
1.2.1.4. <i>Limfocyty T cytotoksyczne (CTL) i mechanizmy cytotoksyczności limfocytów</i>	20
1.2.1.5. <i>Komórki NK</i>	21
1.3. Rola komórek układu odpornościowego w procesie nowotworzenia	21
1.3.1. Wpływ mikrośrodowiska nowotworu na funkcje komórek dendrytycznych.....	23
1.3.1.1. <i>Komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego</i>	24
1.3.1.2. <i>Limfocyty T regulatorowe</i>	24
1.3.1.3. <i>Makrofagi związane z nowotworem</i>	25
1.4. Rola IL-12 i IL-18 w zwalczaniu nowotworu	26
1.4.1. Interleukina 12 i receptor dla IL-12.....	26
1.4.2. Interleukina 18 i receptor dla IL-18.....	27
1.4.3. Aktywność IL-12 i IL-18 oraz zastosowanie tych cytokin w terapii przeciwnowotworowej	29
1.5. Terapia przeciwnowotworowa.....	31
1.5.1. Wykorzystanie komórek dendrytycznych w immunoterapii.....	31
1.5.1.1. <i>Wykorzystanie wektorów lentiwirusowych do modyfikacji komórek dendrytycznych</i>	33
1.5.2. Immunomodulujące właściwości cyklofosfamidu	34
2. Założenia i cel pracy	37
3. Materiały i metody	39
3.1. Materiały	39
3.1.1. Model zwierzęcy	39
3.1.2. Linie komórkowe.....	39
3.1.3. Plazmidy lentiwirusowe	40
3.1.4. Podłoża hodowlane.....	40
3.1.5. Płyny, odczynniki i czynniki wzrostowe.....	41
3.1.6. Komercyjne zestawy odczynników	42
3.1.7. Przeciwciała monoklonalne stosowane do oznaczeń metodą cytometrii przepływowej.	44
3.2. Metody.....	46
3.2.1. Prowadzenie hodowli komórek eukariotycznych <i>in vitro</i> oraz <i>ex vivo</i>	46

3.2.2.	Izolacja splenocytów ze śledzion pobranych od zdrowych myszy szczepu C57BL/6/J	46
3.2.3.	Przygotowanie lizatu z komórek nowotworowych	46
3.2.4.	Produkcja i zagęszczanie wektorów lentiwirusowych	47
3.2.4.1.	<i>Produkcja wektorów lentiwirusowych</i>	47
3.2.4.2.	<i>Zagęszczanie wektorów lentiwirusowych</i>	47
3.2.4.3.	<i>Określenie miana zagęszczonych wektorów lentiwirusowych</i>	47
3.2.5.	Przygotowanie szczepionek komórkowych na bazie modyfikowanych komórek dendrytycznych pochodzenia szpikowego	48
3.2.5.1.	<i>Izolacja i hodowla komórek dendrytycznych pochodzenia szpikowego w warunkach ex vivo</i>	48
3.2.5.2.	<i>Transdukcja komórek dendrytycznych pochodzenia szpikowego uzyskanych w warunkach ex vivo</i>	49
3.2.5.3.	<i>Stymulacja transdukowanych komórek dendrytycznych antygenami nowotworowymi</i>	49
3.2.6.	Oznaczenie poziomu ekspresji genów IL-12 i IL-18 w komórkach szczepionkowych metodą Real-Time PCR.....	51
3.2.6.1.	<i>Izolacja całkowitego RNA z komórek</i>	51
3.2.6.2.	<i>Określenie stężenia i czystości RNA</i>	51
3.2.6.3.	<i>Reakcja odwrotnej transkrypcji</i>	52
3.2.6.4.	<i>Reakcja PCR w czasie rzeczywistym</i>	52
3.2.7.	Określenie stężenia IL-12 i IL-18 w nadsączach znad hodowli komórek szczepionkowych metodą ELISA.....	52
3.2.8.	Oznaczenie poziomu zróżnicowania komórek szczepionkowych metodą cytometrii przepływowej	54
3.2.9.	Ocena zdolności komórek dendrytycznych transdukowanych genami IL-12 i/lub IL-18 oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi do pierwotnego pobudzenia komórek śledzionowych.....	54
3.2.9.1.	<i>Mieszana hodowla komórek dendrytycznych z komórkami śledzionowymi</i>	54
3.2.9.3.	<i>Ocena aktywności cytotoksycznej stymulowanych komórek śledzionowych metodą cytometrii przepływowej</i>	55
3.2.9.4.	<i>Ocena stężenia cytokin w nadsączach znad mieszanej hodowli metodą ELISA</i> ..	56
3.2.10.	Analiza zdolności modyfikowanych komórek dendrytycznych do naciekania tkanki nowotworowej oraz migracji do wartowniczych węzłów chłonnych	56
3.2.10.1.	<i>Schemat doświadczenia in vivo</i>	57
3.2.10.2.	<i>Wszczepienie komórek nowotworowych</i>	58
3.2.10.3.	<i>Przygotowanie komórek szczepionkowych znakowanych barwnikiem CFDA-SE</i>	58
3.2.10.4.	<i>Określenie zdolności komórek szczepionkowych do infiltrowania tkanki nowotworowej i migracji do wartowniczych węzłów chłonnych</i>	59
3.2.11.	Ocena kinetyki indukowania odpowiedzi przeciwnowotworowej przez komórki szczepionkowe.....	59
3.2.11.1.	<i>Określenie wielkości populacji komórek limfoidalnych i mieloidalnych w guzach i wartowniczych węzłach chłonnych metodą cytometrii przepływowej</i>	60

3.2.11.2.	<i>Określenie wielkości populacji komórek limfoidalnych i mieloidalnych wśród splenocytów metodą cytometrii przepływowej</i>	61
3.2.11.3.	<i>Restymulacja komórek śledzionowych</i>	62
3.2.11.3.3.	<i>Ocena aktywności restymulowanych splenocytów</i>	62
3.2.12.	<i>Określenie efektu przeciwnowotworowego immunoterapii z zastosowaniem komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi</i>	63
3.2.12.1.	<i>Schemat doświadczenia immunoterapeutycznego</i>	63
3.2.12.2.	<i>Przygotowanie szczepionek na bazie modyfikowanych komórek dendrytycznych</i>	64
3.2.12.3.	<i>Określenie wielkości populacji komórek limfoidalnych i mieloidalnych w guzach i śledzionach metodą cytometrii przepływowej</i>	64
3.2.12.4.	<i>Określenie wielkości populacji komórek limfoidalnych i mieloidalnych w wartowniczych węzłach chłonnych metodą cytometrii przepływowej</i>	66
3.2.12.5.	<i>Ocena aktywności restymulowanych komórek śledzionowych</i>	66
3.2.13.	<i>Określenie efektu przeciwnowotworowego chemioimmunoterapii z zastosowaniem cyklofosfamidu i komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi</i>	67
3.2.13.1.	<i>Schemat doświadczenia chemioimmunoterapeutycznego</i>	67
3.2.14.	<i>Analiza statystyczna</i>	67
4.	Wyniki	69
4.1.	Charakterystyka komórek dendrytycznych transdukowanych do produkcji cytokin	70
4.1.1.	<i>Ocena skuteczności transdukcji komórek dendrytycznych</i>	70
4.1.2.	<i>Ocena wpływu transdukcji genami cytokin na poziom zróżnicowania komórek dendrytycznych</i>	72
4.1.3.	<i>Ocena zdolności komórek dendrytycznych transdukowanych genami IL-12 i/lub IL-18 oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi do indukowania swoistej odpowiedzi komórkowej w warunkach <i>ex vivo</i></i>	74
4.1.4.	<i>Podsumowanie</i>	77
4.2.	Charakterystyka funkcjonalna komórek dendrytycznych transdukowanych do produkcji cytokin	78
4.2.1.	<i>Ocena zdolności komórek szczepionkowych do naciekania tkanki nowotworowej oraz migracji do wartowniczych węzłów chłonnych</i>	78
4.2.2.	<i>Kinetyka indukowania odpowiedzi przeciwnowotworowej w wyniku jednokrotnego podania komórek dendrytycznych transdukowanych genami IL-12 i/lub IL-18</i>	83
4.2.2.1.	<i>Ocena nacieku subpopulacji komórek limfoidalnych i mieloidalnych do tkanki nowotworowej</i>	84
4.2.2.2.	<i>Analiza zmian odsetka komórek limfoidalnych i mieloidalnych w wartowniczych węzłach chłonnych</i>	92
4.2.2.3.	<i>Analiza fenotypowa i funkcjonalna komórek śledzionowych</i>	100
4.2.3.	<i>Kinetyka indukowania odpowiedzi przeciwnowotworowej w wyniku jednokrotnego podania komórek dendrytycznych transdukowanych genami IL-12 i/lub IL-18 oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi</i>	107
4.2.3.1.	<i>Ocena nacieku subpopulacji komórek limfoidalnych i mieloidalnych do tkanki nowotworowej</i>	107

4.2.3.2.	<i>Analiza zmian odsetka komórek limfoidalnych i mieloidalnych w wartowniczych węzłach chłonnych.....</i>	115
4.2.3.3.	<i>Analiza zmian odsetka komórek limfoidalnych i mieloidalnych w śledzionie</i>	121
4.2.4.	Porównanie skuteczności działania szczepionek.....	127
4.3.	Ocena efektu przeciwnowotworowego immunoterapii z zastosowaniem komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi.....	132
4.3.1.	Wzrost guzów MC38 u myszy poddanych immunoterapii	132
4.3.2.	Ocena miejscowej odpowiedzi przeciwnowotworowej u myszy poddanych immunoterapii.....	134
4.3.2.1.	<i>Ocena zmian zachodzących w tkance nowotworowej.....</i>	134
4.3.2.2.	<i>Ocena zmian zachodzących w wartowniczych węzłach chłonnych</i>	145
4.3.3.	Ocena ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej u myszy poddanych immunoterapii.....	153
4.3.3.1.	<i>Subpopulacje komórek limfoidalnych w śledzionach uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.....</i>	155
4.3.3.2.	<i>Subpopulacje komórek mieloidalnych w śledzionach uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.....</i>	159
4.3.3.3.	<i>Aktywność restymulowanych splenocytów uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii</i>	161
4.3.4.	Podsumowanie.....	167
4.4.	Ocena efektu przeciwnowotworowego chemioimmunoterapii z zastosowaniem cyklofosfamidu i komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi.....	170
4.4.1.	Wzrost guzów MC38 u myszy poddanych chemioimmunoterapii	170
4.4.2.	Ocena miejscowej odpowiedzi przeciwnowotworowej u myszy poddanych chemioimmunoterapii.....	172
4.4.2.1.	<i>Ocena zmian zachodzących w tkance nowotworowej.....</i>	172
4.4.2.2.	<i>Ocena zmian zachodzących w wartowniczych węzłach chłonnych</i>	179
4.4.3.	Ocena ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej u myszy poddanych chemioimmunoterapii.....	183
4.4.3.1.	<i>Subpopulacje komórek limfoidalnych w śledzionach uzyskanych od myszy poddanych chemioimmunoterapii</i>	183
4.4.3.2.	<i>Subpopulacje komórek mieloidalnych w śledzionach uzyskanych od myszy poddanych chemioimmunoterapii</i>	186
4.4.3.3.	<i>Aktywność restymulowanych splenocytów uzyskanych od myszy poddanych chemioimmunoterapii.....</i>	187
4.4.4.	Podsumowanie.....	190
4.5.	Rekapitulacja wyników	192
5.	Dyskusja.....	195
6.	Wnioski	207
Spis rycin i tabel		208
Ryciny		208
Tabele		213
Piśmiennictwo		215

Wykaz skrótów

- APC** (ang. *antigen presenting cells*) – komórki prezentujące antygen;
- CCL** (ang. *CC chemokine ligand*) – chemokine CC;
- CCR** (ang. *CC chemokine receptor*) – receptor chemokin CC;
- CD** (ang. *cluster of differentiation*) – kompleks różnicowania;
- cDC** (ang. *conventional/classical dendritic cell*) – konwencjonalne/klasyczne komórki dendrytyczne;
- CDP** (ang. *common DC progenitor*) – wspólna komórka progenitorowa DC;
- CTLA-4** (ang. *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*);
- CXCL** (ang. *CXC chemokine ligand*) – chemokine CXC;
- DAMP** (ang. *damage-associated molecular patterns*) – wzorce molekularne związane z uszkodzeniem;
- DAPI** (ang. *4',6-diamidino-2-phenylindole*) – 4',6-diamidyno-2-fenylindyol;
- DC** (ang. *dendritic cell*) – komórka dendrytyczna;
- DMEM** (ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) – podłoże hodowlane;
- EDTA** (ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*) – kwas etylenodiaminotetraoctowy;
- ELISA** (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) – test immunoenzymatyczny;
- FasL** (ang. *Fas ligand*) – ligand Fas;
- FBS** (ang. *fetal bovine serum*) – płodowa surowica bydlęca;
- FDA** (ang. *Food and Drug Administration*) – amerykańska Agencja Żywności i Leków;
- GM-CSF** (ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów;
- HSC** (ang. *hematopoietic stem cell*) – hematopoetyczna komórka macierzysta;
- i.c.** (ang. *isotype control*) – kontrola izotypowa;
- IDO** (ang. *indoleamine 2,3-dioxygenase*) – 2,3-dioksygenaza indoloaminy;
- IFN** (ang. *interferon*) – interferon;
- IL** (ang. *interleukin*) – interleukina;
- IL-10R** – receptor IL-10;
- IL-12R** – receptor IL-12;
- Pre-IL-18** – prekursor IL-18;
- IL-18R** – receptor IL-18;
- JAK1** (ang. *Janus-activated kinase 1*) – kinaza Janusowa 1;
- LV** (ang. *lentivirus*) – lentiwirus;
- M-CSF** (ang. *macrophage colony-stimulating factor*) – czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów;
- MDSC** (ang. *myeloid-derived suppressor cell*) – komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego;
- MHC** (ang. *major histocompatibility complex*) – główny układ zgodności tkankowej;
- M-MDSC** (ang. *monocytic MDSC*) – monocytarne MDSC;
- NK** (ang. *natural killer cell*) – naturalna komórka cytotoksyczna;

- NKT** (ang. *natural killer T cell*) – naturalna komórka cytotoksyczna mająca cechy limfocytu T;
- p.t.** (ang. *peritumorally*) – okołoguzowo;
- PAP** (ang. *prostatic acid phosphatase*) – kwaśna fosfataza prostaty;
- PBS** (ang. *phosphate-buffered saline*) – zbuforowany roztwór soli fizjologicznej;
- PD-1** (ang. *programmed death receptor 1*) – receptor 1 programowanej śmierci;
- pDC** (ang. *plasmacytoid DC*) – plazmocytoidalne DC;
- PD-L** (ang. *programmed death ligand*) – ligand receptora programowanej śmierci;
- PEG** (ang. *polyethylene glycol*) – glikol polietylenowy;
- PEI** (ang. *polyethylenimine*) – polietylenoinina;
- PI** (ang. *propidium iodide*) – jodek propidyny;
- PMA** (ang. *phorbol 12-myristate 13-acetate*) – 12- mirystynian, 13-octan forbolu;
- PMN-MDSC** (ang. *polymorphonuclear MDSC*) – granulocytarne MDSC;
- PRR** (ang. *pattern-recognition receptors*) – receptory rozpoznające wzorce;
- RNS** (ang. *reactive nitrogen species*) – reaktywne formy tlenu;
- ROS** (ang. *reactive oxygen species*) – reaktywne formy tlenu;
- RPMI** (ang. *Roswell Park Memorial Institute*) – podłoże hodowlane;
- SIN** (ang. *self-inactivating vectors*) wektor samoinaktywujący;
- s.c.** (ang. *subcutaneously*) – podskórnice;
- STAT** (ang. *signal transducer and activator of transcription*) – transductor sygnału i aktywator transkrypcji;
- TAA** (ang. *tumor associated antigens*) – antygeny związane z nowotworem;
- TAg** (ang. *tumor antigens*) – antygeny nowotworowe obecne w lizacie komórek MC38;
- TAM** (ang. *tumor-associated macrophages*) – makrofagi związane z nowotworem;
- TCR** (ang. *T cell receptor*) – receptor limfocytu T;
- TGF- β** (ang. *transforming growth factor β*) – transformujący czynnik wzrostu β ;
- TGI** (ang. *tumor growth inhibition*) – zahamowanie wzrostu nowotworu;
- Th** (ang. *T helper*) – limfocyt T pomocniczy;
- TLR** (ang. *Toll like receptor*) – receptor Toll-podobny;
- TMB** (ang. *3,3',5,5'-tetramethylbenzidine*) – tetrametylobenzydina;
- TME** (ang. *tumor microenvironment*) – mikrośrodowisko nowotworu;
- TNF** (ang. *tumor necrosis factor*) – czynnik martwicy nowotworu;
- TRAIL** (ang. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) – ligand TNF indukujący apoptozę;
- TRAIL-R** (ang. *TRAIL receptor*) – receptor TRAIL;
- Treg** (ang. *T regulatory*) – limfocyt T regulatorowy;
- Tyk2** (ang. *non-receptor tyrosine-protein kinas 2*) – kinaza tyrozynowa 2;
- VEGF** (ang. *vascular endothelial growth factor*) – czynnik wzrostu śródbłonna naczyńniowego;
- VSV-G** (ang. *vesicular stomatitis virus G glycoprotein*) – glikoproteina G wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej.

Streszczenie

Wykorzystanie szczepionek na bazie komórek dendrytycznych (DC, ang. *dendritic cells*) w terapii przeciwnowotworowej umożliwia zwiększenie reaktywności układu odpornościowego u chorych na nowotwory. Stąd też podejmowane są próby modulowania właściwości DC w celu zwiększenia skuteczności ich działania, a jednym z opracowanych sposobów modyfikacji tych komórek jest ich aktywacja *ex vivo* za pomocą antygenów nowotworowych (TAg, ang. *tumor antigen*). Istotnymi czynnikami zaangażowanymi w rozwój odpowiedzi przeciwnowotworowej są cytokiny, m.in. interleukina (IL-) 12 i IL-18, które indukują aktywację cytotoksycznych limfocytów T oraz komórek NK, przyczyniając się do opóźnienia wzrostu guza.

Celem niniejszej pracy było opracowanie i określenie wpływu zastosowania szczepionek na bazie komórek dendrytycznych transdukowanych do produkcji IL-12 i/lub IL-18 oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi na powstawanie odpowiedzi przeciwnowotworowej w modelu mysiego raka jelita grubego MC38.

Komórki dendrytyczne transdukowane wektorami lentiwirusowymi niosącymi geny IL-12 lub IL-18 i stymulowane antygenami nowotworowymi okazały się zdolne do zwiększonej produkcji IL-12 (DC/IL-12/TAg) lub IL-18 (DC/IL-18/TAg), lub obu tych cytokin jednocześnie (DC/IL-12+IL-18/TAg), jak również aktywacji specyficznej odpowiedzi przeciwnowotworowej w warunkach *ex vivo*. Co więcej, modyfikowane DC wydzielające cytokiny, a szczególnie DC/IL-12+IL-18/TAg, charakteryzowały się zwiększoną zdolnością do naciekania tkanki nowotworowej, a ich jednokrotne, okołoguzowe podanie miało potencjał do aktywacji miejscowej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Tak scharakteryzowane szczepionki zawierające modyfikowane DC zastosowano w terapii myszy obciążonych rakiem jelita grubego MC38. Stwierdzono, że wielokrotne podanie DC/IL-12+IL-18/TAg generuje krótkotrwały efekt terapeutyczny związany ze zmianami w mikrośrodowisku nowotworu oraz aktywację ogólnoustrojowej odpowiedzi odpornościowej. Natomiast terapia skojarzona z udziałem cyklofosfamidu i DC/IL-12+IL-18/TAg prowadziła do wydłużenia czasu zahamowania wzrostu guza MC38. Było to związane ze wzrostem wielkości populacji efektorowych limfocytów T i komórek NKT, zmniejszeniem odsetka makrofagów związanych z nowotworem i komórek T regulatorowych w tkance guza oraz silną indukcją ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki wskazują, że tylko chemioimmunoterapia z zastosowaniem szczepionek na bazie komórek dendrytycznych transdukowanych do jednoczesnej produkcji IL-12 i IL-18 oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi może nasilać i znacząco wydłużać swoistą odpowiedź przeciwnowotworową. Ta obserwacja sugeruje duży potencjał wykorzystania zaproponowanej terapii skojarzonej w zwalczaniu guzów litych.

Abstract

Effect of dendritic cells transduced with lentiviral IL-12 and IL-18 gene carriers for activation of anti-tumor response in murine MC38 colon carcinoma model

The application of dendritic cell (DCs)-based vaccines in anti-tumor therapy enables enhancing the reactivity of the immune system in cancer patients. In order to increase their efficiency, attempts are made to modulate of DC properties. One of the methods developed for modifying these cells is their *ex vivo* stimulation with tumor antigens (TAg). Significant factors involved in the upregulation of the anti-tumor response are cytokines, e.g. interleukin (IL-) 12 and IL-18 which induce the activation of cytotoxic T lymphocytes and NK cells, contributing to tumor growth delay.

The aim of this study was to develop and determine the effect of the application of dendritic cell-based vaccines transduced for the production of IL-12 and/or IL-18 and stimulated with tumor antigens on the induction of anti-tumor response in the MC38 mouse colon carcinoma model.

Dendritic cells transduced with lentiviral vectors carrying IL-12 or IL-18 genes and stimulated with tumor antigens turned out to be capable of increased production of IL-12 (DC/IL-12/TAg) or IL-18 (DC/IL-18/TAg), or both of these cytokines simultaneously (DC/IL-12+IL-18/TAg) as well the activation of specific *ex vivo* anti-tumor response. Moreover, modified DCs secreting cytokines, especially DC/IL-12+IL-18/TAg, were characterized by an increased ability to infiltrate tumor tissue, whereby a single peritumoral administration of these cells had the potential to activate a local anti-tumor response. Such characterized vaccines containing modified DCs have been used for anti-cancer therapy in the mouse MC38 colon carcinoma model. It was found that the repeated administration of DC/IL-12+IL-18/TAg generated a short-term therapeutic effect related to changes in the tumor microenvironment and activation of the systemic immune response. However, combined therapy with cyclophosphamide and DC/IL-12+IL-18/TAg led to prolonged inhibition of MC38 tumor growth. It was associated with an increase in the size of the effector T lymphocyte and NKT cell population, a decrease in the percentage of Treg and TAM cells in tumor tissue, and strong induction of a systemic anti-tumor response.

The results presented in this study show that only chemoimmunotherapy with vaccines based on dendritic cells transduced for the simultaneous production of IL-12 and IL-18 and stimulated with tumor antigens can intensify and significant prolongation of the specific antitumor response. This observation suggests the high potential for using the proposed combination therapy in the fight against solid tumors.

1. Wstęp

1.1. Komórki dendrytyczne jako profesjonalne komórki prezentujące antygen

Komórki dendrytyczne (DC, ang. *dendritic cells*), których nazwa pochodzi od greckiego słowa *dendron* – drzewo, po raz pierwszy zostały opisane przez Paula Langerhans'a w 1868 r. i przez blisko sto lat, były nieprawidłowo kwalifikowane jako komórki pochodzenia nerwowego. Dopiero w 1973 r. Ralph Steinman i Zanvil Cohn zidentyfikowali niewielką populację komórek w mysiej śledzionie, o charakterystycznych licznych wypustkach i nazwali je komórkami dendrytycznymi (Steinman i Cohn, 1973). W ciągu kolejnych kilku dekad, heterogenna populacja tych komórek była szczegółowo analizowana, a uzyskane wyniki badań pozwoliły stwierdzić, że komórki dendrytyczne należą do grupy profesjonalnych komórek prezentujących antygen (APC, ang. *antigen presenting cells*). Uważa się, że DC stanowią pomost pomiędzy odpornością wrodzoną a adaptacyjną, odgrywając kluczową rolę w indukowaniu swoistej odpowiedzi odpornościowej. Za odkrycie tej niezwykle istotnej populacji komórek układu odpornościowego Ralph Steinman otrzymał Nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny, którą nadano mu pośmiertnie w 2011 r. (Gu i in., 2020).

Duże zainteresowanie odkryciem Ralph'a Steinmana sprawiło, że dostępnych jest wiele doniesień opisujących wyodrębnione subpopulacje komórek dendrytycznych oraz ich właściwości biologiczne (Banchereau i in., 2000; Guilliams i in., 2016), a nawet sposoby pozyskiwania tych komórek w warunkach *ex vivo* (Inaba i in., 1992; Sallusto i Lanzavecchia, 1994). Ze względu na ogromny potencjał DC, obecnie prowadzone badania skupiają się głównie na modulowaniu właściwości tych komórek w celu wykorzystania ich w terapii przeciwnowotworowej (Ghorbaninezhad i in., 2022).

1.1.1. Biologia komórek dendrytycznych

Wśród heterogennej populacji komórek dendrytycznych można wyodrębnić kilka subpopulacji, a podział ten opiera się na różnicach w ich pochodzeniu, fenotypie, lokalizacji tkankowej oraz pełnionych funkcjach (Steinman, 2012). Jednym z głównych kryteriów podziału DC jest ich pochodzenie, zgodnie z którym wyróżnia się plazmacytoidalne komórki dendrytyczne (pDC) lub mieloidalne DC (mDC), określane także jako konwencjonalne DC (cDC). Zarówno komórki pDC, jak i cDC powstają w szpiku kostnym z hematopoetycznych komórek macierzystych (HSC, ang. *hematopoietic stem cell*), które kolejno ulegają zróżnicowaniu w komórki prekursorowe pochodzenia mieloidalnego (CMP, ang. *common myeloid precursors*), komórki progenitorowe makrofagów i DC (MDP, ang. *macrophage DC progenitor*), a następnie komórki progenitorowe

DC (CDP, ang. *common DC progenitor*), z których to bezpośrednio powstają pDC lub prekursorzy cDC (pre-cDC). Plazmocytoidalne DC mogą różnicować się także z komórek prekursorowych pochodzenia limfoidalnego (CLP, ang. *common lymphoid progenitors*), a ich aktywacja, głównie pod wpływem antygenów wirusowych, powoduje wysoką produkcję interferonów typu I (Anderson i in., 2021; Y. Wang i in., 2020). Oprócz pDC i cDC, wyróżnia się też populacje komórek dendrytycznych na podstawie ich lokalizacji tkankowej: komórki Langerhansa zlokalizowane w nabłonku i naskórku, DC występujące w skórze, płucach, kępkach Peyera oraz narządach limfatycznych (np. węzłach chłonnych, śledzionie) (Randolph i in., 2008).

Konwencjonalne komórki dendrytyczne wykazują wysoką ekspresję cząsteczek łańcucha α integryny (CD11c) oraz cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej klasy II (MHC II, ang. *major histocompatibility complex*), a także cząsteczek kostymulujących, dzięki czemu są zdolne do skutecznego pochłaniania, przetwarzania oraz prezentacji antygenów. Zasiedlają zarówno tkanki limfoidalne (np. węzły chłonne, śledziona, grasica lub błony śluzowe) jak i nielimfoidalne (np. skórę, płuca lub jelita), gdzie jako dojrzałe cDC indukują aktywację limfocytów T CD4⁺, CD8⁺, komórek NK oraz dojrzewanie limfocytów B (Randolph i in., 2008).

Komórki dendrytyczne są zdolne do działania w dwóch formach: niedojrzałej i dojrzałej. Niedojrzałe DC dzięki zdolności do fagocytozy i makropinocytozy pochłaniają antygeny z otoczenia, jednak charakteryzują się niską ekspresją cząsteczek kostymulujących oraz niewielką sekrecją cytokin co sprawia, że nie są zdolne do skutecznego pobudzenia dziewiczych limfocytów T (Mellman, 2013).

W wyniku stymulacji antygenowej lub pod wpływem cytokin prozapalnych w niedojrzałych DC dochodzi do istotnych zmian morfologicznych, fenotypowych i funkcjonalnych, a tym samym dojrzewania tych komórek. Cząsteczki obcych antygenów np. pochodzenia bakteryjnego lub wirusowego, jako tzw. molekularne wzorce związane z patogenami (PAMP, ang. *pathogen-associated molecular pattern*) wiążą się do występujących na powierzchni DC receptorów rozpoznających wzorce (PRR, ang. *pattern-recognition receptors*), do których należą m.in. receptory Toll-podobne (TLR, ang. *Toll-like receptors*). Oprócz antygenów egzogennych, DC są zdolne do rozpoznawania zmienionych antygenów endogennych np. pochodzących z komórek nowotworowych. W tym procesie największe znaczenie odgrywają tzw. wzorce molekularne związane z uszkodzeniem (DAMP, ang. *damage-associated molecular patterns*) do których zalicza się m.in. ATP występujące w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, białko HMGB1 (ang. *high mobility group box 1*), białka szoku cieplnego oraz kalretikulinę, które podobnie jak PAMP wiążą się do PRR na powierzchni DC (Strioga i in., 2013). W procesie dojrzewania, DC tracą zdolność pochłaniania, a zinternalizowany antygen jest przetwarzany przy udziale proteaz lizosomowych, które wspomagają proces ich fragmentacji. Następnie antygen prezentowany jest

na powierzchni komórek w postaci stabilnych kompleksów peptyd - cząsteczka MHC. Jednocześnie dochodzi do formowania wypustek cytoplazmatycznych i przebudowy cytoszkieletu tych komórek, zwiększenia ekspresji cząsteczek kostymulujących (m.in. CD80 i CD86) i zdolności do wydzielania cytokin (np. IL-12, IFN- γ) oraz zmian w ekspresji receptorów dla chemokin (np. CCR6 i CCR7) (Stober i in., 2001; Worbs i in., 2017). Wzrost ekspresji receptora CCR7, warunkuje migrację DC w kierunku wzrastającego gradientu chemokin CCL19 oraz CCL21, wydzielanych przez komórki śródbłonna naczyń limfatycznych oraz komórki strefy przykorowej węzłów chłonnych, co umożliwia dojrzałym DC migrację w kierunku wtórnych narządów limfatycznych (Worbs i in., 2017).

1.1.2. Migracja komórek dendrytycznych

Proces migracji komórek dendrytycznych rozpoczyna się już w szpiku kostnym, gdy niedojrzałe pre-cDC przenikają do krwioobiegu i jest kontrolowany m.in. przez oddziaływanie odpowiednich par receptorów i ligandów chemokinowych (Tiberio i in., 2018). Jednak wrażliwość DC na działanie chemokin jest zależna od stopnia dojrzałości tych komórek. Dzięki występowaniu na ich powierzchni licznych receptorów dla chemokin prozapalnych, krążące ze strumieniem krwi niedojrzałe DC wędrują w kierunku miejsca stanu zapalnego, a po dotarciu do niego pochłaniają antygen i dojrzewają pod wpływem działania czynników prozapalnych. Dojrzałe DC prezentujące na swojej powierzchni antygeny w kontekście MHC, tracą receptory dla chemokin występujących w miejscu stanu zapalnego i zwiększają ekspresję takich receptorów jak CCR7 wiążących się z chemokinami CCL19 oraz CCL21 wydzielanymi przez komórki śródbłonna narządów limfatycznych oraz komórki zrębu tkanki limfatycznej w węzłach chłonnych (de Winde i in., 2020; Tiberio i in., 2018). Proces migracji kontrolowany jest także przez metaloproteiny (MMP, ang. *matrix metalloproteinases*) umożliwiające migrację DC przez śródbłonek, cząsteczki adhezyjne ICAM-1 (ang. *intercellular adhesion molecule 1*) i VCAM-1 (ang. *vascular cell adhesion molecule 1*), a nawet prostaglandynę E₂ stymulującą ekspresję receptorów chemokinowych CCR7 oraz zwiększającą ich powinowactwo do ligandu (Randolph i in., 2005). Warto też zaznaczyć, że we wczesnych etapach rozwoju nowotworu, komórki NK promują akumulację komórek cDC w tkance guzów poprzez produkcję CCL5 i XCL1/2 (Böttcher i Reis e Sousa, 2018; Feng i in., 2021). Dlatego też, można przypuszczać, że zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej dojrzałych DC prezentujących na swojej powierzchni swoiste antygeny w kontekście cząsteczek MHC, może zwiększać zdolność tych komórek do migracji do wartowniczych węzłów chłonnych lub tkanki nowotworowej.

Jednak oprócz czynników promujących migrację DC istotną rolę pełnią także cząsteczki odpowiedzialne za jej hamowanie. Jedną z nich jest receptor D6 (ang. *priomiscous chemokine-*

scavenging receptor), którego rolą jest regulowanie poziomu chemokin prozapalnych (Alvarez i in., 2008) oraz inhibitory metaloproteinaz (TIMP), które regulują aktywność MMP i hamują przenikanie komórek przez śródbłonek (Darmanin i in., 2007).

1.2. Aktywacja limfocytów T przez komórki dendrytyczne

W węzłach chłonnych, dojrzałe i pobudzone DC inicjują aktywację antygenowo-swoistych limfocytów T w wyniku utworzenia płaszczyzny kontaktowej określanej mianem synapsy immunologicznej (IS, *ang. immunological synapse*). Dojrzała forma IS zawiera uporządkowane wielkocząsteczkowe agregaty molekuł uczestniczących w adhezji i przekazywaniu sygnału do wnętrza komórki (SMAC, *ang. supramolecular activation clusters*). W centrum synapsy (cSMAC, *ang. central SMAC*) zgrupowane są receptory TCR (*ang. T cell receptor*), cząsteczki CD3, CD4/CD8, kompleksy peptyd-MHC, cząsteczki kostymulujące i ich ligandy, a także cytoplazmatyczne białka przekaźnikowe. Na obwodzie IS (pSMAC, *ang. peripheral SMAC*) występują cząsteczki adhezyjne i ich receptory (np. LFA-1/ICAM-1), które stabilizują połączenie komórki prezentującej antygen i limfocyta T. Natomiast w części dystalnej IS (dSMAC, *ang. distal SMAC*) skupione są białka hamujące przekazywanie sygnału (np. CD43, fosfatazy).

Komórki dendrytyczne uważane są za najistotniejszą populację APC, ponieważ jako jedyne, w przeciwieństwie do makrofagów i limfocytów B, są zdolne do dostarczenia wszystkich trzech sygnałów niezbędnych do aktywacji dziewiczych limfocytów T i indukowania odpowiedzi odpornościowej. Pierwszy sygnał aktywacji, niezbędny do utworzenia synapsy pochodzi z oddziaływania kompleksu peptyd-MHC występującego na powierzchni DC i receptorów limfocytów T. W zależności od rodzaju antygeny dochodzi do utworzenia kompleksów z udziałem cząsteczek MHC klasy I lub MHC klasy II. Prezentacja antygenów endogennych zachodzi w kontekście cząsteczek MHC I i skutkuje aktywacją limfocytów T CD8⁺. Natomiast prezentacja antygenów egzogennych w kontekście cząsteczek MHC II prowadzi do aktywacji limfocytów T CD4⁺. Możliwa jest także aktywacja limfocytów T CD8⁺ w wyniku prezentacji krzyżowej, podczas której antygeny egzogenne prezentowane są przez DC w kontekście cząsteczek MHC I. Ten szczególnie rodzaj prezentacji antygeny ma duże znaczenie podczas aktywacji odpowiedzi przeciwnowotworowej zależnej od limfocytów T cytotoksycznych (CTL, *ang. cytotoxic T lymphocytes*) (Merad i in., 2013; Sánchez-Paulete i in., 2017).

Drugi sygnał aktywacji pochodzący od cząsteczek kostymulujących, moduluje proces aktywacji limfocytów T i gwarantuje skuteczną prezentację antygeny, a w wypadku jego braku limfocyty przechodzą w stan anergii. Podczas tego etapu aktywacji dochodzi do oddziaływania cząsteczek kostymulujących takich jak CD80 i CD86 na powierzchni DC z cząsteczką CD28 zlokalizowaną na dziewiczym limfocycie T (Hathcock i in., 1994). W wyniku tej interakcji

dochodzi do krótkotrwałego zwiększenia produkcji IL-2 przez DC, co warunkuje dalszą aktywację i proliferację limfocytów (Hubo i in., 2013; Zelante i in., 2012). Inną cząsteczką kostymulującą występującą na powierzchni DC jest CD40. Jej oddziaływanie z ligandem CD40L zlokalizowanym na powierzchni limfocytów T powoduje wzrost ekspresji MHC oraz innych molekuł kostymulujących, zwiększa zdolność DC do sekrecji IL-12, a także promuje prezentację krzyżową antygenów (Hubo i in., 2013). Jednak prawidłowe funkcjonowanie IS jest uwarunkowane dostępnością cytokin, które stanowią trzeci sygnał aktywacji limfocytów i nadają kierunek polaryzacji limfocytów T CD4⁺.

Modulowanie właściwości DC zależy od różnych czynników, w tym od rodzaju i dostępności antygeny inicjującego dojrzewanie tych komórek, ale przede wszystkim od cytokin zarówno tych wydzielanych przez DC, jak i obecnych w otoczeniu. Zatem poprzez dostarczenie swoistych antygenów (I sygnał), indukowanie ekspresji cząsteczek kostymulujących (II sygnał) oraz zmianę profilu wydzielanych cytokin (III sygnał, np. za pomocą modyfikacji genetycznych) DC mają ogromne znaczenie w indukowaniu polaryzacji odpowiedzi odpornościowej.

1.2.1. Polaryzacja odpowiedzi komórkowej przez komórki dendrytyczne

1.2.1.1. Limfocyty Th1 i interferon γ

Odpowiedź komórkowa typu Th1 jest indukowana w wyniku prezentacji antygenów pochodzących od patogenów wewnątrzkomórkowych oraz antygenów nowotworowych, dzięki czemu aktywacja tych komórek jest oczekiwanym efektem immunoterapii (Terhune i in., 2013). Interakcja DC i dziewiczych limfocytów T CD4⁺ w obecności IL-12 i interferonu γ (IFN- γ), prowadzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych STAT1, STAT4 oraz T-bet i różnicowania ich w kierunku komórek Th1, zdolnych do wydzielania IL-2 i IFN- γ , ale także szeregu innych cytokin prozapalnych np. TNF- α (Lazarevic i in., 2013). Aktywacja czynnika transkrypcyjnego T-bet odpowiada również za ekspresję receptora CXCR3 i chemokin CCL3 i CCL4 umożliwiających migrację dojrzałych limfocytów do tkanki nowotworowej. Co więcej, ekspresja tego czynnika odgrywa istotną rolę w hamowaniu różnicowania limfocytów T w kierunku populacji Th2 i Th17, blokując ekspresję czynników transkrypcyjnych odpowiednio GATA3 i ROR γ t (Djuretic i in., 2007; Hwang i in., 2005; Lazarevic i in., 2011). W procesie różnicowania limfocytów Th1, przebiegającym pod wpływem IL-12, aktywacja STAT4 indukuje zwiększoną ekspresję podjednostki α receptora dla IL-18 (IL-18R α) na powierzchni tych komórek. Produkowane przez komórki mieloidalne IL-12 i IL-18 indukują produkcję IFN- γ , który wpływa na różnicowanie limfocytów T CD4⁺ do subpopulacji Th1 na zasadzie dodatniego sprzężenia zwrotnego (Luckheeram i in., 2012), a przeciwnowotworowy efekt działania limfocytów Th1, związany jest

głównie z sekrecją IFN- γ . Receptor dla IFN- γ składa się z dwóch łańcuchów (α – IFNGR1 oraz β – IFNGR2) i występuje na powierzchni większości komórek układu odpornościowego.

Interferon γ wykazuje działanie immunomodulujące, przeciwwirusowe i przeciwnowotworowe. Wpływa na zwiększenie ekspresji cząsteczek MHC II oraz cząsteczek kostymulujących na komórkach dendrytycznych, dzięki czemu wspomaga skuteczną prezentację antygenów i pobudzenie limfocytów T. Promuje także pobudzenie aktywności cytotoksycznej limfocytów T CD8⁺ i komórek NK, a także hamuje produkcję cytokin przez limfocyty Th2 (Li i in., 2018). Dodatkowo IFN- γ stymuluje ekspresję cząsteczek MHC I na powierzchni komórek nowotworowych, co ułatwia ich rozpoznanie przez komórki układu odpornościowego. Zastosowanie IFN- γ w formie białka rekombinowanego hamuje proliferację i indukuje apoptozę komórek nowotworowych oraz wykazuje działanie antyangiogenne (Coughlin i in., 1998; Kaplan i in., 1998).

1.2.1.2. *Limfocyty Th2 i interleukina 4*

Odpowiedź komórkowa typu Th2 powstaje pod wpływem czynników zewnątrzkomórkowych (np. bakterii lub pasożytów) i jest indukowana przez DC, prezentujące niewielkie ilości antygeny lub substancji o niskim powinowactwie do receptorów PRR (de Jong i in., 2005; Kumar i in., 2019). Limfocyty Th2 powstają w wyniku działania IL-4 i IL-2 obecnych w otoczeniu komórek dendrytycznych i dziewiczych limfocytów T CD4⁺. Przyłączenie IL-4 do jej receptora na powierzchni limfocytów T prowadzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych takich jak STAT6 oraz GATA3 i różnicowania populacji komórek Th2 zdolnych do produkcji IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 i IL-13 (Kumar i in., 2019; Zhu, 2018). Należy zaznaczyć, że aktywacja czynnika transkrypcyjnego GATA3 hamuje różnicowanie innych subpopulacji limfocytów T CD4⁺ (Świst i Pajtasz-Piasecka, 2011).

Limfocyty Th2 poprzez wydzielanie znacznych ilości IL-4 wpływają na powstawanie odpowiedzi humoralnej poprzez pobudzenie proliferacji i różnicowania limfocytów B do komórek plazmatycznych produkujących immunoglobuliny klasy E (Walker i McKenzie, 2018). Z jednej strony, wspomaga zdolność komórek dendrytycznych do produkcji IL-12, pośrednio stymulując różnicowanie limfocytów Th1 (Yao i in., 2005). Z drugiej strony, IL-4 uczestniczy w regulacji odpowiedzi komórkowej hamując wydzielanie IFN- γ przez limfocyty Th1. Oddziałuje także na limfocyty T CD8⁺ powodując obniżenie ekspresji cząsteczek CD8 na ich powierzchni, co w konsekwencji prowadzi do zahamowania aktywności cytolitycznej tych komórek (wydzielania perforyny i granzymów) (Olver i in., 2013). W wyniku jej działania komórki Th2 mogą wspomagać rozwój nowotworu poprzez promowanie angiogenezy, stymulację aktywności makrofagów

związanych z nowotworem (TAM, *ang. tumor-associated macrophages*) oraz hamowanie różnicowania limfocytów Th1.

1.2.1.3. Limfocyty Treg i interleukina 10

W środowisku cytokin o właściwościach supresorowych takich jak IL-10 i TGF- β , w wyniku aktywacji czynnika transkrypcyjnego FoxP3 w dziewiczych limfocytach T CD4⁺, powstają limfocyty T regulatorowe (Treg, *ang. regulatory T lymphocyte*) (O'Garra i in., 2004). Komórki te uczestniczą w regulowaniu odpowiedzi odpornościowej i są zdolne do wydzielania IL-10 i TGF- β . W warunkach prawidłowych są odpowiedzialne za utrzymanie tolerancji organizmu wobec antygenów gospodarza, natomiast podczas rozwoju nowotworu ich obecność u chorych wiąże się ze złym rokowaniem. Naturalne limfocyty T regulatorowe (nTreg) powstają w grasicy i migrują do TME pod wpływem chemokin, natomiast indukowane (iTreg) powstają w wyniku różnicowania się dziewiczych limfocytów T CD4⁺ przy udziale cytokin. Limfocyty Treg mogą hamować aktywność i proliferację efektorowych limfocytów T CD4⁺ oraz CD8⁺, a także aktywność cytotoksyczną komórek NK. Ponadto mogą też hamować proliferację i wytwarzanie przeciwciał przez limfocyty B. Są również zdolne do zabijania komórek docelowych w wyniku uwalniania perforyny i granzymów. Natomiast bezpośredni kontakt Treg i komórek dendrytycznych może powodować przekształcenie DC w komórki o charakterze tolerogennym, zdolnych do wytwarzania enzymuIDO, a w konsekwencji indukować przechodzenie limfocytów w stan anergii lub różnicowanie komórek Treg (C. Li i in., 2020).

IL-10 jest cytokiną o działaniu plejotropowym i jest produkowana przez Treg, jak i limfocyty Th2, limfocyty T cytotoksyczne, limfocyty B, komórki NK, komórki dendrytyczne, makrofagi, komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego (MDSC, *ang. myeloid-derived suppressor cells*), neutrofile, eozynofile, komórki tuczne, a nawet komórki nowotworowe (Kicielińska i Pajtasz-Piasecka, 2014). W wyniku przyłączenia się tej cytokiny do funkcjonalnego receptora występującego na komórkach docelowych, IL-10 może promować immunosupresję, bowiem pod wpływem działania IL-10, limfocyty T CD4⁺ wykazują mniejszą zdolność do produkcji cytokin prozapalnych takich jak IL-2, IFN- γ oraz TNF- α (Mannino i in., 2015), a komórki NK charakteryzują się obniżoną produkcją IFN- γ oraz TNF- α , co w konsekwencji osłabia ich aktywność przeciwnowotworową (Conti i in., 2003). Obecność IL-10 w środowisku DC, obniża poziom ekspresji cząsteczek MHC II, cząsteczek adhezji międzykomórkowej ICAM-1 oraz cząsteczek kostymulujących CD80 i CD86 na powierzchni DC, powoduje obniżenie zdolności tych komórek do produkcji IL-12, a także negatywnie wpływa na ich mobilność hamując migrację DC do wtórych narządów limfatycznych. Supresorowe działanie IL-10 na DC ma więc bezpośredni wpływ na obniżoną aktywację limfocytów T. Ponadto pod wpływem IL-10 może dochodzić do

konwersji subpopulacji makrofagów związanych z nowotworem w kierunku komórek M2, wspomagających rozwój nowotworu (Pan i in., 2020). IL-10 może również działać immunostymulująco. Morel i wsp. wykazali zwiększenie zdolności DC stymulowanych IL-10 do wychwytywania antygenów (Morel i in., 1997), a inni badacze odnotowali immunostymulujący wpływ tej cytokiny na aktywność komórek NK (Mocellin i in., 2004) i limfocytów T CD8⁺ o aktywności cytotoksycznej oraz wykształcenie pamięci immunologicznej (Giovarelli i in., 1995).

1.2.1.4. *Limfocyty T cytotoksyczne (CTL) i mechanizmy cytotoksyczności limfocytów*

Limfocyty T CD8⁺ cytotoksyczne (CTL) są zdolne do rozpoznania antygenów prezentowanych w kontekście cząsteczek MHC klasy I, przy udziale koreceptora CD8. Odpowiedź limfocytów CTL jest skierowana głównie przeciwko komórkom zakażonym przez wirusy lub inne patogeny wewnątrzkomórkowe, a także wobec komórek nowotworowych. Aktywowane CTL wydzielają m.in. IL-2, IFN- γ oraz TNF- α co prowadzi do uruchomienia mechanizmów niszczenia komórek docelowych (Barry i Bleackley, 2002; Ito i Seishima, 2010). Oprócz CTL właściwości cytotoksyczne wykazują także inne limfocyty takie jak: limfocyty T $\gamma\delta$, komórki NK, komórki NKT, a nawet niektóre limfocyty T $\alpha\beta$ CD4⁺.

Podstawowymi mechanizmami cytotoksyczności wykorzystywanymi przez limfocyty są dwa niezależne sposoby zabijania komórek docelowych: reakcja cytotoksyczna zależna od ziaren cytolitycznych (głównie przez CTL i komórki NK) oraz mechanizm zależny od receptorów dla cząsteczek z nadrodziny TNF (głównie przez limfocyty T CD4⁺) (Chávez-Galán i in., 2009). Aktywacja ścieżki cytotoksycznej zależnej od ziaren cytolitycznych rozpoczyna się podczas rozpoznania komórki docelowej przez CTL, czego efektem są charakterystyczne zmiany struktury tych limfocytów. W wyniku reorganizacji cytoszkieletu CTL dochodzi do fuzji granulosomów z błoną komórkową i utworzenia litycznej synapsy immunologicznej z komórką docelową oraz uwalniania ziaren cytolitycznych zawierających m.in. perforynę i granzymy. Ziarna cytolityczne otoczone są pojedynczą błoną, w którą wbudowane są receptory mannozo-6-fosforanu oraz białka błonowe LAMP (*ang. lysosome associated membrane glikoproteins*) takie jak: CD107a (LAMP-1), CD107b (LAMP-2) oraz CD63 (LAMP-3) (Lorenzo-Herrero i in., 2019). Dlatego też, podczas uwalniania ziaren cytolitycznych na powierzchni komórek efektorowych pojawiają się m.in. cząsteczki CD107a, a zjawisko to zostało wykorzystane w niniejszej pracy. Drugim mechanizmem wykorzystywanym przez limfocyty do zabijania komórek docelowych jest cytotoksyczność zależna od receptorów dla cząsteczek z rodziny TNF. Proces ten opiera się na interakcji ligandów takich jak FasL, TNF- α oraz TRAIL znajdujących się na powierzchni komórek efektorowych z receptorami typu DC (*ang. death receptors*) tj. Fas, TNFR1 i TRAIL-R na powierzchni komórek docelowych. Jednak w przypadku limfocytów główną rolę odgrywa cząsteczka FasL. W wyniku jej

oddziaływania dochodzi do agregacji receptorów Fas na komórkach docelowych i powstania kompleksu indukującego śmierć komórki (DISC, ang. *death-inducing signalling complex*), który następnie aktywuje szereg kaspaz indukujących proces apoptozy (Siegel i in., 2003).

1.2.1.5. Komórki NK

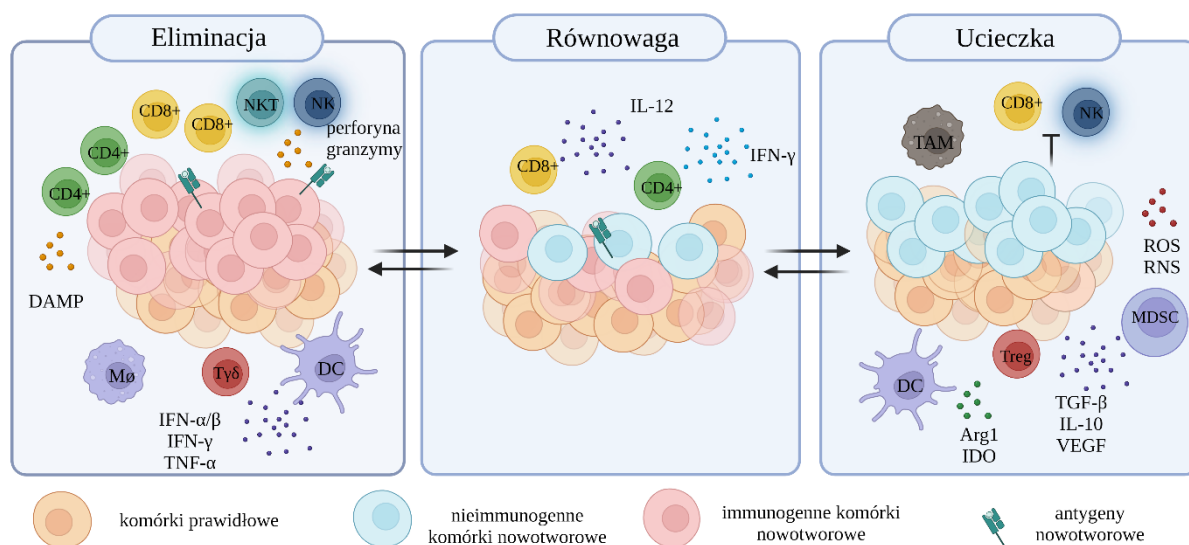
W przeciwieństwie do limfocytów T, aktywacja komórek NK nie wymaga prezentacji antygeny związanej z cząsteczkami MHC na powierzchni APC. Komórki NK są zaangażowane w aktywację nieswoistych mechanizmów obronnych pośredniczących w odpowiedzi przeciwnowotworowej i przeciwwirusowej, posiadając zdolność do spontanicznego zabijania komórek docelowych oraz produkcji IFN- γ i TNF- α (Abel i in., 2018). Najbardziej charakterystycznym markerem umożliwiającym identyfikację tych komórek u ludzi jest cząsteczka CD56, natomiast w modelu mysim komórki te identyfikuje się na podstawie obecności cząsteczek NK1.1, NCR1, a także CD49b.

Komórki NK pełnią także istotną rolę w regulacji wczesnych etapów indukcji swoistej odpowiedzi odpornościowej, co jest związane ze wzajemnym oddziaływaniem tych komórek z komórkami dendrytycznymi (Cazzetta i in., 2021). Komórki dendrytyczne wpływają na aktywność komórek NK za pośrednictwem produkowanych cytokin. Przykładowo, IL-15 stymuluje rozwój komórek NK oraz podtrzymuje ich przeżycie, natomiast IL-12, poprzez stymulację produkcji IFN- γ przez te komórki jest silnym aktywatorem efektorowych funkcji komórek NK. Kolejną cytokiną produkowaną przez DC jest IL-18, która współdziałając z IL-12 indukuje sekrecję IFN- γ przez komórki NK, wzmacniając w ten sposób aktywność cytotoksyczną tych komórek zarówno w zakażeniu drobnoustrojami, jak i w odpowiedzi przeciwnowotworowej. Co więcej, DC uwalniają chemokiny takie jak CXCL9 i CXCL10, które rekrutują komórki NK do miejsca zapalenia. Z kolei, komórki NK produkując cytokiny takie jak IFN- γ oraz TNF- α , promują dojrzewanie DC, ich migrację w kierunku wtórnych narządów limfatycznych oraz produkcję IL-12 niezbędną do aktywacji limfocytów Th1 i CTL.

1.3. Rola komórek układu odpornościowego w procesie nowotworzenia

Badania nad mechanizmami zaangażowanymi w wieloetapowy proces nowotworzenia, pozwoliły na określenie ośmiu charakterystycznych cech nowotworu (ang. *hallmarks of cancer*): nieograniczona zdolność do podziałów, niezależność od zewnętrznych czynników wzrostowych, niewrażliwość na sygnały hamujące wzrost, unikanie apoptozy, zdolność do tworzenia przerzutów i angiogenezy, zmiana metabolizmu komórek oraz ucieczka komórek spod nadzoru immunologicznego (Hanahan, 2022; Hanahan i Weinberg, 2000, 2011). Udział układu odpornościowego w procesie nowotworzenia został zauważony już na początku dwudziestego

wieku przez Paula Ehrlicha, który wnioskował, że komórki nowotworowe powstają w organizmie w sposób ciągły, a następnie są wykrywane i na bieżąco eliminowane przez komórki układu odpornościowego. Podobną hipotezę, która została określona mianem nadzoru immunologicznego, postawili w połowie XX w. Thomas i Burnet (Dunn i in., 2004). Obecnie uważa się, że układ odpornościowy oddziałuje na rozwijający się nowotwór nie tylko poprzez eliminację komórek nowotworowych, ale także selekcję komórek immunogennych spośród których pozostają te, które nie mogą zostać rozpoznane przez komórki efektorowe. Proces ten nazwano immunoedycją (immunoredagowaniem), w ramach którego wyróżnia się trzy fazy: eliminacji, równowagi oraz ucieczki (Ryc. 1.) (Schreiber i in., 2011).



Ryc. 1. Rola komórek układu odpornościowego w procesie immunoedycji.

DAMP - wzorce molekularne związane z uszkodzeniem (ang. *damage-associated molecular patterns*); CD4⁺ - limfocyt T CD4⁺; CD8⁺ - limfocyt T CD8⁺; NK – komórki NK; NKT – komórki NKT; DC – komórka dendrytyczna; Mφ – makrofag; Tγδ – limfocyt Tγδ; IFN-α/β/γ – interferon α/β/γ; TNF-α czynnik wzrostu nowotworów (ang. *tumor necrosis factor*); IL – interleukina; TAM – makrofag związany z nowotworem (ang. *tumor associated macrophag*); ROS – reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*); RNS – reaktywne formy azotu (ang. *reactive nitrogen species*); MDSC - komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego (ang. *myeloid-derived suppressor cells*); Treg – limfocyt T regulatorowy; Arg1 – arginaza 1; IDO – 2,3 dioksygenaza indoloaminy; TGF-β – transformujący czynnik wzrostu β (ang. *tumor growth factor*); VEGF – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. *vascular endothelial growth factor*). Rycinę przygotowano w programie BioRender, na podstawie Schreiber i in. 2011.

W fazie eliminacji, dzięki mechanizmom odpowiedzi odpornościowej nabytej i wrodzonej, układ odpornościowy eliminuje komórki o cechach nowotworowych. W warunkach hipoksji panujących w tkance nowotworowej, indukowana jest nekroza i apoptoza komórek nowotworowych, co w konsekwencji prowadzi do wydzielania DAMP. Molekularne wzorce związane z uszkodzeniem pobudzają makrofagi oraz komórki dendrytyczne do aktywacji komórek NK i NKT zdolnych do wytwarzania IFN-γ, który ma bezpośredni wpływ na zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych oraz stymulację komórek układu odpornościowego. Oprócz produkcji IFN-γ, aktywowane komórki NK, NKT oraz limfocyty Tγδ indukują inne mechanizmy prowadzące do eliminowania komórek nowotworowych z organizmu np. wydzielanie ziaren

cytolitycznych zawierających granzymy i perforynę oraz ekspresję cząsteczek TRAIL i FasL (Woo i in., 2015). Następnie antygeny nowotworowe są pochłaniane przez komórki dendrytyczne, które migrują do węzłów chłonnych i prezentują antygeny dziewiczym limfocytom T CD4⁺ oraz limfocytom T cytotoksycznym. Aktywowane limfocyty T migrują do miejsca rozwoju nowotworu przyczyniając się do eliminowania komórek nowotworowych poprzez produkcję cytokin lub mechanizmy cytotoxyczności (Kim i in., 2007).

Proces immunoedycji przechodzi do fazy równowagi, kiedy nie wszystkie komórki nowotworowe zostaną usunięte z organizmu. Jest to najdłuższy okres w rozwoju choroby. W trakcie tej fazy następuje ciągła eliminacja komórek nowotworowych przez mechanizmy nabytej odpowiedzi odpornościowej, jednak zachowana jest równowaga pomiędzy komórkami układu odpornościowego a komórkami nowotworowymi. Co więcej, pod wpływem działania komórek układu odpornościowego komórki nowotworowe w tej fazie rozwoju nowotworu zmieniają poziom ekspresji antygenów na swojej powierzchni, co uniemożliwia ich rozpoznanie przez komórki efektorowe. Nowotwór może pozostawać w tym stadium przez wiele lat, wrócić do etapu eliminacji lub przejść do etapu ucieczki spod nadzoru układu odpornościowego. W fazie ucieczki, komórki nowotworowe nie są już rozpoznawane przez układ odpornościowy gospodarza i indukują silnie immunosupresorowe warunki mikrośrodowiska nowotworowego, które umożliwiają ucieczkę nowotworu spod nadzoru immunologicznego. W rezultacie, dochodzi do dalszej nieograniczonej proliferacji komórek nowotworowych, wytworzenia swoistej niszy zwanej mikrośrodowiskiem nowotworu i szybkiej progresji choroby (Schreiber i in., 2011).

1.3.1. Wpływ mikrośrodowiska nowotworu na funkcje komórek dendrytycznych

Mikrośrodowisko nowotworu (TME, *ang. tumor microenvironment*) składa się nie tylko z komórek nowotworowych, ale także z komórek śródbłonna tworzących naczynia krwionośne, fibroblastów związanych z nowotworem (CAF, *ang. cancer associated fibroblast*) oraz komórek odpornościowych (Hanahan i Weinberg, 2011). Wraz z rozwojem nowotworu w TME obecnych jest coraz więcej czynników o charakterze immunosupresorowym lub regulatorowym, a pod wpływem hipoksji dochodzi do zmian metabolicznych. Wszystkie te elementy zaburzają funkcjonowanie efektorowych komórek układu odpornościowego i wzrost populacji komórek o charakterze immunosupresorowym takich jak MDSC, limfocyty T regulatorowe oraz makrofagi związane z nowotworem (TAM, *ang. tumor associated macrophages*). Ponadto w TME znajduje się wiele produktów komórek nowotworowych i immunosupresyjnych, np. prostaglandyna E₂ (PGE₂), PD-1, CTLA-4 oraz czynniki proangiogenne takie jak czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF, *ang. vascular endothelial growth factor*), które hamują zróżnicowanie i pobudzenie komórek dendrytycznych (Ghorbaninezhad i in., 2022).

1.3.1.1. Komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego

Wśród supresorowych komórek pochodzenia mieloidalnego wyróżnia się subpopulację komórek monocytarnych (M-MDSC, ang. *monocytic MDSC*) oraz granulocytarnych (PMN-MDSC, ang. *polymorphonuclear MDSC*), które powstają w wyniku zaburzenia procesu mielopojezy przez czynniki pochodzenia nowotworowego. Subpopulacje MDSC rozróżnia się na podstawie charakterystyki fenotypowej i funkcjonalnej, co pozwoliło dowiedzieć, że M-MDSC wykazują większą zdolność do hamowania aktywności komórek immunokompetentnych w TME niż PMN-MDSC (Bronte i in., 2016). Mechanizmy supresji wykorzystywane przez te komórki obejmują zarówno działanie pośrednie, poprzez wydzielanie cytokin (np. IL-10, TGF- β), enzymów (Arg1,IDO) oraz reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*) i azotu (RNS, ang. *reactive nitrogen species*), jak i bezpośrednie oddziaływanie z komórkami odpornościowymi w TME.

Wpływ MDSC na dysfunkcyjność DC oraz szczepionek na bazie DC wykazano już w kilku modelach nowotworów (Salminen i in., 2019; Shadbad i in., 2021). W mysim modelu raka wątrobokomórkowego, wykazano wpływ IL-10 produkowanej przez MDSC na zmniejszenie produkcji IL-12 przez DC oraz osłabioną aktywację limfocytów T (Hu i in., 2011). Natomiast u pacjentów chorych na czerniaka, MDSC hamowały proces dojrzewania DC, ograniczały zdolność tych komórek do migracji oraz aktywacji limfocytów T do produkcji IFN- γ , a nawet indukowały zmianę profilu cytokin produkowanych przez DC, na te o działaniu przeciwzapalnym (Poschke i in., 2012). U pacjentów chorych na szpiczaka mnogiego zwiększona populacja MDSC była związana z upośledzeniem różnicowania DC i obniżeniem wielkości populacji tych komórek we krwi (Brimnes i in., 2010). Na skutek produkcji IL-10 i TGF- β , MDSC przyczyniają się także do różnicowania i aktywacji limfocytów T regulatorowych. Ponadto w warunkach hipoksji panujących w TME, MDSC mogą ulegać przekształceniu w makrofagi związane z nowotworem (Corzo i in., 2010).

1.3.1.2. Limfocyty T regulatorowe

Jak już wcześniej wspomniano, dziewicze limfocyty T CD4⁺ pod wpływem IL-10 i TGF- β różnicują się do limfocytów Treg, identyfikowanych na podstawie ekspresji czynnika transkrypcyjnego FoxP3 i zdolnych do produkcji IL-10, tworząc kolejną populację komórek mających negatywny wpływ na aktywność DC.

Jednym z mechanizmów immunosupresji wykorzystywanych przez limfocyty Treg jest ekspresja cząsteczki CTLA-4 lub LAG-3 i Nrp-1 oddziałującej z cząsteczkami napowierzchni DC CD80 i CD86 lub odpowiednio MHC II. W wyniku tych interakcji dochodzi do hamowania dojrzewania DC oraz wydzielania enzymu IDO, a tym samym ograniczenia zdolności tych komórek do prezentacji antygenów oraz ograniczenia proliferacji limfocytów T (Paluskievicz i in., 2019).

Oprócz IL-10, której wpływ na aktywność DC opisano już wcześniej, limfocyty Treg są zdolne także do sekrecji TGF- β , który wspiera powstawanie populacji DC o właściwościach regulatorowych lub populacji MDSC o aktywności supresorowej, a także wpływa na obniżenie ekspresji cząsteczek kostymulujących i MHC II na powierzchni już dojrzałych DC (Hargadon, 2016). Ponadto limfocyty Treg oddziałują też bezpośrednio na aktywację i proliferację efektorowych limfocytów T. Wysoka ekspresja cząsteczki CD25 na powierzchni Treg, należącej do receptora wiążącego IL-2 z wysokim powinowactwem, prowadzi do ograniczenia dostępności tej cytokiny w otoczeniu a tym samym zahamowania proliferacji limfocytów T efektorowych (Busse i in., 2010). Co więcej, zdolność Treg do wydzielania perforyny i granzymów może prowadzić do eliminacji efektorowych limfocytów T (Cao i in., 2007; Ohue i Nishikawa, 2019).

1.3.1.3. Makrofagi związane z nowotworem

Makrofagi związane z nowotworem stanowią najliczniejszą populację komórek mieloidalnych obecnych w tkance nowotworowej, która w niektórych przypadkach może stanowić nawet połowę masy guzów, a większość populacji tych komórek wykazuje właściwości immunosupresyjne (Zheng i in., 2017). Pod wpływem warunków panujących w TME dochodzi do różnicowania TAM w subpopulacje makrofagów M1 o właściwościach przeciwnowotworowych lub M2 o charakterze supresorowym. W początkowych etapach rozwoju nowotworu w tkance guza dominują makrofagi M1, które poprzez wysoką ekspresję cząsteczek MHC I i MHC II oraz produkcję cytokin prozapalnych takich jak IL-12, IL-6 i TNF- α indukują tworzenie odpowiedzi typu Th1 i eliminację komórek nowotworowych. Jednak wraz z rozwojem nowotworu, w obecności czynników immunosupresyjnych takich jak IL-10 i TGF- β , a także IL-4 i IL-13 dochodzi do konwersji makrofagów do komórek M2, które wspomagają dalszy rozwój nowotworu (Pan i in., 2020). Dlatego też uważa się, że TAM obecne w tkance nowotworowej zwiększają nagromadzenie czynników supresorowych, pełniących istotną rolę w wyciszeniu odpowiedzi przeciwnowotworowej.

Komórki te, wydzielając IL-10 wpływają na zmniejszenie produkcji IL-12 przez DC, a tym samym niekorzystnie wpływają na aktywność limfocytów T cytotoksycznych i limfocytów Th (Ruffell i in., 2014). Natomiast sekrecja TGF- β przez TAM zaburza funkcjonowanie DC poprzez zmniejszenie zdolności tych komórek do prezentacji antygeny, ograniczenie zdolności do migracji (Sato i in., 2000) oraz zahamowania procesu dojrzewania tych komórek (Ghorbaninezhad i in., 2022; Huang i in., 2017). Co więcej, w wyniku sekrecji IL-10 i TGF- β , wspomagają indukowanie ekspresji czynnika FoxP3 oraz cząsteczki CTLA-4 w limfocytach T CD4⁺ (Daurkin i in., 2011), a nawet hamują aktywność cytotoksyczną komórek NK wpływając w ten sposób na mechanizmy

odpowiedzi swoistej i nieswoistej (Krneta i in., 2017). Ponadto poprzez zdolność do wydzielania chemokin promują migrację MDSC i limfocytów Treg do TME (Yang i Zhang, 2017).

Tak więc, prawidłowe działanie komórek dendrytycznych w mikrośrodkowisku nowotworu jest znacznie ograniczone przez liczne czynniki immunosupresyjne, obniżoną zawartość tlenu i utrudnioną prezentację antygenów, ale przede wszystkim przez niedobór cytokin prozapalnych warunkujących skuteczne pobudzenie odpowiedzi przeciwnowotworowej takich jak IL-12 i IL-18 ogrywających szczególną rolę w aktywacji komórek dendrytycznych.

1.4. Rola IL-12 i IL-18 w zwalczaniu nowotworu

1.4.1. Interleukina 12 i receptor dla IL-12

Interleukina-12 jest cytokiną produkowaną głównie przez komórki dendrytyczne, makrofagi i limfocyty B, ale również przez monocyty, neutrofile, keratynocyty, granulocyty i komórki tuczne, a dzięki swojej aktywności tworzy pomost pomiędzy odpornością wrodzoną i adaptacyjną (Lasek i in., 2014). Pierwotnie IL-12 została scharakteryzowana jako czynnik stymulujący komórki NK (Kobayashi i in., 1989) oraz czynnik dojrzewania limfocytów cytotoksycznych (Stern i in., 1990), a obecnie wiadomo, że jest cytokiną o działaniu plejotropowym (Lasek i in., 2014).

Biologicznie aktywna IL-12 (IL-12p70) jest heterodimerem zbudowanym z dwóch podjednostek związanych kowalencyjnie: IL-12p35 (p35, IL-12 α) o masie 35kDa oraz IL-12p40 (p40, IL-12 β) o masie 40kDa, a geny kodujące te podjednostki znajdują się na różnych chromosomach (Hamza i in., 2010). Mimo że transkrypty podjednostki IL-12p35 występują w wielu typach komórek, to jest ona wydzielana jedynie w obecności drugiej podjednostki – IL-12p40, produkowanej przez DC, makrofagi, monocyty i neutrofile. Z uwagi na model badawczy wykorzystywany w niniejszej pracy, należy podkreślić, że w modelu mysim, ale nie u człowieka, podjednostka IL-12p40 może tworzyć homodimery o właściwościach antagonistycznych do IL-12p70, poprzez wiązanie się z podjednostką β 1 receptora dla IL-12 (Gately i in., 1996). Wykazano również, że podjednostka IL-12p40 może działać jako chemoatraktant makrofagów i promować migrację stymulowanych DC do węzłów chłonnych (Khader i in., 2006). Cytokina ta jest produkowana przez komórki APC w odpowiedzi na aktywację m.in. receptora TLR przez bakterie, grzyby, pasożyty wewnątrzkomórkowe i wirusy (Hamza i in., 2010). Produkcja IL-12 jest także indukowana dzięki interakcji cząsteczki CD40 występującej na powierzchni APC i jej ligandem CD40L eksprymowanym na aktywowanych limfocytach T (Cheng i in., 2022).

Podobnie jak w przypadku innych cytokin, aktywność biologiczna IL-12 jest uwarunkowana związaniem do receptora błonowego występującego głównie na powierzchni aktywowanych limfocytów T i komórkach NK, komórkach dendrytycznych oraz limfocytach B.

Obecność niewielkiej liczby receptorów dla tej cytokiny wykazano także na powierzchni nieaktywowanych komórek NK i niektórych subpopulacji limfocytów T, co potwierdza wrażliwość tych komórek na obecność IL-12 w otoczeniu (Trinchieri, 2003). Receptor dla IL-12 zaliczany jest do receptorów cytokinowych klasy 1 i składa się z dwóch podjednostek: IL-12R β 1 oraz IL-12R β 2, przy czym należy zaznaczyć, że do wygenerowania miejsc wiążących o wysokim powinowactwie niezbędna jest koekspresja obu podjednostek (Hamza i in., 2010). Po przyłączeniu się IL-12 do receptora, następuje aktywacja kinaz tyrozynowych Tyk2 oraz Jak2 przyłączonych po cytoplazmatycznej stronie do łańcuchów IL-12R β 1 oraz IL-12R β 2, a następnie fosforylacja i homodimeryzacja czynnika transkrypcyjnego STAT4, co w konsekwencji prowadzi do ekspresji genów w komórkach docelowych (Mirlekar i Pylayeva-Gupta, 2021).

1.4.2. Interleukina 18 i receptor dla IL-18

Cytokina funkcjonalnie podobną do IL-12 jest IL-18 wykazująca działanie prozapalne i regulatorowe, jednak ze względu na podobieństwo strukturalne została zakwalifikowana do rodziny cytokin IL-1 (Fabbi i in., 2015). Białko to zostało zidentyfikowane w 1989 r. w surowicy myszy zakażonych *Mycobacterium bovis* BCG oraz szczepionych dootrzewnowo lipopolisacharydem (LPS, ang. *lipopolysaccharide*) i opisane jako „czynnik indukujący IFN- γ ” (Nakamura i in., 1989). Nazwa została zmieniona w 1995 r., na IL-18 po sklonowaniu tej cytokiny wyizolowanej z ekstraktów wątroby myszy zakażonych *Propionibacterium acnes*, poddanych prowokacji LPS (Okamura i in., 1995).

IL-18 jest produkowana jako nieaktywne białko prekursorowe (pro-IL-18) pozbawione peptydu sygnałowego i w tej formie pozostaje wewnątrz komórki (Yasuda i in., 2019). Aktywacja białka prekursorowego IL-18 zachodzi przy udziale kaspazy-1 po utworzeniu inflamasomu i jest regulowana obecnością cząsteczek PAMP i DAMP rozpoznawanych przez PRPs (Fabbi i in., 2015). Aktywacja tej cytokiny jest indukowana także pod wpływem chymazy, granzymu B oraz proteinazy-3. Po przetworzeniu, dojrzała forma IL-18 jest wydzielana do otoczenia lub pozostaje związana z błoną komórkową (Lee i in., 2015), jednak ponad 80% prekursora IL-18 pozostaje nieprzetworzone wewnątrz komórki (Dinarelo i in., 2013). Komórkami wytwarzającymi prekursor IL-18 oraz aktywną formę IL-18 są aktywowane komórki układu odpornościowego takie jak DC i makrofagi. Nieaktywna forma IL-18 jest konstytutywnie ekspresjonowana w innych typach komórek w tym komórkach nabłonkowych, keratynocytach, osteoblastach, komórkach Kupffera, astrocytach i mikrogleju (Lee i in., 2015). Prekursor IL-18 może być także uwalniany przez komórki apoptotyczne i przetwarzany pozakomórkowo przez proteiny neutrofilowe, takie jak proteinaza-3 (Dinarelo i in., 2013).

Receptor IL-18 (IL-18R) jest heterodimerem składającym się z indukowalnej podjednostki IL-18R α wiążącej IL-18 na zewnątrz komórki i podjednostki IL-18R β eksprymowanej konstytutywnie i pośredniczącej w przekazywaniu sygnału do wnętrza. Domeny cytoplazmatyczne IL-18R α i IL-18R β zawierają wspólną domenę TIR, charakterystyczną dla rodziny IL-1R. Po związaniu IL-18, podjednostka IL-18R α tworzy kompleks o wysokim powinowactwie z IL-18R β , co prowadzi do indukcji ścieżki sygnałowej, wspólnej dla wszystkich czynników z rodziny IL-1. Do domeny TIR receptora dla IL-18 przyłącza się MyD88 oraz kinaza związana z receptorem IL-1 (IRAK) wywołując aktywację receptora (Yasuda i in., 2019). Receptor dla tej cytokiny występuje na powierzchni limfocytów T, komórkach NK, limfocytach B, makrofagach, neutrofilach, bazofilach, komórkach śródbłonna, komórkach mięśni gładkich, chondrocytach, keratynocytach, fibroblastach, melanocytach oraz licznych komórkach nabłonkowych (Lee i in., 2015), dzięki czemu IL-18 może bezpośrednio oddziaływać na różne typy komórek. W warunkach prawidłowych IL-18 indukuje powstawanie ziarnistości w neutrofilach, a także ekspresję FasL na powierzchni limfocytów T i komórek NK, dzięki czemu stymuluje zdolność tych komórek do aktywacji apoptozy komórek docelowych, ekspresjonujących na swojej powierzchni cząsteczkę Fas (Palma i in., 2013). Ponadto IL-18 wspiera wydzielanie IL-4 i IL-13 przez komórki NK, limfocyty B i komórki tuczne oraz indukuje wysoka ekspresję IgE przez limfocyty B. Wzmaga także produkcję czynników angiogennych i chemotaktycznych takich jak VEGF, CXCL12 i CCL2 w fibroblastach. Współdziałając z IL-23 indukuje różnicowanie dziewiczych limfocytów T CD4⁺ do Th17 oraz produkcję IL-17 przez tę populację komórek (Carroll, Paunovic, i in., 2008).

Podobnie jak w przypadku innych cytokin skuteczność działania IL-18 jest uwarunkowana obecnością receptora na powierzchni komórek docelowych, jednak aktywność tej cytokiny jest dodatkowo regulowana przez rozpuszczalne białko IL-18BP (ang. *IL-18 binding protein*) (Dinarello i in., 2013). IL-18BP jest produkowana konstytutywnie i wiąże dojrzałą IL-18 z wysokim powinowactwem (400 pM), uniemożliwiając przyłączenie się tej cytokiny do receptora występującego na powierzchni komórek, a w warunkach fizjologicznych jego poziom ponad 20-krotnie przewyższa ilość IL-18 (Sims i Smith, 2010). Zwiększony poziom IL-18BP zaobserwowano także w kilku modelach nowotworów, co może znacząco ograniczać przeciwnowotworowe działanie tej cytokiny.

Interesującym odkryciem ostatnich lat jest zidentyfikowanie i zbadanie aktywności przeciwnowotworowej zmutowanej formy IL-18 (DRIL-18, ang. *decoy-resistant IL-18*) o wysokim powinowactwie do podjednostki IL-18R α receptora, ale nie IL-18BP (Zhou i in., 2020). Po zastosowaniu DRIL-18 w badaniach przedklinicznych wykazano lepszą skuteczność monoterapii oraz terapii skojarzonej z udziałem anty-PD1 w porównaniu z zastosowaniem konwencjonalnej rIL-18 (Nakamura i in., 2020).

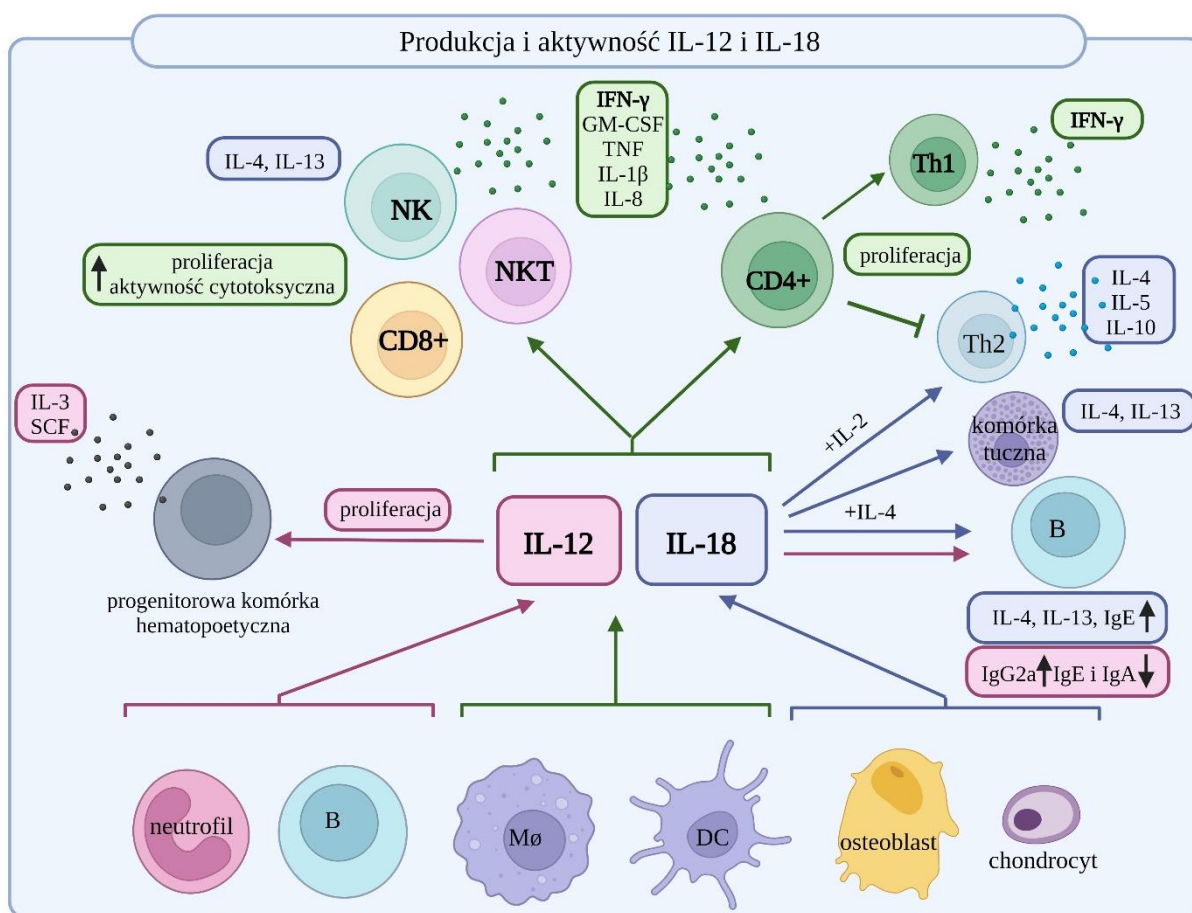
1.4.3. Aktywność IL-12 i IL-18 oraz zastosowanie tych cytokin w terapii przeciwnowotworowej

Zarówno IL-12, jak i IL-18 są cytokinami o plejotropowym działaniu i właściwościach prozapalnych. IL-12 stymuluje proliferację i aktywację funkcjonalnych limfocytów T i komórek NK oraz wytwarzanie przez te komórki IFN- γ i TNF- α (Ryc. 2). Przyłączenie się IL-12 wydzielanej przez komórki APC do receptora występującego na komórkach docelowych, wzmacnia produkcję IFN- γ , który w wyniku korzystnego sprzężenia zwrotnego indukuje zwiększoną produkcję IL-12, co dodatkowo indukuje wydzielanie IFN- γ przez APC. W przeciwieństwie do IFN- γ , cytokiny takie jak IL-10 i TGF- β hamują wydzielanie IL-12 przez APC. Ponadto IL-12 warunkuje różnicowanie dziewiczych limfocytów T CD4⁺ do subpopulacji komórek Th1, wzmagając ich aktywność i proliferację, a także pobudza limfocyty B do wydzielania przeciwciał klasy IgG oraz hamuje wydzielanie IgE (Cheng i in., 2022). IL-12 odgrywa też znaczącą rolę w migracji limfocytów T poprzez indukowanie funkcjonalnych cząsteczek adhezji komórkowej takich jak P- i E-selektyny na powierzchni komórek Th1, ale nie Th2, dlatego właśnie komórki Th1 są selektywnie rekrutowane do miejsc, w których wymagana jest aktywacja odpowiedzi odpornościowej. Cytokina ta oddziałuje także na hematopoetyczne komórki progenitorowe stymulując ich proliferację (Hamza i in., 2010). Warto też zaznaczyć, że IL 12 wpływa na zwiększenie ekspresji antygenu MHC I na powierzchni komórek nowotworowych, dzięki czemu rośnie prawdopodobieństwo rozpoznania nowotworu przez układ odpornościowy gospodarza, a tym samym promowanie swoistej aktywności cytotoksycznej limfocytów (Suzuki i in., 1998).

Ważną cechą IL-12 jest jej silna tendencja do współdziałania z kilkoma innymi cytokinami tj. TNF- α , IL-15, IL-18, GM-CSF, a szczególnie z IL-2 (Weiss i in., 2007). Oddziaływanie IL-12 z IL-2 wiąże się ze wzajemną regulacją ich receptorów, indukujących odrębne ścieżki sygnałowe (Cheng i in., 2022). Zarówno IL-12, jak i IL-2 indukują proliferację limfocytów T CD3⁺, wytwarzanie IFN- γ i aktywność cytotoksyczną komórek NK i limfocytów CTL. Wykorzystanie właściwości obu tych cytokin w terapii wydaje się obiecującym rozwiązaniem, dlatego też we wcześniejszych badaniach naszego zespołu prowadzono prace nad opracowaniem szczepionek przeciwnowotworowych m.in. na bazie komórek dendrytycznych transdukowanych do produkcji tych cytokin (Pajtasz-Piasecka i in., 2007; Rossowska i in., 2014; Wojas-Turek i in., 2016).

Natomiast zastosowanie w terapii IL-12 jednocześnie z IL-18 przyczynia się do eliminowania ograniczeń obserwowanych przy ich samodzielnym użyciu. Główną funkcją biologiczną IL-18, podobnie jak IL-12, jest zwiększenie produkcji IFN- γ przez limfocyty T oraz komórki NK, jak i promowanie różnicowania dziewiczych limfocytów T CD4⁺ do populacji komórek Th1 (Ryc. 2). Mimo że IL-18 jest silnym stymulatorem produkcji IFN- γ , nie jest możliwe indukowanie odpowiedzi typu Th1 przez tę cytokinę bez udziału IL-12. Ponadto IL-18 wzmacnia

wrodzoną odpowiedź odpornościową poprzez indukcję ekspresji cytokin takich jak GM-CSF, TNF- α , IL-1 β , a nawet IL-8 w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej. Należy jednak zaznaczyć, że IL-18 jest również zdolna do stymulowania odpowiedzi typu Th2, kiedy pod nieobecność IL-12 w środowisku, ale pod wpływem IL-2 promuje różnicowanie dziewiczych limfocytów T CD4⁺ do subpopulacji komórek Th2 i wydzielania przez te komórki IL-4, IL-5 oraz IL-10. Co ciekawe, obecność IL-12 i IFN- γ w otoczeniu, nie wpływa na zahamowanie aktywacji odpowiedzi odpornościowej typu Th2, co sugeruje, że może ona wystąpić równolegle z odpowiedzią Th1 (Carroll, Paunović, i in., 2008).



Ryc. 2. Wpływ IL-12 i IL-18 na proliferację i aktywność komórek układu odpornościowego.

B – limfocyt B; M ϕ – makrofag; DC – komórka dendrytyczna; NK – komórka NK, NKT – komórka NKT, CD8⁺ - limfocyt T CD8⁺; CD4⁺ - limfocyt T CD4⁺; Th1 – limfocyt Th1; Th2 – limfocyt Th2; SCF – czynnik komórek macierzystych (ang. *stem cell factor*); IL- interleukina; IFN- γ – interferon γ ; TNF – czynnik martwicy nowotworów (ang. *tumor necrosis factor*); IgE – immunoglobulina klasy E; IgA – immunoglobulina klasy A; IgG2a – immunoglobulina klasy G. Rycinę przygotowano w programie BioRender, na podstawie Hamza 2010 oraz Carroll 2008.

Podczas rozwoju nowotworu, IL-18 może zarówno wspierać odpowiedź odpornościową, ale także promować jego rozwój i przerzutowanie, a wiele komórek nowotworowych wykazuje sekrecję tej cytokiny (Palma i in., 2013). Zdolność do stymulacji czynników proangiogennych może wspierać unaczynienie nowotworu, a przez regulowanie czynników stymulujących proliferację

może bezpośrednio promować namnażanie komórek nowotworowych. Ponadto indukując ekspresję FasL na komórkach nowotworowych, może przyczynić się do wspierania apoptozy komórek odpornościowych poprzez aktywację ścieżki sygnałowej Fas/FasL (Arend i in., 2008).

Jednym z najważniejszych przykładów synergistycznego działania IL-12 i IL-18 jest korzystny wpływ IL-12 na ekspresję receptora dla IL-18, co w konsekwencji prowadzi do wzmocnienia odpowiedzi wywołanej działaniem samej IL-12 (Smeltz i in., 2001). Mimo że w niektórych badaniach wykazano proangiogenne właściwości IL-18, to podanie mysich komórek raka sutka SCK zdolnych do ekspresji IL-18 i IL-12 wpłynęło na zahamowanie wzrostu guza i ograniczenie angiogenezy (Coughlin i in., 1998). Inni autorzy wykazali, że zastosowanie IL-18 w połączeniu z IL-2 indukuje odpowiedź odpornościową typu Th2, ale przy współdziałaniu IL-12 wspiera polaryzację odpowiedzi w kierunku Th1 (Rodriguez-Galán i in., 2005). Ponadto w zwierzęcym modelu nowotworu indukowanego MCA, po podaniu samej IL-18 nie wykazano produkcji IFN- γ przez komórki węzłów chłonnych, podczas gdy zastosowanie samej IL-12 indukowało sekrecję IL-10. Natomiast jednoczesne zastosowanie tych cytokin spowodowało wzrost ekspresji IFN- γ i osłabienie ekspresji IL-10 (Q. Li i in., 2005). Subleski i wsp. wykazali, że podawanie IL-18 w połączeniu z IL-12 myszom obciążonym nowotworem wywołało przedłużony efekt zwiększonego stężenia IFN- γ w surowicy, podczas gdy u myszy traktowanych samą IL-18 lub IL-12 indukowany poziom IFN- γ był minimalny, a jego stężenie szybko ulegało obniżeniu (Subleski i in., 2006; Weiss i in., 2007).

1.5. Terapia przeciwnowotworowa

1.5.1. Wykorzystanie komórek dendrytycznych w immunoterapii

Zastosowanie komórek dendrytycznych w leczeniu chorych na nowotwory zaliczane jest do strategii terapii adoptywnej i ma na celu wyindukowanie swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Jednak pod wpływem niekorzystnego mikrośrodowiska nowotworowego zdolność DC do pobudzenia komórek efektorowych jest ograniczona. Ogromny postęp w badaniach nad zastosowaniem DC w immunoterapii osiągnięto dzięki opracowaniu metod pozyskiwania prekursorów tych komórek, namnażania ich oraz różnicowania w warunkach *ex vivo* (Galluzzi i in., 2014).

Przygotowanie szczepionek na bazie DC składa się z trzyetapowego procesu: generowanie niedojrzałych DC z prekursorów wykorzystując różne stymulatory, dostarczanie antygenów nowotworowych oraz podanie szczepionek. Mysie komórki dendrytyczne uzyskiwane w warunkach *ex vivo* są różnicowane z hodowli komórek szpikowych w obecności GM-CSF oraz IL-4. Natomiast najczęściej stosowaną metodą pozyskiwania prekursorów ludzkich komórek dendrytycznych jest izolacja monocytów (CD14⁺) z krwi obwodowej pacjenta lub dawcy. Możliwe

jest także otrzymanie ludzkich DC z prekursorowych komórek hematopoetycznych (CD34⁺), jednak w tym przypadku izolacja tych komórek z krwi obwodowej musi zostać poprzedzona mobilizacją komórek szpiku kostnego za pomocą G-CSF (Sabado i in., 2017). Uzyskane komórki prekursorowe poddaje się następnie kilkudniowej hodowli w obecności GM-CSF i IL-4 otrzymując niedojrzałe DC. Skuteczność tej immunoterapii jest zależna od stopnia dojrzałości i pobudzenia DC, a tym samym zdolności tych komórek do indukowania swoistych wobec antygenów nowotworowych limfocytów T cytotoksycznych oraz komórek Th1. W związku z powyższym niezbędne jest uzupełnienie procedury różnicowania o dostarczenie do niedojrzałych DC antygenów związanych z nowotworem (TAA, ang. tumor-associated antigens). W tym celu niedojrzałe DC poddaje się stymulacji antygenami nowotworowymi w postaci pojedynczych peptydów, całych białek lub lizatu komórek nowotworowych. Stosowane są także inne metody np. wprowadzenie mRNA kodującego antygen nowotworowy do DC za pomocą transdukcji lub transfekcji wektorami wirusowymi (Constantino i in., 2016).

Pierwszą próbę kliniczną, której celem było sprawdzenie bezpieczeństwa i skuteczności zastosowania szczepionek na bazie komórek dendrytycznych w immunoterapii opisano w 1996 r. (Hsu i in., 1996), a do tej pory przeprowadzono ich już ponad kilkaset. Bezpieczeństwo zastosowania komórek dendrytycznych w immunoterapii zostało już wielokrotnie potwierdzone, a zaobserwowane efekty uboczne są bardzo łagodne i ograniczają się do np. wysypki i bólu w miejscu wkłucia oraz objawy grypopodobne (Anguille i in., 2015). Jednak jedynym preparatem zatwierdzonym przez Agencję Żywności i Leków (FDA, ang. *Food and Drug Administration*) jest Sipuleucel-T (Provenge®). Szczepionka ta zawiera komórki dendrytyczne pozyskiwane w wyniku hodowli komórek jednojądrzastych izolowanych z krwi obwodowej pacjentów. W celu uzyskania dojrzałych i swoistych DC, do stymulacji wyizolowanych komórek stosowane jest rekombinowane białko fuzyjne PA2024, składające się z GM-CSF oraz kwaśnej fosfatazy prostaty (PAP, ang. *prostatic acid phosphatase*). Preparat ten wykorzystywany jest do leczenia chorych z bezobjawowym lub minimalnie objawowym nowotworem gruczołu krokowego opornego na kastrację. W badaniach klinicznych lek ten stosowano w terapii pacjentów z hormonoopornym rakiem stercza i podczas trwającej 36 miesięcy III fazy badań klinicznych powodował przedłużenie czasu przeżycia pacjentów o 4,1 miesiąca oraz zwiększenie prawdopodobieństwa przeżycia o 8,7% w odniesieniu do grupy pacjentów otrzymujących placebo (Beer i in., 2013; Kantoff i in., 2010).

Ze względu na swoje unikalne właściwości, już od ponad 20 lat komórki dendrytyczne są wykorzystywane jako narzędzie terapeutyczne do wprowadzenia czynników stymulujących układ odpornościowy gospodarza takich jak IL-2, IL-12, IL-7, CD40L lub GM-CSF (Caux i in., 1994; Curiel-Lewandrowski i in., 1999; Pajtasz-Piasecka i in., 2007; Westermann i in., 1998; Wojas-Turek i in., 2016). Wyniki badań prowadzonych w tym zakresie wykazują, że zmiana profilu

cytokin wytwarzanych przez DC prowadzi do zmian fenotypowych i funkcjonalnych tych komórek w tym zdolności migracyjnych oraz zwiększenia skuteczności prezentacji antygenów poprzez indukcję dojrzewania lub przedłużenia czasu przeżycia. Według dostępnych danych oraz na podstawie wcześniejszych badań zespołu dowiedziono, że zastosowanie DC modyfikowanych genetycznie do produkcji IL-12 prowadzi do zahamowania wzrostu nowotworu oraz aktywacji swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej (Rossowska i in., 2014).

1.5.1.1. Wykorzystanie wektorów lentiwirusowych do modyfikacji komórek dendrytycznych

Do modyfikacji genetycznej komórek dendrytycznych stosuje się najczęściej wektory wirusowe z rodziny *retroviridae*, do których należą γ -retrowirusy i lentiwirusy (Cavazzana-Calvo i in., 2000). Wykorzystując naturalne właściwości tych cząstek do przenoszenia materiału genetycznego i jego integracji z genomem gospodarza, możliwe jest uzyskanie stabilnej i długotrwałej ekspresji wbudowanych genów (Vannucci i in., 2013). Ponadto zastosowanie wektorów lentiwirusowych pozwala na wprowadzenie informacji genetycznej do komórek dzielących się, dzięki obecności dodatkowych mechanizmów regulujących etapy infekcji, czego nie można uzyskać stosując γ -retrowirusy. Zastosowanie wektorów lentiwirusowych jako narzędzia do modyfikacji genetycznych, w przeciwieństwie do γ -retrowirusów, pozwala także na przenoszenie większych transgenów (nawet o długości do 9 kbp) i wiąże się z niższym ryzykiem mutagenyzy insercyjnej (Liechtenstein i in., 2013; Milone i O'Doherty, 2018).

Przez kilka ostatnich lat udoskonalano system dostarczania genomu wirusowego do komórek pakujących (np. HEK 293T), a obecnie stosuje się system trzeciej generacji, w którym uzyskiwane są wektory lentiwirusowe samoinaktywujące (SIN, ang. *self-inactivating vectors*). System ten składa się z czterech plazmidów: plazmidu transferowego z wklonowanym genem białka docelowego, plazmidu pakującego kodującego geny białek *gag* i *pol*, plazmidu pakującego kodującego gen białka *rev* oraz plazmidu kodującego gen białka otoczki wirusa VSV-G (Gándara i in., 2018; Merten i in., 2016).

Możliwość wykorzystania systemu lentiwirusowego trzeciej generacji do transdukcji komórek dendrytycznych przyczyniła się do zwiększenia efektywności działania tych komórek oraz opracowywania nowych strategii przeciwnowotworowych z wykorzystaniem DC np. w terapii skojarzonej z udziałem chemioterapeutyków.

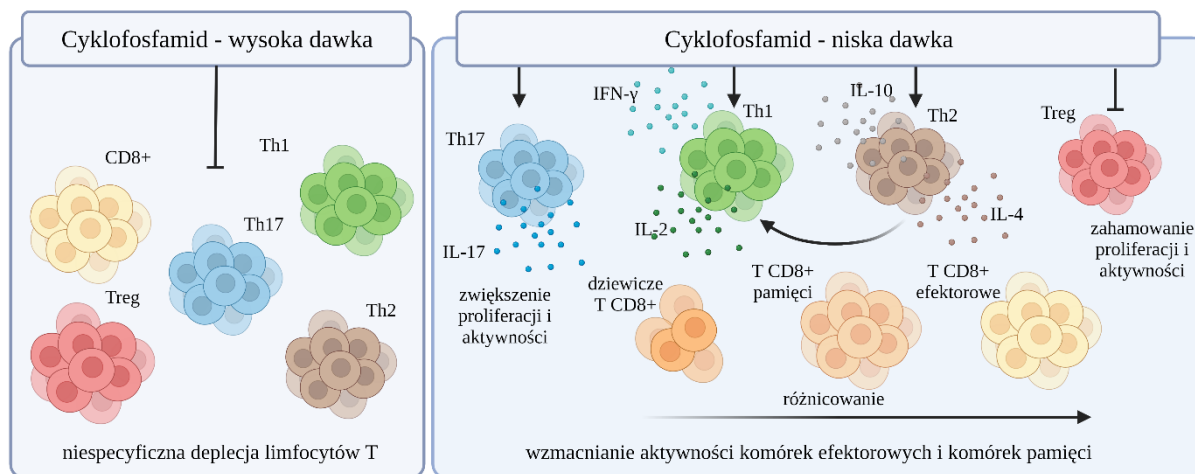
1.5.2. Immunomodulujące właściwości cyklofosfamidu

Cyklofosfamid (CY, ang. *cyclophosphamide*) jest alkilującym środkiem chemioterapeutycznym należącym do grupy oksazafosporyn o silnym działaniu immunosupresyjnym. Jest jednym z najstarszych leków przeciwnowotworowych, który został odkryty w 1958 r., a już rok później wprowadzony jako terapeutyk w leczeniu pacjentów chorych na nowotwory. Ten cytostatyk podawany w formie nieaktywnej farmakologicznie, a następnie ulega przemianom metabolicznym w wątrobie pod wpływem enzymów cytochromu P450 do aktywnej postaci metabolitu pośredniego - 4-hydroksycyklofosfamidu. Za alkilację DNA i powstanie połączeń krzyżowych w obrębie helisy odpowiadają metabolity aktywne takie jak akroleina i iperyt fosfoamidowy, przy czym akroleina ma także działanie toksyczne i uszkadza błonę pęcherza moczowego (Ahlmann i Hempel, 2016).

W zależności od zastosowanej dawki, CY wpływa na komórki nowotworowe bezpośrednio lub pośrednio poprzez stymulowanie mechanizmów wzmacniających odpowiedź przeciwnowotworową (Ryc. 3). Cytostatyk stosowany w wysokich dawkach ma właściwości alkilujące przez co jego bezpośrednie działanie prowadzi do eliminacji komórek nowotworowych, ale także niespecyficznego deplekcji komórek limfoidalnych znajdujących się zarówno podczas podziałów jak i w stanie spoczynku (de Jonge i in., 2005). Ponadto powoduje uszkodzenia szpiku kostnego, a w konsekwencji pancytopenię i silną immunosupresję. Stwierdzono, że cyklofosfamid zastosowany w wysokich dawkach zmniejsza liczbę limfocytów T CD8⁺ oraz populacji Th1, Th2, Th17 i Treg naciekających tkankę nowotworową (Motoyoshi i in., 2006). Natomiast zastosowanie niskich dawek tego cytostatyku w terapii przeciwnowotworowej wykazuje działanie immunomodulujące wobec komórek układu odpornościowego, a tym samym prowadzi do aktywacji mechanizmów odpowiedzi przeciwnowotworowej, w tym zwiększa naciek i wspomaga aktywność komórek limfoidalnych do TME (Abu Eid i in., 2016).

Jednym z ważniejszych elementów warunkującym immunomodulujące właściwości cyklofosfamidu jest jego udział w selektywnej eliminacji limfocytów T regulatorowych. Zaobserwowano, że zastosowanie metronomicznej terapii z udziałem cyklofosfamidu u pacjentów chorych na przerzutujące nowotwory lite, prowadzi nie tylko do obniżenia liczebności limfocytów Treg, ale także zwiększenia aktywności komórek NK oraz swoistych wobec antygenów nowotworowych limfocytów T (Ge i in., 2012; Ghiringhelli i in., 2007). Inni badacze odnotowali, że zastosowanie pojedynczej dawki cyklofosfamidu prowadzi do apoptozy limfocytów Treg już w ciągu 24 godzin od podania tego cytostatyku, a nadir występuje po 3-4 dniach, jednak w ciągu 10 dni od podania CY wielkość tej populacji odbudowuje się (Lutsiak i in., 2005). Zaproponowano kilka mechanizmów odpowiadających za wpływ cyklofosfamidu na eliminację i zahamowanie właściwości limfocytów Treg, jednak wydaje się, że główną przyczyną wysokiej wrażliwości

limfocytów Treg na działanie cyklofosfamidu jest obniżona zdolność tych komórek do jego neutralizacji. Toksyczne metabolity cyklofosfamidu są usuwane z komórek po ich związaniu do glutationu, natomiast limfocyty T regulatorowe nie są zdolne do wydajnej syntezy tej cząsteczki, ze względu na obniżony poziom wewnątrzkomórkowego ATP (Zhao i in., 2010).



Ryc. 3. Wpływ cyklofosfamidu na aktywność limfocytów T.

Th – limfocyt T pomocniczy, Treg – limfocyt T regulatorowy; CD8+ - limfocyt T CD8+; IL – interleukina; IFN- γ – interferon γ . Rycinę przygotowano w programie BioRender, na podstawie Abu Eid 2016.

Cyklofosfamid podawany w dawce immunomodulującej wpływa także na zwiększenie zdolności komórek dendrytycznych do prezentacji antygenów oraz promuje wydzielanie IFN typu I, prowadząc do polaryzacji limfocytów T CD4⁺ do populacji Th1 lub Th17, a efekt ten jest dodatkowo nasilony poprzez zahamowanie aktywności oraz eliminację limfocytów Treg w TME (Sistigu i in., 2011). Ponadto CY wspiera proliferację i aktywność limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ efektorowych oraz pamięci, a także wspomaga konwersję komórek Th2 do populacji Th1 (Abu Eid i in., 2016). Jak już wcześniej wspomniano, aktywacja DC jest zależna od obecności cząsteczek DAMP w otoczeniu. W procesie immunogennej śmierci komórek nowotworowych (ICD, ang. *immunogenic cell death*) indukowanej działaniem cyklofosfamidu, w TME dochodzi do akumulacji cząsteczek DAMP i pobudzenia DC. Podczas ICD następuje translokacja kalretikuliny z retikulum endoplazmatycznego na powierzchnię komórki nowotworowej, co stanowi sygnał dla DC do fagocytozy. Ponadto martwe komórki nowotworowe wydzielają białka HMGB1, będące ligandem dla receptora TLR4 występującego na powierzchni DC. Wszystkie te mechanizmy prowadzą do wydajniejszego pochłaniania antygenów nowotworowych przez komórki dendrytyczne i ich prezentacji krzyżowej aktywującej swoistą odpowiedź przeciwnowotworową zależną od limfocytów T cytotoksycznych (Schiavoni i in., 2011). Natomiast inni badacze udowodnili, że mimo to że, cyklofosfamid może wpływać na zmniejszenie populacji komórek mieloidalnych, a tym samym ograniczenie liczebności DC, to wkrótce po jego podaniu dochodzi do zwiększonej proliferacji komórek szpikowych. W wyniku różnicowania tych komórek w kierunku dojrzałych

DC i ich rekrutacji do TME aktywowana jest swoista odpowiedź przeciwnowotworowa (Radojic i in., 2010).

Ze względu na ogromny potencjał cyklofosfamidu w modulowaniu układu odpornościowego obecnie prowadzone badania skupiają się na opracowaniu protokołów terapii skojarzonych z udziałem tego cytostatyku. Obecnie prowadzone badania kliniczne dotyczą terapii skojarzonych z udziałem cyklofosfamidu w połączeniu z immunomodulatorami limfocytów T, przeciwciałami skierowanymi na immunologiczne punkty kontroli, cytokinami immunostymulującymi, transferem adoptywnym limfocytów CAR-T oraz innymi cytostatykami (Vanmeerbeek i in., 2020). Obecnie trwają także badania kliniczne nad zastosowaniem chemioimmunoterapii z udziałem cyklofosfamidu i komórek dendrytycznych np. w leczeniu pacjentów z nowotworami hematologicznymi, nowotworami głowy i szyi, glejakiem wielopostaciowym, czerniakiem, niedrobnokomórkowym rakiem płuc, rakiem gruczołu piersiowego, rakiem jajnika i jajowodu, rakiem prostaty, rakiem jelita grubego oraz pierwotnym rakiem wątroby (Vanmeerbeek i in., 2020; clinicaltrials.gov, słowa kluczowe: ang. *cancer, cyclophosphamide, dendritic cell*).

Na podstawie dostępnej wiedzy oraz przytoczonych wyników badań klinicznych nad zastosowaniem w terapii przeciwnowotworowej szczepionek na bazie komórek dendrytycznych (Yu i in., 2022) oraz cytokin takich jak IL-12 i IL-18 (Nguyen i in., 2020; Srivastava i in., 2010), w ramach niniejszej pracy podjęto próbę połączenia tych elementów do opracowania skutecznej immunoterapii. W celu zminimalizowania skutków ubocznych obserwowanych po zastosowaniu rekombinowanych cytokin, komórki dendrytyczne stymulowane antygenami nowotworowymi wykorzystano jako narzędzie do wprowadzenia IL-12 i IL-18 do organizmu. Ponadto w celu zwiększenia efektywności szczepionek, wykorzystano immunomodulujące właściwości cyklofosfamidu w terapii skojarzonej. Niniejsza praca doktorska stanowi próbę odpowiedzi na pytanie czy opracowane szczepionki na bazie komórek dendrytycznych transdukowanych do produkcji IL-12 i/lub IL-18 oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi są zdolne do wygenerowania skutecznej odpowiedzi przeciwnowotworowej w modelu mysiego raka jelita grubego MC38.

2. Założenia i cel pracy

Od wielu lat trwają badania nad wykorzystaniem różnego typu immunomodulatorów w zwiększaniu reaktywności układu odpornościowego u chorych na nowotwory. Jednym z narzędzi terapeutycznych umożliwiającym wprowadzenie zmian w mikrośrodowisku nowotworu są komórki dendrytyczne (**DC**, *ang. dendritic cells*) - komórki najskuteczniej prezentujące antygeny limfocytom T. Badania nad zastosowaniem DC w indukowaniu swoistej odpowiedzi odpornościowej pozwoliły na opracowanie metod ich aktywacji *ex vivo* za pomocą antygenów nowotworowych (**TAg**, *tumor antigens*), a ich wykorzystanie jako szczepionek dało możliwość zwiększenia prawdopodobieństwa rozpoznania heterogennej populacji komórek nowotworowych przez układ odpornościowy gospodarza. Ważnymi czynnikami biorącymi udział w regulowaniu odpowiedzi przeciwnowotworowej są cytokiny. Przykładowo, w modelach doświadczalnych wykazano wpływ zastosowania rekombinowanej IL-12 na zwiększenie immunogenności nowotworów, wiążący się jednak z wystąpieniem ciężkich objawów ubocznych. Próba zminimalizowania negatywnych skutków działania IL-12 jest lokalne wprowadzenie tej cytokiny w formie związanej z nośnikiem, terapii genowej lub stopniowe jej uwalnianie przez komórki modyfikowane genetycznie. Cytokiną funkcjonalnie podobną do IL-12 jest IL-18, której wpływ na modulowanie odpowiedzi odpornościowej w dużej mierze zależy od obecności IL-12 w środowisku. Tak więc, ze względu na duże znaczenie zarówno DC, jak i IL-12 oraz IL-18 w powstawaniu odpowiedzi odpornościowej, uzasadnione jest połączenie tych elementów i zastosowanie ich w tworzeniu nowych strategii zwalczania nowotworów jako uzupełnienie metod konwencjonalnych.

Celem niniejszej pracy było opracowanie i określenie wpływu zastosowania szczepionek na bazie komórek dendrytycznych transdukowanych lentiwirusowymi nośnikami genów do nadprodukcji IL-12 i IL-18 oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi na powstawanie odpowiedzi przeciwnowotworowej w modelu mysiego raka jelita grubego MC38. Kolejne etapy badań obejmowały:

1. Charakterystykę komórek dendrytycznych transdukowanych do produkcji cytokin, a w tym:
 - ocenę skuteczności transdukcji komórek dendrytycznych genami IL-12 i/lub IL-18;
 - ocenę wpływu transdukcji oraz stymulacji TAg na poziom zróżnicowania komórek dendrytycznych;
 - ocenę zdolności transdukowanych DC stymulowanych TAg do indukowania swoistej odpowiedzi komórkowej w warunkach *ex vivo*;

2. Charakterystykę funkcjonalną komórek szczeniowych, a w tym:
 - ocenę ich zdolności do naciekania tkanki nowotworowej oraz migracji do wartowniczych węzłów chłonnych;
 - ocenę kinetyki indukowania odpowiedzi przeciwnowotworowej wykonaną w oparciu o analizę wielkości populacji leukocytów w guzach, wartowniczych węzłach chłonnych i śledzionach poddanych powtórnej stymulacji z komórkami nowotworowymi w warunkach *ex vivo*, po jednokrotnym, okołoguzowym podaniu szczepionek;
3. Określenie efektu przeciwnowotworowego opracowanych szczepionek, a w tym:
 - ocenę wpływu immunoterapii na zahamowanie wzrostu guzów;
 - ocenę miejscowej odpowiedzi przeciwnowotworowej na podstawie analizy wielkości populacji leukocytów naciekających guzy i wartownicze węzły chłonne;
 - ocenę ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej w oparciu o analizę zmian wielkości populacji leukocytów w śledzionach oraz stopnia pobudzenia splenocytów poddanych wtórnej stymulacji z komórkami nowotworowymi w warunkach *ex vivo*;
4. Określenie efektu przeciwnowotworowego terapii skojarzonej z udziałem cyklofosfamid i opracowanych szczepionek, a w tym:
 - ocenę wpływu chemioimmunoterapii na zahamowanie wzrostu guzów;
 - ocenę miejscowej odpowiedzi przeciwnowotworowej w oparciu o analizę wielkości populacji leukocytów naciekających guzy i wartownicze węzły chłonne;
 - ocenę ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej w oparciu o analizę zmian wielkości populacji leukocytów w śledzionach oraz stopnia pobudzenia splenocytów poddanych wtórnej stymulacji z komórkami nowotworowymi w warunkach *ex vivo*;

3. Materiały i metody

3.1. Materiały

3.1.1. Model zwierzęcy

Do badań w warunkach *in vivo* wykorzystano 8-12 tygodniowe samice myszy szczepu C57BL/6/J pochodzące z hodowli prowadzonej przez Centrum Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Zdrowe zwierzęta, od których pobierany był szpik kostny przeznaczony do hodowli komórek dendrytycznych oraz śledzony wykorzystywane do testów, utrzymywano w standardzie higienicznym SPF (*ang. Specific Pathogen Free*). Doświadczenia terapeutyczne prowadzono w części konwencjonalnej Zwierzętarni Doświadczalnej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu, za zgodą I Lokalnej Komisji Etycznej (nr uchwały 21/2017 oraz 052/2020).

3.1.2. Linie komórkowe

Tabela 1. Linie komórkowe.

LINIA KOMÓRKOWA	CHARAKTERYSTYKA LINII ORAZ TECHNIKA HODOWLI	POCHODZENIE
MC38/0	Linia komórek mysiego raka jelita grubego uzyskana w wyniku naprzemiennych pasażów <i>in vivo/ in vitro</i> (Pajtasz-Piasecka i in., 2004), wyprowadzona z wyindukowanego chemicznie raka jelita grubego u myszy szczepu C57BL/6 (MC38, <i>ang. mouse colon adenocarcinoma, grade III</i> , (Corbett i in., 1975);	IITD PAN we Wrocławiu
	Komórki hodowano w uzupełnionym podłożu RPMI 1640 z dodatkiem 5% FBS. Hodowlę pasażowano co 3-4 dni za pomocą roztworu trypsyny z EDTA o pH 8,0.	
LentiX 293T	Linia komórek pakujących stosowana do produkcji wektorów lentiwirusowych. Komórki te wywodzą się z ludzkich embrionalnych komórek nerki HEK293 (<i>ang. human embryonic kidney cells</i>), które zostały poddane modyfikacjom genetycznym i charakteryzują się dużą podatnością na transfekcje oraz wydają produkcją lentiwirusów.	Clontech/Takara
	Komórki hodowano w uzupełnionym podłożu DMEM z dodatkiem 10% FBS. Hodowlę pasażowano co 3-4 dni za pomocą roztworu trypsyny z EDTA o pH 7,4.	

3.1.3. Plazmidy lentiwirusowe

Do produkcji wektorów lentiwirusowych wykorzystano system lentiwirusowy trzeciej generacji składający się z plazmidów pomocniczych (Tabela 2.) zakupionych w firmie Addgene oraz plazmidów transferowych (Tabela 3.) dostarczonych przez firmę VectorBuilder.

Tabela 2. Plazmidy pomocnicze.

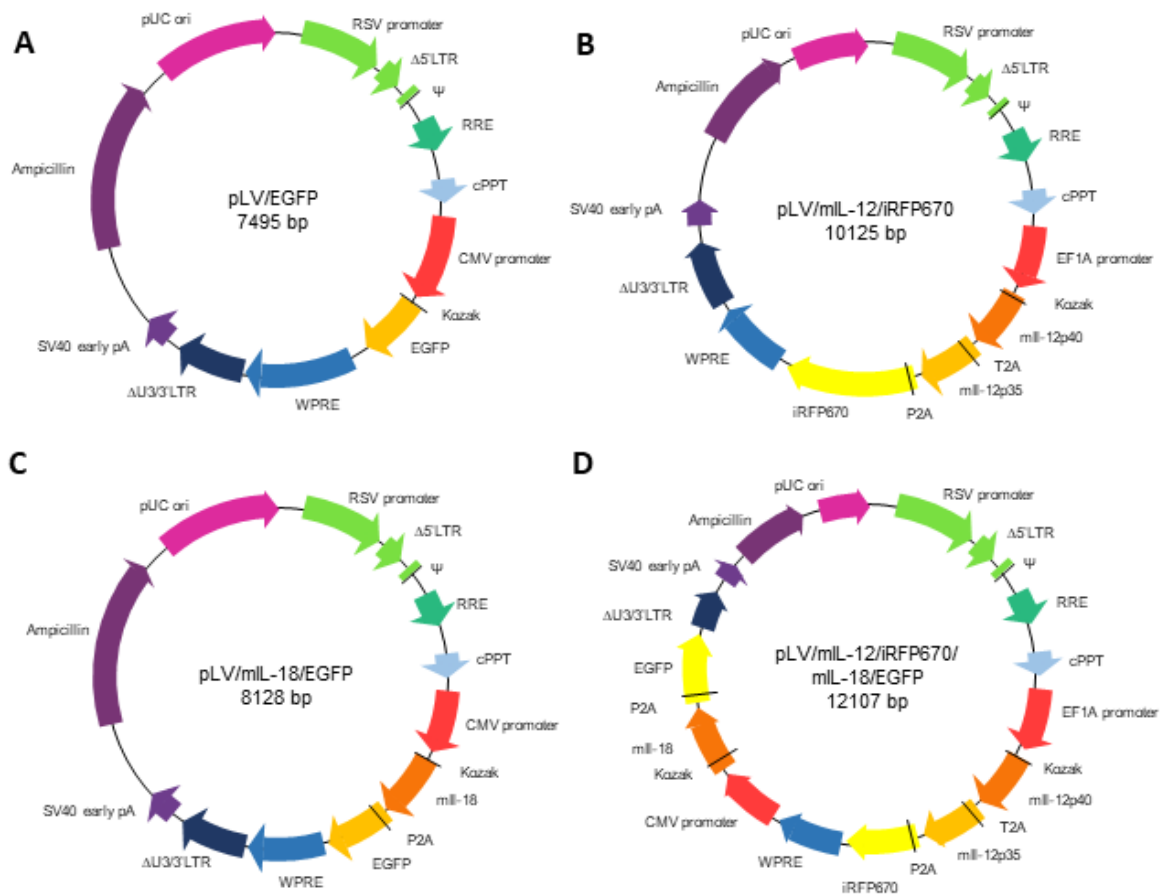
PLAZMID	CHARAKTERYSTYKA
pMD2.G	plazmid kodujący gen białka otoczki wirusa VSV-G
pMDL-g/p RRE	plazmid pakujący, kodujący geny białek <i>gag</i> i <i>pol</i>
pRSV-Rev	plazmid pakujący kodujący gen białka Rev

Tabela 3. Plazmidy transferowe.

PLAZMID	CHARAKTERYSTYKA
pLV/EGFP	plazmid transferowy z wklonowanym genem białka wzmocnionej zielonej fluorescencji (EGFP, <i>ang. Enhanced Green Fluorescent Protein</i>); plazmid kontrolny
pLV/mIL-12/iRFP670	plazmid transferowy z wklonowanymi genami mysiej IL-12 (geny podjednostki p40 oraz p35) i iRFP670
pLV/mIL-18/EGFP	plazmid transferowy z wklonowanymi genami mysiej IL-18 i EGFP
pLV/mIL-12/iRFP670/mIL-18/EGFP	plazmid transferowy z wklonowanymi genami mysiej IL-12 (geny podjednostek p40, p35) i iRFP670 oraz genem mysiej IL-18 i EGFP

3.1.4. Podłoża hodowlane

- **RPMI 1640 GlutaMAX** (*ang. Roswell Park Memorial Institute 1640*, Gibco, Szkocja, Wielka Brytania) - Skład podłoża hodowlanego uzupełniano o penicylinę (100 U/ml), streptomycynę (100 µg/ml), 2-merkaptoetanol (5×10^{-5} M), pirogronian sodu (1mM) oraz FBS w odpowiednim stężeniu dla danej hodowli.
- **DMEM** (*ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN, Wrocław, Polska) – Skład podłoża hodowlanego uzupełniano o glukozę (4,5 g/l), L-glutaminę (1 mM), pirogronian sodu (1mM), penicylinę (100 U/ml), streptomycynę (100 µg/ml).
- **Opti-MEM GlutaMAX** – (*ang. Minimal Essential Medium*, Gibco, Szkocja, Wielka Brytania) – Skład podłoża hodowlanego uzupełniano o penicylinę (100 U/ml), streptomycynę (100 µg/ml) oraz 5% FBS.



Ryc. 4. Mapy plazmidów transferowych.

3.1.5. Płyny, odczynniki i czynniki wzrostowe

- 2-merkaptoetanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy);
- Błękit trypanu – 20% roztwór do liczenia komórek; roztwór trypanu (1mg/ml) rozcieńczano w 4,25% NaCl w stosunku 4:1 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy);
- Bufor do transfekcji – roztwór o składzie: 150mM NaCl, 25 mM HEPES, pH 7,5 (Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN, Wrocław, Polska);
- Count Bright Absolute Counting Beads (Thermo Fisher Scientific)
- DMSO – dimetylosulfotlenek, krioprotektant (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy);
- FBS (*ang. Fetal Bovine Serum*) – inaktywowana płodowa surowica bydlęca (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy);
- Glukoza (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy);
- Jonomycyna (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy);
- L-Glutamina (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy);
- Mitomycyna C (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy);

- NaCl 0,9% (Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN, Wrocław, Polska);
- NaCl 4,25% (Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN, Wrocław, Polska);
- PBS (*ang. Phosphate-Buffered Saline*) – 0,9% roztwór soli fizjologicznej o pH 7,4 buforowany fosforanami (Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN, Wrocław, Polska);
- PEG 6000 BioUltra – glikol polietylenowy (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy);
- Penicylina (Polfa, Tarchomin, Polska);
- Pirogronian sodu (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy);
- PMA – ester forbolu (12-mirystynian, 13-octan forbolu), (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy)
- Polibren (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy);
- Polietylenoimina (PEI, Polysciences, Warrington, PA, USA)
- rmGM-CSF (*ang. recombinant mouse Granulocyte Macrophage Colony-Stimulation Factor*) – rekombinowany myszy czynnik tworzenia kolonii granulocytów i makrofagów (ImmunoTools, Friesoythe, Niemcy);
- rmIL-2 (*ang. recombinant mouse interleukin-2*) rekombinowana mysia interleukina 2 (ImmunoTools, Friesoythe, Niemcy);
- rmIL-4 (*ang. recombinant mouse interleukin-4*) – rekombinowana mysia interleukina 4 (ImmunoTools, Friesoythe, Niemcy);
- Roztwór trypsyny z EDTA o pH 8,0 lub pH 7,4– enzymatyczny roztwór do pasażowania komórek adherentnych, 0,25% roztwór trypsyny z 2mM EDTA w PBS (Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN, Wrocław, Polska);
- Streptomycyna (Polfa, Tarchomin, Polska);
- Tween 20 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy);

3.1.6. Komercyjne zestawy odczynników

Zestaw odczynników do oznaczania miana zagęszczonych wektorów lentiwirusowych

- **Quick Titer Lentivirus Titer Kit (Lentivirus-Associated HIV p24)** – zestaw odczynników do oznaczania miana wektorów lentiwirusowych (Cell Biolabs, Inc. San Diego CA);

Zestawy stosowane do oznaczeń metodą Real-Time PCR:

- NucleoSpin RNA – zestaw odczynników do izolacji RNA (Macherey-Nagel, Düren, Niemcy);
- RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit – zestaw odczynników do przeprowadzania reakcji PCR w czasie rzeczywistym (Applied Biosystem, Kalifornia, USA);

- TaqMan Gene Expression Master Mix – odczynnik do przeprowadzania reakcji PCR w czasie rzeczywistym (Applied Biosystem, Kalifornia, USA);
- TaqMan Gene Expression Assay – sondy do oznaczeń ekspresji genów metodą PCR w czasie rzeczywistym (Applied Biosystem, Kalifornia, USA). Numery identyfikacyjne zastosowanych sond przedstawiono w Tabeli 4.

Tabela 4. Sondy do oznaczeń ekspresji genów metodą PCR w czasie rzeczywistym.

GEN	NR SONDY
HPRT	Mm00446968_m1
IL-12p35	Mm00434169_m1
IL-18	Mm00434226_m1

Odczynniki stosowane do oznaczeń metodą cytometrii przepływowej:

- DAPI – barwnik fluorescencyjny stosowany do barwienia jąder komórkowych; w niniejszej pracy stosowany do oznaczania martwych komórek (Molecular Probes, Eugene, USA);
- LIVE/DEAD Fixable Violet - Dead Cell Stain Kit – barwnik fluorescencyjny stosowany do oznaczania martwych komórek w utrwalonych próbkach (Invitrogen, Kalifornia, USA);
- eBioscience FoxP3/ Transcription Factor Staining Buffer Set – (Invitrogen, Kalifornia, USA);
- 5(6)-CFDA-SE – dioctan karboksylfluoresceiny estru sukcyimidylu (*ang. carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*) barwnik fluorescencyjny (Molecular Probes, Eugene, USA);
- DiOC₁₈(3) – zielony barwnik fluorescencyjny (Vybrant DiO Cell-Labeling Solution, Molecular Probes, Eugene, USA);
- Jodek propidyny (PI, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy);

Zestawy testów i odczynniki stosowane w immunoenzymatycznym teście ELISA:

- Invitrogen Pre-coated ELISA Kit – zestaw do oznaczania stężenia mysiej IL-18 w teście ELISA, zawierający: opłaszczoną przeciwciałami płytkę testową, bufor do przemywania, bufor do rozcieńczania próbek i standardów, mIL-18 o znanym stężeniu do przygotowania krzywej standardowej, bufor blokujący tło, przeciwciała detekcyjne skoniugowane z biotyną, koniugat awidyny i peroksydazy chrzanowej, roztwór TMB, bufor zatrzymujący reakcję. Rozcieńczenia odczynników i przeciwciał przygotowano według wskazań producenta (Invitrogen, Kalifornia, USA);
- Invitrogen Uncoated ELISA Kit – zestaw do oznaczania stężenia mysiej IL-12 lub mysiego IFN- γ w teście ELISA, zawierający: bufor opłaszczający, bufor blokujący tło, przeciwciała

opłaszczające, rekombinowane białko o znanym stężeniu do przygotowania krzywej standardowej, przeciwciała detekcyjne skoniugowane z biotyną, koniugat awidyny i peroksydazy chrzanowej oraz roztwór substratu TMB. Rozcieńczenia odczynników i przeciwciał przygotowano według wskazań producenta (Invitrogen, Kalifornia, USA);

- BD OptEIA ELISA set – zestaw do oznaczania stężenia mysiej IL-4 lub IL-10 w teście ELISA, zawierający: przeciwciała opłaszczające, rekombinowane białko o znanym stężeniu do przygotowania krzywej standardowej, przeciwciała detekcyjne skoniugowane z biotyną oraz koniugat awidyny i peroksydazy chrzanowej. Rozcieńczenia przeciwciał i rekombinowanego białka przygotowano według wskazań producenta (BD Pharmingen, CA, USA);
- Bufor opłaszczający – 0,1 M węglan sodu o pH 9,5 (dla IL-4) lub 0,2 M fosforan wapnia o pH 6,5 (dla IL-10) (Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN, Wrocław, Polska);
- Bufor do przemywania – PBS z dodatkiem 0,05% Tween 20, pH 7,0;
- Bufor blokujący tło – PBS z dodatkiem 10% FBS, pH 7,0;
- Roztwór zatrzymujący reakcję – 1 M H₃PO₄ (Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN, Wrocław, Polska);
- Roztwór substratu – tetrametylobenzydyna (TMB) i nadtlenek wodoru w stosunku objętościowym 1:1 (BD Pharmingen, CA, USA)

Tabela 5. Zestawy testów ELISA stosowane do oznaczania stężenia cytokin w nadsączach hodowlanych.

CYTOKINA	PRODUCENT	CZUŁOŚĆ TESTU [PG/ML]
mIL-18	Invitrogen	31,3
mIL-12p70	Invitrogen	31,3
mIFN- γ	Invitrogen	31,3
mIL-4	BD Pharmingen	7,8
mIL-10	BD Pharmingen	31,3

3.1.7. Przeciwciała monoklonalne stosowane do oznaczeń metodą cytometrii przepływowej.

Tabela 6. Przeciwciała monoklonalne stosowane w oznaczeniach cytometrycznych.

ANTYGEN	CHARAKTERYSTYKA PRZECIWCIAŁA	KLASA PRZECIWCIAŁA (KLON)	FLUOROCHROMY	STOSOWANE ROZCIEŃCZENIE	PRODUCENT
CD3e	Szczurcze anty-mysz	IgG2b, κ (17A2)	BV 605	1:200	BioLegend
CD4	Szczurcze anty-mysz	IgG2a, κ (RM4-5)	FITC	1:200	BioLegend
CD8a	Szczurcze anty-mysz	IgG2a, κ (53-6,7)	APC-Fire750	1:200	BioLegend

CD11b	Szczurze anty-mysz/człowiek	IgG2b, κ (M1/70)	PerCP-Cy5,5	1:200	BioLegend
CD11c	Chomicze anty-mysz	IgG (N418)	BV* 650	1:200	BioLegend
CD19	Szczurze anty-mysz	Rat IgG2a, κ (6D5) (1D3)	AF 700 PE-CF594	1:200	BioLegend
CD25	Szczurze anty-mysz	IgG1, λ (PC61)	PE	1:200	BioLegend
CD44	Szczurze anty-mysz	IgG2b, κ (IM7)	PE-Cy7	1:200	BioLegend
CD45	Szczurze anty-mysz	IgG2b, κ (30-F11)	BV*605	1:200	BioLegend
CD62L	Szczurze anty-mysz	IgG2a, κ (MEL-14)	PerCP-Cy5.5	1:200	BioLegend
CD80	Chomicze anty-mysz	IgG (16-10A1) (i.c. HTK888)	PerCP-Cy5,5	1:200	BioLegend
CD86	Szczurze anty-mysz	IgG2b, κ (GL-1) (i.c. RTK2758)	PE-Cy7	1:200	BioLegend
CD107a	Szczurze anty-mysz	IgG2a, κ (1D4B) (i.c. RTK2758)	APC	1:200	BioLegend
FoxP3	Szczurze anty-mysz/człowiek	IgG2a, κ (FJK-16s) (i.c. eBR2a)	APC	1:100	eBioscience
F4/80	Szczurze anty-mysz	IgG2a, κ (BM8)	AF 700**	1:200	BioLegend
Ly6C	Szczurze anty-mysz	IgG2c, κ (HK1.4)	PE	1:200	BioLegend
Ly6G	Szczurze anty-mysz	IgG2a, κ (1A8)	APC-Cy7	1:200	BioLegend
MHC II	Szczurze anty-mysz	IgG2b, κ (M5/114.15.2) (i.c. RTK 4530)	FITC APC-Cy7	1:400	BioLegend
NK 1.1	Szczurze anty-mysz	IgG2a, κ (PK136)	PE-Dazzle	1:200	BioLegend
CD16/CD32	Szczurze anty-mysz	IgG2a, λ (93)	-	1:50	eBioscience

* - BV (Briliant Violet); ** - AF (Alexa Fluor)

3.2. Metody

3.2.1. Prowadzenie hodowli komórek eukariotycznych *in vitro* oraz *ex vivo*

Wykorzystywane w badaniach linie komórkowe przedstawiono w Tabeli 1. Hodowle komórkowe prowadzono w warunkach standardowych (37°C, 95% wilgotności powietrza i 5% CO₂) w plastikowych butelkach o powierzchni 75cm² (Corning). Komórki pasażowano co 3-4 dni za pomocą roztworu trypsyny z EDTA, tak aby utrzymać niską gęstość hodowli. Przy każdym pasażu, mikroskopowo oceniano liczebność i żywotność komórek z zastosowaniem błękitu trypanu oraz komory Bürkera.

W doświadczeniach wykorzystano także hodowle komórkowe *ex vivo*: hodowlę komórek dendrytycznych pochodzenia szpikowego (opisano w podrozdziale 3.2.5) oraz hodowlę komórek izolowanych z mysiej śledziony (opisano w podrozdziałach 3.2.2., 3.2.9.1., 3.2.11.3).

3.2.2. Izolacja splenocytów ze śledzion pobranych od zdrowych myszy szczepu C57BL6/J

Śledziony pobierano od zdrowych myszy szczepu C57BL6/J. W celu uzyskania jednolitej zawiesiny splenocytów, pobrane narządy przecierano przez jałowy nylonowy filtr, zawieszano w RPMI z dodatkiem 2,5% FBS, a następnie dwukrotnie wirowano (7 min., 192×g). Otrzymane komórki śledzionowe zawieszano w mieszaninie składającej się z RPMI (40%), FBS (50%) oraz DMSO (10%) i zamrażano w oparach ciekłego azotu, a po upływie 1,5 godziny przekładano do ciekłego azotu.

3.2.3. Przygotowanie lizatu z komórek nowotworowych

Lizat z komórek nowotworowych MC38 wykorzystywano jako źródło antygenów nowotworowych (TA_g) do stymulacji niedojrzałych komórek dendrytycznych. W celu uzyskania lizatu, komórki MC38 zdejmowano z butelek hodowlanych przy użyciu trypsyny z EDTA, wirowano (7 min., 192×g) i zawieszano w RPMI z dodatkiem 5% FBS, doprowadzając do gęstości 5×10⁶ kom./ml. Zawiesinę komórkową 5-krotnie zamrażano w ciekłym azocie i rozmrażano w temperaturze (temp.) 37°C, a następnie poddawano sonikacji z wykorzystaniem urządzenia Bandelin, Sonorex Digital (2 godziny, 37°C). Otrzymany lizat komórkowy przechowywano w temp. -20°C.

3.2.4. Produkcja i zagęszczanie wektorów lentiwirusowych

3.2.4.1. Produkcja wektorów lentiwirusowych

Wektory lentiwirusowe otrzymywano z nadsączy hodowlanych komórek pakujących Lenti-X™ 293T transfekowanych plazmidami pomocniczymi (Tabela 2.) i plazmidami transferowymi (Tabela 3.) wchodzącymi w skład systemu lentiwirusowego trzeciej generacji. Hodowlę komórek Lenti-X™ 293T (5×10^6 kom.) zakładano na szalkach hodowlanych (Sarstedt) o powierzchni 150 cm^2 w DMEM uzupełnionym 10% FBS. Po około 72 godzinach hodowli, gdy komórki osiągały 80% konfluencji, przeprowadzano transfekcję wcześniej przygotowaną mieszaniną plazmidowych DNA i polietylenoiminy (PEI). Roztwory plazmidowych DNA i polietylenoiminy (PEI) sporządzono w buforze do transfekcji i inkubowano 10 min. w temperaturze pokojowej (RT, ang. *room temperature*). Po tym czasie roztwór PEI wkraplano do roztworu DNA, intensywnie wytrząsając przez 3 min. i ponownie inkubowano przez 15 min. w RT. Tak przygotowaną mieszaninę dodawano do komórek pakujących na 24 godziny. Kolejnego dnia, na szalkach wymieniano medium hodowlane na Opti-MEM uzupełnione o 5% FBS. Przez kolejne 48 godzin, transfekowane komórki Lenti-X™ 293T wydzielają cząsteczki wirusów do medium hodowlanego.

3.2.4.2. Zagęszczanie wektorów lentiwirusowych

Nadsącza zawierające wektory lentiwirusowe zbierano i odwirowano (20 min., $2\,000 \times g$) w celu wstępnego oczyszczenia ze zlepów komórkowych oraz martwych komórek, a szalki uzupełniano o świeże medium hodowlane. Następnie, do nadsączy dodawano mieszaninę glikolu polietylenowego (PEG) 6 000, 4 M NaCl oraz PBS i inkubowano 90 min. w temp. $4 \text{ }^\circ\text{C}$, intensywnie mieszając co 30 min. Po tym czasie mieszaninę odwirowano ($80 \text{ min.}, 3\,800 \times g$), a uzyskany pelet zawierający wektory lentiwirusowe zawieszano w PBS i przechowywano w temp. -80°C . Nadsącza z nad transfekowanych komórek Lenti-X™ 293T zbierano dwukrotnie.

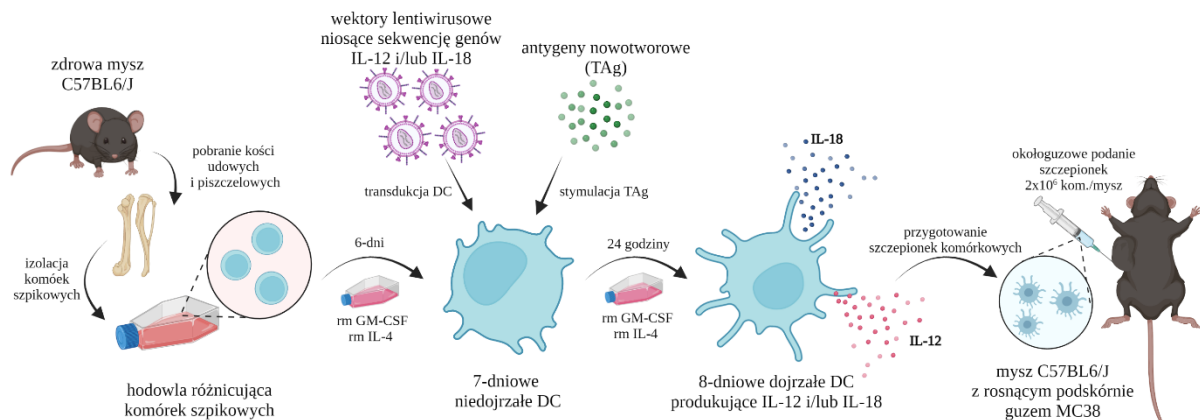
3.2.4.3. Określenie miana zagęszczonych wektorów lentiwirusowych

Miano wektorów lentiwirusowych określano za pomocą komercyjnie dostępnego testu Quick Titer Lentivirus Titer Kit (Lentivirus-Associated HIV p24). Odczynniki, próbki oraz roztwory wzorcowe białka p24 HIV1 przygotowano zgodnie z instrukcją producenta. Odpowiednio przygotowane (inaktywowane) próbki wektorów lentiwirusowych lub roztworów wzorcowych nakładano na płytkę opłaszczoną przeciwciałami anti-p24 (przygotowaną przez producenta) i inkubowano przez noc w temp. $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Po tym czasie dołki trzykrotnie odplukano w buforze do przemywania i osuszano. Następnie nakładano po $100 \text{ }\mu\text{l}$ /dołek roztworu przeciwciał monoklonalnych anti-p24 sprzężonych z FITC i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze

pokojoyej na wytrząsarce orbitalnej. Po upływie czasu inkubacji dołki ponownie odpłukano i nakładano po 100 μ l/dołek roztworu przeciwciał monoklonalnych anty-FITC sprzężonych z HRP. Tak przygotowana płytkę inkubowano przez kolejną godzinę w temperaturze pokojowej, na wytrząsarce orbitalnej. Po zakończeniu inkubacji dołki ponownie odpłukano i nakładano po 100 μ l/dołek roztworu substratu. Inkubację prowadzono przez około 8 min. Reakcję enzymatyczną blokowano przez dodanie 100 μ l/dołek buforu do zatrzymywania reakcji. Bezpośrednio po zatrzymaniu reakcji mierzono absorbancję roztworów przy długości fali 450 nm za pomocą spektrofotometru Thermo Labsystem Multiskan RC oraz oprogramowania Genlite. Miano wektorów lentiwirusowych obliczono na podstawie wyznaczonej krzywej standardowej z roztworów wzorcowych białka p24 HIV1 oraz założeń podanych przez producenta: 1 ng p24 = $1,25 \times 10^7$ LPs gdzie LPs (cząstki lentiwirusowe, *Lentiviral Particles*).

3.2.5. Przygotowanie szczepionek komórkowych na bazie modyfikowanych komórek dendrytycznych pochodzenia szpikowego

Szczepionki komórkowe otrzymywano w wieloetapowym procesie składającym się z izolacji komórek szpikowych, prowadzenia hodowli różnicującej te komórki, transdukcji niedojrzałych komórek dendrytycznych oraz stymulacji antygenami nowotworowymi (TAG), którego schemat przedstawiono na Ryc. 5.



Ryc. 5. Schemat przygotowania szczepionek na bazie komórek dendrytycznych pochodzenia szpikowego transdukowanych za pomocą wektorów lentiwirusowych trzeciej generacji kodujących geny IL-12 i/lub IL-18 oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi.

3.2.5.1. Izolacja i hodowla komórek dendrytycznych pochodzenia szpikowego w warunkach *ex vivo*

Od zdrowych myszy szczepu C57BL6/J pobierano kości udowe i piszczelowe, z których izolowano szpik kostny. Wyizolowane komórki szpikowe trzykrotnie odwirowano (7 min, 192 \times g)

w medium hodowlanym i zakładano hodowlę różnicującą o gęstości 10×10^6 kom./10 ml w butelkach o powierzchni 75 cm^2 (Eppendorf). Komórki dendrytyczne pochodzenia szpikowego (oznaczane dalej jako **DC**) uzyskiwano podczas hodowli komórek szpikowych, prowadzonej w obecności rm GM-CSF (40 ng/ml) oraz rm IL-4 (10 ng/ml) w RPMI z dodatkiem 10% FBS w warunkach standardowych (37°C , 95% wilgotności powietrza i 5% CO_2). Po 2 dniach, do hodowli dodano 10 ml medium hodowlanego, a po 4 dniach hodowli, z butelek odbierano 10 ml zawiesiny komórkowej, którą wirowano (7 min., $192 \times g$), a otrzymany pelet komórkowy zawieszano w 10 ml świeżego medium hodowlanego i nakładano do butelek. W szóstym dniu hodowli, komórki zbierano z butelek przy pomocy roztworu trypsyny i EDTA. Niedojrzałe DC zawieszano w RPMI uzupełnionym o 40 ng/ml GM-CSF i 5 ng/ml IL-4 i zakładano hodowlę na nowych butelkach w gęstości 15×10^6 kom./20 ml. W kolejnych dniach hodowli, uzyskane DC transdukowano wektorami lentiwirusowymi (podrozdział 3.2.5.2.), a następnie stymulowano TAg (podrozdział 3.2.5.3.).

3.2.5.2. *Transdukcja komórek dendrytycznych pochodzenia szpikowego uzyskanych w warunkach ex vivo*

W siódmym dniu hodowli różnicującej, DC transdukowano wektorami lentiwirusowymi trzeciej generacji niosącymi sekwencję genów mysiej IL-12 (pLV/IL-12), mysiej IL-18 (pLV/IL-18) lub genami obu tych cytokin jednocześnie (pLV/IL-12/IL-18), otrzymując w ten sposób komórki transdukowane odpowiednio do produkcji samej IL-12 (DC/IL-12), samej IL-18 (DC/IL-18) lub obu tych cytokin (DC/IL-12/IL-18). Ponadto w celu opracowania najskuteczniejszej metody transdukcji komórek zdolnych do jednoczesnej produkcji IL-12 i IL-18, DC transdukowano dwoma wektorami lentiwirusowymi pLV/IL-12 oraz pLV/IL-18 otrzymując komórki oznaczone jako DC/IL-12+IL-18. Kontrolę procesu transdukcji stanowiły komórki transdukowane wektorem kodującym gen białka wzmocnionej zielonej fluorescencji (pLV/EGFP) oznaczone jako DC/EGFP oraz komórki nietransdukowane (DC). Odpowiednie mieszaniny wektorów lentiwirusowych (w liczbie 4 cząstek LV/1 kom. docelową) dodawano do zawiesiny komórek dendrytycznych. Transdukcję prowadzono w obecności polibrenu ($8 \mu\text{g/ml}$) przez 28 godzin w standardowych warunkach hodowli.

3.2.5.3. *Stymulacja transdukowanych komórek dendrytycznych antygenami nowotworowymi*

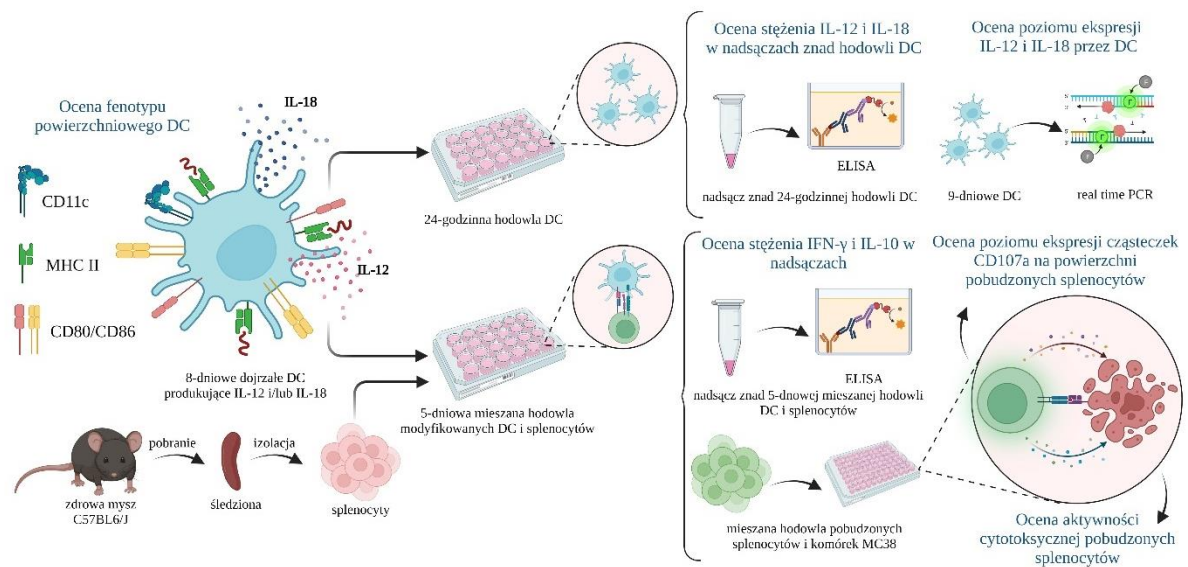
W siódmym dniu hodowli różnicującej, po 4 godzinach od transdukcji komórek dendrytycznych, do hodowli dodawano antygeny nowotworowe (TAg) w postaci wcześniej

przygotowanego lizatu z komórek MC38 (10% objętości). Procedurę przygotowania lizatu opisano w podrozdziale 3.2.3.

Tabela 7. Opracowane szczepionki przeciwnowotworowe na bazie komórek dendrytycznych pochodzenia szpikowego.

A		B	
Szczepionki na bazie transdukowanych DC		Szczepionki na bazie transdukowanych DC stymulowanych TAg (modyfikowanych DC)	
NAZWA DC	RODZAJ TRANSDUKCJI	NAZWA DC	RODZAJ MODYFIKACJI
DC	-	DC/TAg	TAg
DC/EGFP	pLV/EGFP	DC/EGFP/TAg	pLV/EGFP; TAg
DC/IL-12	pLV/IL-12	DC/IL-12/TAg	pLV/IL-12; TAg
DC/IL-18	pLV/IL-18	DC/IL-18/TAg	pLV/IL-18; TAg
DC/IL-12+IL-18	pLV/IL-12; pLv/IL-18	DC/IL-12+IL-18/TAg	pLV/IL-12; pL/vIL-18; TAg
DC/IL-12/IL-18	pLV/IL-12/IL-18	DC/IL-12/IL-18/TAg	pLV/IL-12/IL-18; TAg

W 8 dniu hodowli, po 24 godzinach stymulacji antygenami nowotworowymi i/lub 28 godzinach transdukcji, modyfikowane komórki dendrytyczne zdejmowano z butelek z użyciem roztworu trypsyny i EDTA, odwirowano (7 min., 192×g), zawieszano w RPMI z dodatkiem 10% FBS i wykorzystywano do dalszych analiz i testów funkcjonalnych w warunkach *in vitro*. W celu przygotowania szczepionek komórkowych do badań *in vivo*, modyfikowane DC zawieszano w soli fizjologicznej w gęstości 2×10^6 kom./0,2 ml NaCl. Opracowane komórki szczepionkowe (Tabela 7.) poddano charakterystyce fenotypowej i funkcjonalnej w warunkach *in vitro* (Ryc. 6) oraz *in vivo* (Ryc. 7).



Ryc. 6. Charakterystyka fenotypowa i funkcjonalna szczepionek komórek dendrytycznych pochodzenia szpikowego - schemat doświadczeń *in vitro*.

3.2.6. Oznaczenie poziomu ekspresji genów IL-12 i IL-18 w komórkach szczepionkowych metodą Real-Time PCR

W ósmym dniu hodowli modyfikowane komórki dendrytyczne zawieszano w RPMI uzupełnionym o 10% FBS oraz GM-CSF (40 ng/ml) i nakładano na płytki 12-dółkowe w gęstości 5×10^5 kom./1 ml/dółek. Po 24 godzinach (9 dzień hodowli), komórki zdejmowano z dółków z użyciem roztworu trypsyny i EDTA, a następnie określano poziom ekspresji IL-12 i IL-18 metodą reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

3.2.6.1. Izolacja całkowitego RNA z komórek

Izolację całkowitego RNA z komórek dendrytycznych wykonano z użyciem zestawu NucleoSpin® RNA (Macherey-Nagel) zgodnie z instrukcją producenta. Komórki dendrytyczne zdjęte z dółków płytki 12-dółkowej, przekładano do probówek i dwukrotnie płukano w PBS, odwirowano, a następnie lizowano przez zawieszenie peletu w 350 μ l buforu RA1 uzupełnionego o 3,5 μ l 2-merkaptioetanolu. Lizat komórkowy nakładano na kolumnę filtrującą (NucleoSpin Filter) i wirowano (1 min., 11 000 \times g). Otrzymany przesącz uzupełniono 350 μ l roztworu alkoholu etylowego o stężeniu 70%, a następnie mieszaninę nakładano na kolumnę wiążącą RNA (NucleoSpin RNA) i wirowano (30 s, 11 000 \times g). Kolumnę ze związanym na złożu RNA, przekładano do nowej probówki i odsalano membranę poprzez nałożenie 350 μ l buforu MDB (ang. *Membrane Desalting Buffer*) i odwirowanie (1 min., 11 000 \times g). Następnie na membranę nakładano 95 μ l roztworu rDNazy i inkubowano przez 15 min. w RT, aby wyeliminować DNA. Po tym czasie enzym inaktywowano przez odpłukanie kolumny 200 μ l buforu RAW2 (30 s, 11 000 \times g). Membranę oczyszczano i osuszano przez dwukrotne odpłukanie i wirowanie: w 600 μ l buforu RA3 (30 s, 11 000 \times g) i 250 μ l buforu RA3 (2 min., 11 000 \times g). Kolumnę przekładano do nowej probówki, a wyizolowane RNA eluowano ze złoża nakładając na membranę 40 μ l wody wolnej od RNaz i wirując (1 min., 11 000 \times g).

3.2.6.2. Określenie stężenia i czystości RNA

Stężenie oraz czystość wyizolowanego RNA oceniano na podstawie pomiaru absorbancji przy długości fali 260 nm oraz 280 nm za pomocą spektrofotometru NanoDrop (Thermo Scientific). Stężenie RNA zostało obliczone na podstawie zmodyfikowanego równania Lamberta-Beer'a z użyciem skorygowanej wartości absorbancji kwasu nukleinowego ($c = A \cdot f$, gdzie c - stężenie analitu w ng/ μ l; A - absorbancja; f - współczynnik, dla RNA = 40 ng-cm/ μ l). Czystość RNA określono na podstawie współczynnika skorygowanej absorbancji przy długości fali 260 nm do

skorygowanej absorbancji przy długości fali 280 nm (Współczynnik czystości A_{260}/A_{280}). Dla „czystego” RNA zakłada się, że współczynnik A_{260}/A_{280} wynosi $\sim 2,0$.

3.2.6.3. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono z użyciem zestawu ReverAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fischer) zgodnie z instrukcją producenta za pomocą termocyklera firmy Bio-Rad. Do reakcji pobierano objętość roztworu odpowiadającą 2 μg wyizolowanego RNA i uzupełniano wodą wolną od RNaz do 11 μl . Następnie do każdej próbki dodawano 1 μl roztworu starterów oligo(dT)₁₈ i 8 μl mieszaniny reakcyjnej składającej się z: 4 μl buforu reakcyjnego (5x), 1 μl roztworu inhibitorów RNaz RiboLock (20 U/ μl), 2 μl mieszaniny dNTP (10 mM) i 1 μl roztworu odwrotnej transkryptazy M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/ μl). Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 20 μl . Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono przez 60 min. w temperaturze 42°C, a zakończono przez 5 min. inkubację w 70 °C. Otrzymane cDNA wykorzystywano do przeprowadzenia reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

3.2.6.4. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym

Do przeprowadzenia reakcji PCR w czasie rzeczywistym wykorzystano odczynnik TaqMan™ Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems™) zawierający m.in. polimerazę DNA AmpliTag Gold™, mieszaninę dNTP, dTTP/dUTP, glikozylazę uracylo-DNA, barwnik referencyjny ROX oraz inne składniki. Do mieszaniny reakcyjnej dodawano cDNA (50 ng/reakcję) oraz odpowiednie sondy (Tabela 4.). Na płytkę 96-dołkową MicroAmp™ (Applied Biosystems™) nakładano po 20 μl /dołek mieszaniny reakcyjnej. Analizę przeprowadzono wykorzystując urządzenie ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™). Poziom ekspresji genów IL-12 oraz IL-18 w transdukowanych komórkach dendrytycznych oszacowano metodą komparatywną ($\Delta\Delta\text{Ct}$) względem nietransdukowanych DC, a jako gen referencyjny zastosowano *Hprt*.

3.2.7. Określenie stężenia IL-12 i IL-18 w nadsączach znad hodowli komórek szczepionkowych metodą ELISA

Stężenie IL-12 i IL-18 oceniano metodą ELISA w 24-godzinnych nadsączach znad modyfikowanych komórek dendrytycznych, zakładanych w ósmym dniu hodowli różnicującej na płytkach 12-dołkowych w gęstości 5×10^5 kom./1 ml/dołek w RPMI uzupełnionym o 10% FBS oraz GM-CSF (40 ng/ml). Do określenia stężenia IL-12 w nadsączach hodowlanych zastosowano komercyjnie dostępny zestaw Mouse IL-12 p70 Uncoated ELISA Kit (Invitrogen), natomiast do

oznaczenia stężenia IL-18 wykorzystano zestaw Mouse IL-18 Pre-coated ELISA Kit (Invitrogen). Testy wykonano zgodnie z zaleceniami producenta.

W celu oznaczenia stężenia IL-12 w nadsączach, na 96-dołkową płytkę MaxiSorp™ (Nunc) nakładano po 100 µl/dołek przeciwciał I warstwy przygotowanych w buforze opłaszczającym i inkubowano przez noc (około 16 godzin) w temperaturze 4°C. Po tym czasie płytki trzykrotnie odpłukano w buforze do przemywania (po 300 µl/dołek), nakładano po 200 µl/dołek buforu blokującego tło, a następnie inkubowano przez 1 godzinę w RT. W czasie trwania inkubacji sporządzono odpowiednie rozcieńczenia nadsączy (dobrane doświadczalnie w badaniach wstępnych) oraz roztworów wzorcowych (zgodnie z instrukcjami producenta) przygotowanych metodą seryjnych rozcieńczeń w buforze do rozcieńczania próbek. Ponownie, 3-krotnie odpłukano dołki i nakładano po 100 µl/dołek wcześniej przygotowanych próbek badanych oraz próbek wzorcowych niezbędnych do wyznaczenia krzywej kalibracyjnej. Inkubację prowadzono przez 2 godziny w RT, a następnie w celu usunięcia niezwiązanych białek, płytkę 5-krotnie odpłukano i osuszono. W kolejnym etapie testu, na dołki nakładano po 100 µl mieszaniny przeciwciał II warstwy (przeciwciała detekcyjne) i prowadzono 1-godzinną inkubację, po której płytkę 5-krotnie odpłukano i nakładano po 100 µl/dołek roztworu enzymu na 30 min. Po tym czasie, płytkę odpłukano 7-krotnie, za każdym razem pozostawiając bufor do przemywania w dołkach przez 1 min. Po dokładnym osuszeniu płytki, nakładano po 100 µl/dołek roztworu substratu i inkubowano przez 15 min bez dostępu światła. W ostatnim etapie, reakcję enzymatyczną blokowano przez zmianę pH tj. dodanie po 50 µl/dołek 1M H₃PO₄. W ciągu 30 min od zatrzymania reakcji mierzono absorbancję roztworów przy długości fali 450 nm oraz 570 nm (jako długości korekcyjnej) za pomocą spektrofotometru Thermo Labsystem Multiskan RC oraz oprogramowania Genlite.

Do oznaczenia stężenia IL-18 w nadsączach wykorzystano zestaw zawierający płytkę opłaszczoną przeciwciałami I warstwy przez producenta. Po dwukrotnym odpłukaniu, na płytkę nakładano przygotowane wcześniej roztwory wzorcowe oraz próbki badane (dwukrotnie rozcieńczone) w buforze do przygotowania próbek (po 100 µl/dołek). Następnie, do dołków dodawano po 50 µl roztworu przeciwciał II warstwy i inkubowano przez 2 godziny w RT. Po tym czasie płytkę 3-krotnie odpłukano, dodawano po 100 µl/dołek roztworu enzymu i inkubowano przez 1 godzinę w RT. Po ponownym, 3-krotnym odpłukaniu pytki nakładano roztwór substratu (100 µl/dołek), inkubowano 10 min w RT, a reakcję zatrzymano przez dodatnie 1M H₃PO₄ (100 µl/dołek). Absorbancję roztworów mierzono przy długości fali 450 nm oraz 610 nm (jako długości korekcyjnej) za pomocą spektrofotometru (Thermo Labsystem Multiskan RC, oprogramowanie Genlite).

3.2.8. Oznaczenie poziomu zróżnicowania komórek szczepionkowych metodą cytometrii przepływowej

W dziewiątym dniu hodowli, komórki zdejmowano z dołków z użyciem roztworu trypsyny i EDTA, a następnie przeniesiono do probówek i odwirowano (7 min., 192×g) w PBS z dodatkiem 2,5% FBS. Po odwirowaniu, do każdej probówki dodawano po 50 µl roztworu przeciwciał monoklonalnych anty CD16/CD32, aby zablokować niespecyficzne oddziaływania przeciwciał skoniugowanych z fluorochromami i inkubowano przez 15 min. w 4 °C. Po tym czasie odpłukano nadmiar przeciwciał blokujących i dodawano po 50 µl mieszaniny przeciwciał monoklonalnych skoniugowanych z fluorochromami: anty-CD11c BV 650, anty-F4/80 Alexa Fluor 700, anty-MHC II APC-Cy7, anty-CD86 PE-Cy7 oraz anty-CD80 PerCP-Cy5,5. Ponadto do każdej próbki przygotowano kontrolę izotypową (i.c.). W Tabeli 6 przedstawiono charakterystykę przeciwciał wykorzystywanych do oznaczeń cytometrycznych. Inkubację komórek z przeciwciałami prowadzono przez 45 min. w 4 °C, następnie odpłukano nadmiar przeciwciał w PBS z 2,5% FBS (7 min., 192×g), a po odwirowaniu komórki zawieszono w 300 µl PBS z 2,5% FBS. Bezpośrednio przed analizą, do próbek dodawano po 50 µl roztworu barwnika DAPI (1 µg/ml) w celu wyodrębnienia populacji martwych komórek. Analizę wykonano za pomocą cytometru przepływowego LSR Fortessa z oprogramowaniem Diva (Becton Dickinson).

3.2.9. Ocena zdolności komórek dendrytycznych transdukowanych genami IL-12 i/lub IL-18 oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi do pierwotnego pobudzenia komórek śledzionowych

3.2.9.1. Mieszana hodowla komórek dendrytycznych z komórkami śledzionowymi

W ósmym dniu hodowli, modyfikowane komórki dendrytyczne zawieszano w RPMI uzupełnionym o 10% FBS i nakładano na płytki 12-dołkowe w gęstości $1,8 \times 10^5$ kom./0,5 ml/dołek. Splenocyty pobrane od zdrowych myszy szczepu C57BL6/J, które przechowywano w ciekłym azocie, rozmrażano, a następnie odwirowano (7 min., 192×g) i zawieszano w RPMI z dodatkiem 10% FBS doprowadzając do gęstości $1,8 \times 10^6$ kom./0,5 ml. Tak przygotowaną zawiesinę komórek śledzionowych nakładano po 0,5 ml na każdy dołek hodowli z modyfikowanymi komórkami DC. Mieszaną hodowlę uzupełniono o rh IL-2 (200 U/ml) i prowadzono przez 5 dni w warunkach standardowych.

Po 5 dniach stymulacji określano: stopień pobudzenia swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej na podstawie oznaczenia ekspresji cząsteczek CD107a wśród populacji komórek śledzionowych; aktywność cytotoksyczną splenocytów z mieszanej hodowli z komórkami

szczepionkowymi wobec komórek nowotworowych MC38 oraz stężenia IFN- γ i IL-10 w nadsączach z nad mieszanej hodowli.

3.2.9.2. *Oznaczanie ekspresji cząsteczek CD107a na powierzchni pobudzonych komórek śledzionowych*

Komórki śledzionowe z mieszanej hodowli, zdejmowano z płytki 12-dołkowej, odwirowano (7 min., 192 \times g) i zawieszono w RPMI z dodatkiem 10% FBS, doprowadzając do gęstości 2 \times 10⁶ kom./ml. Na przygotowaną dzień wcześniej jednowarstwową hodowlę komórek MC38 (0,4 \times 10⁵ kom./dołek) na płytce 96-dołkowej (Costar) nakładano po 100 μ l/dołek (2 \times 10⁵ kom.) zawiesiny splenocytów. Ponadto hodowlę uzupełniono 50 μ l mieszaniny przeciwciał anti-CD107a APC, rh IL-2 (stężenie końcowe 200 U/ml), PMA (stężenie końcowe 50 ng/ml) i jonomycy (stężenie końcowe 1 μ g/ml). Po 2 godzinach, komórki zdejmowano z dołków do probówek, odpłukano w PBS z 2,5% FBS (7 min., 192 \times g) i nakładano po 50 μ l mieszaniny przeciwciał monoklonalnych: anti-CD45 BV605, anti-CD4 FITC, anti-CD8 APC-Fire750 oraz anti-NK1.1 PE-Dazzle (Tabela 6.). Inkubację prowadzono przez 45 min. w 4°C. Po tym czasie odwirowano nadmiar przeciwciał (7 min., 192 \times g), a komórki zawieszono w 200 μ l roztworu PBS z 2,5% FBS. Przed odczytem do probówek dodawano 50 μ l roztworu barwnika DAPI (1 μ g/ml), w celu wyodrębnienia populacji martwych komórek. Analizę wykonano za pomocą cytometru przepływowego LSR Fortessa z oprogramowaniem Diva (Becton Dickinson).

3.2.9.3. *Ocena aktywności cytotoksycznej stymulowanych komórek śledzionowych metodą cytometrii przepływowej*

Aktywność cytotoksyczną komórek śledzionowych z mieszanej hodowli (komórek efektorowych) określano na podstawie ich zdolności do zabijania komórek nowotworowych MC38 (komórek docelowych). Komórki MC38 zdejmowano z butelek hodowlanych, odwirowano (7 min., 192 \times g), doprowadzono do gęstości 1 \times 10⁶ kom./ml w RPMI z dodatkiem 5% FBS i 10 μ l barwnika DiO₁₈C(3) i inkubowano przez 20 min. w 37°C. Następnie, wybarwione komórki docelowe trzykrotnie odpłukano (7 min., 192 \times g), zawieszano w RPMI z dodatkiem 10% FBS i nakładano na dołki okrągłodennej płytki 96-dołkowej (Greiner) po 1 \times 10⁴ kom./100 μ l/dołek. Na tak przygotowane komórki docelowe nakładano komórki efektorowe po 1 \times 10⁵ kom./100 μ l/dołek lub 3 \times 10⁵ kom./100 μ l/dołek w RPMI z dodatkiem 10% FBS. Stosunek komórek efektorowych do komórek docelowych wynosił odpowiednio 10:1 lub 30:1. Mieszaną hodowlę prowadzono w obecności rh IL-2 (200 U/ml) przez 4 godziny w 37°C. Po tym czasie komórki zdejmowano z dołków, przekładano do probówek, odpłukano w PBS z 2,5% FBS (7 min., 192 \times g) i zawieszano w 200 μ l 7,5 nM roztworu jodku propidyny (PI). Po 10 min. inkubacji w 37°C próbki analizowano

za pomocą cytometru przepływowego LSR Fortessa z oprogramowaniem Diva (Becton Dickinson). Aktywność cytotoksyczną komórek śledzionowych przedstawiano jako odsetek martwych komórek docelowych, pomniejszony o odsetek martwych komórek MC38 inkubowanych bez komórek efektorowych (kontrola żywotności komórek docelowych).

3.2.9.4. Ocena stężenia cytokin w nadsączach znad mieszanej hodowli metodą ELISA

W nadsączach znad 5-dniowej mieszanej hodowli modyfikowanych komórek dendrytycznych i splenocytów określano stężenie IFN- γ i IL-10, wykorzystując komercyjnie dostępne zestawy testów ELISA. Stężenie IFN- γ w nadsączach oznaczano za pomocą testu Mouse IFN- γ Uncoated ELISA Kit (Invitrogen), natomiast do oznaczenia stężenia IL-10 wykorzystano zestaw BD OptEIA ELISA Set (BD Pharmingen). Opis stosowanych odczynników umieszczono w podrozdziale 3.1.6.

Procedurę oznaczenia stężenia IFN- γ w nadsączach znad mieszanej hodowli przeprowadzono według instrukcji producenta i jest ona analogiczna do procedury, którą opisano w podrozdziale 3.2.7.

Ocenę stężenia IL-10 w nadsączach przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta, a procedura ta różniła się od oznaczenia stężenia IL-12 lub IFN- γ od etapu nakładania przeciwciał II warstwy. W tym teście, po odpłukaniu z dołek niezwiązanych białek pochodzących z badanych próbek lub roztworów wzorcowych, na płytkę nakładano przygotowaną wcześniej mieszaninę przeciwciał II warstwy oraz enzymu i inkubowano przez 1 godzinę w RT. Następnie, płytkę 7-krotnie odpłukano, za każdym razem pozostawiając bufor do przemywania w dołkach przez 1 min. Po osuszeniu płytki nakładano po 100 μ l/dołek roztworu substratu i inkubowano przez 30 min bez dostępu światła. Reakcję enzymatyczną zatrzymano przez dodanie 50 μ l/dołek 1M H₃PO₄. Absorbancję roztworów mierzono przy długości fali 450 nm oraz 570 nm (jako długości korekcyjnej) za pomocą spektrofotometru Thermo Labsystem Multiskan RC oraz oprogramowania Genlite.

3.2.10. Analiza zdolności modyfikowanych komórek dendrytycznych do naciekania tkanki nowotworowej oraz migracji do wartowniczych węzłów chłonnych

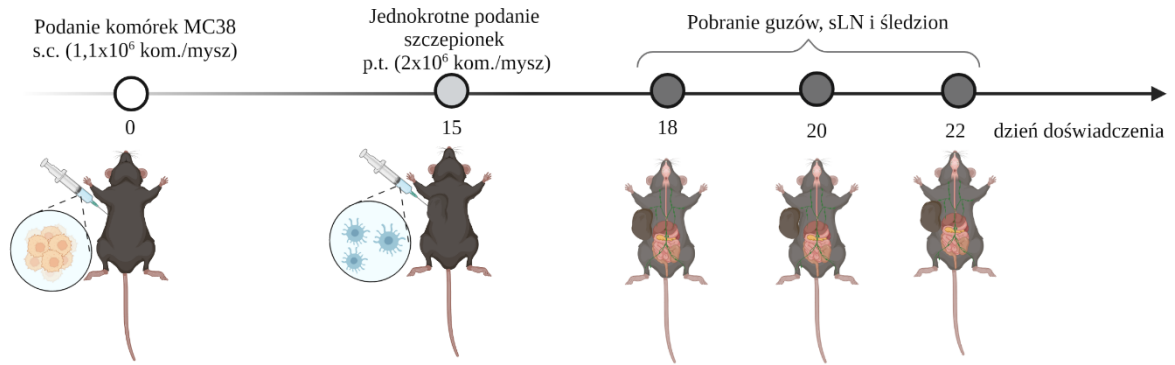
W celu określenia zdolności modyfikowanych komórek dendrytycznych do naciekania tkanki nowotworowej oraz migracji do wartowniczych węzłów chłonnych (ang. *sentinel lymph nodes*, sLN) przeprowadzono **dwa analogiczne doświadczenia *in vivo***, których schemat przedstawiono na Ryc. 7. **W pierwszym doświadczeniu** jako szczepionki zastosowano **DC transdukowane** do produkcji IL-12 lub IL-18 oraz obu tych cytokin jednocześnie, natomiast

w drugim podawano szczepionki na bazie DC transdukowanych do produkcji cytokin i stymulowanych TAg (**modyfikowane DC**) (Tabela 7.). W każdym z doświadczeń zastosowano odpowiednie komórki kontrolne: niemodyfikowane DC i DC transdukowane wektorem kontrolnym (DC/EGFP) oraz DC stymulowane TAg (DC/TAg) i DC/EGFP/TAg. Schemat przygotowania szczepionek na bazie komórek dendrytycznych przedstawiono w podrozdziale 3.2.5. Wszystkie DC zostały wyznakowane wewnątrzcytoplazmatycznym fluorescencyjnym barwnikiem CFDA-SE w celu ich identyfikacji w guzach i sLN (opis procedury zawarto w podrozdziale 3.2.10.3).

3.2.10.1. Schemat doświadczenia *in vivo*

Doświadczenie rozpoczęto od podskórnego podania komórek raka jelita grubego MC38 ($1,1 \times 10^6$ kom./0,2 ml/mysz) myszom szczepu C57BL6/J (podrozdział 3.2.10.2). W 15. dniu doświadczenia jednokrotnie, okołoguzowo podawano szczepionki na bazie transdukowanych DC i/lub stymulowanych TAg, wyznakowanych wewnątrzcytoplazmatycznym fluorescencyjnym barwnikiem CFDA-SE. W 18., 20. i 22. dniu doświadczenia (odpowiednio po trzech, pięciu i siedmiu dniach po podaniu szczepionek) od myszy pobierano tkankę nowotworową oraz sLN. Guzy ważono na wadze szalkowej. Co więcej, w 22. dniu doświadczenia od myszy uzyskano śledziony, w celu określenia wpływu jednokrotnego podania modyfikowanych komórek dendrytycznych na aktywację ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Pobrane od myszy guzy, sLN oraz śledziony przecierano przez jałowy filtr nylonowy, zawieszano w RPMI z dodatkiem 2,5% FBS, a następnie dwukrotnie odpłukano (7 min., $192 \times g$).

Tkankę nowotworową oraz sLN analizowano metodą cytometrii przepływowej w dniu pobrania, a sposób wykonania analiz przedstawiono w podrozdziałach 3.2.10.4 oraz 3.2.11.1. Otrzymane komórki śledzionowe zawieszano w mieszaninie składającej się z RPMI (40%), FBS (50%) oraz DMSO (10%) i zamrażano w oparach ciekłego azotu, a po upływie 1,5 godziny przekładano do ciekłego azotu. Zgromadzone splenocyty przeznaczono do dalszych analiz opisanych w podrozdziale 3.2.11.2 oraz 3.2.11.3.



Ryc. 7. Charakterystyka funkcjonalna szczepionek na bazie komórek dendrytycznych – schemat doświadczeń *in vivo*.

W 15. dniu doświadczeń po podskórnym podaniu komórek raka jelita grubego MC38 ($1,1 \times 10^6$ kom./mysz), kiedy guzy były palpacyjnie wyczuwalne, myszom zostały podane okołoguzowo komórki szczepionkowe. W 18., 20. i 22. dniu doświadczeń od 6 myszy z każdej grupy pobrano tkankę nowotworową i narządy limfoidalne (śledziona, wartownicze węzły chłonne)

3.2.10.2. Wszczepienie komórek nowotworowych

Komórki linii mysiego raka jelita grubego MC38 zdejmowano z butelek hodowlanych za pomocą trypsyny z EDTA i odplukano (7 min., $192 \times g$), zawieszano w soli fizjologicznej i wszczepiano podskórną (*s.c.*) myszom szczepu C57BL6/J w prawy bok w liczbie $1,1 \times 10^6$ kom./0,2 ml/mysz. Dzień przed podaniem szczepionek na bazie modyfikowanych komórek dendrytycznych myszy z rosnącymi podskórnymi guzami MC38 randomizowano na grupy doświadczalne.

3.2.10.3. Przygotowanie komórek szczepionkowych znakowanych barwnikiem CFDA-SE

Modyfikowane komórki dendrytyczne uzyskane z 8 dniowej hodowli różnicującej, zdejmowano z butelek hodowlanych za pomocą trypsyny z EDTA i odplukano (7 min., $192 \times g$). Następnie, modyfikowane DC zawieszano w roztworze CFDA-SE o stężeniu $5 \mu M$ sporządzonym w PBS, doprowadzając do gęstości 5×10^6 kom./ml i inkubowano przez 15 min w $37^\circ C$. Po tym czasie, komórki odplukano w RPMI z dodatkiem 10% FBS (7 min., $192 \times g$). Po odwirowaniu, DC zawieszono w RPMI z 10% FBS i inkubowano przez 30 min., po czym komórki odplukano w soli fizjologicznej (7 min., $192 \times g$) i zawieszono w NaCl doprowadzając do gęstości $2 \times 10^6/0,2$ ml. Tak przygotowane szczepionki na bazie transdukowanych DC i/lub stymulowanych TAg, podawano okołoguzowo w liczbie $2 \times 10^6/0,2$ ml/mysz w 15. dniu po podaniu komórek nowotworowych.

3.2.10.4. *Określenie zdolności komórek szczepionkowych do infiltrowania tkanki nowotworowej i migracji do wartowniczych węzłów chłonnych*

Uzyskaną zawiesinę tkanki nowotworowej i sLN filtrowano przez nylonowe filtry o średnicy porów 35 μm , odpłukano w PBS z dodatkiem 2,5% FBS (7 min., 192 \times g) i doprowadzano do jednakowej gęstości w każdej próbce tkanki guzów (200 mg/ml) lub sLN (10 mln/ml), zawieszając komórki w PBS z EDTA uzupełnionym o 2,5% FBS. Do nowych probówek przekładano po 40 mg tkanki guzów lub 2 mln komórek wyizolowanych z sLN i dodawano po 50 μl roztworu przeciwciał anti-CD16/CD32. Po tym czasie nadmiar przeciwciał odwirowano (7 min., 192 \times g). Następnie do każdej probówki dodawano po 50 μl roztworu przeciwciał monoklonalnych anti-CD45 BV605 i inkubowano przez 45 min. w 4°C. Po zakończeniu inkubacji odpłukano nadmiar przeciwciał w PBS z 2,5% FBS, odwirowano (7 min., 192 \times g) i zawieszano komórki w 300 μl PBS z 2,5% FBS. Bezpośrednio przed analizą do każdej probówki dodawano po 20 μl Count Bright Absolute Counting Beads (Thermo Fisher Scientific) oraz 50 μl roztworu barwnika DAPI (1 $\mu\text{g/ml}$), aby wykluczyć martwe komórki. Liczebność DC w tkance nowotworowej określono jako liczbę komórek szczepionkowych CFDA-SE⁺ w 1 gramie tkanki nowotworowej pobranej od myszy obliczoną na podstawie liczby odczytanych w każdej próbce Count Bright Absolute Counting Beads oraz masy guzów w każdej próbce. Natomiast liczebność DC w sLN zaprezentowano jako liczbę komórek szczepionkowych CFDA-SE⁺ na 1 \times 10⁶ komórek wyizolowanych z sLN. Ponadto przedstawiono odsetki komórek szczepionkowych w guzach i sLN.

3.2.11. Ocena kinetyki indukowania odpowiedzi przeciwnowotworowej przez komórki szczepionkowe

Kinetykę indukowania miejscowej odpowiedzi przeciwnowotworowej przez komórki szczepionkowe oceniano na podstawie zmian wielkości populacji komórek limfoidalnych i mieloidalnych w guzach i sLN pobranych od myszy w 18., 20. i 22. dniu doświadczenia (tj. 3., 5. i 7 dni po podaniu szczepionek). Aktywację ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej określano na podstawie analizy fenotypu powierzchniowego i aktywności splenocytów pobranych od myszy w 22. dniu doświadczenia (7 dni po podaniu szczepionek). Prezentowane schematy wieloparametrowych analiz metodą cytometrii przepływowej zostały przeprowadzone na podstawie oznaczeń opracowanych i opublikowanych w ramach wcześniejszych prac zespołu (Rossowska i in., 2019).

3.2.11.1. *Określenie wielkości populacji komórek limfoidalnych i mieloidalnych w guzach i wartowniczych węzłach chłonnych metodą cytometrii przepływowej*

Do próbek przekładano po 40 mg tkanki guzów lub 2 mln komórek wyizolowanych z sLN i dodawano po 50 µl roztworu przeciwciał anty-CD16/CD32. Inkubację prowadzono przez 15 min w 4°C. Po tym czasie nadmiar przeciwciał odwirowano (7 min., 192×g), a komórki znakowano za pomocą mieszaniny przeciwciał monoklonalnych skoniugowanych z fluorochromami (Tabela 8.). Inkubację prowadzono przez 45 min w 4°C, po czym komórki odpłukano, zawieszono w 300 µl PBS z 2mM EDTA i 2,5% FBS i analizowano za pomocą cytometru przepływowego LSR Fortessa z oprogramowaniem Diva (Becton Dickinson). Bezpośrednio przed analizą do próbek dodawano po 50 µl roztworu barwnika DAPI (1 µg/ml) w celu wyodrębnienia populacji martwych komórek. Charakterystykę fenotypową populacji komórek identyfikowanych podczas analizy przedstawiono w Tabela 9.

Tabela 8. Przeciwciała monoklonalne skoniugowane z fluorochromami wykorzystane do oznaczeń cytometrycznych guzów, sLN i splenocytów pobranych od myszy 3, 5 i/lub 7 dni po jednokrotnym podaniu szczepionek.

<i>SZCZEPIONKI NA BAZIE TRANSDUKOWANYCH DC</i>			<i>SZCZEPIONKI NA BAZIE MODYFIKOWANYCH DC</i>	
<i>badany materiał</i>	<i>guz i sLN</i>	<i>śledziona</i>	<i>guz i sLN</i>	<i>śledziona</i>
Antygen				
<i>Oznaczenie komórek limfoidalnych</i>				
CD45	BV510	BV605	PE-Cy7	BV605
CD19	-	AF700	-	AF700
CD4	PerCP-Cy5,5	BV650	PerCP-Cy5,5	BV650
CD8	PE-Cy7	FITC	APC-Cy7	FITC
NK1.1	PE-Dazzle	APC-Cy7	PE-Dazzle	APC-Cy7
CD44	PE	PE-Dazzle	PE	PE-Dazzle
CD62L	BV605	PE-Cy7	BV605	PE-Cy7
<i>Oznaczenie komórek mieloidalnych</i>				
CD45	BV510	BV605	BV510; PE	V500
CD11b	PerCP-Cy5,5	PerCP-Cy5,5	PerCP-Cy5,5	PerCP-Cy5,5
CD3e	PE-CF594	PE-CF594	PE-CF594	PE-CF594
NK1.1	PE-Dazzle	PE-Dazzle	PE-Dazzle	PE-Dazzle
CD19	PE-CF594	PE-CF594	PE-CF594	PE-CF594
CD11c	BV650	BV650	BV650	BV650
F4/80	AF700	AF700	AF700	AF700
MHC II	APC-Cy7	FITC	APC-Cy7	APC-Cy7

Tabela 9. Charakterystyka populacji komórek identyfikowanych w guzach i sLN pobranych od myszy 3, 5, i 7 dni po jednokrotnym podaniu szczepionek.

POPULACJA KOMÓREK	FENOTYP
Oznaczenie komórek limfoidalnych	
Leukocyty naciekające guzy	CD45 ⁺
Limfocyty T CD4 ⁺	CD45 ⁺ CD4 ⁺
Limfocyty T CD4 ⁺ efektorowe	CD45 ⁺ CD4 ⁺ CD44 ⁺ CD62L ^{neg}
Limfocyty T CD4 ⁺ pamięci	CD45 ⁺ CD4 ⁺ CD44 ⁺ CD62L ⁺
Limfocyty T CD8 ⁺	CD45 ⁺ CD8 ⁺
Limfocyty T CD8 ⁺ efektorowe	CD45 ⁺ CD8 ⁺ CD44 ⁺ CD62L ^{neg}
Limfocyty T CD8 ⁺ pamięci	CD45 ⁺ CD8 ⁺ CD44 ⁺ CD62L ⁺
NK	CD45 ⁺ CD4 ^{neg} CD8 ^{neg} NK1.1 ⁺
NKT	CD45 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ NK1.1 ⁺
Oznaczenie komórek mieloidalnych	
DC w sLN	CD45 ⁺ CD11b ⁺ CD11c ⁺ F4/80 ^{int}
DC w guzach	CD45 ⁺ CD11b ⁺ CD11c ⁺ F4/80 ^{int} MHC II ⁺
TAM*	CD45 ⁺ CD11b ⁺ CD11c ⁺ F4/80 ⁺

*- populacja komórek oznaczana tylko w guzach

3.2.11.2. Określenie wielkości populacji komórek limfoidalnych i mieloidalnych wśród splenocytów metodą cytometrii przepływowej

Zawiesinę komórek wyizolowanych ze śledzion, przechowywaną w ciekłym azocie, rozmrożono w RPMI z dodatkiem 2,5% FBS i odwirowano (7 min., 192×g). Dalszą część oznaczenia wykonano analogicznie do analizy guzów i sLN opisanej w podrozdziale 3.2.11.1. Przeciwciała monoklonalne skoniugowane z fluorochromami wykorzystane do oznaczeń cytometrycznych splenocytów pobranych od myszy po jednokrotnym podaniu szczepionek komórkowych przedstawiono w Tabeli 9. Charakterystykę fenotypową populacji komórek identyfikowanych podczas analizy przedstawiono w Tabeli 10.

Tabela 10. Charakterystyka populacji komórek identyfikowanych w śledzionach pobranych od myszy 7 dni po jednokrotnym podaniu szczepionek.

POPULACJA KOMÓREK	FENOTYP
Oznaczenie komórek limfoidalnych	
Limfocyty T CD4 ⁺	CD45 ⁺ CD19 ^{neg} CD3 ⁺ CD4 ⁺
Limfocyty T CD4 ⁺ efektorowe	CD45 ⁺ CD19 ^{neg} CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD44 ⁺ CD62L ^{neg}
Limfocyty T CD4 ⁺ pamięci	CD45 ⁺ CD19 ^{neg} CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD44 ⁺ CD62L ⁺
Limfocyty T CD8 ⁺	CD45 ⁺ CD19 ^{neg} CD3 ⁺ CD8 ⁺
Limfocyty T CD8 ⁺ efektorowe	CD45 ⁺ CD19 ^{neg} CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD44 ⁺ CD62L ^{neg}
Limfocyty T CD8 ⁺ pamięci	CD45 ⁺ CD19 ^{neg} CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD44 ⁺ CD62L ⁺
NK	CD45 ⁺ CD19 ^{neg} CD3 ^{neg} NK1.1 ⁺
NKT	CD45 ⁺ CD19 ^{neg} CD3 ⁺ NK1.1 ⁺
Oznaczenie komórek mieloidalnych	
DC	CD45 ⁺ CD11b ⁺ CD11c ⁺ F4/80 ^{int} MHC II ⁺

3.2.11.3. *Restymulacja komórek śledzionowych*

W celu oceny aktywności splenocytów uzyskanych od myszy otrzymujących szczepionki na bazie komórek dendrytycznych prowadzono pięciodniową mieszaną hodowlę *ex vivo* komórek śledzionowych z komórkami nowotworowymi MC38 w obecności rh IL-2.

3.2.11.3.1. *Przygotowanie jednowarstwowej hodowli komórek MC38*

Komórki MC38 zdejmowano z butelek hodowlanych za pomocą roztworu trypsyny i EDTA, odwirowano (7 min., 192×g) i zawieszano w RPMI z dodatkiem 5% FBS i 50 µg/ml mitomycyny C, doprowadzano do gęstości 3×10⁶ kom./ml. Inkubację prowadzono przez 30 min w 37°C. Po tym czasie komórki trzykrotnie odpłukano w RPMI z dodatkiem 5% FBS (7 min., 192×g), nakładano na płytki 24-dołkowe w gęstości 0,1×10⁶ kom./ml/dołek i inkubowano przez 24 godziny w warunkach standardowych (37°C, 95% wilgotności powietrza i 5% CO₂).

3.2.11.3.2. *Przygotowanie komórek efektorowych*

Splenocyty uzyskane od myszy nietraktowanych lub otrzymujących szczepionki, przechowywano w ciekłym azocie, rozmrażano w RPMI z dodatkiem 3% FBS, odwirowano (7 min., 192×g) i doprowadzano do gęstości 2×10⁶ kom./ml RPMI z dodatkiem 10% FBS. Komórki śledzionowe (2×10⁶ kom./ml/dołek) nakładano na przygotowaną dzień wcześniej jednowarstwową hodowlę komórek MC38 (0,1×10⁶ kom./dołek) i uzupełniano o rh IL-2 (200 U/ml). Mieszaną hodowlę komórek śledzionowych z komórkami MC38 w stosunku 20:1 prowadzono przez 5 dni.

3.2.11.3.3. *Ocena aktywności restymulowanych splenocytów*

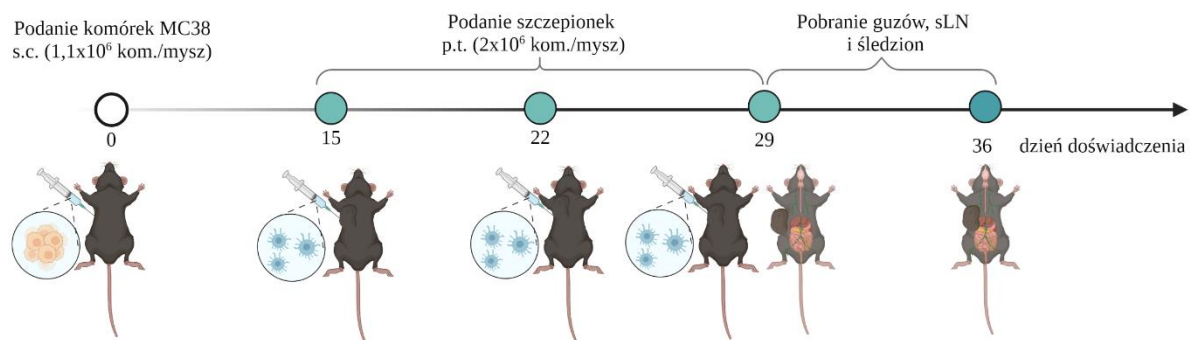
W nadsączach znad 5-dniowej mieszanej hodowli oceniano stężenie IFN-γ, IL-4 oraz IL-10 za pomocą testu ELISA, który przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.2.9.4. Do oznaczenia stężenia IL-4 w nadsączach znad mieszanej hodowli wykorzystano zestaw BD OptEIA ELISA Set (BD Pharmingen), a test przeprowadzono według instrukcji producenta, która jest analogiczna do procedury określenia stężenia IL-10. Restymulowane komórki śledzionowe odwirowano (7 min., 192×g) i analizowano zdolność tych komórek do wydzielania ziaren cytolitycznych na podstawie poziomu ekspresji cząsteczek CD107a na ich powierzchni zgodnie z metodyką opisaną w podrozdziale 3.2.9.2. Ponadto oceniano aktywność cytotoksyczną restymulowanych komórek śledzionowych wobec komórek docelowych MC38 zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.2.9.3.

3.2.12. Określenie efektu przeciwnowotworowego immunoterapii z zastosowaniem komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi

Komórki dendrytyczne transdukowane do produkcji IL-12 i/lub IL-18 i stymulowane antygenami nowotworowymi (modyfikowane DC) wykorzystano jako szczepionki w doświadczeniu immunoterapeutycznym.

3.2.12.1. Schemat doświadczenia immunoterapeutycznego

Myszom z rosnącym podskórnie guzem mysiego raka jelita grubego MC38 (podrozdział 3.2.10.2) okołoguzowo podawano szczepionki na bazie modyfikowanych DC oraz szczepionkę kontrolną w liczbie 2×10^6 kom./0,2 ml/mysz w 15., 22. i 29. dniu po podaniu komórek nowotworowych. Opis przygotowania szczepionek przedstawiono w podrozdziale 3.2.12.2. Podczas trwania doświadczenia co 2-5 dni prowadzono pomiary guzów za pomocą suwmiarki elektronicznej. Objętość guzów obliczano na podstawie wzoru $\frac{1}{2}a \times b^2$, gdzie a jest dłuższym, a b – krótszym wymiarem. Skuteczność zastosowanej immunoterapii oceniano na podstawie zahamowania wzrostu guzów (TGI, *tumor growth inhibition*) w grupach terapeutycznych (otrzymujących szczepionki) w odniesieniu do grupy nietraktowanej (nieleczonej), który obliczano ze wzoru: $100 - \left(\frac{T}{C} \times 100\right)$, gdzie T oznacza medianę objętości guzów myszy poddanych terapii, a C – medianę guzów myszy nietraktowanych.



Ryc. 8. Schemat doświadczenia immunoterapeutycznego.

Myszom z rosnącymi podskórnie guzami MC38, okołoguzowo (p.t.) podano szczepionki na bazie komórek dendrytycznych transdukowanych do produkcji cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi (2×10^6 kom./mysz) w 15., 22. i 29. dniu doświadczenia. W 29. i 36. dniu doświadczenia od 7 myszy z każdej grupy badanej zostały pobrane śledziony, wartownicze węzły chłonne i tkanka nowotworowa do dalszych analiz *ex vivo*.

W 29 i 36 dniu doświadczenia tj. 7 dni po drugim i trzecim podaniu szczepionek, od 7 myszy z każdej grupy pobrano guzy, wartownicze węzły chłonne oraz śledziony, które przecierano przez jałowy filtr nylonowy, zawieszano w RPMI z dodatkiem 2,5% FBS, a następnie dwukrotnie odplukano (7 min., $192 \times g$). Zawiesinę komórek uzyskaną z guzów, sLN oraz śledzion zawieszano

w mieszaninie składającej się z RPMI (40%), FBS (50%) oraz DMSO (10%) i zamrażano woparach ciekłego azotu, a po upływie 1,5 godziny przekładano do ciekłego azotu. Zebrany materiał wykorzystano do dalszych analiz opisanych w podrozdziałach od 3.2.12.3. do 3.2.12.5. (Ryc. 8.).

3.2.12.2. Przygotowanie szczepionek na bazie modyfikowanych komórek dendrytycznych

Modyfikowane komórki dendrytyczne oraz komórki kontrolne uzyskano z 8 dniowej hodowli różnicującej, której opis przedstawiono w podrozdziale 3.2.5. Szczepionki przeciwnowotworowe przygotowano na bazie DC przedstawionych w Tabeli 7. B.

Komórki dendrytyczne zbierano z butelek hodowlanych za pomocą trypsyny i EDTA, odwirowano (7 min., 192×g), a następnie 2-krotnie odpłukano w soli fizjologicznej (7 min., 192×g) i zawieszono w NaCl doprowadzając do gęstości 2×10^6 kom./0,2 ml. Szczepionki na bazie modyfikowanych DC oraz szczepionkę kontrolną przygotowywano trzykrotnie w liczbie 2×10^6 kom./0,2 ml/mysz.

3.2.12.3. Określenie wielkości populacji komórek limfoidalnych i mieloidalnych w guzach i śledzionach metodą cytometrii przepływowej

Zawiesinę komórek wyizolowanych z tkanki nowotworowej i śledzion, przechowywaną w ciekłym azocie, rozmrożono w RPMI z dodatkiem 2,5% FBS i odwirowano (7 min., 192×g), a następnie odpłukano w PBS. Komórki znakowano za pomocą barwnika LIVE/DEAD® Fixable Blue Dead Cell Stain (Life Technologies) w celu identyfikacji martwych komórek. Komórki zawieszano w PBS z dodatkiem barwnika i inkubowano przez 30 min. w RT bez dostępu światła. Po tym czasie komórki odpłukano w PBS z dodatkiem 2,5% FBS (7 min., 192×g), dodawano po 50 µl roztworu przeciwciał anti-CD16/CD32 i inkubowano przez 15 min. w 4 °C. Komórki odwirowano w PBS z dodatkiem 2,5% FBS, a następnie dodawano roztwór przeciwciał monoklonalnych skoniugowanych z fluorochromami (Tabela 11.) i inkubowano przez 45 min. w 4 °C. Po upływie czasu inkubacji komórki odpłukano, próbki z komórkami wybarwionymi mieszaniną przeciwciał do oznaczenia komórek mieloidalnych zawieszono w 300 µl PBS z 2mM EDTA i 2,5% FBS i analizowano za pomocą cytometru przepływowego LSR Fortessa z oprogramowaniem Diva (Becton Dickinson), natomiast próbki z komórkami wybarwionymi mieszaniną przeciwciał do oznaczenia komórek limfoidalnych utrwalało za pomocą FoxP3 Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience). W tym celu komórki zawieszano w Fixation Buffer i inkubowano przez 30 min. w 4°C. Po inkubacji komórki odpłukano w Permabilization Buffer (7 min., 300×g), dodawano roztwór przeciwciał anti-CD16/CD32 i inkubowano przez 15 min. w 4 °C. Próbkę ponownie odpłukano w Permeabilization Buffer (7 min., 300×g), dodawano

roztworu przeciwciał anty-FoxP3-APC i inkubowano przez 45 min. w 4°C. Po tym czasie komórki dwukrotnie odplukano w Permeabilization Buffer (7 min., 300×g), zawieszono w 300 µl PBS z 2mM EDTA i 2,5% FBS i analizowano za pomocą cytometru przepływowego LSR Fortessa z oprogramowaniem Diva (Becton Dickinson).

Tabela 11. Przeciwciała monoklonalne skoniugowane z fluorochromami wykorzystane do oznaczeń cytometrycznych komórek z guzów, sLN i splenocytów uzyskanych od myszy poddanych terapii.

<i>PRZECIWCIAŁA MONOKLONALNE DO OZNACZEŃ CYTOMETRYCZNYCH</i>			
<i>material badany</i>	<i>guz</i>	<i>sLN</i>	<i>śledziona</i>
<i>Antygen</i>			
<i>Oznaczenie komórek limfoidalnych</i>			
CD45	BV605	BV605	BV605
CD19	AF700	-	AF700
CD3e	BV650	BV650	BV650
CD4	FITC	FITC	FITC
CD8	APC-Cy7	APC-Cy7	APC-Cy7
NK1.1	PE-Dazzle	PE-Dazzle	PE-Dazzle
CD44	PE-Cy7	PE-Cy7	PE-Cy7
CD62L	PerCP-Cy5,5	PerCP-Cy5,5	PerCP-Cy5,5
CD25	PE	-	PE
FoxP3	APC	-	APC
<i>Oznaczenie komórek mieloidalnych</i>			
CD45	BV605	BV605	V500
CD11b	PerCP-Cy5,5	PerCP-Cy5,5	PerCP-Cy5,5
CD3e	PE-CF594	PE-CF594	PE-CF594
NK1.1	PE-Dazzle	PE-Dazzle	PE-Dazzle
CD19	PE-CF594	PE-CF594	PE-CF594
CD11c	BV650	BV650	BV650
F4/80	AF700	AF700	AF700
Ly6C	PE	PE	PE
MHC II	FITC	FITC	APC-Cy7
CD86			

Tabela 12. Charakterystyka populacji komórek identyfikowanych w guzach i śledzionach uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.

<i>POPULACJA KOMÓREK</i>	<i>FENOTYP</i>
<i>Oznaczenie komórek limfoidalnych</i>	
Leukocyty	CD45 ⁺
Limfocyty T CD4 ⁺	CD45 ⁺ CD19 ^{neg} CD3 ⁺ CD4 ⁺
Limfocyty T CD4 ⁺ efektorowe	CD45 ⁺ CD19 ^{neg} CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD44 ⁺ CD62L ^{neg}
Limfocyty T CD4 ⁺ pamięci	CD45 ⁺ CD19 ^{neg} CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD44 ⁺ CD62L ⁺
Limfocyty Treg	CD45 ⁺ CD19 ^{neg} CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺
Limfocyty Treg efektorowe	CD45 ⁺ CD19 ^{neg} CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ CD44 ⁺ CD62L ^{neg}
Limfocyty T CD8 ⁺	CD45 ⁺ CD19 ^{neg} CD3 ⁺ CD8 ⁺
Limfocyty T CD8 ⁺ efektorowe	CD45 ⁺ CD19 ^{neg} CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD44 ⁺ CD62L ^{neg}
Limfocyty T CD8 ⁺ pamięci	CD45 ⁺ CD19 ^{neg} CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD44 ⁺ CD62L ⁺
NK	CD45 ⁺ CD19 ^{neg} CD3 ^{neg} NK1.1 ⁺
NKT	CD45 ⁺ CD19 ^{neg} CD3 ⁺ NK1.1 ⁺
<i>Oznaczenie komórek mieloidalnych</i>	
DC	CD45 ⁺ CD11b ⁺ CD11c ⁺ F4/80 ^{int} MHC II ⁺
Mf	CD45 ⁺ CD11b ⁺ CD11c ^{neg} F4/80 ⁺ Ly6C ^{neg}
TAM*	CD45 ⁺ CD11b ⁺ CD11c ⁺ F4/80 ⁺

*- populacja komórek oznaczana tylko w guzach

3.2.12.4. *Określenie wielkości populacji komórek limfoidalnych i mieloidalnych w wartowniczych węzłach chłonnych metodą cytometrii przepływowej*

Zawiesinę komórek wyizolowanych z wartowniczych węzłów chłonnych, przechowywaną w ciekłym azocie, rozmrożono w RPMI z dodatkiem 2,5% FBS i odwirowano (7 min., 192×g). Oznaczenie komórek limfoidalnych i mieloidalnych w sLN uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii wykonano analogicznie do procedury opisanej w podrozdziale 3.2.11.1., a zastosowane przeciwciała monoklonalne skoniugowane z fluorochromami przedstawiono w Tabeli 11. Charakterystykę fenotypową populacji komórek identyfikowanych podczas analizy przedstawiono w Tabeli 13.

Tabela 13. Charakterystyka populacji komórek identyfikowanych w sLN uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.

<i>POPULACJA KOMÓREK</i>	<i>FENOTYP</i>
<i>Oznaczenie komórek limfoidalnych</i>	
Leukocyty	CD45 ⁺
Limfocyty T CD4 ⁺	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺
Limfocyty T CD4 ⁺ efektorowe	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD44 ⁺ CD62L ^{neg}
Limfocyty T CD4 ⁺ pamięci	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD44 ⁺ CD62L ⁺
Limfocyty Treg	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺
Limfocyty Treg efektorowe	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ CD44 ⁺ CD62L ^{neg}
Limfocyty T CD8 ⁺	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺
Limfocyty T CD8 ⁺ efektorowe	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD44 ⁺ CD62L ^{neg}
Limfocyty T CD8 ⁺ pamięci	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD44 ⁺ CD62L ⁺
NK	CD45 ⁺ CD3 ^{neg} NK1.1 ⁺
NKT	CD45 ⁺ CD3 ⁺ NK1.1 ⁺
<i>Oznaczenie komórek mieloidalnych</i>	
DC	CD45 ⁺ CD11b ⁺ CD11c ⁺ F4/80 ^{int} MHC II ⁺
Mf	CD45 ⁺ CD11b ⁺ CD11c ^{neg} F4/80 ⁺ Ly6C ^{neg}

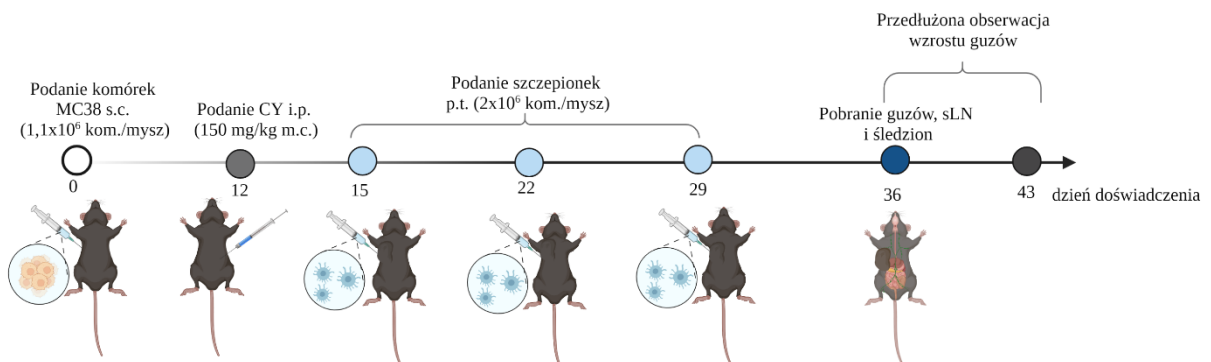
3.2.12.5. *Ocena aktywności restymulowanych komórek śledzionowych*

Aby określić aktywność splenocytów uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii, komórki śledzionowe poddano pięciodniowej restymulacji *ex vivo* z komórkami nowotworowymi. Warunki prowadzenia mieszanej hodowli oraz analizy wykonane w celu określenia aktywności restymulowanych splenocytów opisano w podrozdziale 3.2.11.3.

3.2.13. Określenie efektu przeciwnowotworowego chemioimmunoterapii z zastosowaniem cyklofosfamid i komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi

3.2.13.1. Schemat doświadczenia chemioimmunoterapeutycznego

Myszom z rosnącym podskórnie guzem mysiego raka jelita grubego MC38 (podrozdział 3.2.10.2) dootrzewnowo (i.p.) podano cyklofosfamid (CY) w dawce 150 mg/kg m.c. w 12. dniu po podaniu komórek nowotworowych, a następnie okołoguzowo podawano szczepionki na bazie modyfikowanych DC oraz szczepionkę kontrolną w liczbie 2×10^6 kom./0,2 ml/mysz w 15., 22. i 29. dniu. Opis przygotowania szczepionek przedstawiono w podrozdziale 3.2.12.2. Ocenę skuteczności zastosowanej terapii przeprowadzono na podstawie pomiarów wzrostu guzów prowadzonych podczas trwania doświadczenia co 3-4 dni oraz obliczonych wartości TGI w grupach terapeutycznych w odniesieniu do grupy nietraktowanej (nieleczonej) i/lub traktowanej samym CY. W 36. dniu doświadczenia od 7 myszy z każdej grupy badanej zostały pobrane śledziony, sLN i tkanka nowotworowa do dalszych analiz *ex vivo*, które opisano w podrozdziałach 3.2.12.3., 3.2.12.4. oraz 3.2.12.5. Pomiary objętości guzów prowadzono do 43. dnia doświadczenia (Ryc. 9.).



Ryc. 9. Schemat doświadczenia chemioimmunoterapeutycznego.

W 12. dniu doświadczenia, myszom z rosnącymi podskórnie guzami MC38 podano dootrzewnowo cyklofosfamid (150 mg/kg), a w 15., 22. i 29. dniu doświadczenia zastosowano okołoguzowo szczepionki na bazie komórek dendrytycznych transdukowanych do produkcji cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi (p.t.; 2×10^6 kom./mysz). W 36. dniu doświadczenia od 7 myszy z każdej grupy badanej zostały pobrane śledziony, wartownicze węzły chłonne (sLN) i tkanka nowotworowa do dalszych analiz *ex vivo*. Pomiary objętości guzów prowadzono co 3-4 dni do 43. dnia doświadczenia.

3.2.14. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono w programie GraphPad Prism 9. W pierwszym etapie analizy statystycznej sprawdzano normalność rozkładu danych za pomocą testu Shapiro-Wilk'a. Istotność statystyczną wyznaczano za pomocą: parametrycznego jednoczynnikowego testu ANOVA i testu *post hoc* wielokrotnych porównań Tukey'a dla danych z rozkładu normalnego o równych wartościach SD; jednoczynnikowego testu ANOVA

w modyfikacji Brown-Forsythe'a i Welcha i testu *post hoc* wielokrotnych porównań Dunnett'a T3 dla danych z rozkładu normalnego o nierównych wartościach SD; nieparametrycznego jednoczynnikowego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunn'a dla danych niezgodnych z rozkładem normalnym. Analizę statystyczną pomiarów objętości guzów prowadzonych przez cały czas trwania doświadczeń terapeutycznych wykonano za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a. Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$; #### - $p < 0,0001$ względem grupy nietraktowanej; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$; pomiędzy poszczególnymi grupami). W opisach pod rycinami zamieszczono rodzaj zastosowanego testu statystycznego dla danego oznaczenia.

Korelację pomiędzy objętością guzów MC38, a odsetkiem komórek CD45⁺ naciekających do tkanki nowotworowej obliczono za pomocą nieparametrycznego współczynnika korelacji Spearmana, a rodzaj i siłę korelacji określono na podstawie poniższych założeń (Tabela 14.).

Tabela 14. Interpretacja współczynnika korelacji Spearmana.

RODZAJ KORELACJI	SILA KORELACJI DLA R
$r > 0$ korelacja dodatnia	$< 0,2$ – brak związku liniowego
$r = 0$ brak korelacji	0,2-0,4 – słaba zależność
$r < 0$ korelacja ujemna	0,4-0,7 – umiarkowana zależność
	0,7-0,9 – dość silna zależność
	$> 0,9$ – bardzo silna zależność

4. Wyniki

W ramach realizacji niniejszej pracy doktorskiej opracowano szczepionki na bazie komórek dendrytycznych (**DC**) izolowanych ze szpiku kostnego samic myszy szczepu C57BL/6 i różnicowanych w trakcie krótkotrwałej hodowli prowadzonej w warunkach *ex vivo* (Tabela 7.; Ryc. 5). W siódmym dniu różnicującej hodowli mysich komórek szpikowych, prowadzonej w obecności *rm* GM-CSF i *rm* IL-4, komórki dendrytyczne transdukowano wektorami lentiwirusowymi trzeciej generacji niosącymi sekwencję genów mysiej IL-12 (pLV/IL-12; **DC/IL-12**), mysiej IL-18 (pLV/IL-18; **DC/IL-18**) lub genami obu tych cytokin jednocześnie (pLV/IL-12/IL-18; **DC/IL-12/IL-18**). Komórki **DC/IL-12+IL-18** otrzymano poprzez transdukcję DC dwoma wektorami lentiwirusowymi niosącymi geny IL-12 (pLV/IL-12) oraz IL-18 (pLV/IL-18). Komórki transdukowane wektorem kodującym gen białka wzmocnionej zielonej fluorescencji (pLV/EGFP; **DC/EGFP**) oraz komórki nietransdukowane (**DC**) stanowiły kontrolę procesu transdukcji. Schematy wektorów lentiwirusowych przedstawiono na Ryc. 4. DC transdukowane do produkcji cytokin oraz komórki kontrolne stymulowano antygenami nowotworowymi w postaci lizatu z komórek mysiego raka jelita grubego MC38 (**TAg**). Tak przygotowane komórki oznaczono jako: **DC/TAg**, **DC/EGFP/TAg**, **DC/IL-12/TAg**, **DC/IL-18/TAg**, **DC/IL-12/IL-18/TAg**, **DC/IL-12+IL-18/TAg**.

W pierwszym etapie badań oceniano skuteczność transdukcji komórek dendrytycznych do produkcji cytokin oraz wpływ transdukcji wektorami lentiwirusowymi na zmiany fenotypowe tych komórek (rozdział 4.1.). Po wstępnych badaniach *in vitro*, sprawdzano aktywność komórek szczepionkowych poprzez ocenę zdolności DC do pierwotnego pobudzenia splenocytów w warunkach *in vitro* (rozdział 4.1.), określenie kinetyki migracji DC do wartowniczych węzłów chłonnych lub infiltrowania tkanki nowotworowej oraz określenie kinetyki indukowania odpowiedzi przeciwnowotworowej w warunkach *in vivo* (rozdział 4.2.). Pełna charakterystyka komórek dendrytycznych transdukowanych do produkcji IL-12 i/lub IL-18 oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi pozwoliła na opracowanie schematów terapeutycznych mysiego raka jelita grubego MC38. Przeciwnowotworowy efekt działania opracowanych szczepionek w immunoterapii przedstawiono w rozdziale 4.3., a zastosowanie ich w terapii skojarzonej z cyklofosfamidem (chemioimmunoterapia) opisano w rozdziale następnym (rozdział 4.4).

4.1. Charakterystyka komórek dendrytycznych transdukowanych do produkcji cytokin

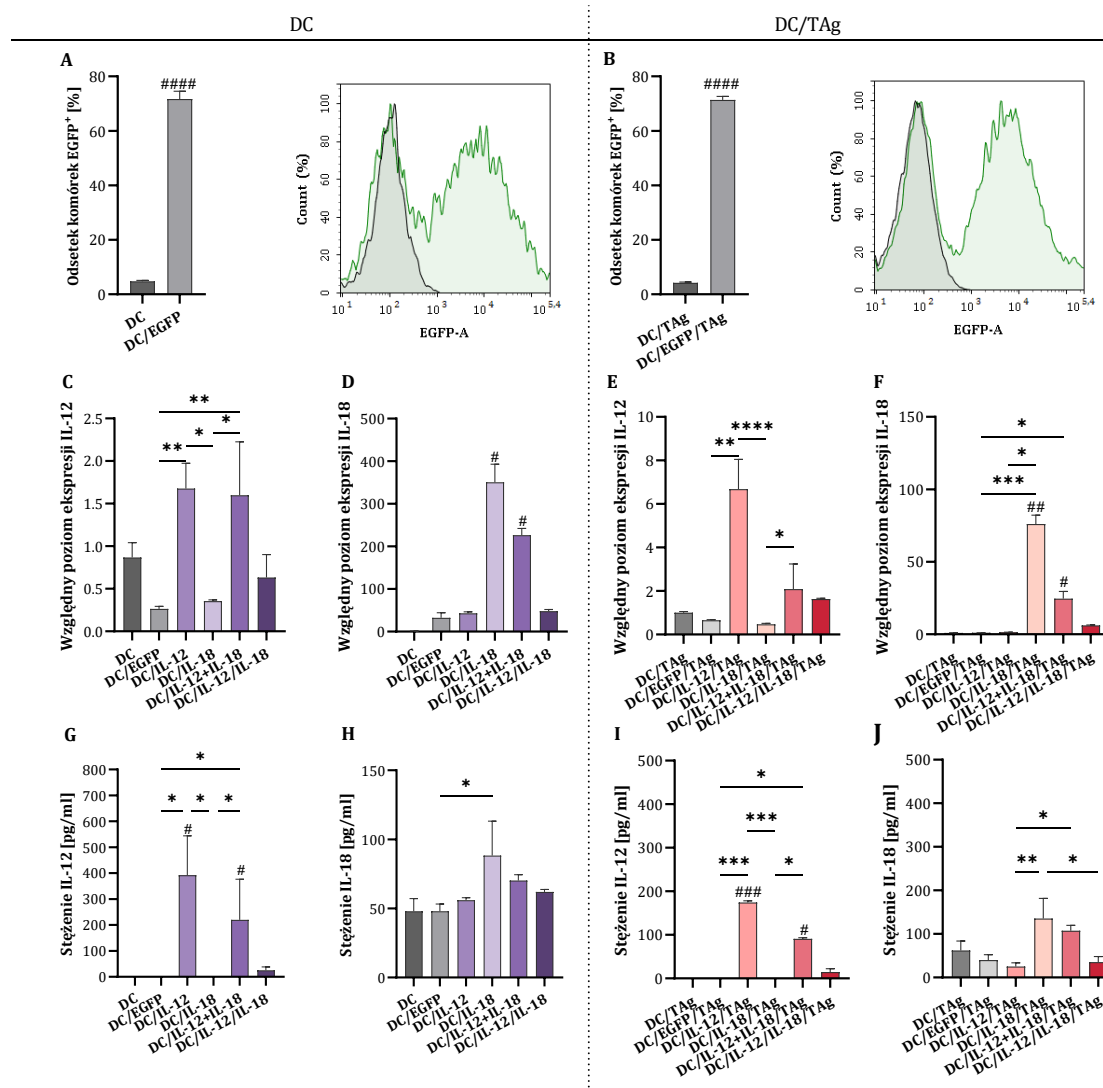
Badania rozpoczęto od dokonania charakterystyki komórek szczepionkowych w warunkach *in vitro*, określając wydajność procesu transdukcji, a także wpływ transdukcji oraz stymulacji antygenami nowotworowymi na stopień zróżnicowania tych komórek, w porównaniu do komórek transdukowanych wektorem kontrolnym oraz komórek nietransdukowanych. W celu wstępnego określenia skuteczności działania opracowanych szczepionek oceniano zdolność komórek dendrytycznych transdukowanych do produkcji IL-12 i/lub IL-18 oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi do pobudzenia swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej w warunkach *ex vivo*.

4.1.1. Ocena skuteczności transdukcji komórek dendrytycznych

Celem przeprowadzonych doświadczeń był wybór skutecznej metody transdukcji komórek dendrytycznych za pomocą wektorów lentiwirusowych do produkcji IL-12 lub IL-18, jak również do jednoczesnej produkcji tych cytokin.

Wstępnym parametrem umożliwiającym ocenę wydajności transdukcji komórek szczepionkowych, była analiza poziomu ekspresji białka wzmocnionej zielonej fluorescencji (EGFP) w komórkach kontrolnych (DC/EGFP, DC/EGFP/TAg) w porównaniu do komórek nietransdukowanych (DC, DC/TAg) (Ryc. 10. A, B). Analiza ekspresji EGFP w DC/EGFP i DC/EGFP/TAg wykonana za pomocą cytometrii przepływowej wykazała wydajność transdukcji na poziomie ok. 71 %, po wprowadzeniu do komórek określonej doświadczalnie liczby cząstek wirusa, przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej żywotności transdukowanych DC (dane dotyczące żywotności komórek nie zostały zaprezentowane). Na podstawie poziomu ekspresji EGFP w komórkach kontrolnych oraz ze względu na to, że wektory wszystkich typów były wprowadzane do komórek w tej samej liczbie uznano, że otrzymane komórki szczepionkowe są komórkami zmodyfikowanymi genetycznie.

Wydajność transdukcji komórek szczepionkowych do produkcji IL-12 i/lub IL-18 określono na podstawie poziomu ekspresji mRNA dla IL-12 i IL-18 w transdukowanych DC (Ryc. 10. C, D), jak również transdukowanych DC stymulowanych TAg (Ryc. 10. E, F). Ponadto oznaczono stężenie tych cytokin w nadsączach znad hodowli obu typów komórek (Ryc. 10. G, H oraz I, J). Największą wydajność transdukcji do produkcji cytokin uzyskano w komórkach transdukowanych genami jednej cytokiny (DC/IL-12, DC/IL-18, DC/IL-12/TAg, DC/IL-18/TAg). Modyfikacja komórek za pomocą dwóch wektorów niosących geny IL-12 lub IL-18 (DC/IL-12+IL-18, DC/IL-12+IL-18/TAg) mająca na celu wygenerowanie komórek zdolnych do jednoczesnej produkcji cytokin, była bardziej skuteczna niż transdukcja DC jednym wektorem niosącym sekwencję genów obu cytokin jednocześnie (DC/IL-12/IL-18, DC/IL-12/IL-18/TAg).



Ryc. 10. Wydajność transdukcji komórek dendrytycznych za pomocą wektorów lentiwirusowych kodujących geny IL-12 i/lub IL-18.

Odsetek komórek EGFP⁺ wśród DC/EGFP (A) i DC/EGFP/TAG (B) oceniono za pomocą cytometrii przepływowej. Na histogramach przedstawiono dane z prób reprezentatywnych. Komórki nietransdukowane (DC, DC/TAG – szary histogram) oraz komórki transdukowane wektorem kodującym gen białka wzmocnionej zielonej fluorescencji (DC/EGFP, DC/EGFP/TAG – zielony histogram) stanowiły kontrolę procesu transdukcji. Względny poziom ekspresji mRNA dla IL-12 i IL-18 w transdukowanych DC (C, D) oraz transdukowanych DC stymulowanych TAG (E, F) określono metodą reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Stężenie IL-12 i IL-18 w nadsączach znad 24 godzinnej hodowli transdukowanych DC (G, H) oraz transdukowanych DC stymulowanych TAG (I, J) określono za pomocą testu ELISA. Na wykresach przedstawiono wyniki z testu przeprowadzonego w 6 powtórzeniach. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunn'a. Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$; #### - $p < 0,0001$ względem grupy DC lub DC/TAG; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$ pomiędzy poszczególnymi grupami).

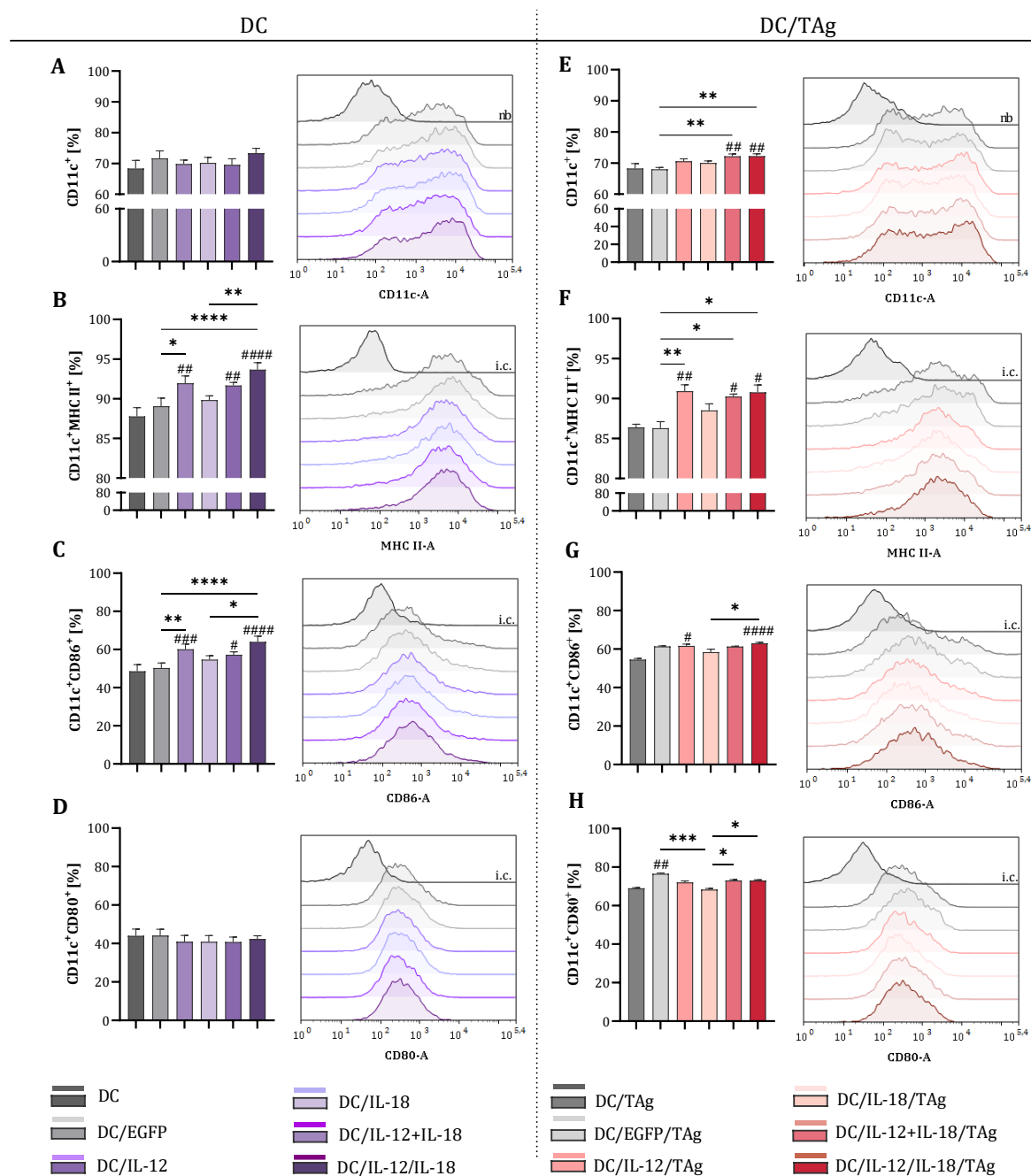
4.1.2. Ocena wpływu transdukcji genami cytokin na poziom zróżnicowania komórek dendrytycznych

W ramach wstępnej charakterystyki komórek szczepionkowych, oceniano wpływ procesu transdukcji oraz stymulacji antygenami nowotworowymi na poziom zróżnicowania komórek dendrytycznych w porównaniu do DC/EGFP i DC/EGFP/TAg oraz komórek nietransdukowanych (DC; DC/TAg). W ósmym dniu hodowli, komórki znakowano przeciwciałami monoklonalnymi skoniugowanymi z fluorochromami, a intensywność fluorescencji analizowano metodą cytometrii przepływowej.

Po wprowadzeniu wektorów lentiwirusowych do hodowli, oceniono odsetek komórek dendrytycznych ($CD11c^+$), który wynosił około 70% (Ryc. 11. A) i nie zmieniał się pod wpływem transdukcji. Poziom zróżnicowania DC określano na podstawie ekspresji cząsteczek głównego kompleksu zgodności tkankowej klasy II (MHC II) oraz cząsteczek kostymulujących (CD86, CD80). Wykazano wzrost odsetka komórek $MHC II^+$ oraz $CD86^+$ w hodowli DC transdukowanych do produkcji samej IL-12 lub IL-12 i IL-18 w porównaniu hodowli komórek kontrolnych (Ryc. 11. B, C, D, F). Transdukcja DC wektorem niosącym gen samej IL-18 lub wektorem kontrolnym, nieznacznie wpłynęła na zmiany w ekspresji cząsteczek MHC II i CD86 na powierzchni tych komórek. Natomiast wprowadzenie do komórek dendrytycznych dowolnego z wektorów nie spowodowało zmian w ekspresji cząsteczki CD80 (Ryc. 11. D).

Stymulacja transdukowanych komórek dendrytycznych antygenami nowotworowymi wpłynęła na statystycznie istotne zwiększenie odsetka komórek $CD11c^+$ w hodowli DC/IL-12+IL-18/TAg, jak również DC/IL-12/IL-18/TAg, w porównaniu do DC/TAg lub DC/EGFP/TAg (Ryc. 11. E). Dodatkowo spowodowała istotny statystycznie wzrost odsetka komórek $MHC II^+$ wśród DC/IL-12/TAg, DC/IL-12+IL-18/TAg oraz DC/IL-12/IL-18/TAg i niewielki wzrost odsetka tych komórek wśród DC/IL-18/TAg w odniesieniu do DC/TAg oraz DC/EGFP/TAg (Ryc. 11. F). Aktywacja DC za pomocą TAg indukowała także wzrost udziału procentowego komórek $CD86^+$ wśród DC/IL-12/TAg oraz DC/IL-12/IL-18/TAg w porównaniu do komórek nietransdukowanych (Ryc. 11. G). Co więcej, po stymulacji TAg stwierdzono wzrost odsetka komórek $CD80^+$ we wszystkich typach hodowli, a szczególnie po transdukcji wektorem kontrolnym (DC/EGFP/TAg) (Ryc. 11. H).

Ze względu na to, że komórki szczepionkowe DC/IL-12/IL-18 oraz DC/IL-12/IL-18/TAg były zdolne do produkcji IL-12 i IL-18 na niewielkim poziomie, pomimo zwiększonego stopnia ich pobudzenia, nie zostały zakwalifikowane do dalszych etapów badań.

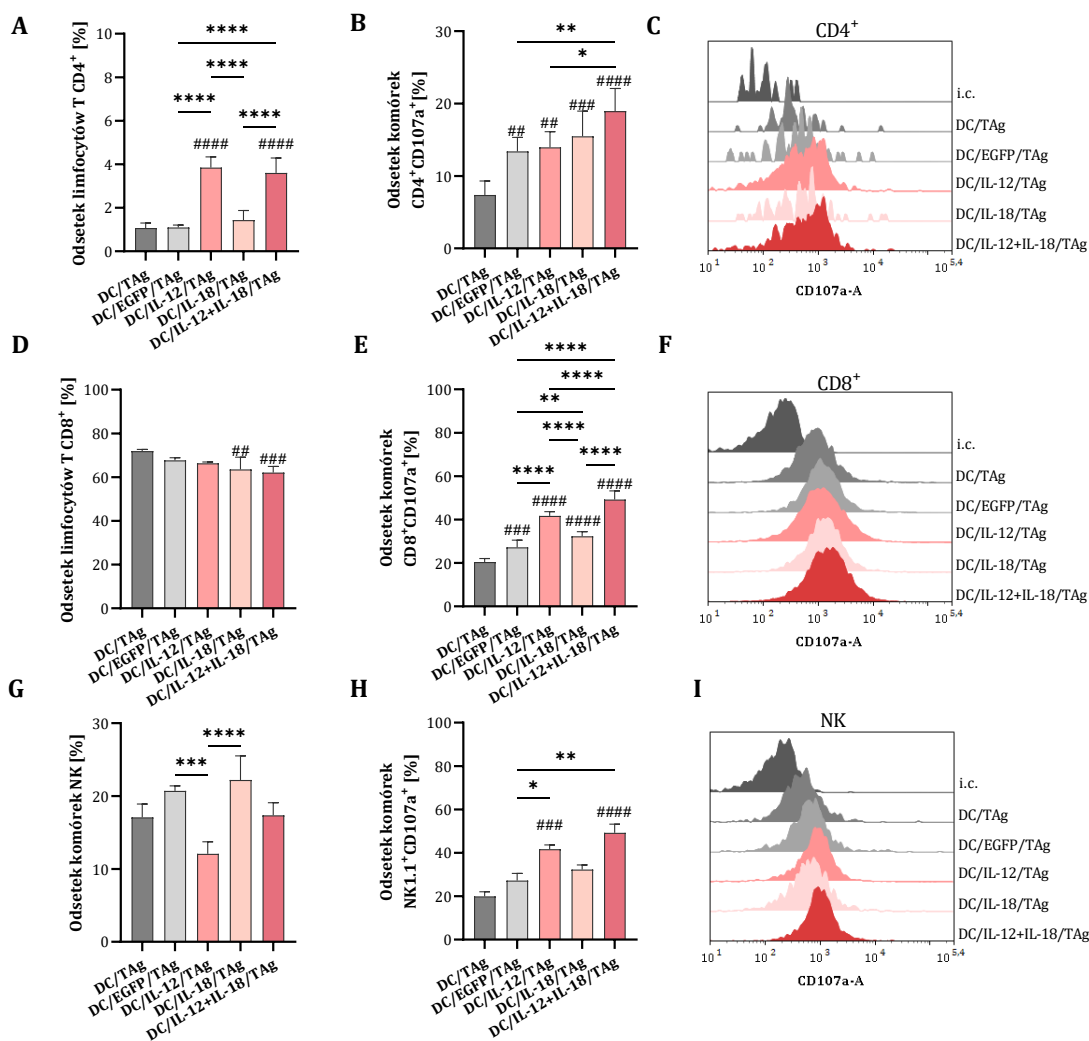


Ryc. 11. Ocena poziomu zróżnicowania komórek dendrytycznych transdukowanych do produkcji IL-12 i/lub IL-18.

Niedojrzałe komórki dendrytyczne pochodzenia szpikowego transdukowano wektorami lentiwirusowymi w 7. dniu hodowli różnicującej, prowadzonej w obecności rm GM-CSF i rm IL-4 oraz stymulowano antygenami nowotworowymi (TAg). W 8 dniu hodowli, określano odsetek komórek dendrytycznych (CD11c⁺) uzyskanych podczas hodowli (A, E). Poziom zróżnicowania komórek dendrytycznych po transdukcji oceniano na podstawie ekspresji cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej klasy II (MHC II) (B, F) oraz cząsteczek kostymulujących (CD86 (C, G) i CD80 (D, H)) na powierzchni komórek CD11c⁺. Na wykresach przedstawiono wyniki z testu przeprowadzonego w 6-9 powtórzeniach metodą cytometrii przepływowej. Na histogramach przedstawiono dane z prób reprezentatywnych. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallis i testu *post hoc* Dunn'a. Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których p<0,05 (# - p<0,05; ## - p<0,01; ### - p<0,001; #### - p<0,0001 względem grupy DC lub DC/TAg; * - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001; **** - p<0,0001 pomiędzy poszczególnymi grupami). *nb* – próbka niebarwiona; *i.c.* – kontrola izotypowa

4.1.3. Ocena zdolności komórek dendrytycznych transdukowanych genami IL-12 i/lub IL-18 oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi do indukowania swoistej odpowiedzi komórkowej w warunkach *ex vivo*

W celu określenia zdolności transdukowanych DC stymulowanych antygenami nowotworowymi do pobudzenia swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej, prowadzono 5-dniową mieszaną hodowlę komórek szczepionkowych z komórkami śledzionowymi wyizolowanymi ze śledzion zdrowych samic myszy szczepu C57BL/6.

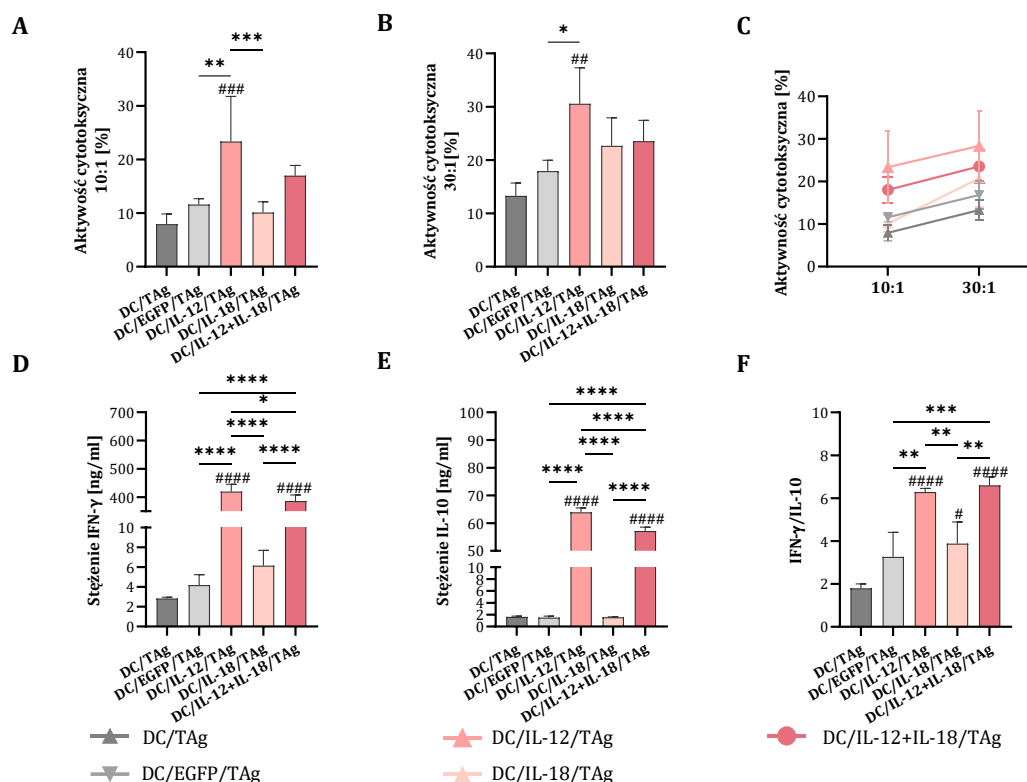


Ryc. 12. Zdolność komórek dendrytycznych transdukowanych genami IL-12 i/lub IL-18 oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi do pierwotnego pobudzenia komórek śledzionowych.

Komórki szczepionkowe hodowano przez 5 dni ze splenocytami wyizolowanymi ze śledziony zdrowej myszy. Wśród splenocytów określano odsetek limfocytów T CD4⁺ (A), T CD8⁺ (D) i komórek NK (NK1.1⁺) (G) oraz odsetek komórek zdolnych do wydzielania ziaren cytotolitycznych (CD107a⁺) wśród tych populacji (B, C, E, F, H, I), po 2-godzinnej inkubacji z komórkami MC38. Na rycinie przedstawiono wyniki z testu przeprowadzonego w 6-9 powtórzeniach metodą cytometrii przepływowej. Na histogramach przedstawiono dane z prób reprezentatywnych. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunn'a (D, G, H) lub parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A, B, E). Za istotnie statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$; #### - $p < 0,0001$ względem grupy DC/TAg; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$ pomiędzy poszczególnymi grupami). *i.c.* – kontrola izotypowa

Komórki śledzionowe znakowano przeciwciałami monoklonalnymi skoniugowanymi z fluorochromami, a intensywność fluorescencji analizowano metodą cytometrii przepływowej. Wśród splenocytów z mieszanej hodowli określono zmiany odsetka limfocytów T CD4⁺, T CD8⁺ i komórek NK (NK1.1⁺) oraz na podstawie poziomu ekspresji cząsteczek CD107a po 2-godzinnej inkubacji z komórkami nowotworowymi MC38, odsetek komórek cytotoksycznych (Ryc. 12). Stopień pobudzenia swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej oceniano na podstawie aktywności cytotoksycznej splenocytów z mieszanej hodowli z komórkami szczepionkowymi wobec komórek nowotworowych MC38 oraz stężenia IFN- γ i IL-10 w nadsączach z tej mieszanej hodowli. Aktywność cytotoksyczną komórek śledzionowych przedstawiono jako odsetek martwych komórek MC38 po 4-godzinnej inkubacji z komórkami efektorowymi w stosunku 10:1 oraz 30:1 (Ryc. 13).

W 5-dniowej hodowli z kontrolnymi DC, populacja limfocytów T CD4⁺ stanowiła niewielką część splenocytów, natomiast ponad 3-krotny wzrost odsetka tych komórek zależał od obecnej w środowisku IL-12, produkowanej przez transdukowane DC (Ryc. 12. A). Z drugiej strony, hodowla wraz z DC/IL-12+IL-18/TAg spowodowała najwyższą zdolność do uwalniania ziaren cytolitycznych, podkreślając w ten sposób wpływ IL-18 na stopień aktywacji tych splenocytów (Ryc. 12. B, C). Limfocyty T CD8⁺ stanowiły ponad 65% populacji splenocytów w mieszanej hodowli z DC/TAg. Natomiast odsetek tych komórek był niższy po inkubacji z DC transdukowanymi do produkcji IL-18 zarówno DC/IL-18/TAg, jak i DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc. 12. D). Jednakże komórki DC/IL-12+IL-18/TAg aktywowały w najwyższym stopniu limfocyty T CD8⁺ zdolne do uwalniania ziaren cytolitycznych (Ryc. 12. E, F). Zróżnicowanie wielkości populacji komórek NK po stymulacji przez transdukowane DC w mieszanej hodowli, okazało się znacznie bardziej zależne od produkowanej cytokiny. Istotny wzrost odsetka tych komórek stwierdzono pod wpływem IL-18 (Ryc. 12. G), niemniej jednak podobnie jak w przypadku limfocytów T, najwyższy odsetek komórek NK CD107a⁺ obserwowano w hodowli z DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc. 12. H, I).



Ryc. 13. Wpływ komórek szczipionkowych na aktywację efektorowych komórek śledzionowych.

Komórki dendrytyczne transdukowane do produkcji cytokin oraz stymulowane TAG hodowano przez 5 dni ze splenocytami wyizolowanymi ze śledziony zdrowej myszy. Aktywność cytotokсыczną komórek śledzionowych przedstawiono jako odsetek martwych komórek MC38 po 4-godzinnej inkubacji z komórkami efektorowymi w stosunku 10:1 (A, C) i 30:1 (B, C) (komórki efektorowe : komórki nowotworowe MC38). Stężenie IFN-γ (D) i IL-10 (E) w nadsączach znad 5-dniowej mieszanej hodowli splenocytów i komórek szczipionkowych oceniano za pomocą testu ELISA. Stosunek stężenia IFN-γ i IL-10 (F). Na rycinie przedstawiono wyniki z testu przeprowadzonego w 6-9 powtórzeniach. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallis i testu *post hoc* Dunn'a (B) lub parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A, D, E, F). Za istotnie statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - 0,05; ## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$; #### - $p < 0,0001$ względem grupy DC/TAG; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$ pomiędzy poszczególnymi grupami).

Jedną z oczekiwanych cech opracowanych szczipionek na bazie DC transdukowanych do produkcji IL-12 i IL-18 była ich zdolność do aktywowania efektorowych komórek śledzionowych.

W przeprowadzonych badaniach *ex vivo* wykazano wzrost aktywności cytotokсыcznej splenocytów wobec komórek MC38, pod wpływem cytokin produkowanych przez DC, przy czym splenocyty hodowane w obecności DC/IL-12/TAG charakteryzowały się najwyższą zdolnością do zabijania komórek nowotworowych (Ryc. 13. A, B, C). Komórki śledzionowe inkubowane zarówno z DC/IL-12+IL-18/TAG, jak i DC/IL-18/TAG również powodowały wzrost odsetka martwych komórek MC38, w porównaniu z komórkami kontrolnymi, jednak zmiany te nie były istotnie statystycznie (Ryc. 13. B).

W nadsączach znad 5-dniowej mieszanej hodowli splenocytów z DC transdukowanymi do produkcji IL-12 (DC/IL-12/TAG; DC/IL-12+IL-18/TAG) odnotowano najwyższe stężenie IFN-γ

oraz IL-10 (Ryc. 13. D, E). Wynik analizy stosunku stężenia IFN- γ do IL-10 potwierdził, że produkowana przez komórki szczepionkowe IL-12 miała wpływ na zwiększenie zdolności dziewiczych limfocytów T do produkcji IFN- γ , a IL-18 uwalniana do środowiska przez DC/IL-12+IL-18/TAg jedynie nieznacznie wzmocniła ten efekt, wskazując na ich wspólny udział w promowaniu polaryzacji splenocytów w kierunku odpowiedzi typu Th1 (Ryc. 13. F).

4.1.4. Podsumowanie

W pierwszym etapie badań wykazano, że komórki szczepionkowe otrzymane z 8-dniowej różnicującej hodowli komórek szpikowych, prowadzonej w obecności rm GM-CSF i rm IL-4, transdukowane do produkcji cytokin oraz stymulowane lub niestymulowane antygenami nowotworowymi, stanowiły w 70% w pełni zróżnicowane komórki dendrytyczne (CD11c⁺). Skuteczność transdukcji tych komórek za pomocą wektorów lentiwirusowych wyniosła około 71%, a DC/IL-12, DC/IL-18, DC/IL-12/TAg oraz DC/IL-18/TAg charakteryzowały się najwyższą zdolnością do produkcji cytokin. Analiza fenotypu powierzchniowego wykazała wzrost odsetka komórek MHC II⁺ w hodowli DC transdukowanych do produkcji samej IL-12 lub IL-12 i IL-18, zarówno bez, jak i po stymulacji antygenami nowotworowymi. Co więcej, wykazano, że niezależnie od stymulacji TAg, transdukcja DC do jednoczesnej produkcji cytokin za pomocą dwóch wektorów niosących geny IL-12 lub IL-18 (DC/IL-12+IL-18; DC/IL-12+IL-18/TAg) była bardziej wydajna niż transdukcja DC jednym wektorem niosącym sekwencję genów obu cytokin jednocześnie (DC/IL-12/IL-18, DC/IL-12/IL-18/TAg). Ze względu na to, że głównym celem niniejszej pracy jest opracowanie najskuteczniejszej szczepionki przeciwnowotworowej, do dalszych badań wybrano komórki szczepionkowe transdukowane za pomocą dwóch wektorów niosących geny IL-12 lub IL-18 (DC/IL-12+IL-18, DC/IL-12+IL-18/TAg).

Wstępna ocena skuteczności komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi wykazała ich znaczący wpływ na indukowanie swoistej odpowiedzi komórkowej w warunkach *ex vivo*. Obserwacja ta dotyczyła przede wszystkim szczepionek zawierających DC produkujące samą IL-12 lub IL-12 wraz z IL-18, które były zdolne do aktywacji limfocytów T CD4⁺, T CD8⁺ oraz komórek NK, a w konsekwencji - zwiększenie aktywności cytotoksycznej tych komórek oraz ich zdolności do produkcji IFN- γ oraz IL-10.

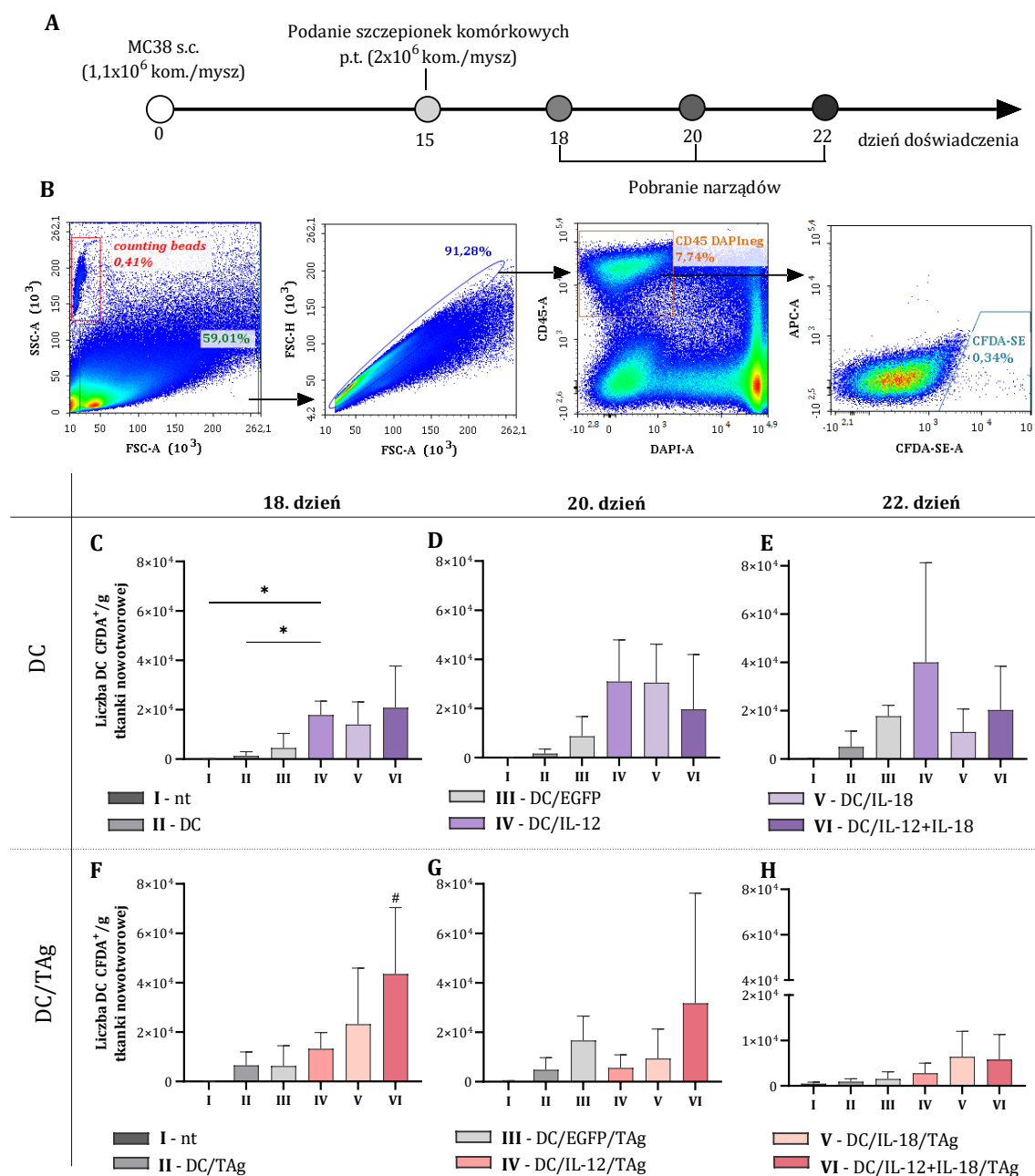
4.2. Charakterystyka funkcjonalna komórek dendrytycznych transdukowanych do produkcji cytokin

W drugim etapie badań, dokonano charakterystyki funkcjonalnej komórek szczepionkowych w warunkach *in vivo*. Po jednokrotnym, okołoguzowym podaniu transdukowanych DC i/lub stymulowanych antygenami nowotworowymi, myszom obciążonym rakiem jelita grubego MC38, oceniano zdolność tych komórek do naciekania tkanki nowotworowej i migracji do wartowniczych węzłów chłonnych. Określano także kinetykę odpowiedzi przeciwnowotworowej indukowanej przez komórki szczepionkowe w warunkach *in vivo*.

4.2.1. Ocena zdolności komórek szczepionkowych do naciekania tkanki nowotworowej oraz migracji do wartowniczych węzłów chłonnych

W celu określenia zdolności komórek szczepionkowych do infiltrowania tkanki nowotworowej oraz migrowania do wartowniczych węzłów chłonnych (ang. *sentinel lymph nodes*, sLN), wszystkie stosowane DC zostały wyznakowane wewnątrzcytoplazmatycznym fluorescencyjnym barwnikiem CFDA-SE. Następnie, w 15. dniu doświadczenia, zostały podane okołoguzowo (ang. *peritumorally* – p.t.) myszom z rosnącymi podskórnymi guzami nowotworowymi MC38. W 18., 20. i 22. dniu doświadczenia, (odpowiednio po trzech, pięciu i siedmiu dniach po podaniu szczepionek) od myszy pobierano tkankę nowotworową, sLN oraz śledziony (Ryc. 14. A). Obecność wyznakowanych DC w tkance nowotworowej oraz w sLN (pachowych i pachwinowych zlokalizowanych po stronie rosnącego guza) określano metodą cytometrii przepływowej. Schemat analizy populacji komórek szczepionkowych w tkance nowotworowej i sLN przedstawiono na Ryc. 14. B. i Ryc. 15. A.

Po wyeliminowaniu debris i zlepow komórkowych, w analizowanej tkance wyodrębniono żywe leukocyty (DAPI^{neg}CD45⁺), a wśród nich zidentyfikowano komórki szczepionkowe CFDA-SE⁺. Liczebność DC w tkance nowotworowej określono jako liczbę komórek CFDA-SE⁺ w 1 gramie tkanki nowotworowej pobranej od myszy. Natomiast liczebność DC w sLN zaprezentowano jako liczbę komórek szczepionkowych CFDA-SE⁺ na 1×10^6 komórek wyizolowanych z sLN. Ponadto przedstawiono odsetek komórek szczepionkowych w guzach i sLN (Tabela 15, Tabela 16).



Ryc. 14. Ocena infiltracji tkanki nowotworowej przez komórki dendrytyczne transdukowane genami cytokin i/lub stymulowane antygenami nowotworowymi.

W 15. dniu doświadczenia po podskórnym podaniu komórek raka jelita grubego MC38 ($1,1 \times 10^6$ kom./mysz), kiedy guzy były palpacyjnie wyczuwalne, myszom zostały podane okołoguzowo komórki szczepionkowe. W 18., 20. i 22. dniu doświadczenia od 6 myszy z każdej grupy pobrano tkankę nowotworową i narządy limfoidalne (śledziony, wartownicze węzły chłonne) (A). Schemat analizy cytometrycznej komórek szczepionkowych w tkance nowotworowej (B). Po wyliminowaniu debris i zlepów komórkowych, wyodrębniono żywe leukocyty (DAPI^{neg}CD45⁺), a wśród nich zidentyfikowano komórki szczepionkowe (CFDA-SE⁺). Liczebność komórek szczepionkowych na 1g tkanki nowotworowej pobranej od myszy szczepionych transdukowanymi DC (C, D, E) oraz transdukowanym DC stymulowanymi TAg (F, G, H). Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunn'a (F) lub parametrycznego testu Brown-Forsythe i Welch ANOVA i testu *post hoc* Dunnett'a T3 (C). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$ względem grupy nt; * - $p < 0,05$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Analiza liczebności komórek szczepionkowych niestymulowanych antygenami nowotworowymi w tkance guzów pobranych od myszy w 18. dniu doświadczenia po jednokrotnym, okołoguzowym podaniu wykazała, że DC transdukowane do produkcji cytokin były zdolne do zasiedlania tkanki nowotworowej bardziej efektywnie niż komórki nietransdukowane lub transdukowane wektorem kontrolnym. Ponadto istotne statystycznie zwiększenie liczebności komórek szczepionkowych zaobserwowano po podaniu komórek DC/IL-12 (Ryc. 14. C). W kolejnym dniu doświadczenia, w tkance guzów stwierdzono zwiększoną liczebność DC transdukowanych do produkcji cytokin w odniesieniu do komórek DC i DC/EGFP, jednak zmiany te nie były istotne statystycznie. Największą liczebność komórek szczepionkowych zaobserwowano w tkance guzów pobranych w 20. dniu doświadczenia od myszy traktowanych DC/IL-12 lub DC/IL-18 (Ryc. 14. D). Obniżenie odsetka komórek CFDA-SE⁺ w analizowanej tkance było prawdopodobnie związane ze wzrostem masy guzów. W 22. dniu doświadczenia liczba komórek szczepionkowych obliczona na 1 gram analizowanej tkanki nowotworowej uległa zróżnicowaniu, mimo to po podaniu DC/IL-12 utrzymywała się wciąż na wysokim poziomie (Ryc. 14. E).

Znacznie bardziej zróżnicowany okazał się efekt podania transdukowanych DC stymulowanych TAG. W 18. dniu doświadczenia w tkance nowotworowej zidentyfikowano istotny statystycznie wzrost liczby DC/IL-12+IL-18/TAG, jednak zmniejszała się ona w kolejnych dniach obserwacji (Ryc. 14. F; Tabela 15. B) w porównaniu do DC/TAG lub DC/EGFP/TAG. Oznaczało to, że w 18. i 20. dniu doświadczenia, najbardziej efektywnie tkankę nowotworową naciekały DC/IL-12+IL-18/TAG (Ryc. 14. F, G; Tabela 15. B). Natomiast w 22. dniu doświadczenia wykazano znaczne obniżenie liczebności komórek szczepionkowych, mimo to do 7 dnia po podaniu, w tkance guzów utrzymywała się jeszcze śladowa liczba DC/IL-18/TAG oraz DC/IL-12+IL-18/TAG (Ryc. 14. H). Zatem komórki DC/IL-12+IL-18/TAG wykazywały zdolność do naciekania tkanki nowotworowej już w 3. dobie po ich podaniu (18. dnia doświadczenia), jak i do dłuższego pozostawania w guzie w widocznej liczbie.

Stymulacja komórek szczepionkowych antygenami nowotworowymi nie miała jednoznacznego wpływu na zdolność tych komórek do naciekania tkanki nowotworowej po jednokrotnym, okołoguzowym podaniu. Analiza odsetka komórek szczepionkowych w tkance nowotworowej wykazała, że udział procentowy tych komórek wynosił maksymalnie 0,07% w całej masie guzów MC38 (Tabela 15.), co odnotowano po podaniu DC/IL-12+IL-18 lub DC/IL-12+IL-18/TAG. Najwyższy odsetek wszystkich typów komórek szczepionkowych w guzach wykazano 3 dni po ich podaniu (18. dnia doświadczenia), a ich udział procentowy zmniejszał się wraz z rozwojem nowotworu. Wyjątek stanowiły DC/IL-18 oraz DC/EGFP/TAG, których najwyższy odsetek w guzach odnotowano 20. dnia doświadczenia.

Tabela 15. Odsetek komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i/lub stymulowanych antygenami nowotworowymi w tkance nowotworowej pobranej od myszy po jednokrotnym, okologuzowym podaniu szczepionek.

A	DC			B	DC/TAg		
	18. dzień	20. dzień	22. dzień		18. dzień	20. dzień	22. dzień
Grupy badane:	DC	DC	DC	Grupy badane:	DC	DC	DC
	[%]	[%]	[%]		[%]	[%]	[%]
nt	0,000	0,000	0,000	nt	0,000	0,000	0,000
DC	0,004	0,004	0,002	DC/TAg	0,010	0,004	0,001
DC/EGFP	0,008	0,007	0,006	DC/EGFP/TAg	0,010	0,016	0,001
DC/IL-12	0,063	0,027	0,022	DC/IL-12/TAg	0,018	0,006	0,002
DC/IL-18	0,033	0,037	0,004	DC/IL-18/TAg	0,037	0,007	0,006
DC/IL-12+IL-18	0,071	0,023	0,013	DC/IL-12+IL-18/TAg	0,070	0,069	0,005

Oceniono również zdolność komórek szczepionkowych do migracji do wartowniczych węzłów chłonnych wykazując, że nietransdukowane DC charakteryzowały się największą zdolnością do zasiedlania sLN, a ich liczba utrzymywała się na podobnym poziomie w ciągu 7 dni obserwacji (Ryc. 15. B, C, D). Największą liczbę komórek dendrytycznych transdukowanych do produkcji cytokin na 1×10^6 komórek sLN zidentyfikowano w 18. dniu doświadczenia, jednak malała ona w kolejnych dniach. Wyjątek stanowiły DC/IL-12, które w dniach pierwszego i drugiego pobrania wyróżniały się najmniejszą zdolnością do migracji.

Wprawdzie oceniając kinetykę migracji komórek szczepionkowych stymulowanych TAg do sLN zaobserwowano tę samą tendencję co w przypadku niestymulowanych DC, jednak modyfikacja ta znacznie wspomogła ich zdolności migracyjne (Ryc. 15. E, F, G). Największą mobilnością charakteryzowały się nietransdukowane DC/TAg. W 18. dniu doświadczenia, w wartowniczych węzłach chłonnych pobranych od myszy traktowanych DC/TAg zidentyfikowano największą liczbę komórek szczepionkowych w porównaniu do pozostałych grup badanych, jednak zmiany te nie były istotne statystycznie (Ryc. 15. E). Istotnie statystycznie okazało się natomiast zwiększenie liczebności komórek DC/TAg w sLN wykazane w 20. i 22. dniu doświadczenia (Ryc. 15. F, G). Podobnie jak w przypadku komórek szczepionkowych jedynie transdukowanych do produkcji cytokin, te stymulowane dodatkowo TAg, a w szczególności DC/IL-12/TAg, charakteryzowały się najmniejszą zdolnością do migracji do wartowniczych węzłów chłonnych.

obserwacji. Zatem stymulacja komórek szczepionkowych antygenami nowotworowymi zwiększała zdolność tych komórek do migracji do wartowniczych węzłów chłonnych.

Tabela 16. Odsetek komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i/lub stymulowanych antygenami nowotworowymi w wartowniczych węzłach chłonnych pobranych od myszy po jednokrotnym, okołoguzowym podaniu szczepionek.

DC				DC/TAg			
A	18. dzień	20. dzień	22. dzień	B	18. dzień	20. dzień	22. dzień
Grupy badane:	DC [%]	DC [%]	DC [%]	Grupy badane:	DC [%]	DC [%]	DC [%]
nt	0,000	0,000	0,000	nt	0,001	0,000	0,000
DC	0,004	0,002	0,004	DC/TAg	0,007	0,006	0,003
DC/EGFP	0,002	0,002	0,003	DC/EGFP/TAg	0,006	0,005	0,002
DC/IL-12	0,000	0,000	0,001	DC/IL-12/TAg	0,002	0,001	0,001
DC/IL-18	0,002	0,001	0,001	DC/IL-18/TAg	0,003	0,003	0,001
DC/IL-12+IL-18	0,002	0,001	0,001	DC/IL-12+IL-18/TAg	0,003	0,003	0,001

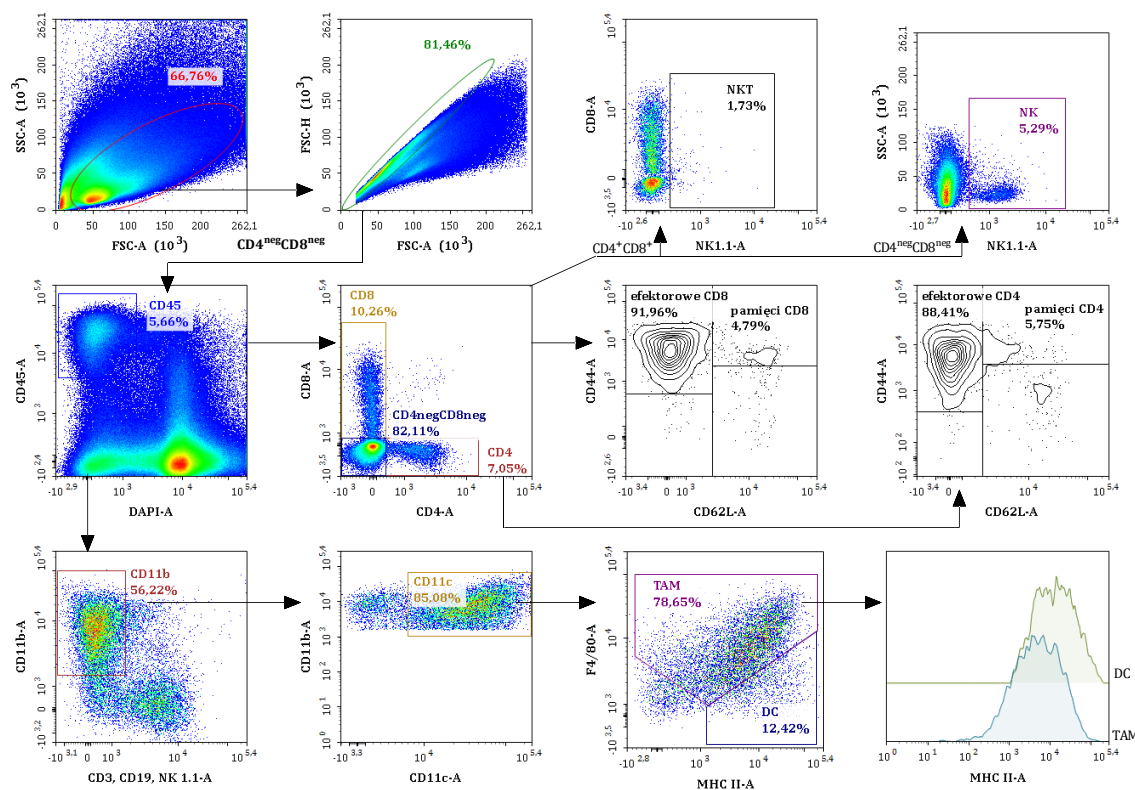
Widoczny stał się wpływ cytokin produkowanych przez transdukowane DC na ich skuteczność zarówno w naciekaniu tkanki nowotworowej, jak i migracji do wartowniczych węzłów chłonnych. Zjawisko to było ściśle zależne od stopnia dojrzałości DC będącego wynikiem rodzaju wprowadzonej cytokiny i poziomu jej uwalniania. Komórki transdukowane do produkcji cytokin traciły bowiem zdolność do efektywnej migracji do sLN, ale skuteczniej wnikały do tkanki guzów zmieniając w ten sposób równowagę cytokinową w środowisku nowotworowym. Stymulacja komórek szczepionkowych antygenami nowotworowymi wspomagała ich zdolność do migracji do wartowniczych węzłów chłonnych.

4.2.2. Kinetyka indukowania odpowiedzi przeciwnowotworowej w wyniku jednokrotnego podania komórek dendrytycznych transdukowanych genami IL-12 i/lub IL-18

W celu określenia zdolności komórek dendrytycznych transdukowanych genami IL-12 i IL-18 do indukowania odpowiedzi przeciwnowotworowej oceniano zmiany w wielkości wybranych subpopulacji komórek limfoidalnych i mieloidalnych w tkance nowotworowej i wartowniczych węzłach chłonnych. W 15. dniu doświadczenia myszom obarczonym rakiem jelita grubego MC38, jednokrotnie, okołoguzowo podano szczepionki przeciwnowotworowe (Ryc. 14. A). Następnie w trzech punktach czasowych tj. w 18., 20. i 22. dniu doświadczenia, określano zmiany odsetka limfocytów T CD4⁺ i T CD8⁺, komórek NK i NKT oraz komórek dendrytycznych i makrofagów związanych z nowotworem (TAM) w guzach oraz zmiany w odsetku subpopulacji leukocytów w sLN. Ponadto w 22. dniu doświadczenia od myszy pobrano śledziony i oznaczano zmiany odsetka subpopulacji komórek limfoidalnych oraz komórek dendrytycznych wśród splenocytów. Komórki śledzionowe poddano wtórnej stymulacji w pięciodniowej mieszanej

hodowli z komórkami nowotworowymi MC38 i oceniano ich aktywność cytotoksyczną wobec komórek MC38 oraz poziom produkowanych cytokin.

4.2.2.1. Ocena nacieku subpopulacji komórek limfoidalnych i mieloidalnych do tkanki nowotworowej



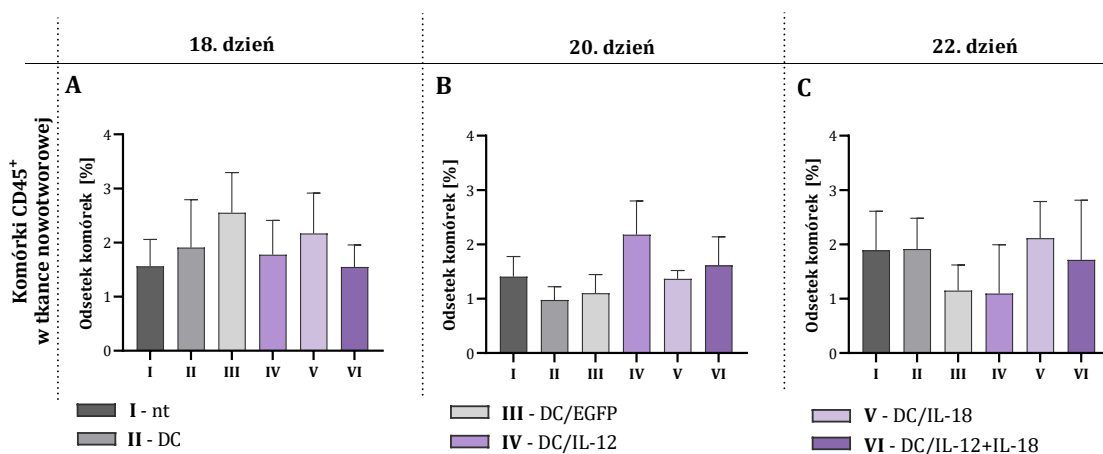
Ryc. 16. Schemat analizy populacji komórek limfoidalnych i mieloidalnych naciekających tkankę nowotworową w wyniku jedнокrotnego podania szczepionek.

Po wyeliminowaniu debris oraz zlepek komórkowych, w analizowanej tkance nowotworowej wyodrębniono żywe leukocyty (DAPI^{neg}CD45⁺). Podczas analizy komórek limfoidalnych, wśród komórek DAPI^{neg}CD45⁺ zidentyfikowano limfocyty T CD4⁺ oraz T CD8⁺. Następnie, wśród populacji komórek CD4⁺CD8⁺ wyodrębniono komórki NKT (NK1.1⁺CD4⁺; NK1.1⁺CD8⁺), a wśród populacji komórek CD4^{neg}CD8^{neg}, komórki NK (NK1.1⁺CD4^{neg}CD8^{neg}). Ponadto wśród limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ oznaczono komórki efektorowe (CD44⁺CD62L^{neg}) i komórki pamięci (CD44⁺CD62L⁺) na podstawie ekspresji markerów CD44 i CD62L. Podczas analizy komórek mieloidalnych wśród komórek DAPI^{neg}CD45⁺ zidentyfikowano komórki CD11b⁺, a wśród nich komórki CD11c⁺, a następnie populację komórek dendrytycznych (DC, CD11c⁺F4/80^{int}MHC II⁺) oraz makrofagów związanych z nowotworem (TAM, CD11c⁺F4/80⁺). Na rycinie przedstawiono reprezentatywną analizę tkanki nowotworowej pobranej w 20. dniu doświadczenia od myszy traktowanej DC/TAg.

Metodą cytometrii przepływowej, przeprowadzono wieloparametrową analizę tkanki nowotworowej pobranej od myszy po podaniu komórek szczepionkowych (Ryc. 16), podczas której wśród żywych leukocytów (DAPI^{neg}CD45⁺) zidentyfikowano wybrane populacje komórek limfoidalnych i mieloidalnych: limfocyty T CD4⁺ (CD45⁺CD4⁺), limfocyty T CD8⁺ (CD45⁺CD8⁺), komórki NKT (NK1.1⁺CD4⁺; NK1.1⁺CD8⁺) oraz komórki NK (NK1.1⁺CD4^{neg}CD8^{neg}). Ponadto na podstawie ekspresji markerów CD44 i CD62L, wśród limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ wyodrębniono

subpopulacje komórek efektorowych ($CD44^+CD62L^{neg}$) oraz komórek pamięci ($CD44^+CD62L^+$). Wśród mieloidalnych komórek $DAPI^{neg}CD45^+$ oznaczono komórki dendrytyczne (DC, $CD11c^+F4/80^{int}MHC II^+$) i makrofagi związane z nowotworem (TAM, $CD11c^+F4/80^+$) oraz poziom ekspresji cząsteczek MHC II na powierzchni tych komórek.

Odsetek leukocytów w guzach pobranych od myszy nietraktowanych wynosił około 1,5% we wszystkich dniach obserwacji. Podanie szczepionek w niewielkim stopniu wpłynęło na zmiany odsetka tych komórek w tkance nowotworowej w ciągu następnych 7 dni doświadczenia (Ryc. 17). W 18. dniu, w porównaniu do grupy nietraktowanej, najwyższy odsetek leukocytów odnotowano w grupie myszy otrzymujących DC/EGFP (Ryc. 17. A), w 20. dniu, po podaniu DC/IL-12 (Ryc. 17. B), natomiast w 22. dniu doświadczenia niewielki wzrost odsetka tych komórek stwierdzono w grupie myszy traktowanych DC/IL-18 (Ryc. 17. C).



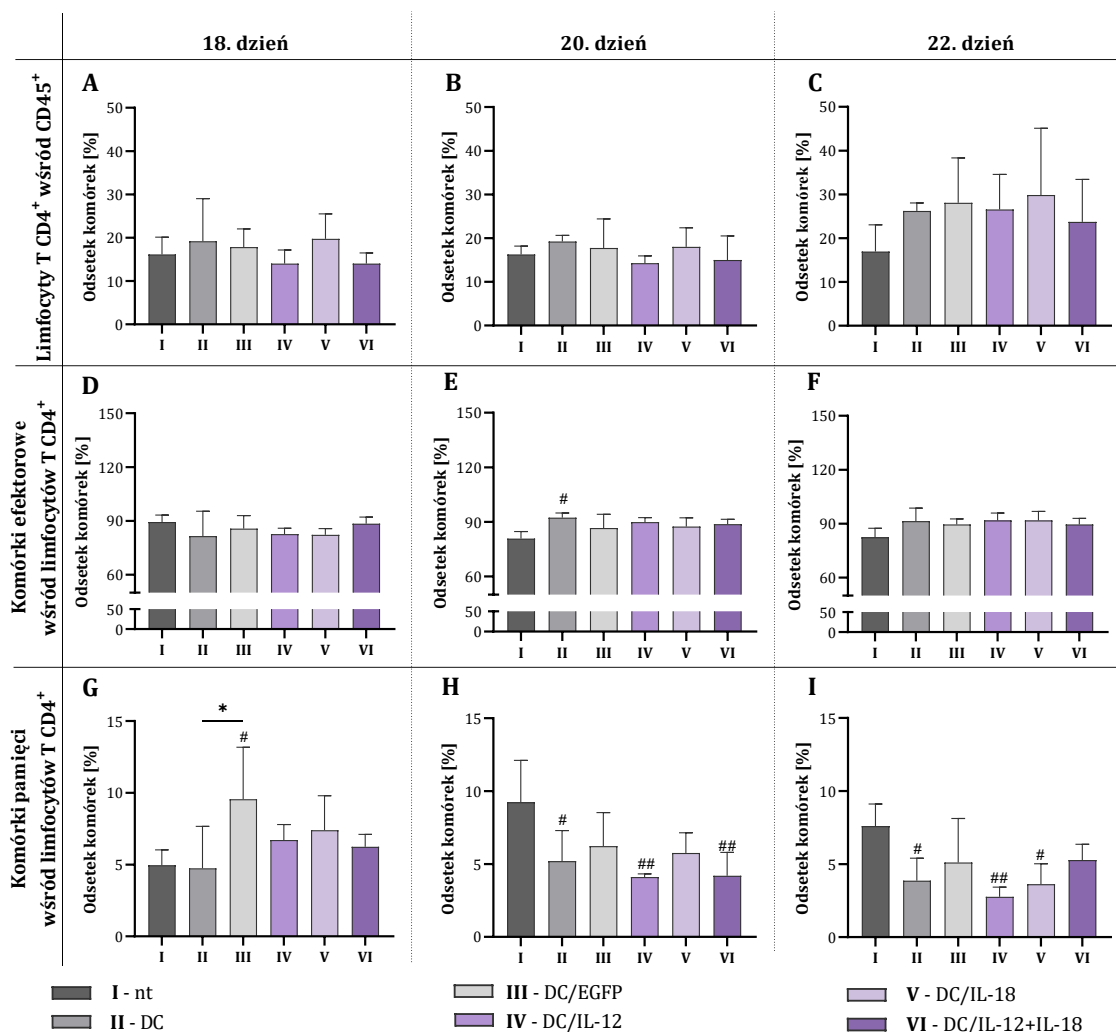
Ryc. 17. Odsetek leukocytów naciekających tkankę nowotworową w wyniku jednokrotnego podania komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin.

Guzy pobierano od myszy w 18. (A), 20. (B) i 22. (C) dniu doświadczenia. W pierwszym etapie wieloparametrowej analizy cytometrycznej tkanki nowotworowej MC38 wyodrębniono żywe leukocyty ($DAPI^{neg}CD45^+$) (A, B, C). Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$. *nt* – grupa kontrolna nietraktowana

Niezależnie od rodzaju komórek szczepionkowych, ich podanie wywołało niewielkie zmiany odsetka limfocytów T $CD4^+$ naciekających tkankę nowotworową w 18. i 20. dniu doświadczenia (Ryc. 18. A, B). Natomiast 22. dnia (7. dnia po zastosowaniu DC), stwierdzono wzrost nacieku tych limfocytów, a ich najwyższy odsetek odnotowano w grupie myszy traktowanych DC/IL-18 (Ryc. 18. C).

Ocena poziomu ekspresji cząsteczek CD44 i CD62L na powierzchni limfocytów T $CD4^+$ po podaniu szczepionek, wykazała wysoki odsetek komórek efektorowych wynoszący około 90% we wszystkich dniach obserwacji. Wielkość populacji tych komórek w większości grup badanych utrzymywała się na podobnym poziomie, jedynie w grupie nietraktowanej stopniowo się obniżała

(Ryc. 18. D, E, F), a w 20. dniu doświadczenia w odniesieniu do myszy otrzymujących DC/EGFP, zmiana ta okazała się statystycznie istotna (Ryc. 18. E).



Ryc. 18. Odsetek limfocytów T CD4⁺ naciekających tkankę nowotworową w wyniku jednokrotnego podania komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin.

Guzy pobierano od myszy w 18. (A, D, G), 20. (B, E, H) i 22. (C, F, I) dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej, wśród komórek limfoidalnych naciekających tkankę nowotworową wyodrębniono populację limfocytów T CD4⁺ oraz oznaczono ekspresję cząsteczek CD62L i CD44 na ich powierzchni. Określono odsetek limfocytów T CD4⁺ wśród leukocytów CD45⁺ (A, B, C) oraz odsetek komórek efektorowych (CD44⁺CD62L^{neg}) (D, E, F) i komórek pamięci (CD44⁺CD62L⁺) (G, H, I) wśród limfocytów T CD4⁺. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa (E) i testu *post hoc* Dunn'a lub parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (G, H, I). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których p < 0,05 (# - p < 0,05; ## - p < 0,01 względem grupy nt, * - p < 0,05 pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

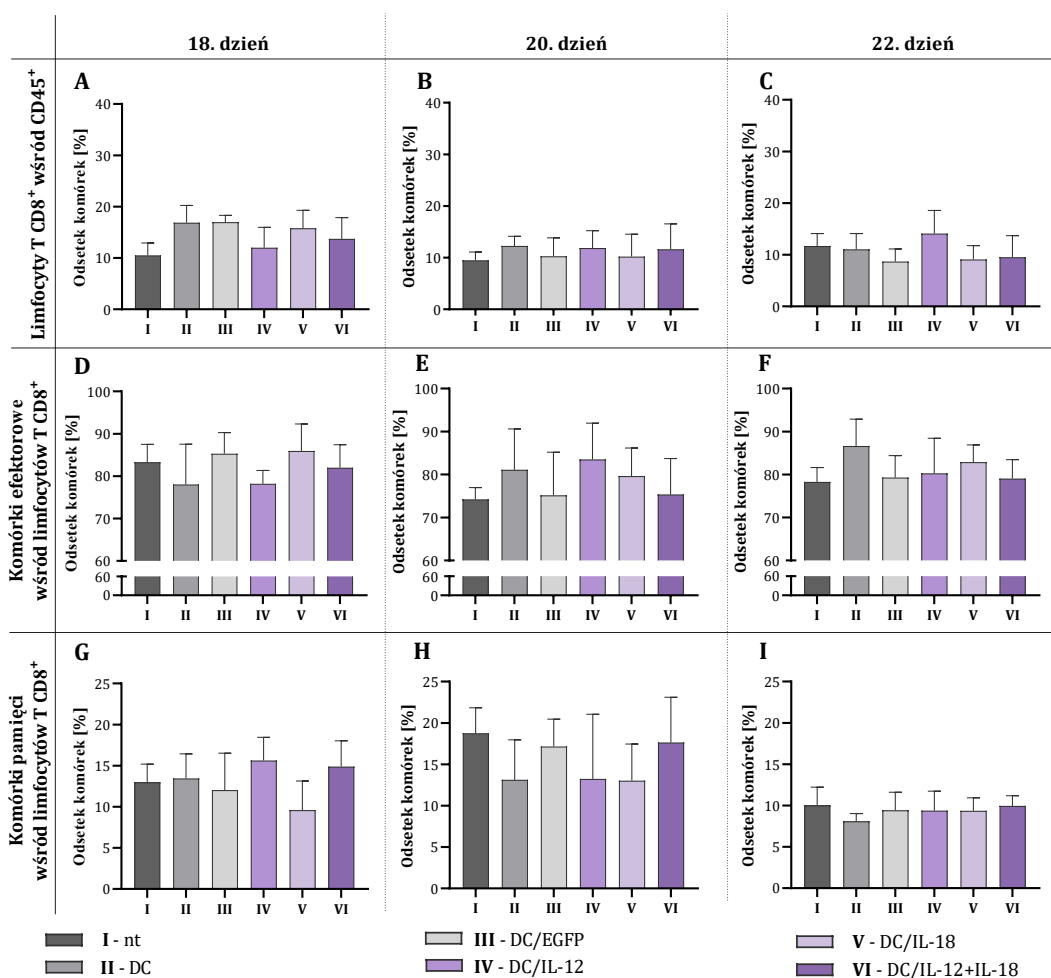
Największe zróżnicowanie w odsetku limfocytów T CD4⁺ naciekających tkankę nowotworową wykazano w przypadku komórek pamięci, a zmiany istotne statystycznie odnotowano głównie w porównaniu do grupy nietraktowanej. W 18. dniu doświadczenia znaczący wzrost odsetka tych komórek oznaczono po podaniu DC/EGFP (Ryc. 18. G), a w 20. i 22. dniu

doświadczenia stwierdzono istotne statystycznie obniżenie udziału procentowego komórek CD44⁺CD62L⁺ w grupach myszy, które otrzymywały odpowiednio DC, DC/IL-12 lub DC/IL-12+IL-18 (Ryc. 18. H), jak również DC, DC/IL-12 lub DC/IL-18 (Ryc. 18. I).

Wśród leukocytów naciekających tkankę nowotworową pobraną od myszy doświadczalnych oceniono także zmiany wielkości populacji limfocytów T CD8⁺ (Ryc. 19). W 18. dniu doświadczenia w tkance guzów otrzymanych od myszy traktowanych szczepionkami komórkowymi odnotowano wzrost odsetka limfocytów T CD8⁺ w porównaniu do guzów pobranych od myszy nietraktowanych, a najwyższy odsetek tych komórek wykazano w grupie myszy otrzymujących DC, DC/EGFP lub DC/IL-18 (Ryc. 19. A). W dniu kolejnego pobrania (20. dzień doświadczenia), we wszystkich grupach otrzymujących szczepionki komórkowe odsetek limfocytów T CD8⁺ wciąż utrzymywał się na wyższym poziomie w porównaniu do grupy nietraktowanej. Różnice odnotowane między grupami były jednak nieznaczne i dotyczyły guzów pobranych od myszy traktowanych DC, DC/IL-12 lub DC/IL-12+IL-18 (Ryc. 19. B). W 22. dniu doświadczenia zwiększony odsetek limfocytów T CD8⁺ utrzymał się jedynie po podaniu DC/IL-12 (Ryc. 19. C).

W przypadku komórek efektorowych, w 18. dniu doświadczenia, stwierdzono zwiększenie ich odsetka wśród limfocytów T CD8⁺ po podaniu DC/EGFP lub DC/IL-18 w porównaniu do myszy nietraktowanych (Ryc. 19. D), jednak zmiany te nie były istotne statystycznie. Tymczasem w 20. i 22. dniu doświadczenia wzrost odsetka komórek CD44⁺CD62L^{neg} odnotowano we wszystkich grupach otrzymujących szczepionki, a najwyższy udział procentowy tych komórek wykazano odpowiednio po podaniu DC/IL-12 (Ryc. 19. E) lub DC/EGFP (Ryc. 19. F).

Nie wykazano istotnych statystycznie zmian w wielkości populacji komórek pamięci, mimo to stwierdzono znaczne zróżnicowanie odsetka tych komórek zależne od rodzaju podanej szczepionki i długości obserwacji. W 18. dniu doświadczenia, podanie nietransdukowanych DC, DC/IL-12 lub DC/IL-12+IL-18 w odniesieniu do grupy nieleczonej wywołało wzrost udziału procentowego komórek CD44⁺CD62L⁺ (Ryc. 19. G). Natomiast dwa dni później, w tkance nowotworowej uzyskanej od myszy nietraktowanych, traktowanych DC/EGFP, ale też DC/IL-12+IL-18 odnotowano zwiększenie nacieku tych komórek wśród limfocytów T CD8⁺ (Ryc. 19. H). Znaczne obniżenie odsetka komórek pamięci odnotowano natomiast w 22. dniu doświadczenia we wszystkich grupach, a szczególnie w guzach myszy, które otrzymały nietransdukowane DC (Ryc. 19. I).



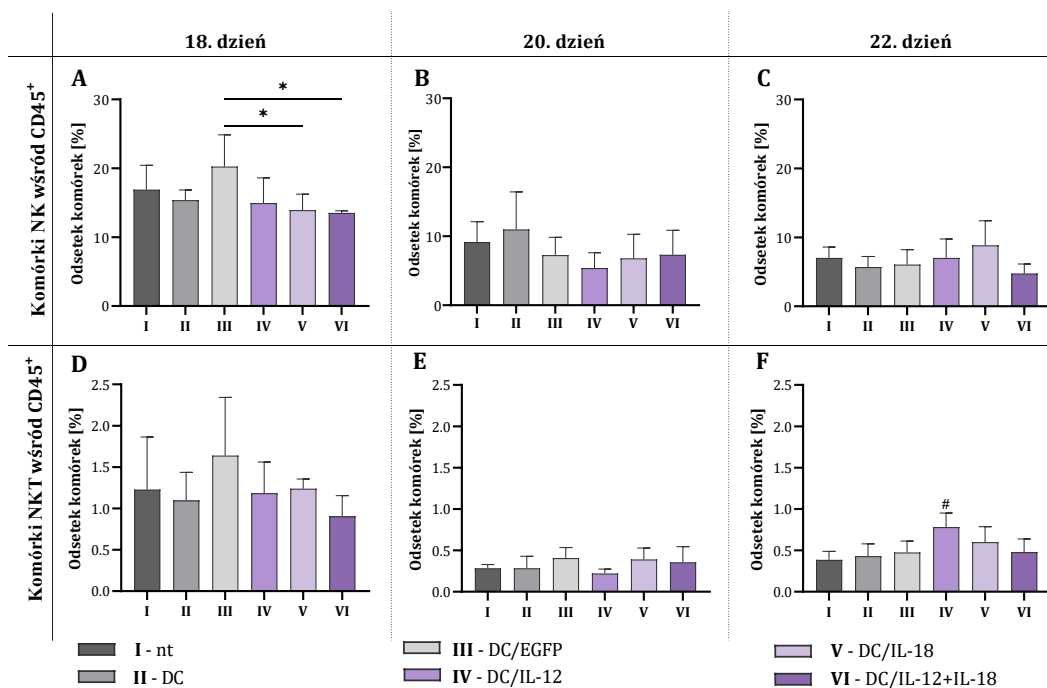
Ryc. 19. Odsetek limfocytów T CD8⁺ naciekających tkankę nowotworową w wyniku jednokrotnego podania komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin.

Guzy pobierano od myszy w 18. (A, D, G), 20. (B, E, H) i 22. (C, F, I) dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej, wśród komórek limfoidalnych naciekających tkankę nowotworową wyodrębniono populację limfocytów T CD8⁺ oraz oznaczono ekspresję cząsteczek CD62L i CD44 na powierzchni tych komórek. Określono odsetek limfocytów T CD8⁺ wśród leukocytów CD45⁺ (A, B, C) oraz odsetek komórek efektorowych (CD44⁺CD62L^{neg}) (D, E, F) i komórek pamięci (CD44⁺CD62L⁺) (G, H, I) wśród limfocytów T CD8⁺. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$. *nt* – grupa kontrolna nietraktowana

Znaczną część populacji komórek limfoidalnych w tkance nowotworowej stanowiły komórki NK (Ryc. 20. A, B, C), a ich odsetek stopniowo obniżał się w trakcie trwania doświadczenia. W dniu pierwszego pobrania, wykazano istotne statystycznie zmiany odsetka tych komórek pomiędzy grupami myszy traktowanych DC/EGFP, DC/IL-18/TA_g lub DC/IL-12+IL-18/TA_g (Ryc. 20. A). W 20. i 22. dniu doświadczenia, wielkość populacji komórek NK uległa dwukrotnemu obniżeniu we wszystkich grupach badanych i nie odnotowano istotnych zmian odsetka tych komórek zależnych od rodzaju zastosowanej szczepionki (Ryc. 20. B, C).

Populacja komórek NKT, stanowiła jedynie około 0,5-1% wśród leukocytów naciekających tkankę guzów MC38 (Ryc. 20. D, E, F). W 18. dniu doświadczenia, odnotowano wzrost odsetka

tych komórek po podaniu DC/EGFP w odniesieniu do pozostałych grup (Ryc. 20. D). Po kolejnych dwóch dniach obserwacji odsetek komórek NKT obniżył się we wszystkich grupach badanych niemal 3-krotnie, a najbardziej po podaniu szczepionki DC/IL-12 (Ryc. 20. E). Z drugiej strony, w 22. dniu jedynie w tej grupie wykazano znaczący wzrost odsetka komórek NKT, w porównaniu do kontroli nietraktowanej (Ryc. 20. F).

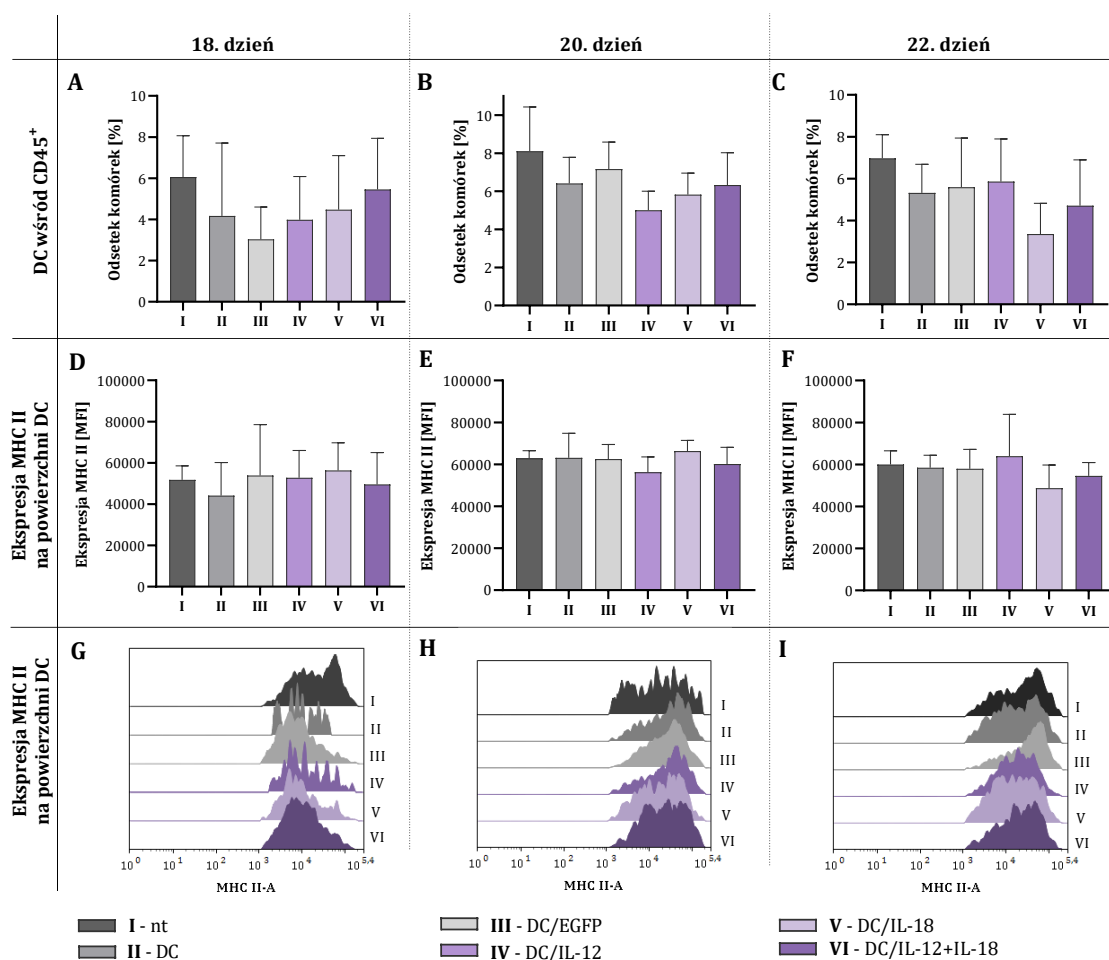


Ryc. 20. Odsetek komórek NK i NKT naciekających tkankę nowotworową w wyniku jednokrotnego podania komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin.

Guzy pobierano od myszy w 18. (A, D), 20. (B, E) i 22. (C, F) dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej, wśród komórek limfoidalnych naciekających tkankę nowotworową wyodrębniono populację komórek NK ($NK1.1^+CD4^{neg}CD8^{neg}$) oraz NKT ($NK1.1^+CD4^+$; $NK1.1^+CD8^+$). Określono odsetek komórek NK (A, B, C) oraz NKT (D, E, F) wśród leukocytów $CD45^+$. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunn'a (F) lub parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$ względem grupy nt, * - $p < 0,05$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

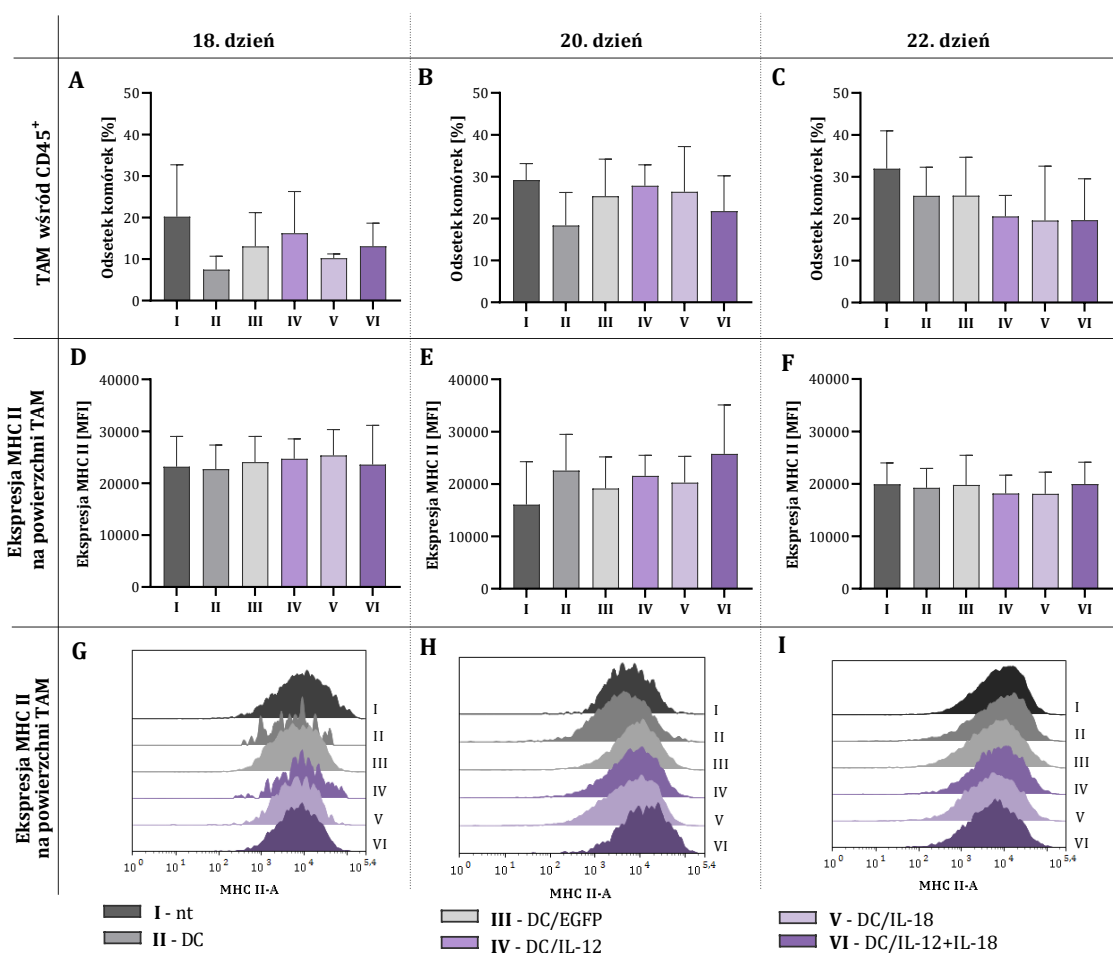
Odsetek komórek dendrytycznych w tkance nowotworowej pobranej od myszy nietraktowanych wynosił około 6% i był najwyższy spośród wszystkich badanych grup, a także nie zmieniał się w kolejnych dniach obserwacji (Ryc. 21). Zastosowanie szczepionek w różnym stopniu wpłynęło na wielkość badanej populacji i tak w 18. dniu doświadczenia obniżeniu uległ odsetek DC w tkance guzów myszy traktowanych DC/EGFP (Ryc. 21. A), a w 20. dniu po podaniu DC/IL-12 (Ryc. 21. B). Natomiast zastosowanie szczepionki zawierającej DC/IL-18 wpłynęło na zmniejszenie odsetka DC w tkance guzów uzyskanej w 22. dniu (Ryc. 21. C). Tak więc, wielkość populacji DC w tkance nowotworowej zmieniała się w zależności od rodzaju szczepionki oraz czasu po jej okołoguzowym podaniu.

Z drugiej strony, nie odnotowano istotnego wpływu zastosowanych szczepionek na zmiany ekspresji cząsteczek MHC II na powierzchni DC uzyskanych z tkanki guzów, a zatem i stopnia aktywacji tych komórek. Zaobserwowano niewielkie obniżenie poziomu ekspresji MHC II na powierzchni DC obecnych w tkance guzów w 18. dniu doświadczenia po podaniu DC/EGFP (Ryc. 21. D, G), w 20. dniu po zastosowaniu DC/IL-12 (Ryc. 21. E, H) oraz w 22. dniu doświadczenia po podaniu DC/IL-18 (Ryc. 21. F, I).



Ryc. 21. Odsetek i stopień aktywacji komórek dendrytycznych naciekających tkankę nowotworową w wyniku jednokrotnego podania komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin.

Guzy pobierano od myszy w 18. (A, D, G), 20. (B, E, H) i 22. (C, F, I) dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej, wśród komórek mieloidalnych naciekających tkankę nowotworową wyodrębniono populację komórek dendrytycznych (DC, $CD11c^+F4/80^{int}MHCII^+$) oraz określono poziom ekspresji cząsteczek MHC II na ich powierzchni. Określono odsetek komórek DC (A, B, C) wśród leukocytów $CD45^+$ oraz poziom ekspresji MHC II na ich powierzchni (D, E, F, G, H, I). Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$. *nt* – grupa kontrolna nietraktowana



Ryc. 22. Odsetek i stopień pobudzenia makrofagów związanych z nowotworem (TAM) w guzach MC38 po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin.

Guzy pobierano od myszy w 18. (A, D, G), 20. (B, E, H) i 22. (C, F, I) dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej, wśród komórek mieloidalnych naciekających tkankę nowotworową wyodrębniono populację makrofagów związanych z nowotworem (TAM, CD11c⁺F4/80⁺) oraz oceniano poziom ekspresji cząsteczek MHC II na ich powierzchni. Określono odsetek TAM (A, B, C) wśród leukocytów CD45⁺ oraz stopień ich pobudzenia (D, E, F, G, H, I). Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$. *nt* – grupa kontrolna nietraktowana

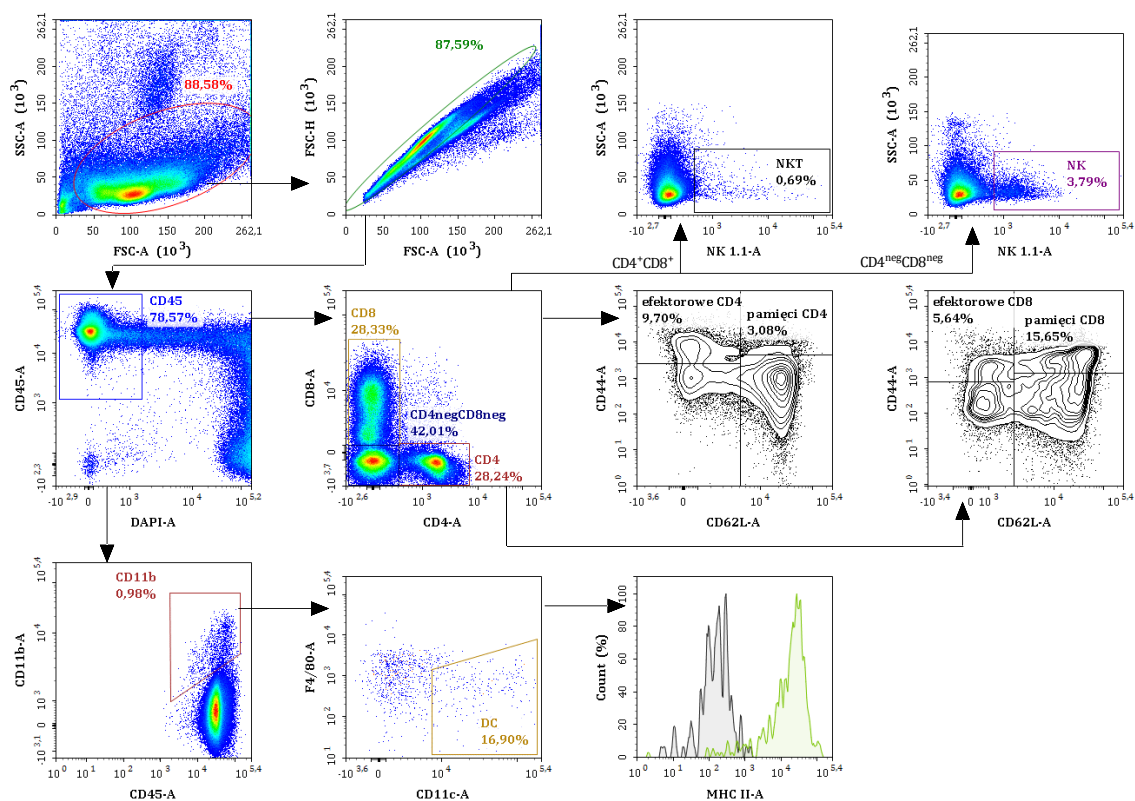
Kolejną niezwykle istotną populacją komórek mieloidalnych oznaczaną w tkance nowotworowej pobranej od myszy doświadczalnych były makrofagi związane z nowotworem (TAM), których odsetek w grupie myszy nietraktowanych wynosił 20-32 % i wzrastał wraz z rozwojem nowotworu (Ryc. 22). Podobnie jak w przypadku zróżnicowania wielkości populacji DC, naciek TAM do tkanki guzów zależał od rodzaju podanej szczepionki. W 18. i 20. dniu doświadczenia największy wpływ na obniżenie odsetka tych makrofagów miało podanie nietransdukowanych DC, w porównaniu do grupy nietraktowanej (Ryc. 22. A, B). Natomiast w 22. dniu najniższy odsetek TAM odnotowano w tkance nowotworowej pobranej od myszy traktowanych komórkami dendrytycznymi transdukowanymi do produkcji cytokin (Ryc. 22. C).

Z drugiej strony, jednokrotne podanie szczepionek, nie wpłynęło znacząco na zmiany w ekspresji cząsteczek MHC II na powierzchni TAM. W 18. dniu doświadczenia, najwyższy poziom ekspresji MHC II na powierzchni tych komórek wykazano po podaniu DC/IL-18 (Ryc. 22. D, G), natomiast w dniu drugiego pobrania - po zastosowaniu DC/IL-12+IL-18 (Ryc. 22. E, H), jednak w 22. dniu doświadczenia, nie odnotowano różnic w ekspresji cząsteczek MHC II na powierzchni TAM (Ryc. 22. F, I).

Podsumowując wyniki oceny skuteczności z jaką DC transdukowane do produkcji cytokin indukowały odpowiedź przeciwnowotworową można stwierdzić, że jednokrotne podanie tych komórek nie miało istotnego wpływu na zmiany wielkości populacji leukocytów naciekających guzy po 3, 5 i 7 dniach po zastosowaniu szczepionek. Zaobserwowano jedynie niewielkie zmiany stopnia pobudzenia limfocytów T CD4⁺ po 5 dniach, a zróżnicowanie ich odsetka odnotowano dopiero w 7. dniu. Podobne obserwacje wykazano w przypadku limfocytów T CD8⁺. Podanie szczepionek nie wpłynęło na zmiany odsetka limfocytów T CD8⁺ w ciągu 7 dni obserwacji. Wykazano jedynie niewielkie różnice w stopniu pobudzenia tych komórek 5. i 7. dnia. Udział procentowy komórek NK i NKT w tkance nowotworowej stopniowo obniżał się we wszystkich grupach badanych w trakcie trwania doświadczenia, natomiast wpływ podania DC transdukowanych do produkcji cytokin na zmiany odsetka populacji tych komórek widoczny był dopiero w 7. dniu. Zmiany wielkości populacji DC i TAM, także obserwowano dopiero w 7. dniu, przy czym w czasie trwania doświadczenia nie wykazano różnic w stopniu pobudzenia tych komórek.

4.2.2.2. Analiza zmian odsetka komórek limfoidalnych i mieloidalnych w wartowniczych węzłach chłonnych

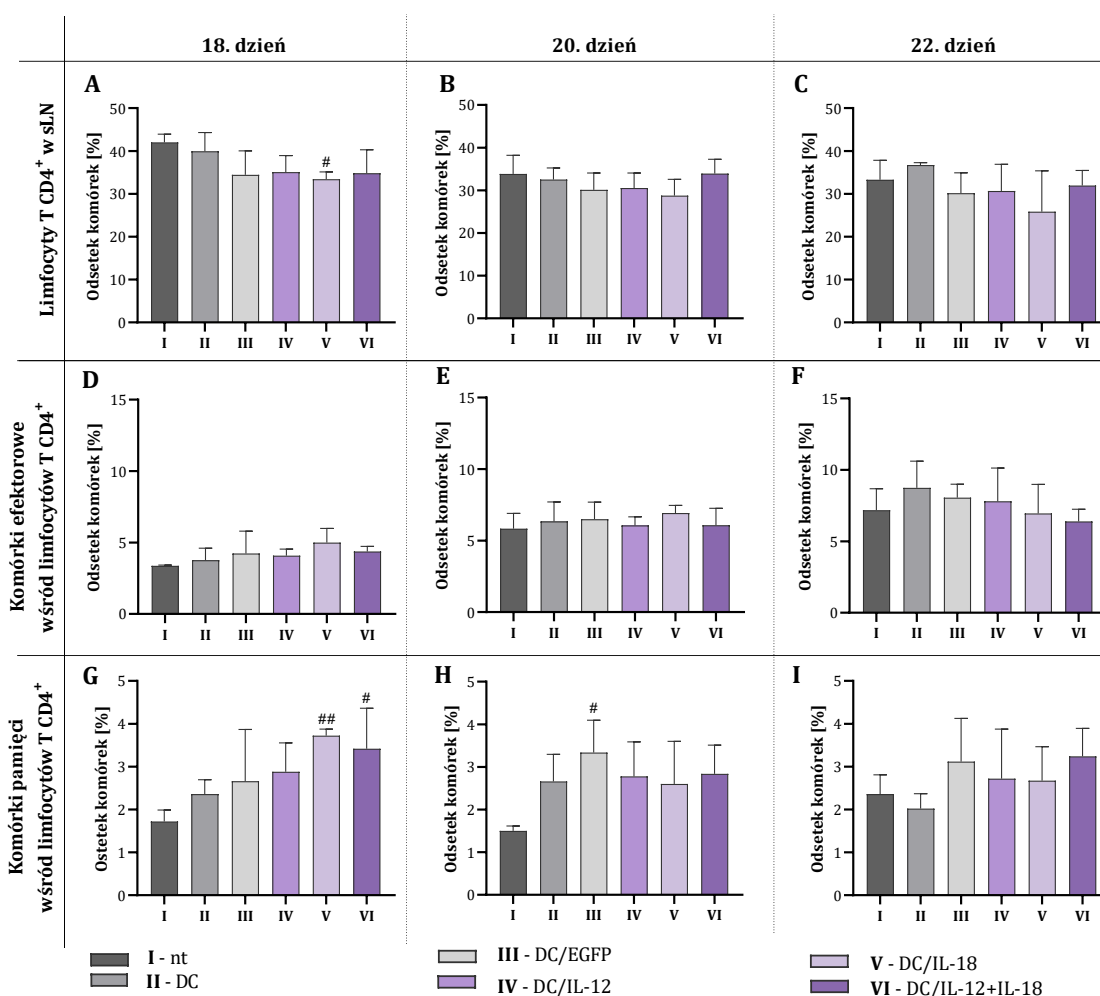
W celu określenia wpływu **jednokrotnego** podania komórek dendrytycznych transdukowanych do produkcji IL-12 i/lub IL-18 na indukowanie odpowiedzi odpornościowej w wartowniczych węzłach chłonnych wyodrębniono populacje komórek limfoidalnych i mieloidalnych, w tym określono odsetek limfocytów T CD4⁺, limfocytów T CD8⁺, komórek NK i NKT oraz komórek dendrytycznych (Ryc. 23). Ponadto oszacowano odsetek komórek efektorowych i komórek pamięci wśród limfocytów T CD4⁺ i limfocytów T CD8⁺, a także poziom ekspresji cząsteczek MHC II na powierzchni DC.



Ryc. 23. Schemat analizy populacji komórek mieloidalnych i limfoidalnych w wartowniczych węzłach chłonnych pobranych od myszy po jednokrotnym podaniu szczepionek.

Po wyeliminowaniu debris oraz zlepów komórkowych, w analizowanych wartowniczych węzłach chłonnych wyodrębniono żywe leukocyty ($\text{DAPI}^{\text{neg}}\text{CD45}^+$). Podczas analizy komórek limfoidalnych, wśród komórek $\text{DAPI}^{\text{neg}}\text{CD45}^+$ zidentyfikowano limfocyty T CD4^+ oraz T CD8^+ . Następnie, wśród populacji komórek CD4^+ lub CD8^+ wyodrębniono komórki NKT ($\text{NK1.1}^+\text{CD4}^+$; $\text{NK1.1}^+\text{CD8}^+$), a wśród populacji komórek $\text{CD4}^{\text{neg}}\text{CD8}^{\text{neg}}$, komórki NK ($\text{NK1.1}^+\text{CD4}^{\text{neg}}\text{CD8}^{\text{neg}}$). Ponadto wśród limfocytów T CD4^+ i CD8^+ wyodrębniono komórki efektorowe ($\text{CD44}^+\text{CD62L}^{\text{neg}}$) i komórki pamięci ($\text{CD44}^+\text{CD62L}^+$) na podstawie ekspresji markerów CD44 i CD62L . Podczas analizy komórek mieloidalnych wśród komórek $\text{DAPI}^{\text{neg}}\text{CD45}^+$ zidentyfikowano komórki mieloidalne CD11b^+ , a wśród nich wyodrębniono populację DC ($\text{CD11c}^+\text{F4/80}^{\text{int}}$). Dodatkowo, określono poziom ekspresji cząsteczek MHC II na powierzchni DC (kontrola izotypowa – czarny histogram, ekspresja MHC II na DC – zielony histogram). Na rycinie przedstawiono reprezentatywną analizę wartowniczych węzłów chłonnych pobranych w 20. dniu doświadczenia od myszy traktowanej DC/TAG.

W wartowniczych węzłach chłonnych pobranych od myszy nietraktowanych, limfocyty T CD4^+ stanowiły 41% populacji leukocytów w 18. dniu doświadczenia (Ryc. 24. A), a w kolejnych dniach wielkość tej populacji nieznacznie się obniżyła (Ryc. 24. B, C). Podanie szczepionek spowodowało obniżenie odsetka limfocytów T CD4^+ w sLN pobranych od myszy w 18. dniu doświadczenia, lecz jedynie po podaniu DC/IL-18 było ono istotne statystycznie (Ryc. 24. A). W 20. dniu doświadczenia odsetek limfocytów T CD4^+ w sLN utrzymywał się na niższym poziomie niż w grupie nietraktowanej (Ryc. 24. B). Wyjątek stanowiła grupa myszy otrzymująca DC/IL-12+IL-18, w której wielkość populacji tych limfocytów okazała się podobna do grupy nieleczonej. Natomiast w 22. dniu, odsetek limfocytów T CD4^+ w sLN był bardziej zróżnicowany, mimo to najniższy odsetek tych komórek stwierdzono po podaniu DC/IL-18 (Ryc. 24. C).



Ryc. 24. Odsetek limfocytów T CD4⁺ w wartowniczych węzłach chłonnych po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin.

Wartownicze węzły chłonne pobierano od myszy w 18. (A, D, G), 20. (B, E, H) i 22. (C, F, I) dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej sLN wyodrębniono populację limfocytów T CD4⁺ oraz oznaczono ekspresję cząsteczek CD62L i CD44 na powierzchni tych komórek. Określono odsetek limfocytów T CD4⁺ wśród leukocytów CD45⁺ (A, B, C) oraz odsetek komórek efektorowych (CD44⁺CD62L^{neg}) (D, E, F) i komórek pamięci (CD44⁺CD62L⁺) (G, H, I) wśród limfocytów T CD4⁺. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallis (H) i testu *post hoc* Dunn'a lub parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A, G). Za istotnie statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$ względem grupy nt). nt – grupa kontrolna nietraktowana

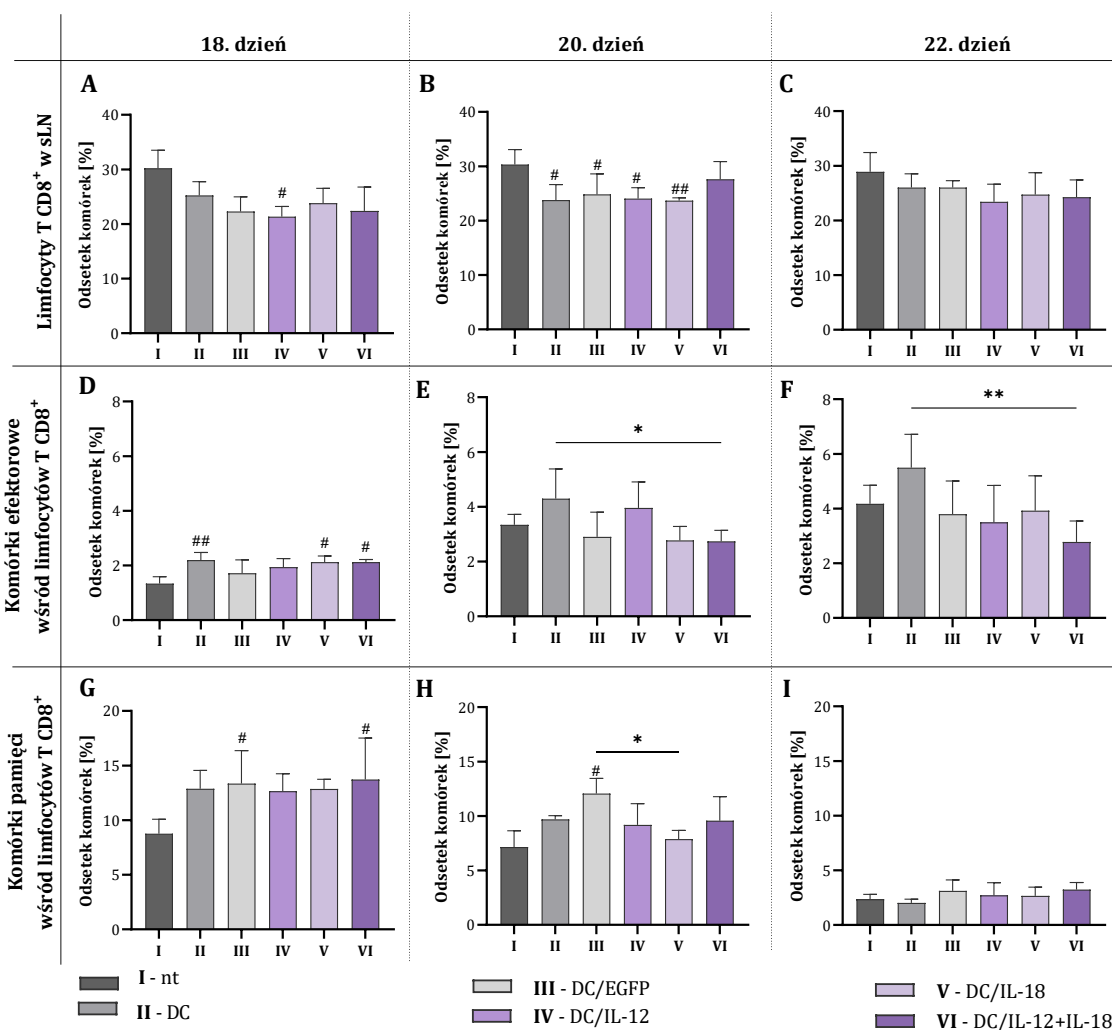
Podanie komórek dendrytycznych miało wpływ na zwiększenie w sLN odsetka limfocytów T CD4⁺ efektorowych w porównaniu do grupy myszy nietraktowanych. W 18. i 20. dniu doświadczenia, najwyższy odsetek tych komórek wykazano po podaniu DC/IL-18 (Ryc. 24. D, E), a w 22. dniu - po podaniu DC, DC/EGFP lub DC/IL-12 (Ryc. 24. F).

W 18. dniu doświadczenia zaobserwowano wzrost odsetka komórek pamięci wśród limfocytów T CD4⁺ we wszystkich grupach otrzymujących szczepionki na bazie DC (Ryc. 24. G). Co więcej, po podaniu DC/IL-18 lub DC/IL-12+IL-18 zmiana ta była istotna statystycznie w porównaniu do grupy kontrolnej. W sLN uzyskanych od traktowanych myszy w kolejnym dniu

pobrania wielkość ocenianej populacji limfocytów wciąż była wyższa niż w grupie kontrolnej (Ryc. 24. H), lecz jedynie różnica między grupą DC/EGFP, a grupą nietraktowaną okazała się statystycznie istotna. W 22. dniu doświadczenia, 7 dni po zastosowaniu transdukowanych DC, odsetek komórek pamięci wśród limfocytów T CD4⁺ utrzymał się na tym samym poziomie, jednak zmiany te nie były istotne statystycznie (Ryc. 24. I).

W wartowniczych węzłach chłonnych pobranych od myszy nietraktowanych, limfocyty T CD8⁺ stanowiły 30% populacji leukocytów (Ryc. 25.). Podanie komórek szczepionkowych spowodowało zmniejszenie wielkości populacji limfocytów T CD8⁺ w sLN we wszystkich grupach myszy otrzymujących szczepionki komórkowe, a stwierdzone zmiany odsetka tych komórek utrzymywały się w kolejnych dniach obserwacji (Ryc. 25. A, B, C). Najniższy odsetek limfocytów T CD8⁺ odnotowano w 18. dniu doświadczenia w sLN pobranych od myszy traktowanych DC/IL-12 i zmiana ta była istotna statystycznie w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 25. A). Tymczasem w 20. dniu doświadczenia we wszystkich grupach otrzymujących szczepionki komórkowe, z wyjątkiem DC/IL-12+IL-18, wykazano istotne statystycznie obniżenie odsetka komórek T CD8⁺ (Ryc. 25. B), a w dniu ostatniego pobrania najniższy odsetek tych komórek odnotowano po podaniu DC/IL-12. Jednak w tym dniu obserwowane zmiany nie były statystycznie istotne (Ryc. 25. C).

Zastosowanie szczepionek wpłynęło na zwiększenie odsetka komórek efektorowych wśród limfocytów T CD8⁺ w sLN w 18. dniu doświadczenia (Ryc. 25. D). Istotny statystycznie wzrost tego odsetka w porównaniu do grupy nietraktowanej odnotowano po podaniu nietransdukowanych DC, DC/IL-18 lub DC/IL-12+IL-18. W sLN pobranych w 20. dniu, stwierdzono niemal dwukrotne zwiększenie odsetka komórek efektorowych w porównaniu do zaobserwowanego dwa dni wcześniej. W narządach myszy traktowanych DC lub DC/IL-12 wykazano dalsze zwiększenie tego odsetka, w porównaniu do grupy nietraktowanej. Z drugiej strony, w pozostałych grupach wielkość populacji limfocytów T CD8⁺ efektorowych wzrastała wolniej niż w kontroli, a zmiany nie były istotne statystycznie (Ryc. 25. E). Natomiast w 22. dniu doświadczenia, zwiększony odsetek komórek efektorowych wśród limfocytów T CD8⁺ odnotowano jedynie po podaniu nietransdukowanych DC (Ryc. 25. F).



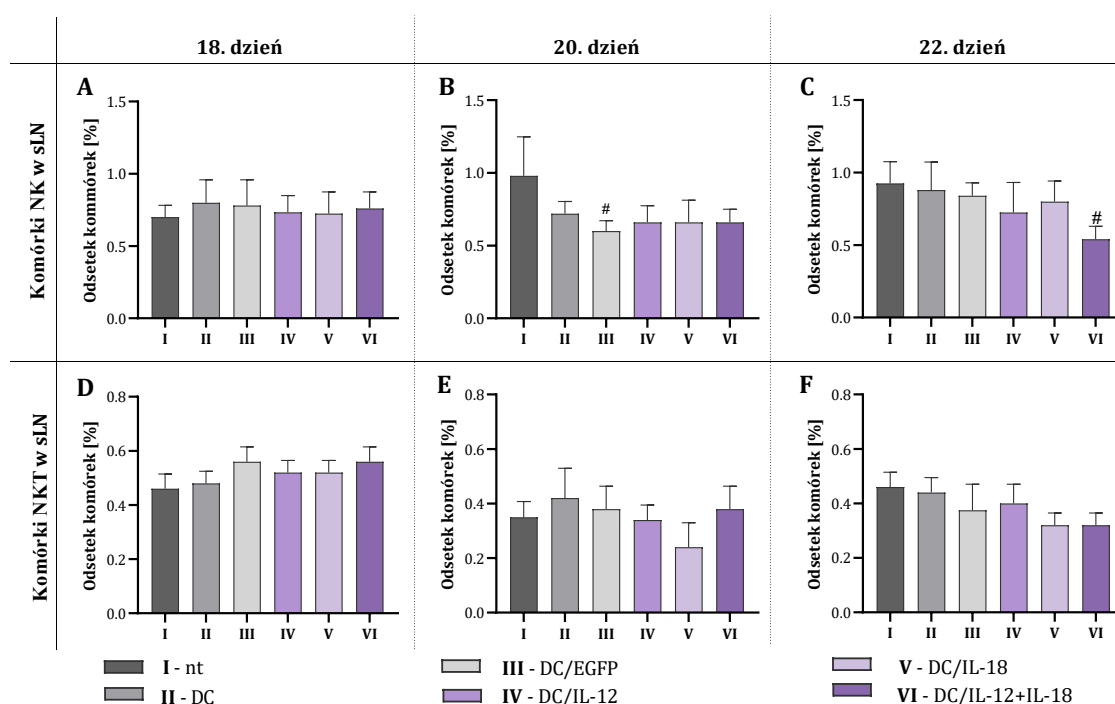
Ryc. 25. Odsetek limfocytów T CD8⁺ w wartowniczych węzłach chłonnych po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin.

Wartownicze węzły chłonne pobierano od myszy w 18. (A, D, G), 20. (B, E, H) i 22. (C, F, I) dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej sLN wyodrębniono populację limfocytów T CD8⁺ oraz oznaczono ekspresję cząsteczek CD62L i CD44 na powierzchni tych komórek. Określono odsetek limfocytów T CD8⁺ wśród leukocytów CD45⁺ (A, B, C) oraz odsetek komórek efektorowych (CD44⁺CD62L^{neg}) (D, E, F) i komórek pamięci (CD44⁺CD62L⁺) (G, H, I) wśród limfocytów T CD8⁺. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallis (A, H) i testu *post hoc* Dunn'a lub parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (B, D, E, F, G). Za istotnie statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$ względem grupy nt, ** - $p < 0,01$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Zupełnie inaczej rozłożyły się zmiany w wielkości populacji komórek pamięci T CD8⁺ w sLN pobranych od myszy otrzymujących szczepionki komórkowe w porównaniu do myszy nietraktowanych. W 18. dniu doświadczenia, istotnie statystycznie zmiany odsetka tych komórek odnotowano po podaniu DC/EGFP lub DC/IL-12+IL-18 (Ryc. 25. G). W kolejnym dniu pobrania, zwiększony odsetek komórek pamięci utrzymywał się we wszystkich grupach, którym podano komórki szczepionkowe, jednak wartość odsetka tych komórek była zróżnicowana pomiędzy grupami i okazała się istotna statystycznie jedynie w przypadku porównania grupy DC/EGFP

i grupy nietraktowanej (Ryc. 25. H). W 22. dniu doświadczenia odsetek limfocytów T CD8⁺ pamięci obniżył się we wszystkich grupach, w porównaniu do wcześniejszych dni obserwacji nie wykazując istotnych zmian zależnych od rodzaju zastosowanej szczepionki (Ryc. 25. I).

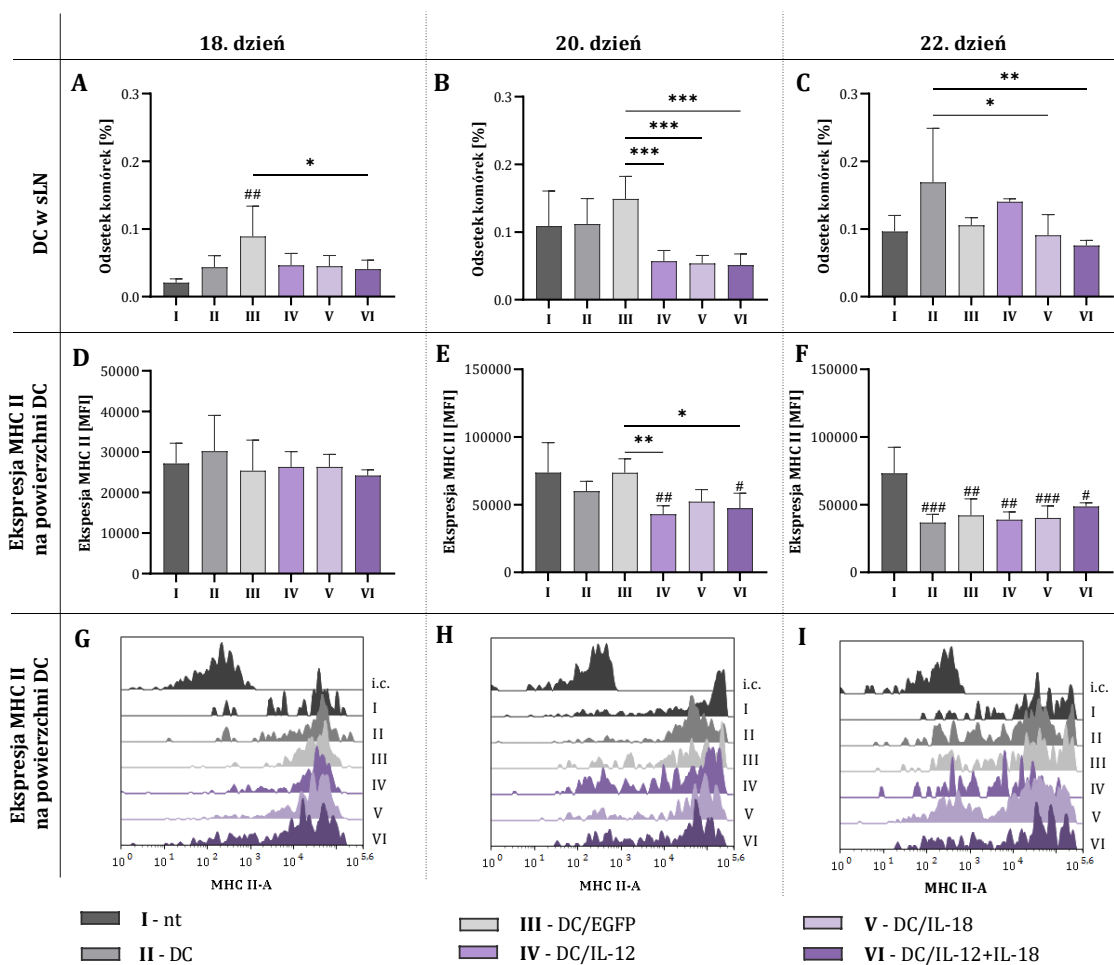
Komórki NK wyizolowane z sLN pobranych od myszy nietraktowanych stanowiły jedynie około 0,75-1% (Ryc. 26. A, B, C). W 18. dniu doświadczenia odnotowano niewielki wzrost odsetka tych komórek po podaniu DC (Ryc. 26. A). Tymczasem w dniu kolejnego pobrania odsetek ten uległ obniżeniu w sLN uzyskanych od myszy traktowanych, lecz statystycznie istotna zmiana została wykazana jedynie po podaniu DC/EGFP (Ryc. 26. B). Największe zróżnicowanie wielkości populacji komórek NK wśród wszystkich grup traktowanych stwierdzono w ostatnim dniu obserwacji w porównaniu do grupy nietraktowanej, jednak istotne statystycznie obniżenie odsetka tych komórek wykazano po podaniu DC/IL-12+IL-18 (Ryc. 26. C).



Ryc. 26. Odsetek komórek NK i NKT w wartowniczych węzłach chłonnych po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin.

Wartownicze węzły chłonne pobierano od myszy w 18. (A, D), 20. (B, E) i 22. (C, F) dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej sLN wyodrębniono populacje komórek NK (CD4^{neg}CD8^{neg}NK1.1⁺) oraz NKT (NK1.1⁺CD4⁺; NK1.1⁺CD8⁺). Określono odsetek komórek NK (A, B, C) oraz NKT (D, E, F) wśród leukocytów CD45⁺. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa (B, C) i testu *post hoc* Dunn'a. Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$ względem grupy nt).
nt – grupa kontrolna nietraktowana

Komórki NKT stanowią najmniejszą z oznaczanych populacji komórek limfoidalnych w wartowniczych węzłach chłonnych i ich odsetek u myszy nietraktowanych wynosił około 0,4% (Ryc. 26. D, E, F). W porównaniu do grupy nietraktowanej, podanie komórek szczepionkowych spowodowało nieistotny statystycznie wzrost odsetka komórek NKT w dniu pierwszego pobrania (Ryc. 26. D). W 20. dniu wielkość populacji NKT obniżyła się we wszystkich grupach, a jej najniższa wartość została odnotowana po podaniu DC/IL-18 (Ryc. 26. E). W 22. dniu doświadczenia, odsetek komórek NKT był najniższy po podaniu DC/IL-18 lub DC/IL-12+IL-18 (Ryc. 26. F). W obu przypadkach różnice między grupami nie były statystycznie istotne.



Ryc. 27. Ocena komórek dendrytycznych w wartowniczych węzłach chłonnych po jednokrotnym podaniu komórek szczepionkowych transdukowanych genami cytokin.

Wartownicze węzły chłonne pobierano od myszy w 18. (A, D, G), 20. (B, E, H) i 22. (C, F, I) dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej sLN wśród komórek DAPI^{neg}CD45⁺ zidentyfikowano komórki mieloidalne CD11b⁺, a wśród nich wyodrębniono populację komórek dendrytycznych (CD11c⁺F4/80^{int}), a także określono poziom ekspresji cząsteczek MHC II na powierzchni DC. Określono odsetek komórek DC (A, B, C) oraz średnią intensywność fluorescencji cząsteczek MHC II na powierzchni DC (D, E, F, G, H, I). Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Na histogramach przedstawiono dane z prób reprezentatywnych. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A, B, C, E, F). Za istotnie statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$ względem grupy nt, * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Wśród komórek wyizolowanych z wartowniczych węzłów chłonnych, komórki dendrytyczne stanowiły około 0,1% (Ryc. 27). Okołożuzowe podanie szczepionkowych komórek dendrytycznych wpłynęło na stopniowy i bardzo zróżnicowany wzrost odsetka DC w sLN. W 18. dniu doświadczenia, jedynie po podaniu DC/EGFP stwierdzono ponad 2-krotny oraz istotny statystycznie wzrost odsetka DC w sLN w porównaniu do grupy nietraktowanej (Ryc. 27. A). W 20. dniu odnotowano podobną tendencję, chociaż w grupach kontrolnych (nietraktowanej i po podaniu nietransdukowanych DC) udział procentowy DC w sLN zwiększył się, podczas gdy podanie komórek szczepionkowych wydzielających cytokiny zasadniczo nie wpłynęło na zmiany w wielkości tej populacji (Ryc. 27. B). W 22. dniu we wszystkich sLN pobranych od myszy traktowanych wzrosła wielkość populacji DC, najwyższy odsetek tych komórek wykazano w narządach myszy traktowanych nietransdukowanymi DC, a najniższy po podaniu DC/IL-12+IL-18 (Ryc. 27. C).

Obserwując wpływ cytokin produkowanych przez komórki szczepionkowe na zróżnicowanie odsetka komórek DC obecnych w sLN, na podstawie poziomu ekspresji cząsteczek MHC II na powierzchni tych komórek, określono stopień ich aktywacji. W 18. dniu doświadczenia, nie odnotowano zmian poziomu ekspresji MHC II na powierzchni DC (Ryc. 27. D). Natomiast w narządach pobranych od myszy w 20. dniu doświadczenia wykazano istotne statystycznie obniżenie ekspresji MHC II po podaniu DC/IL-12 lub DC/IL-12+IL-18 w porównaniu do kontroli nietraktowanej, jak i DC/EGFP (Ryc. 27. E). W dniu ostatniego pobrania, we wszystkich grupach otrzymujących szczepionki komórkowe, zaobserwowano istotne statystycznie zmniejszenie poziomu ekspresji MHC II na powierzchni DC (Ryc. 27. F).

Zatem już jednokrotne podanie szczepionek wpływało na kinetykę indukowania odpowiedzi przeciwnowotworowej w sLN. W 3. dniu po ich zastosowaniu stwierdzono obniżenie odsetka limfocytów T CD4⁺ oraz limfocytów T CD8⁺, które utrzymywało się w trakcie trwania doświadczenia. Zmniejszeniu wielkości tych populacji towarzyszyła niewielka aktywacja komórek T CD4⁺, wywołana podaniem transdukowanych DC, jednak jej poziom obniżał się w dniach kolejnych pobrań. Wykazano również obniżenie odsetka komórek NK i NKT, lecz dopiero 5. dnia po podaniu transdukowanych DC. Zmiany odsetka komórek DC w sLN obserwowano już po 3. dniach od iniekcji szczepionek. Jednak największy efekt ich podania na zróżnicowanie wielkości populacji DC w wartowniczych węzłach chłonnych odnotowano w ostatnim dniu doświadczenia. Zastosowanie komórek szczepionkowych istotnie wpłynęło na stopień pobudzenia DC w sLN, powodując obniżenie ekspresji cząsteczek MHC II na powierzchni tych komórek w 5. dniu, a szczególnie w 7. dniu.

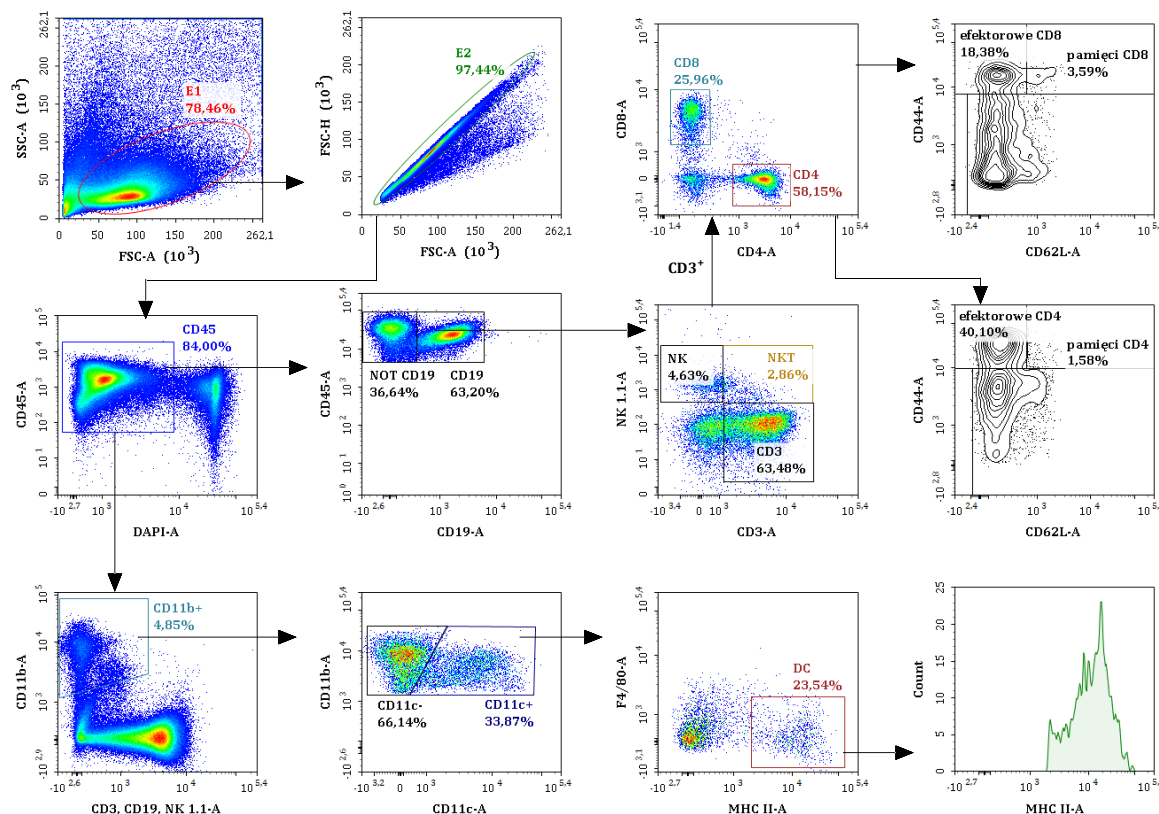
4.2.2.3. Analiza fenotypowa i funkcjonalna komórek śledzionowych

W kolejnym etapie badań na podstawie analizy fenotypu powierzchniowego i aktywności komórek śledzionowych, określono wpływ jednokrotnego podania komórek dendrytycznych transdukowanych do produkcji IL-12 i/lub IL-18 na aktywację ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Ocenie poddano komórki śledzionowe wyizolowane od myszy w 22. dniu doświadczenia (7 dni po podaniu komórek szczepionkowych), ze względu na potencjalny czas indukowania swoistej odpowiedzi ogólnoustrojowej. Ocenę zmian odsetka komórek mieloidalnych i limfoidalnych wśród splenocytów dokonano na podstawie wieloparametrowej analizy metodą cytometrii przepływowej (Ryc. 28). Natomiast aktywność komórek śledzionowych oceniano na podstawie odsetka komórek zdolnych do wydzielania ziaren cytotoxicytnych (CD107a⁺) wśród restymulowanych splenocytów oraz ich aktywności cytotoxicytnych wobec komórek nowotworowych, a także ich zdolności do produkcji cytokin w pięciodniowej mieszanej hodowli *ex vivo* splenocytów i komórek nowotworowych MC38.

4.2.2.3.1. Analiza zmian odsetka komórek limfoidalnych i mieloidalnych wśród splenocytów

Wykorzystując metodę cytometrii przepływowej wyodrębniono populacje komórek T CD4⁺, T CD8⁺, NK i NKT, a wśród limfocytów dodatkowo oszacowano odsetek komórek efektorowych i komórek pamięci. Ponadto wśród komórek mieloidalnych wyznaczono odsetek komórek dendrytycznych, a także poziom ekspresji cząsteczek MHC II na ich powierzchni (Ryc. 28).

Limfocyty T CD4⁺ stanowiły około 20% wśród komórek śledzionowych pobranych w 22. dniu doświadczenia od nietraktowanych myszy z rozwijającym się nowotworem MC38. Wykazano znaczne zróżnicowanie odsetka tych komórek zależne od rodzaju zastosowanej szczepionki. Jednokrotne podanie DC/IL-12+IL-18 wpłynęło na 2-krotne zwiększenie odsetka limfocytów T CD4⁺ wśród splenocytów, w porównaniu do pozostałych grup badanych (Ryc. 29. A). Odnotowano również zwiększenie udziału procentowego limfocytów T CD4⁺ efektorowych, przy czym istotny statystycznie wzrost odsetka tych komórek, wykazano jedynie po podaniu DC/EGFP (Ryc. 29. B). Udział procentowy komórek pamięci wśród limfocytów T CD4⁺ nie przekraczał 1%, niemniej jednak jego wartość była zależna od rodzaju podanej szczepionki. Niewielki wzrost populacji komórek CD44⁺CD62L⁺ odnotowano po podaniu kontrolnych DC, natomiast po zastosowaniu szczepionek na bazie DC transdukowanych do produkcji cytokin, a w szczególności DC/IL-12+IL-18, wykazano istotne statystycznie obniżenie odsetka tych komórek (Ryc. 29. C).

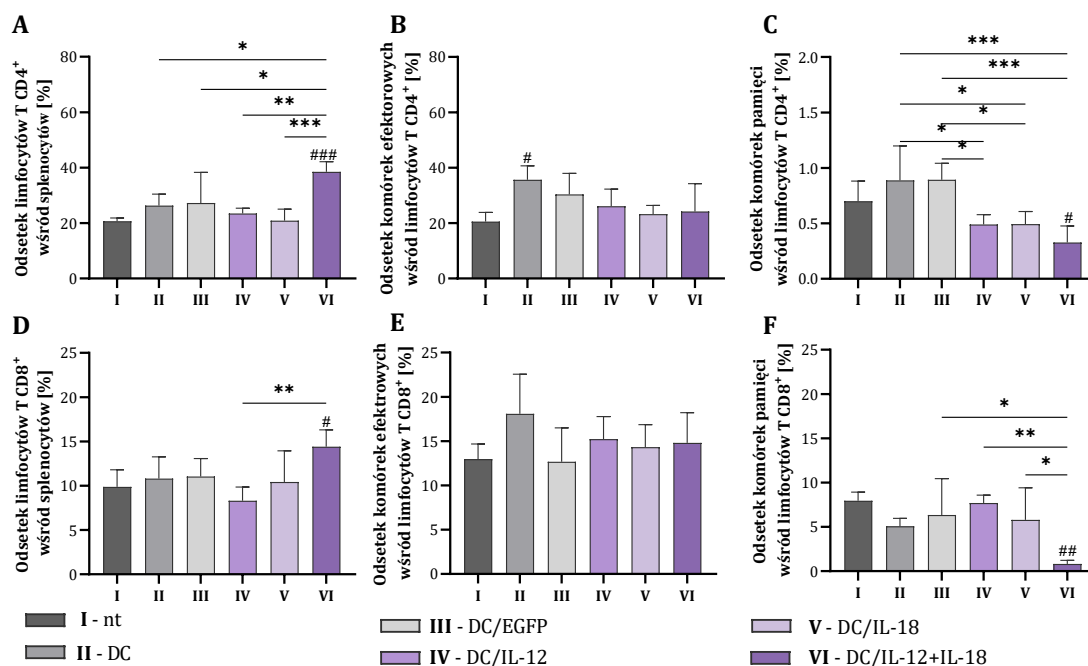


Ryc. 28. Schemat analizy populacji komórek mieloidalnych i limfoidalnych wśród splenocytów pobranych od myszy po jednokrotnym podaniu szczepionek.

Po wyeliminowaniu debris oraz zlepek komórkowych, wśród splenocytów wyodrębniono żywe leukocyty (DAPI^{neg}CD45⁺). Podczas analizy komórek limfoidalnych, wśród komórek DAPI^{neg}CD45⁺ odseparowano populację CD19⁺, a następnie zidentyfikowano komórki CD3⁺, NK i NKT. W populacji komórek CD3⁺ wyodrębniono limfocyty T CD4⁺ i limfocyty T CD8⁺, a wśród nich komórki efektorowe (CD44⁺CD62L^{neg}) i komórki pamięci (CD44⁺CD62L⁺) na podstawie ekspresji markerów CD44 i CD62L. Podczas analizy komórek mieloidalnych wśród komórek DAPI^{neg}CD45⁺ zidentyfikowano komórki mieloidalne CD11b⁺, a następnie CD11c⁺ wśród których, wyodrębniono populację DC (CD11c⁺F4/80^{int}). Dodatkowo, określono poziom ekspresji cząsteczek MHC II na powierzchni DC (zielony histogram). Na rycinie przedstawiono reprezentatywną analizę splenocytów pobranych w 20. dniu doświadczenia od myszy traktowanej DC/TAg.

Wśród komórek śledzionowych pobranych od myszy nietraktowanych zidentyfikowano około 10% limfocytów T CD8⁺. Nie stwierdzono znaczących różnic w wielkości tej populacji w grupach myszy traktowanych komórkami szczepionkowymi, jedynie podanie DC/IL-12+IL-18 wpłynęło w sposób istotny na zwiększenie odsetka tych splenocytów (Ryc. 29. D). Jednak odnotowano niewielki wzrost odsetka komórek efektorowych wśród tej populacji limfocytów we wszystkich grupach, a najwyższy udział procentowy wykazano po podaniu nietransdukowanych DC (Ryc. 29. E). Ciekawy efekt podania szczepionkowych DC zaobserwowano podczas analizy udziału procentowego komórek T CD8⁺ pamięci, który okazał się wielokrotnie wyższy od odsetka komórek pamięci wśród limfocytów T CD4⁺. Znaczące zróżnicowanie odsetka tych limfocytów było zależne od rodzaju podanych komórek szczepionkowych. Jednak podobnie jak w przypadku

komórek pamięci $CD4^+$, największy wpływ na obniżenie odsetka tej subpopulacji limfocytów T $CD8^+$ miało podanie DC/IL-12+IL-18 (Ryc. 29. F).

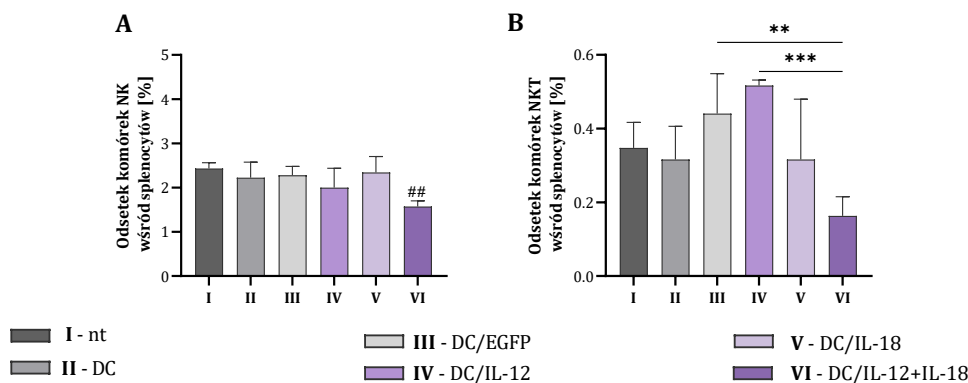


Ryc. 29. Odsetek limfocytów T $CD4^+$ i limfocytów T $CD8^+$ wśród splenocytów uzyskanych od myszy po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin.

Śledziona pobrano od myszy w 22. dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej komórek śledzionowych wyodrębniono populacje limfocytów T $CD4^+$ oraz limfocytów T $CD8^+$ oraz oznaczono ekspresję cząsteczek CD62L i CD44 na powierzchni tych komórek. Określono odsetek limfocytów T $CD4^+$ (A) oraz limfocytów T $CD8^+$ (D) wśród splenocytów oraz odsetek komórek efektorowych ($CD44^+CD62L^{neg}$) (B, E) i komórek pamięci ($CD44^+CD62L^+$) (C, F) wśród limfocytów T $CD4^+$ oraz limfocytów T $CD8^+$. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu *post hoc* Dunn'a lub parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A, B, C, D, F). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$ względem grupy nt; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nieotraktowana

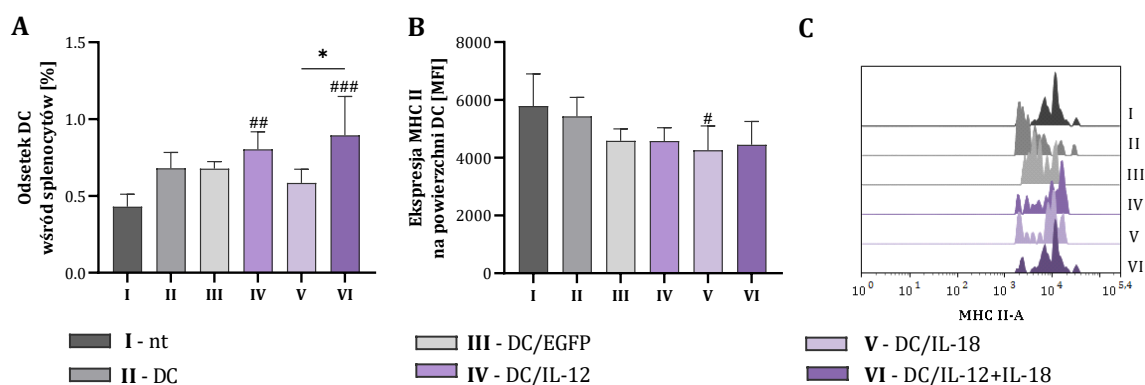
Komórki NK stanowiły około 2,5% wśród splenocytów pobranych od myszy obciążonych guzami MC38 (Ryc. 30. A). Zastosowanie szczepionek na bazie DC/IL-12 lub DC/IL-12+IL-18 wpłynęło na obniżenie odsetka komórek NK wśród splenocytów, jednak istotne statystycznie zmiany w udziale procentowym tych komórek w śledzionach, zaobserwowano jedynie po podaniu DC/IL-12+IL-18.

Najmniejszą populację oznaczanych komórek limfoidalnych wśród splenocytów stanowiły komórki NKT, a ich odsetek wynosił około 0,3% w grupie myszy nieleczonych (Ryc. 30. B). Najwyższy odsetek tych komórek w śledzionach odnotowano po podaniu DC/IL-12, natomiast najniższy po zastosowaniu DC/IL-12+IL-18.



Ryc. 30. Odsetek komórek NK i NKT wśród splenocytów uzyskanych od myszy po jednokrotnym, okologuzowym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin.

Śledziony pobrano od myszy w 22. dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej komórek śledzionowych wyodrębniono populacje komórek NK i NKT. Określono odsetek komórek NK (A) oraz komórek NKT (B) wśród splenocytów. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallis i testu *post hoc* Dunn'a (A) lub parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (B). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (## - $p < 0,01$ względem grupy nt; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana



Ryc. 31. Odsetek komórek dendrytycznych wśród splenocytów po jednokrotnym, okologuzowym podaniu szczepionek.

Śledziony pobrano od myszy w 22. dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej wśród komórek DAPI^{neg}CD45⁺ zidentyfikowano komórki mieloidalne CD11b⁺, a wśród nich wyodrębniono populację komórek dendrytycznych (CD11c⁺F4/80^{int}), a także określono poziom ekspresji cząsteczek MHC II na powierzchni DC. Określono odsetek komórek DC (A) oraz średnią intensywność fluorescencji cząsteczek MHCII (B, C) na powierzchni tych komórek. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Na histogramach przedstawiono dane z prób reprezentatywnych. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A, B). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$ względem grupy nt, * - $p < 0,05$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Wśród komórek mieloidalnych w śledzionach pobranych od myszy doświadczalnych oceniano zmiany odsetka DC (Ryc. 31). Komórki dendrytyczne stanowiły około 0,5% populacji komórek śledzionowych u myszy nietraktowanych, obarczonych nowotworem. Znaczny wzrost odsetka DC wśród splenocytów zaobserwowano po okologuzowym podaniu DC/IL-12 oraz

DC/IL-12+IL-18 (Ryc. 31. A). DC oznaczone wśród splenocytów pobranych od myszy otrzymujących transdukowane komórki szczepionkowe, charakteryzowały się obniżoną ekspresją MHC II, jednak istotną statystycznie zmianę w ekspresji tej cząsteczki na powierzchni śledzionowych DC odnotowano jedynie po podaniu DC/IL-18 (Ryc. 31. B).

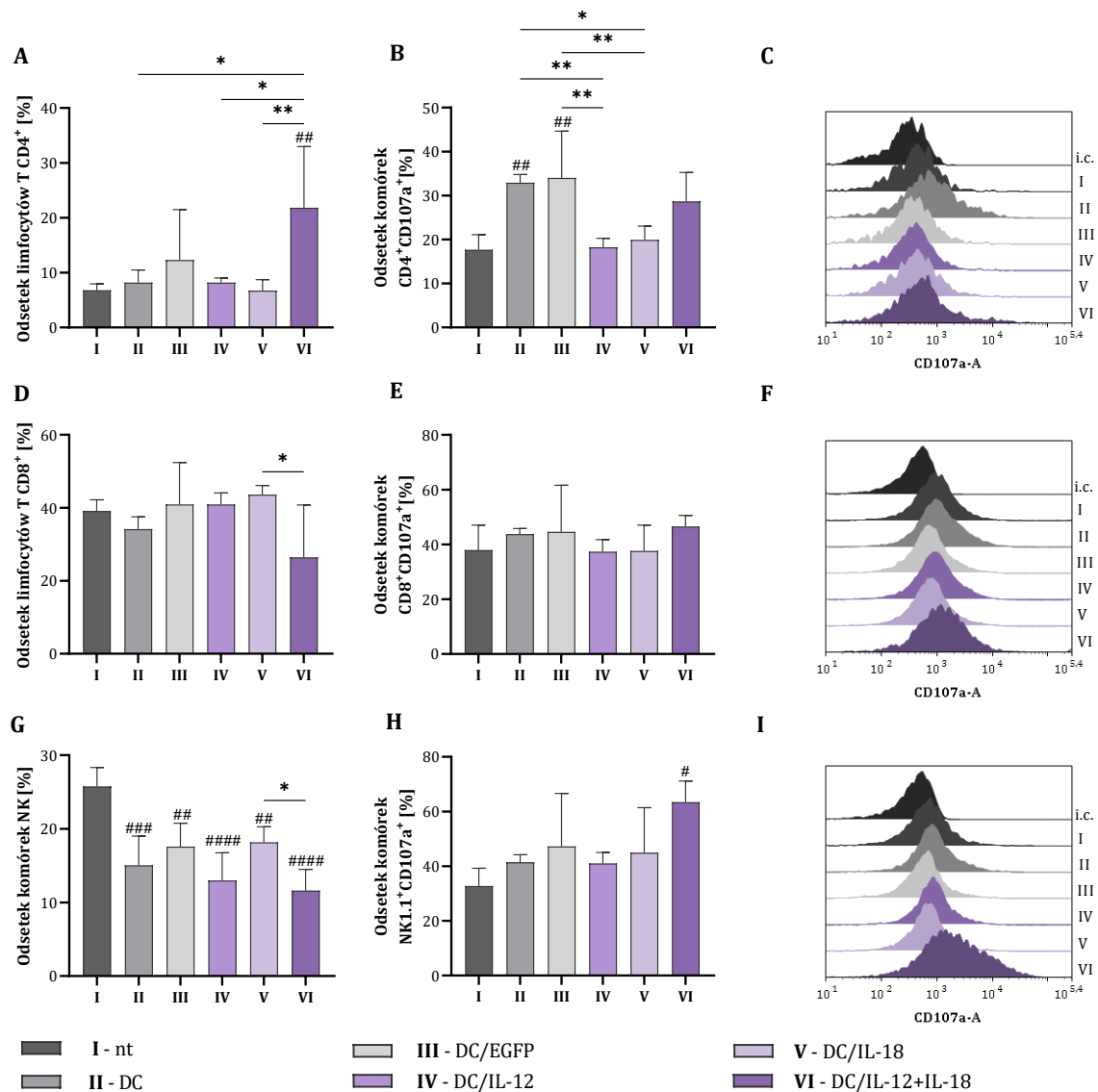
4.2.2.3.2. *Aktywność restymulowanych splenocytów*

Stopień aktywności splenocytów, wyindukowanej podaniem komórek szczepionkowych, oceniano po ich powtórnej stymulacji w pięciodniowej hodowli mieszanej z komórkami MC38 (Ryc. 32). Określono również poziom ekspresji cząsteczek CD107a na ich powierzchni, świadczący o intensywności uwalniania ziaren cytolitycznych. Odsetek komórek CD107a⁺ określano wśród limfocytów T CD4⁺, T CD8⁺ oraz komórek NK po 2-godzinnej inkubacji restymulowanych splenocytów z komórkami nowotworowymi.

Po okołoguzowym podaniu komórek dendrytycznych zaobserwowano zróżnicowany stopień aktywowania splenocytów pobranych od myszy po 7 dniach od podania szczepionek. Zastosowanie DC transdukowanych do produkcji obu cytokin (DC/IL-12+IL-18) znacząco wpłynęło na zwiększenie odsetka limfocytów T CD4⁺ wśród restymulowanych splenocytów w porównaniu do komórek uzyskanych od myszy nietraktowanych oraz otrzymujących nietransdukowane DC i DC transdukowane do produkcji tylko jednej cytokiny (DC/IL-12 lub DC/IL-18) (Ryc. 32. A). Natomiast istotne zwiększenie odsetka limfocytów T CD4⁺ zdolnych do wydzielania ziaren cytolitycznych wykazano wśród restymulowanych splenocytów po podaniu nietransdukowanych DC lub DC/EGFP oraz po podaniu DC/IL-12+IL-18, choć w tej ostatniej grupie zmiana ta nie była istotna statystycznie (Ryc. 32. B).

Podanie szczepionek nie wpłynęło znacząco na zmiany wielkości populacji limfocytów T CD8⁺ wśród restymulowanych splenocytów. Jedynie po zastosowaniu DC/IL-12+IL-18 odsetek tych komórek uległ znacznemu obniżeniu w porównaniu do pozostałych grup badanych (Ryc. 32. D). Ponadto zaobserwowano niewielki wzrost odsetka komórek CD107a⁺ wśród limfocytów T CD8⁺ w śledzionach pobranych od myszy traktowanych DC, DC/EGFP oraz DC/IL-12+IL-18 (Ryc. 32. E).

Wśród restymulowanych splenocytów, komórki NK okazały się populacją najbardziej wrażliwą na zastosowanie szczepionek. Stwierdzono bowiem istotne statystycznie obniżenie odsetka tych komórek we wszystkich grupach traktowanych DC (Ryc. 32. G). Niemniej jednak ta zmniejszona populacja komórek NK charakteryzowała się zwiększoną zdolnością do wydzielania ziaren cytolitycznych, a istotny wzrost odsetka komórek NK CD107a⁺, w porównaniu do grupy nietraktowanej, był efektem podania DC/IL-12+IL-18 (Ryc. 32. H).



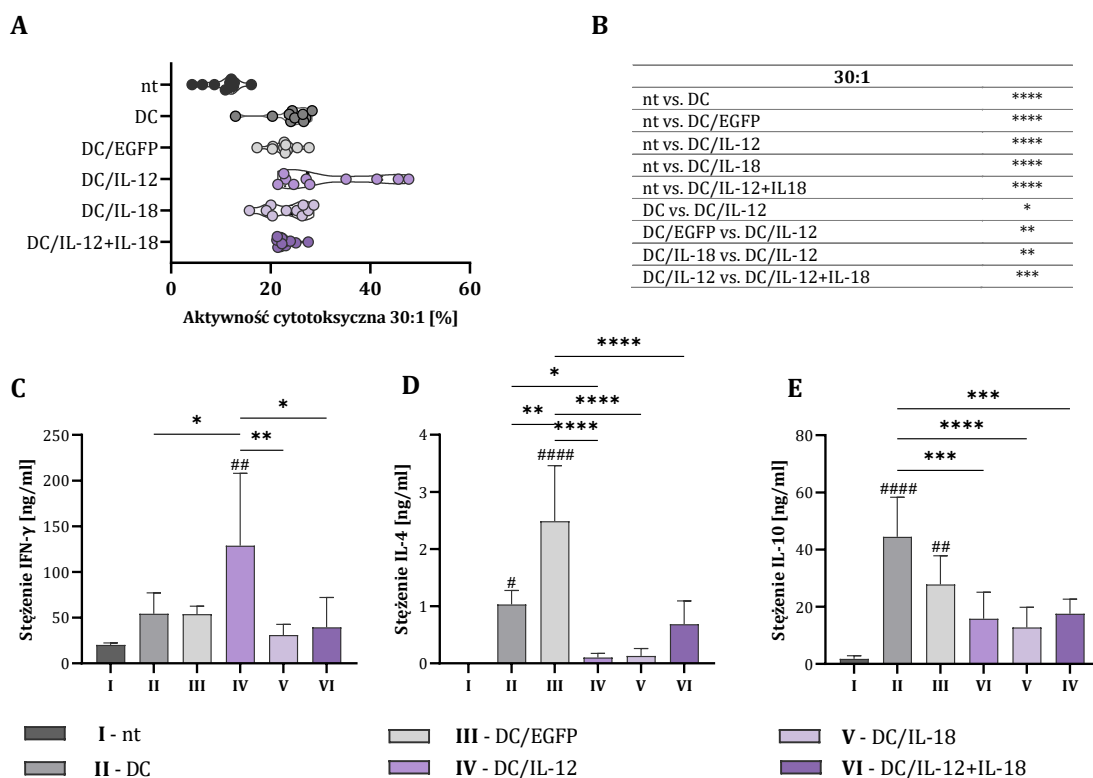
Ryc. 32. Odsetek limfocytów T CD4⁺, T CD8⁺ oraz komórek NK wśród restymulowanych splenocytów otrzymanych od myszy po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin.

Śledziony pobrano od myszy w 22. dniu doświadczenia. Restymulowane splenocyty inkubowano z komórkami nowotworowymi MC38 przez 2 godziny. Po tym czasie określono odsetek limfocytów T CD4⁺ (A), T CD8⁺ (D) oraz komórek NK (G) wśród restymulowanych splenocytów oraz odsetek komórek zdolnych do wydzielania ziaren cytotolitycznych (CD107a⁺) wśród tych komórek (B, C, E, F, H, I). Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Na histogramach przedstawiono dane z prób reprezentatywnych. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallis (H) i testu *post hoc* Dunn'a lub parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A, B, D, G). Za istotnie statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$; #### - $p < 0,0001$ względem grupy nt, * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Ocena zdolności restymulowanych komórek śledzionowych do zabijania komórek nowotworowych MC38 po 4-godzinnej mieszanej hodowli wykazała, że splenocyty pochodzące od myszy z grup traktowanych szczepionkami komórkowymi charakteryzowały się istotnie wyższą aktywnością cytotoksyczną wobec komórek nowotworowych MC38 w porównaniu do komórek

z grupy kontrolnej (Ryc. 33. A, B). Najwyższą aktywność cytotoksyczną wobec komórek docelowych MC38, wykazywały restymulowane splenocyty pochodzące od myszy z grupy traktowanej DC/IL-12.

W nadsączach znad 5- dniowej mieszanej hodowli splenocytów i komórek nowotworowych określono stężenie IFN- γ , IL-4 oraz IL-10. Restymulowane komórki śledzionowe, uzyskane od myszy otrzymujących szczepionki komórkowe charakteryzowały się zwiększoną zdolnością do produkcji IFN- γ w porównaniu do splenocytów pobranych od myszy nietraktowanych (Ryc. 33. C). Najwyższe stężenie IFN- γ wykazano w nadsączach znad mieszanej hodowli, w której splenocyty pochodziły od myszy traktowanych DC/IL-12. Natomiast gdy komórki śledzionowe pobudzone przez podanie DC lub DC/EGFP, w nadsączach odnotowano znaczny wzrost stężenia IL-4 i IL-10 w porównaniu do nadsączy znad komórek pobranych od myszy nietraktowanych (Ryc. 33. D, E).



Ryc. 33. Wpływ jednokrotnego podania komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin na zmiany aktywności restymulowanych splenocytów.

Aktywność cytotoksyczną restymulowanych komórek śledzionowych oceniono na podstawie odsetka martwych komórek nowotworowych MC38 po 4-godzinnej hodowli z komórkami efektorowymi w stosunku 1:30 (A, B). Stężenie IFN- γ (C), IL-4 (D) oraz IL-10 (E) sprawdzono w nadsączach znad 5-dniowej mieszanej hodowli splenocytów z komórkami nowotworowymi MC38. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 6-7 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A, C, D, E). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (## - $p < 0,01$; #### - $p < 0,0001$ względem grupy nt, * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Podsumowując, zastosowanie szczepionek na bazie DC/IL-12+IL-18 miało największy wpływ na zmiany udziału procentowego komórek limfoidalnych w śledzionach. Po podaniu komórek szczepionkowych odnotowano zwiększenie odsetka limfocytów T CD4⁺ oraz CD8⁺ wśród splenocytów, ale nie skutkowało to zwiększeniem stopnia aktywacji tych komórek. Ponadto po zastosowaniu tej szczepionki wykazano istotne statystycznie obniżenie odsetka komórek NK, a także wzrost odsetka komórek DC. W przypadku restymulowanych splenocytów uzyskanych od myszy traktowanych DC/IL-12+IL-18 wykazano istotny wzrost udziału procentowego limfocytów T CD4⁺, a wśród nich komórek zdolnych do wydzielania ziaren cytotolitycznych, choć zmiana ta nie była istotna statystycznie. W tej grupie odnotowano także obniżenie odsetka limfocytów T CD8⁺ i komórek NK, przy czym jedynie wśród populacji komórek NK wykazano istotny wzrost udziału procentowego komórek CD107a⁺. Z drugiej strony, największą aktywnością cytotoksyczną i zdolnością do wydzielania IFN- γ charakteryzowały się splenocyty pobrane od myszy otrzymujących DC/IL-12.

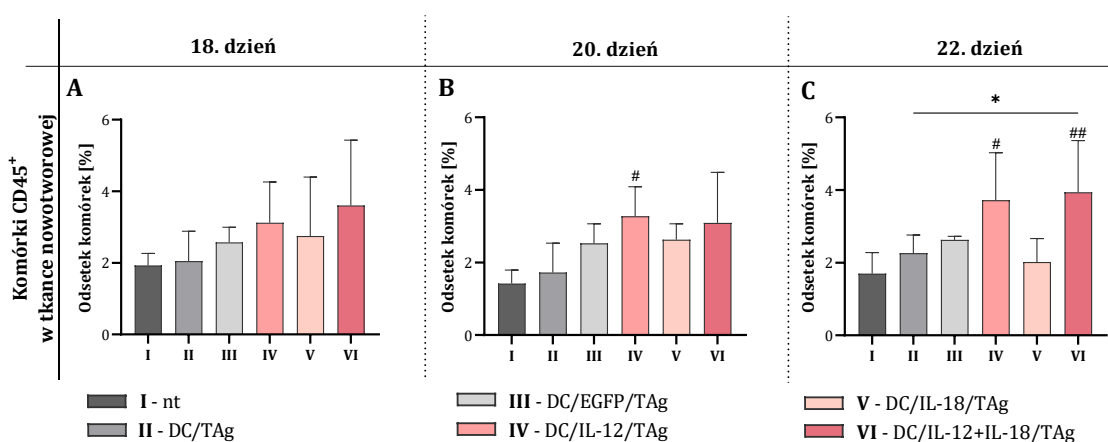
4.2.3. Kinetyka indukowania odpowiedzi przeciwnowotworowej w wyniku jednokrotnego podania komórek dendrytycznych transdukowanych genami IL-12 i/lub IL-18 oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi

W celu określenia kinetyki odpowiedzi przeciwnowotworowej indukowanej przez jednokrotne zastosowanie szczepionek na bazie komórek dendrytycznych transdukowanych do produkcji IL-12 i/lub IL-18 oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi, dokonano analizy nacieku leukocytów w tkance nowotworowej i wartowniczych węzłach chłonnych pobranych w trzech punktach czasowych, jak również w śledzionach uzyskanych w dniu ostatniego pobrania, od myszy z rozwijającym się nowotworem MC38. Schemat doświadczenia przedstawiono na Ryc. 14. A. Wykorzystując metodę cytometrii przepływową, oceniano zmiany odsetka limfocytów T CD4⁺ i T CD8⁺ oraz komórek NK i NKT, a także komórek dendrytycznych i TAM w tkance nowotworowej, wartowniczych węzłach chłonnych i śledzionach. Ponadto analizowano aktywność cytotoksyczną komórek śledzionowych wobec komórek MC38 oraz poziom produkcji cytokin przez restymulowane splenocyty.

4.2.3.1. Ocena nacieku subpopulacji komórek limfoidalnych i mieloidalnych do tkanki nowotworowej

Wieloparametrowa analiza tkanki nowotworowej metodą cytometrii przepływową została przeprowadzona według schematu opisanego w podrozdziale 4.2.2.1 (Ryc. 16).

Jednokrotne podanie komórek dendrytycznych znacząco wpłynęło na zmiany odsetka leukocytów (CD45⁺) naciekających tkankę guzów pobraną od myszy w 18., 20. i 22. dniu doświadczenia w porównaniu do grupy nietraktowanej (Ryc. 34). W 18. dniu doświadczenia wykazano zwiększenie odsetka leukocytów we wszystkich grupach otrzymujących szczepionki, a najwyższy odsetek tych komórek odnotowano po okologuzowym podaniu DC/IL-12/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg, jednak zmiany te nie były istotne statystycznie (Ryc. 34. A). Tę samą tendencję odnotowano w dniach kolejnych pobrań, przy czym w guzach pobranych od myszy traktowanych DC/IL-12/TAg 20. dnia (Ryc. 34. B) lub po podaniu DC/IL-12/TAg lub DC/IL-12+IL18/TAg 22. dnia (Ryc. 34. C), wzrost odsetka komórek CD45⁺ był istotny statystycznie w stosunku do grupy nietraktowanej, a w przypadku podania DC/IL-12+IL-18/TAg także w stosunku do grupy otrzymującej DC/TAg.



Ryc. 34. Odsetek leukocytów naciekających tkankę nowotworową w wyniku jednokrotnego podania komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi.

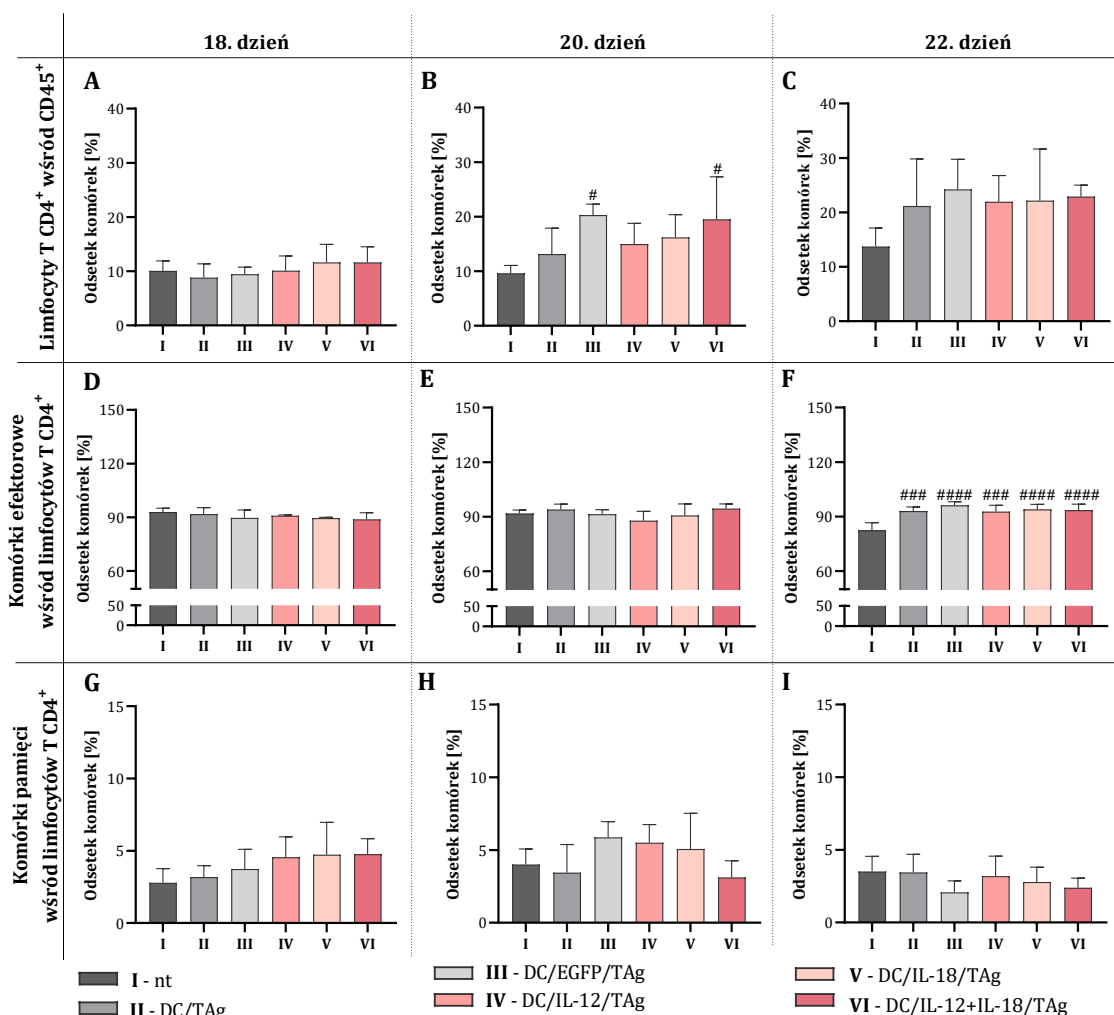
Guzy pobierano od myszy w 18. (A), 20. (B) i 22. (C) dniu doświadczenia. W pierwszym etapie wieloparametrowej analizy cytometrycznej tkanki nowotworowej MC38 wyodrębniono żywe leukocyty (DAPI^{neg}CD45⁺) (A, B, C). Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (B, C). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$ względem grupy nt, * - $p < 0,05$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

W tkance nowotworowej pobranej od myszy oznaczono populację komórek limfoidalnych, a wśród nich limfocyty T CD4⁺, limfocyty T CD8⁺, komórki NK oraz komórki NKT. Wśród obu populacji limfocytów oznaczono ponadto odsetek komórek efektorowych (CD44⁺CD62L^{neg}) i komórek pamięci (CD44⁺CD62L⁺).

W 18. dniu doświadczenia, wykazano jedynie niewielki wzrost odsetka limfocytów T CD4⁺ wśród leukocytów naciekających guzy uzyskane od myszy traktowanych DC/IL-18/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc. 35. A). W dniu kolejnego pobrania, naciek limfocytów T CD4⁺ zwiększał się niezależnie od rodzaju szczepionki, a po podaniu DC/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg odnotowano statystycznie istotny wzrost odsetka tych komórek (Ryc. 35. B). Te same tendencje

odnotowano w ostatnim dniu pobrania, jednak obserwowane zmiany nie były istotne statystycznie (Ryc. 35. C).

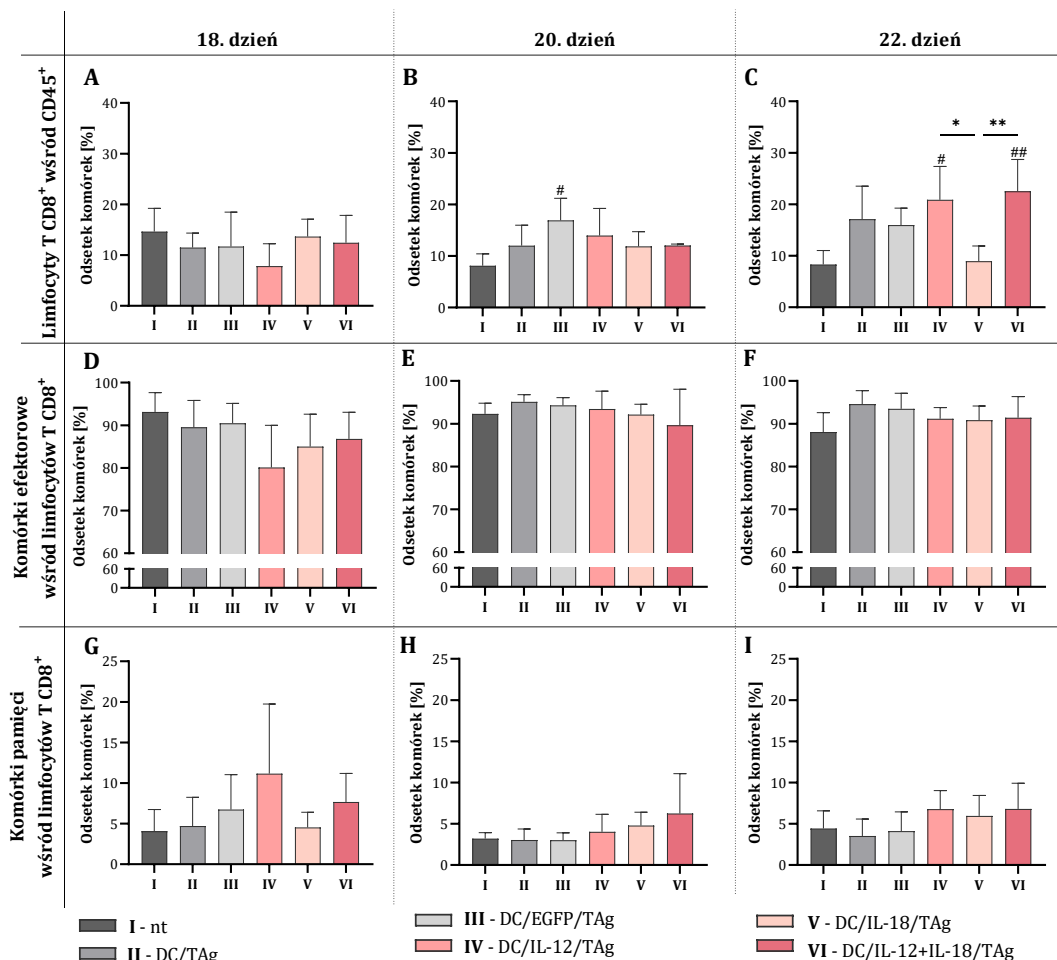
Nie wykazano istotnych statystycznie zmian odsetka komórek efektorowych wśród limfocytów T CD4⁺, podczas pierwszego i drugiego pobrania guzów od myszy traktowanych. (Ryc. 35. D, E). Natomiast w 22. dniu doświadczenia, istotne statystycznie zwiększenie odsetka tych komórek we wszystkich grupach myszy otrzymujących szczepionki, było związane z obniżeniem odsetka limfocytów w grupie nietraktowanej, w porównaniu do poprzednich punktów czasowych (Ryc. 35. F).



Ryc. 35. Odsetek limfocytów T CD4⁺ naciekających tkankę nowotworową w wyniku jednokrotnego podania komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi.

Guzy pobierano od myszy w 18. (A, D, G), 20. (B, E, H) i 22. (C, F, I) dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej, wśród komórek limfoidalnych naciekających tkankę nowotworową wyodrębniono populacje limfocytów T CD4⁺ oraz oznaczono ekspresję cząsteczek CD62L i CD44 na powierzchni tych komórek. Określono odsetek limfocytów T CD4⁺ wśród leukocytów CD45⁺ (A, B, C) oraz odsetek komórek efektorowych (CD44⁺CD62L^{neg}) (D, E, F) i komórek pamięci (CD44⁺CD62L⁺) (G, H, I) wśród limfocytów T CD4⁺. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (B, F). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; #### - $p < 0,0001$ względem grupy nt). nt – grupa kontrolna nietraktowana

W 18. dniu doświadczenia stwierdzono dwukrotny wzrost odsetka komórek pamięci wśród limfocytów T CD4⁺ w tkance nowotworowej pobranej od myszy traktowanych DC transdukowanymi do produkcji cytokin i stymulowanymi TAg w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 35. G). W dniu kolejnego pobrania, po podaniu DC/EGFP/TAg, DC/IL-12/TAg lub DC/IL-18/TAg, odsetek komórek pamięci nadal utrzymywał się na podobnym poziomie, jedynie w przypadku zastosowania DC/IL-12+IL-18/TAg wielkość populacji CD44⁺CD62L⁺ wśród limfocytów T CD4⁺ uległa zmniejszeniu (Ryc. 35. H). Natomiast w 22. dniu, po podaniu szczepionek odsetek tych komórek był niższy niż w grupie nietraktowanej lub DC/TAg (Ryc. 35. I).



Ryc. 36. Odsetek limfocytów T CD8⁺ naciekających tkankę nowotworową w wyniku jednokrotnego podania komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi.

Guzy pobierano od myszy w 18. (A, D, G), 20. (B, E, H) i 22. (C, F, I) dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej, wśród komórek limfoidalnych naciekających tkankę nowotworową wyodrębniono populację limfocytów T CD8⁺ oraz oznaczono ekspresję cząsteczek CD62L i CD44 na powierzchni tych komórek. Określono odsetek limfocytów T CD8⁺ wśród leukocytów CD45⁺ (A, B, C) oraz odsetek komórek efektorowych (CD44⁺CD62L^{neg}) (D, E, F) i komórek pamięci (CD44⁺CD62L⁺) (G, H, I) wśród limfocytów T CD8⁺. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (B, C). Za istotnie statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$ względem grupy nt, * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

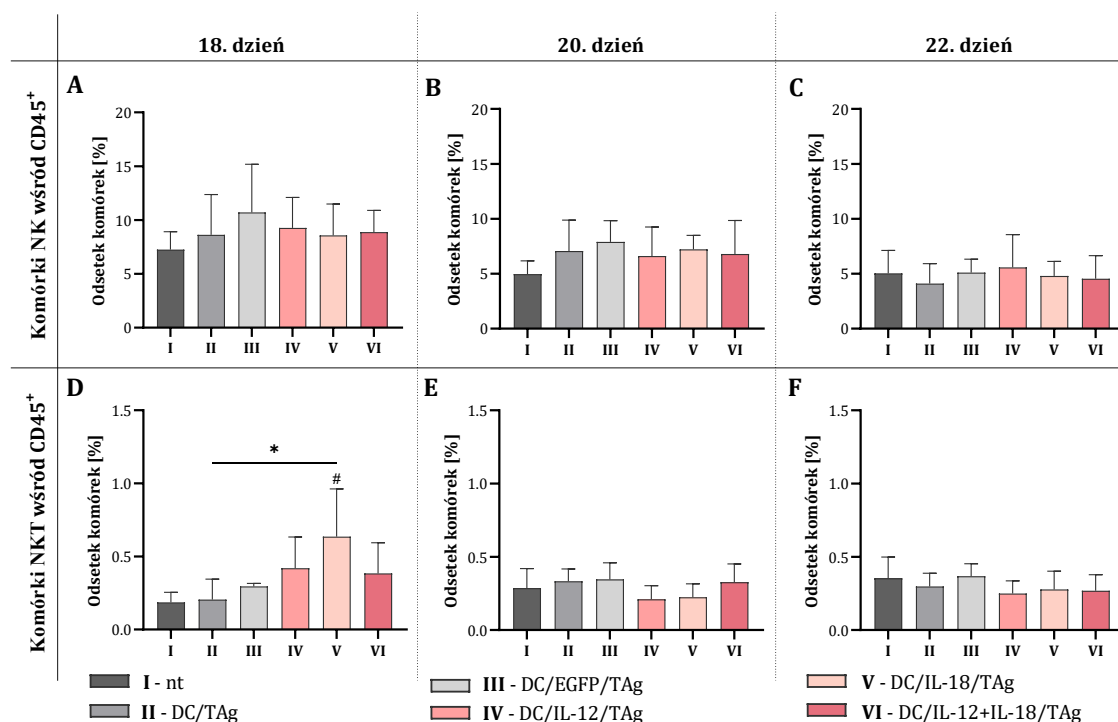
Podanie szczepionkowych DC stymulowanych TAg, niezależnie od rodzaju wprowadzonego genu, wpłynęło na nieznaczne obniżenie odsetka limfocytów T CD8⁺ w guzach pobieranych w 18. dniu doświadczenia, przy czym najniższy odsetek tych komórek odnotowano po podaniu DC/IL-12/TAg (Ryc. 36. A). Już w dniu kolejnego pobrania, wykazano istotne statystycznie zwiększenie odsetka limfocytów T CD8⁺ naciekających tkankę nowotworową po podaniu DC/EGFP/TAg (Ryc. 36. B), a w 22. dniu doświadczenia w guzach pobranych od myszy traktowanych DC/IL-12/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg w porównaniu do grupy nietraktowanej (Ryc. 36. C).

Ocena zmian wielkości populacji limfocytów T CD8⁺ efektorowych naciekających guzy, wykazała nieistotne statystycznie zróżnicowanie odsetka tych komórek w ciągu 7 dni po podaniu szczepionkowych DC. Zastosowanie DC/IL-12/TAg spowodowało niewielkie obniżenie odsetka limfocytów T CD8⁺ efektorowych w 18. dniu doświadczenia w porównaniu do myszy nietraktowanych (Ryc. 36. D). Wzrost odsetka tych komórek w 20. dniu odnotowano po podaniu DC/TAg, DC/EGFP/TAg lub DC/IL-12/TAg (Ryc. 36. E), po czym w 22. dniu doświadczenia udział procentowy limfocytów T CD8⁺ efektorowych utrzymywał się na podobnym poziomie we wszystkich grupach myszy traktowanych szczepionkami komórkowymi i obniżył w grupie nietraktowanej (Ryc. 36. F).

Analiza odsetka limfocytów T CD8⁺ pamięci wykazała zróżnicowanie wielkości tej populacji pod wpływem podania szczepionek w 18. dniu doświadczenia (Ryc. 36. G). Zwiększony udział procentowy tych komórek utrzymywał się w kolejnych dniach, po podaniu DC/IL-12/TAg, DC/IL-18/TAg, DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc. 36. H, I).

Tak jak podczas stosowania komórek szczepionkowych niestymulowanych TAg, także w przypadku transdukowanych DC stymulowanych TAg wykazano, że komórki NK stanowiły znaczną część populacji komórek limfoidalnych naciekających guzy (Ryc. 37. A, B, C). Podanie DC, a szczególnie DC/EGFP/TAg, wpłynęło na zwiększenie odsetka tych komórek w 18. dniu doświadczenia w porównaniu do kontroli nietraktowanej (Ryc. 37. A). Zmiany te utrzymywały się także w kolejnym dniu, jednak odsetek tych komórek obniżył się we wszystkich grupach badanych (Ryc. 37. B). Natomiast w 22. dniu nie obserwowano już wpływu podania szczepionek komórkowych na zmiany odsetka komórek NK naciekających guzy MC38 (Ryc. 37. C).

Analiza odsetka komórek NKT w guzach pobranych 18. dnia doświadczenia, wykazała zwiększony napływ tych komórek po podaniu szczepionek w szczególności DC transdukowanych do produkcji cytokin i stymulowanych TAg, przy czym najwyższy odsetek odnotowano po podaniu DC/IL-18/TAg (Ryc. 37. D). Tymczasem w tkankach nowotworowych pobranych od myszy w 20. i 22. dniu nie zaobserwowano zmian w odsetku komórek NKT zależnych od zastosowania szczepionek (Ryc. 37. E, F).

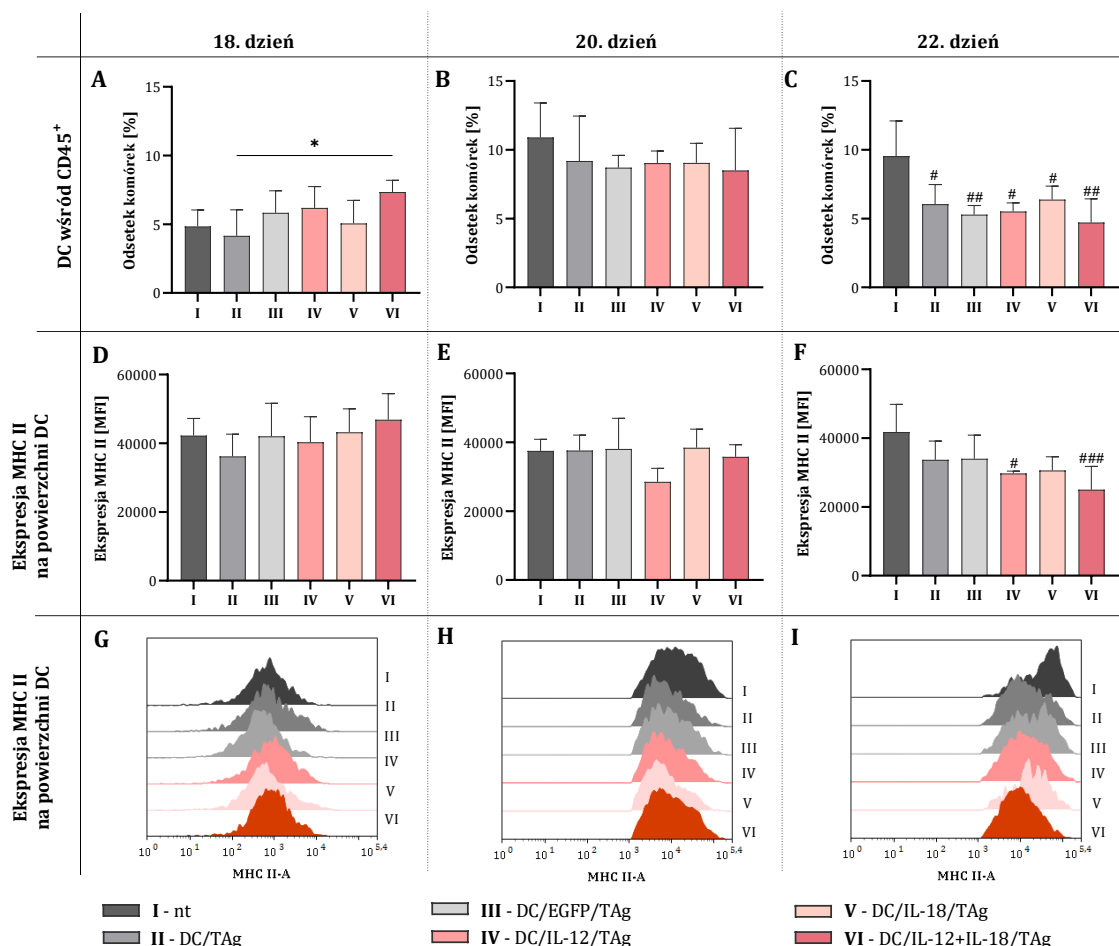


Ryc. 37. Odsetek komórek NK i NKT naciekających tkankę nowotworową w wyniku jednokrotnego podania komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi.

Guzy pobierano od myszy w 18. (A, D), 20. (B, E) i 22. (C, F) dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej, wśród komórek limfoidalnych naciekających tkankę nowotworową wyodrębniono populacje komórek NK ($CD4^{neg}CD8^{neg}NK1.1^{+}$) oraz NKT ($CD4^{+}NK1.1^{+}; CD8^{+}NK1.1^{+}$). Określono odsetek komórek NK (A, B, C) oraz NKT (D, E, F) wśród leukocytów $CD45^{+}$. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallis (D) i testu *post hoc* Dunn'a. Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$ względem grupy nt, * - $p < 0,05$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

W następnym etapie oceny tkanki nowotworowej pobranej od myszy oznaczono populacje komórek mieloidalnych, a wśród nich komórki dendrytyczne (Ryc. 38.) oraz TAM (Ryc. 39).

Analizując zmiany w wielkości populacji komórek dendrytycznych w tkance nowotworowej pobranej od myszy w 18. dniu doświadczenia, odnotowano wzrost odsetka tych komórek po podaniu DC/EGFP/TAg, DC/IL-12/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc. 38. A). Jednak istotne statystycznie zwiększenie odsetka DC obecnych w tkance guzów w porównaniu do grupy myszy otrzymujących DC/TAg wykazano jedynie po podaniu DC/IL-12+IL-18/TAg. W 20. dniu, w tkance nowotworowej pobranej od myszy traktowanych, stwierdzono obniżenie odsetka tych komórek w porównaniu do grupy nietraktowanej (Ryc. 38. B). W 22. dniu doświadczenia, podanie szczepionek spowodowało istotne statystycznie obniżenie odsetka DC w tkance guzów w porównaniu do kontroli nietraktowanej (Ryc. 38. C), a najniższy odsetek tych komórek wykazano po podaniu DC/IL-12+IL-18/TAg.

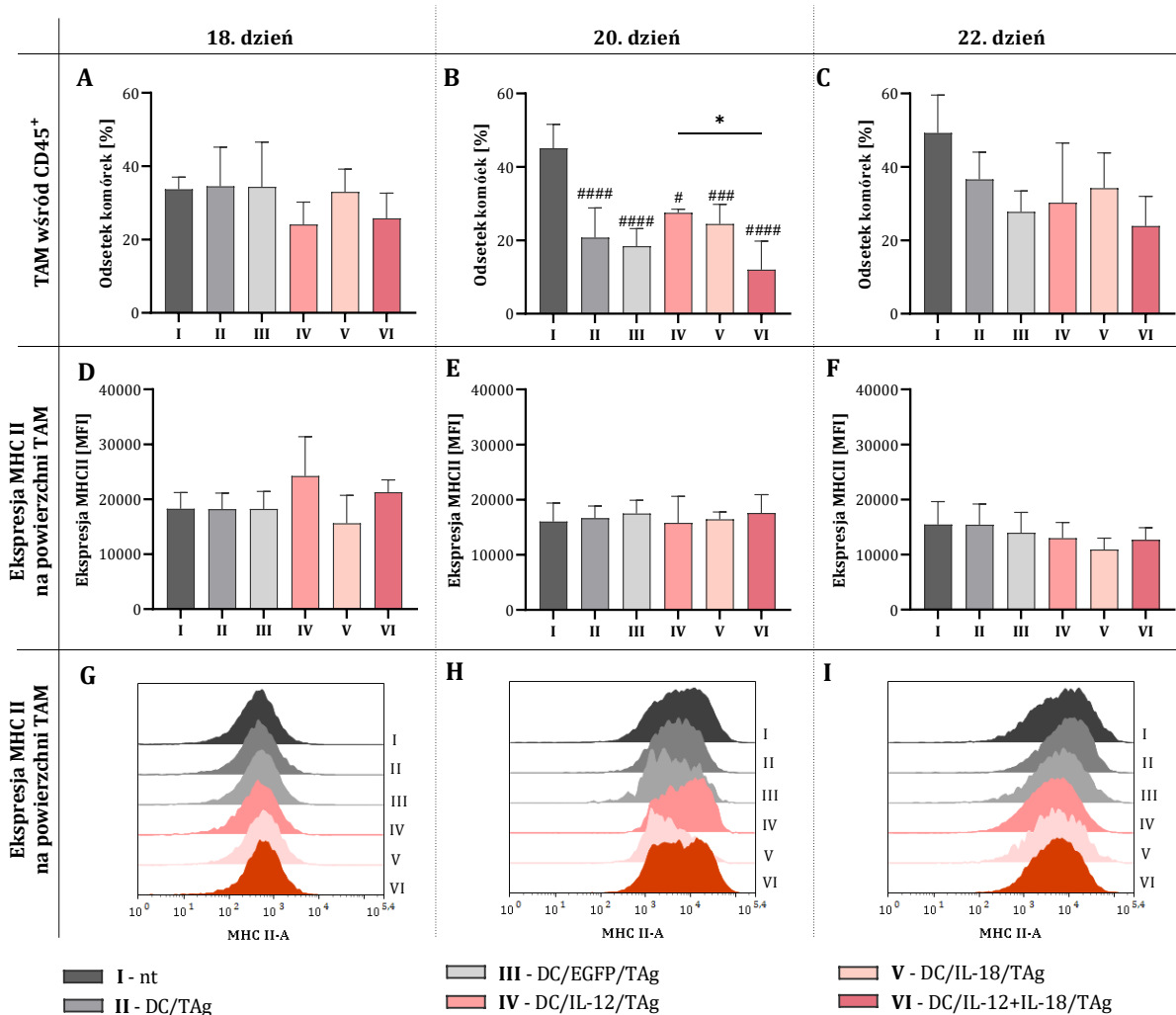


Ryc. 38. Odsetek i stopień aktywacji komórek dendrytycznych naciekających tkankę nowotworową w wyniku jednokrotnego podania komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi.

Guzy pobierano od myszy w 18. (A, D, G), 20. (B, E, H) i 22. (C, F, I) dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej, wśród komórek mieloidalnych naciekających tkankę nowotworową wyodrębniono populację komórek dendrytycznych (DC, CD11c⁺F4/80^{int}MHCII⁺) oraz określono poziom ekspresji cząsteczek MHC II na ich powierzchni. Określono odsetek komórek DC (A, B, C) wśród leukocytów CD45⁺ oraz poziom ekspresji MHC II na ich powierzchni (D, E, F, G, H, I). Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A, C). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$ względem grupy nt, * - $p < 0,05$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

W 18. dniu doświadczenia (3 dni po podaniu szczepionek), niewielki wzrost ekspresji cząsteczek MHC II na powierzchni DC obecnych w tkance guzów wykazano po zastosowaniu DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc. 38. D, G). Natomiast w 20. dniu zaobserwowano niewielkie obniżenie ekspresji MHC II po okołoguzowym podaniu komórek szczepionkowych transdukowanych do produkcji IL-12 (Ryc. 38. E, H). W dniu ostatniego pobrania, intensywność ekspresji MHC II uległa dalszemu niewielkiemu obniżeniu tak, że zmiany w grupach myszy otrzymujących DC/IL-12/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg były istotne statystycznie w porównaniu do kontroli (Ryc. 38. F, I).

Zastosowanie szczepionek zawierających DC/IL-12/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg wpłynęło na obniżenie odsetka TAM w guzach już w dniu pierwszego pobrania (Ryc. 39. A). W 20. dniu wykazano dalsze, istotne statystycznie zmniejszenie odsetka tych komórek w przypadku wszystkich grup otrzymujących szczepionki komórkowe, a najniższy odsetek TAM odnotowano po podaniu DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc. 39. B). Tę samą tendencję w zróżnicowaniu wielkości populacji TAM zaobserwowano w 22. dniu doświadczenia, jednak zmiany te nie były istotne statystycznie (Ryc. 39. C).



Ryc. 39. Odsetek i stopień pobudzenia makrofagów związanych z nowotworem w guzach MC38 po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi.

Guzy pobierano od myszy w 18. (A, D, G), 20. (B, E, H) i 22. (C, F, I) dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej, wśród komórek mieloidalnych naciekających tkankę nowotworową wyodrębniono populację makrofagów związanych z nowotworem (TAM, CD11c⁺F4/80⁺). Określono odsetek komórek TAM (A, B, C) wśród leukocytów CD45⁺ oraz poziom ekspresji MHC II na ich powierzchni (D, E, F, G, H, I). Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (E). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ### - $p < 0,001$; #### - $p < 0,0001$ względem grupy nt, * - $p < 0,05$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Nieistotne statystycznie zwiększenie ekspresji cząsteczek MHC II na powierzchni TAM wykazano 3 dni po podaniu DC/IL-12/TAg oraz DC/IL-12+IL-18/TAg w porównaniu do grupy nietraktowanej (Ryc. 39. D, G). Po kolejnych dwóch dniach, nie odnotowano zmian w ekspresji tych cząsteczek między grupami (Ryc. 39. E, H), a w 22. dnia doświadczenia, na powierzchni TAM zaobserwowano niewielkie obniżenie ekspresji cząsteczek MHC II, szczególnie po podaniu DC transdukowanych do produkcji cytokin i stymulowanych TAg (Ryc. 39. F, I).

Ocena kinetyki indukowania odpowiedzi przeciwnowotworowej w 3, 5. i 7. dniu po zastosowaniu szczepionek na bazie DC transdukowanych do produkcji cytokin i stymulowanych TAg wykazała, że już po 5 dniach znacząco wzrósł odsetek leukocytów w tkance guzów i utrzymywał się do 7. dnia. Podobnie, już w 5. dniu po zastosowaniu tych szczepionek zaobserwowano zmiany odsetka limfocytów T CD4⁺ i T CD8⁺ w tkance nowotworowej, jednak istotne statystycznie różnice stopnia pobudzenia limfocytów wykazano 7. dnia. W przeciwieństwie do limfocytów, już 3. dnia odnotowano znaczące zmiany wielkości populacji komórek NK i NKT, jednak odsetek tych komórek stopniowo ulegał obniżeniu w dniach kolejnych pobrań. Zastosowanie szczepionek wpłynęło także na zróżnicowanie wielkości populacji DC i TAM w guzach.

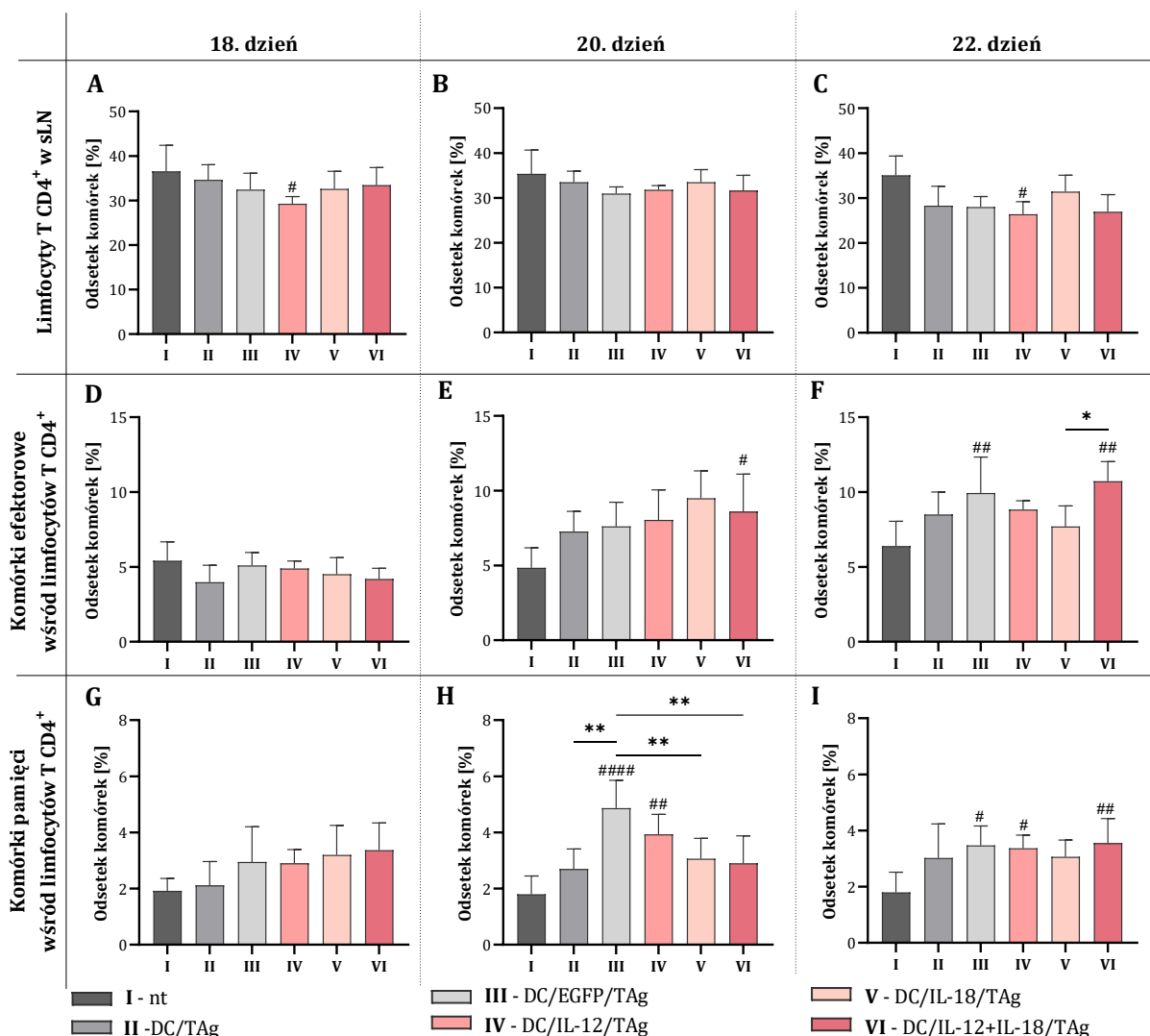
4.2.3.2. *Analiza zmian odsetka komórek limfoidalnych i mieloidalnych w wartowniczych węzłach chłonnych*

Wpływ jednokrotnego podania szczepionkowych komórek dendrytycznych na aktywację komórek odpornościowych w wartowniczych węzłach chłonnych oceniano metodą cytometrii przepływową (Ryc. 23.). Wyodrębniono populacje limfocytów T CD4⁺, limfocytów T CD8⁺, komórek NK i NKT oraz komórek dendrytycznych (DC). Dodatkowo wśród limfocytów T oszacowano odsetek komórek efektorowych i komórek pamięci oraz poziom ekspresji cząsteczek MHC II na powierzchni DC (Ryc. 23).

Wykazano, że okołoguzowe podanie szczepionek, a w szczególności DC/IL-12/TAg, spowodowało obniżenie odsetka limfocytów T CD4⁺ w sLN pobranych 18. dnia doświadczenia, w porównaniu do grupy nietraktowanej (Ryc. 40. A). W kolejnych dniach, niewielkie różnice między poszczególnymi grupami nie uległy zmianie. Jedynie podanie DC/IL-12/TAg spowodowało istotne statystycznie obniżenie odsetka limfocytów T CD4⁺ w sLN w 22. dniu doświadczenia (Ryc. 40. B, C).

Zastosowanie szczepionek nie wpłynęło na zmiany odsetka komórek efektorowych wśród limfocytów T CD4⁺ w sLN pobranych w 18. dniu doświadczenia (Ryc. 40. D). Natomiast w dniach kolejnych pobrań odnotowano zwiększenie odsetka tych komórek w sLN (Ryc. 40. E, F). W 20.

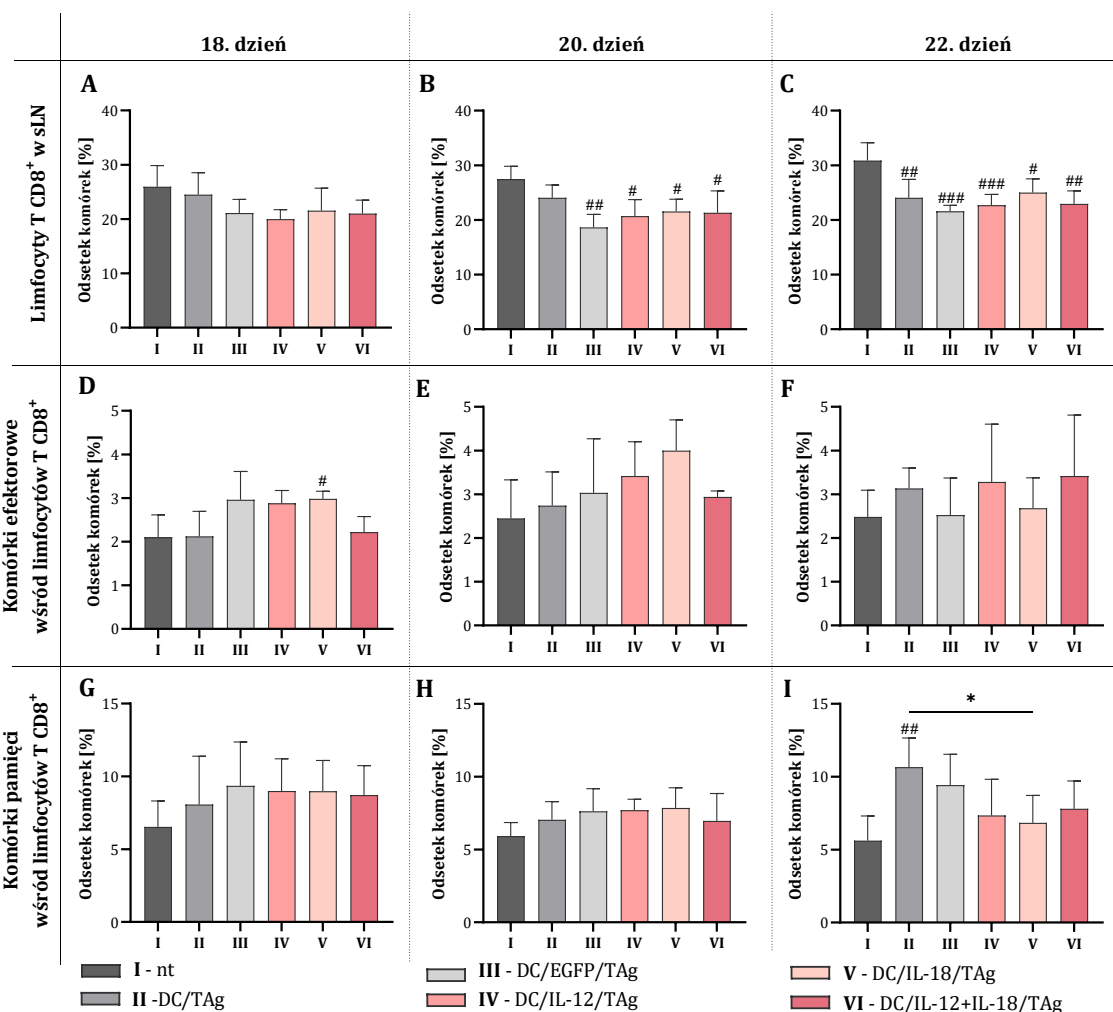
dniu istotny wzrost odsetka komórek T CD4⁺ efektorowych wykazano po podaniu DC/IL-12+IL18/TAg w odniesieniu do grupy nietraktowanej (Ryc. 40. E), a w 22. dniu doświadczenia po podaniu DC/EGFP/TAg oraz DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc. 40. F).



Ryc. 40. Odsetek limfocytów T CD4⁺ w wartowniczych węzłach chłonnych po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi.

Wartownicze węzły chłonne pobierano od myszy w 18. (A, D, G), 20. (B, E, H) i 22. (C, F, I) dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej sLN wyodrębniono populację limfocytów T CD4⁺ oraz oznaczono ekspresję cząsteczek CD62L i CD44 na powierzchni tych komórek. Określono odsetek limfocytów T CD4⁺ wśród leukocytów CD45⁺ (A, B, C), odsetek komórek efektorowych (CD44⁺CD62L^{neg}) (D, E, F) i komórek pamięci (CD44⁺CD62L⁺) (G, H, I) wśród limfocytów T CD4⁺. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa (C) i testu *post hoc* Dunn'a lub parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A, E, F, H). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$ względem grupy nt, * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Zwiększony odsetek limfocytów T CD4⁺ pamięci obserwowano już w 18. dniu doświadczenia, w sLN pobranych od myszy otrzymujących szczepionki, jednak wzrost ten nie był istotny statystycznie w porównaniu do grupy nietraktowanej (Ryc. 40. G). W 20 dniu znaczące zwiększenie odsetka komórek pamięci wśród limfocytów T CD4⁺ stwierdzono u myszy, którym podano DC/EGFP/TAg lub DC/IL-12/TAg (Ryc. 40. H). W 22. dniu doświadczenia okazało się ono statystycznie istotne nie tylko po podaniu DC/EGFP/TAg i DC/IL-12/TAg, lecz również po zastosowaniu DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc. 40. I).



Ryc. 41. Odsetek limfocytów T CD8⁺ w wartowniczych węzłach chłonnych po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi.

Wartownicze węzły chłonne pobierano od myszy w 18. (A, D, G), 20. (B, E, H) i 22. (C, F, I) dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej sLN wyodrębniono populacje limfocytów T CD8⁺ oraz oznaczono ekspresję cząsteczek CD62L i CD44 na powierzchni tych komórek. Określono odsetek limfocytów T CD8⁺ wśród leukocytów CD45⁺ (A, B, C) oraz odsetek komórek efektorowych (CD44⁺CD62L⁻) (D, E, F) i komórek pamięci (CD44⁺CD62L⁺) (G, H, I) wśród limfocytów T CD8⁺. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (B, C, D, I). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$ względem grupy nt, * - $p < 0,05$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

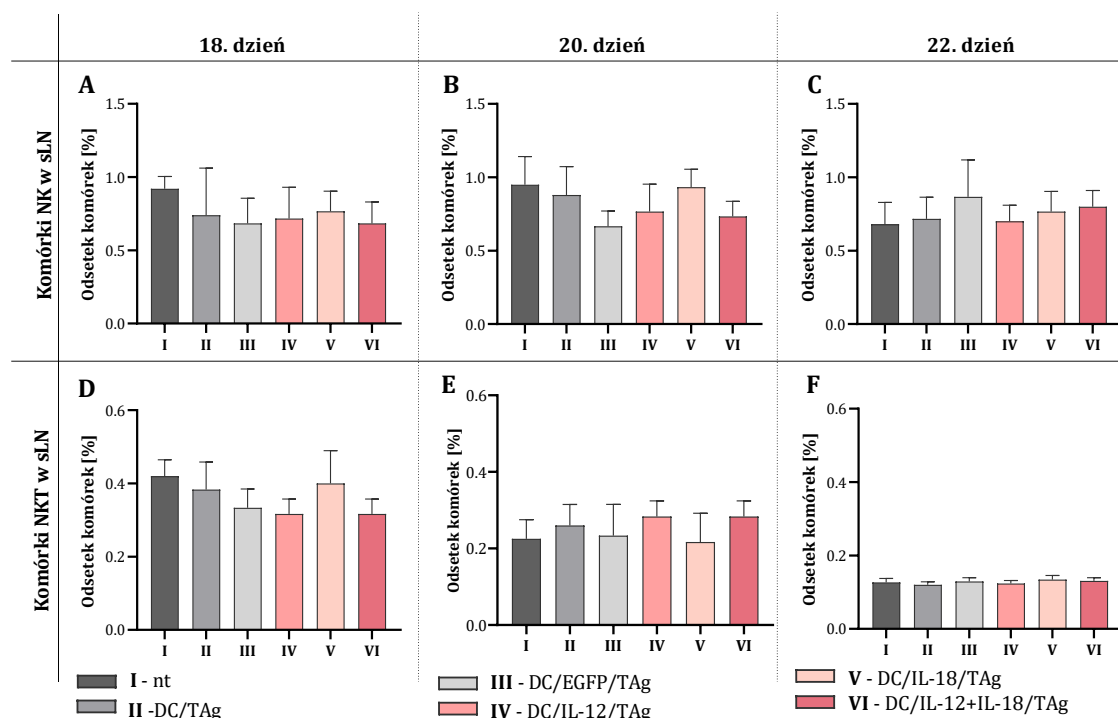
Podobnie jak w przypadku populacji T CD4⁺, podanie DC transdukowanych i stymulowanych TAg spowodowało obniżenie odsetka limfocytów T CD8⁺ w sLN w porównaniu do grupy nietraktowanej, a największy efekt odnotowano już w pierwszym dniu obserwacji po podaniu DC/IL-12/TAg (Ryc. 41. A). Utrzymywał się on w 20. dniu, a znaczące obniżenie odsetka limfocytów T CD8⁺ wykazano w sLN pobranych od myszy otrzymujących transdukowane DC stymulowane TAg. Niemniej jednak najniższy odsetek tych limfocytów zaobserwowano w sLN pobranych od myszy, którym podano DC/EGFP/TAg (Ryc. 41. B). W 22. dniu doświadczenia, znaczące obniżenie udziału procentowego limfocytów T CD8⁺ w sLN wykazano po podaniu każdego rodzaju szczepionek, a w szczególności po zastosowaniu DC/EGFP/TAg (Ryc. 41. C).

Podczas analizy odsetka komórek T CD8⁺ efektorowych w sLN pobranych od myszy w 18. dniu doświadczenia zaobserwowano, że na wzrost wielkości subpopulacji tych komórek w porównaniu do grupy nietraktowanej, wpłynęło zastosowanie szczepionek zawierających DC/EGFP/TAg, DC/IL-12/TAg lub DC/IL-18/TAg (Ryc. 41. D). W dniu kolejnego pobrania, we wszystkich grupach otrzymujących szczepionki komórkowe odnotowano zwiększenie odsetka limfocytów T CD8⁺ efektorowych w sLN, a najwyższą jego wartość wykazano po podaniu DC/IL-18/TAg (Ryc. 41. E). W 22. dniu doświadczenia, zwiększony odsetek komórek efektorowych wśród limfocytów T CD8⁺ w sLN utrzymywał się w grupach traktowanych DC/TAg, DC/IL-12/TAg oraz DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc. 41. F).

Zastosowanie szczepionek wpłynęło na zwiększenie odsetka komórek T CD8⁺ pamięci w sLN, co wykazano już 18. dnia doświadczenia. Dwa dni później zaobserwowano tę samą tendencję (Ryc. 41. H), natomiast 22. dnia w sLN pobranych od myszy traktowanych DC/TAg w porównaniu do grupy nietraktowanej odnotowano znaczący wzrost odsetka komórek T CD8⁺ pamięci (Ryc. 41. I).

W ciągu siedmiu dni w grupach myszy traktowanych nie odnotowano istotnych zmian w odsetku komórek NK i NKT w sLN, który we wszystkich grupach wynosił 0,5-1%. W 18. i 20. dniu, odsetek komórek NK w sLN pobranych od myszy otrzymujących szczepionki komórkowe był niższy niż w grupie nietraktowanej, a najniższą jego wartość wykazano po podaniu DC/EGFP/TAg (Ryc. 42. A, B). Natomiast w dniu ostatniego pobrania, wykazano niewielkie obniżenie odsetka komórek NK w sLN nietraktowanych i traktowanych DC/TAg oraz niewielki wzrost odsetka komórek NK w po podaniu DC/EGFP/TAg (Ryc. 42. C).

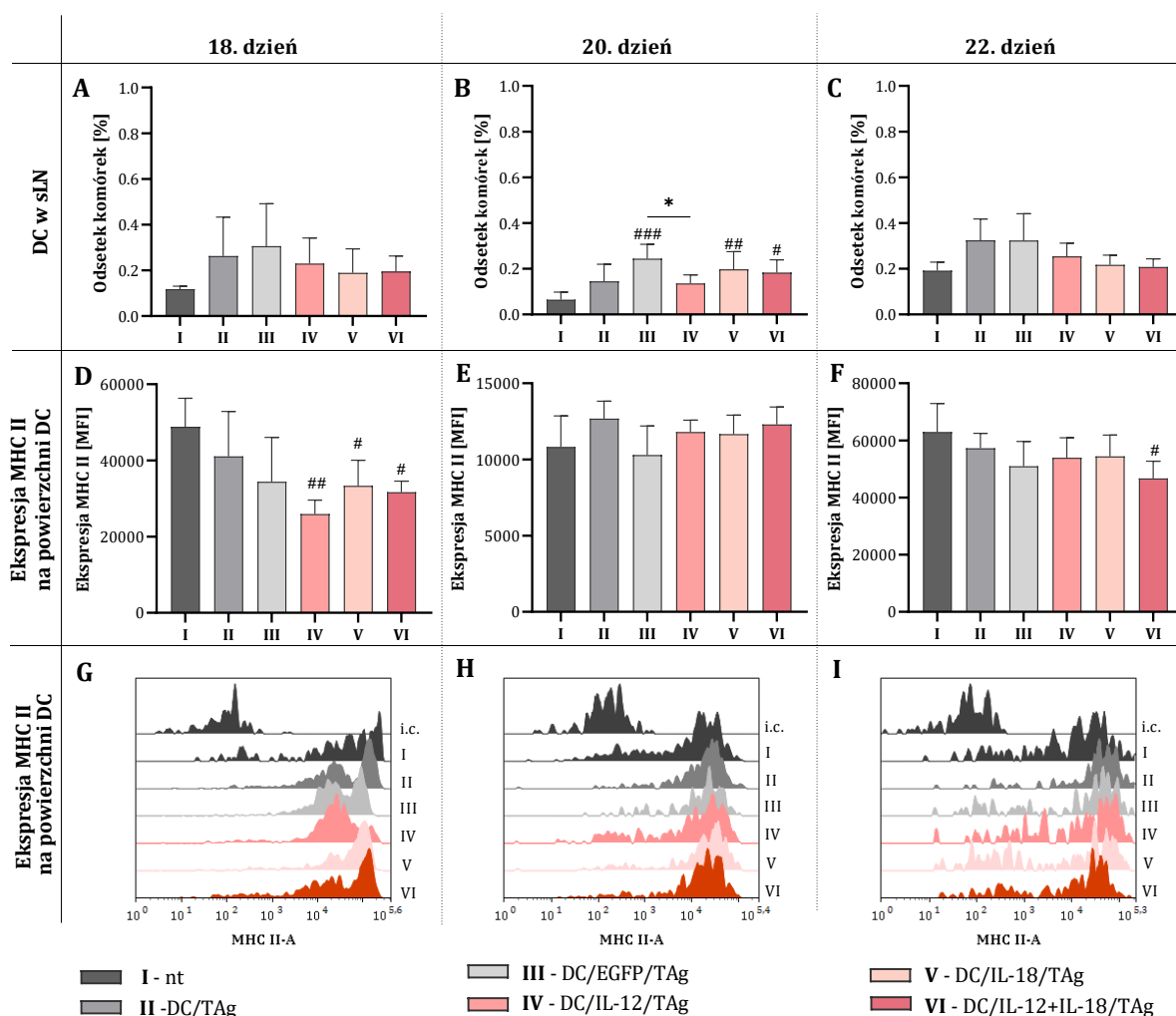
W 18. dniu doświadczenia, odsetek komórek NKT w sLN pobranych od myszy otrzymujących szczepionki komórkowe był niższy niż w grupie nietraktowanej (Ryc. 42. D), w kolejnym dniu pobrania wzrósł po podaniu DC/TAg, DC/IL-12/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc. 42. E). W 22. dniu doświadczenia, niezależnie od rodzaju podanych szczepionek stwierdzono dwukrotne obniżenie odsetka komórek NKT w sLN (Ryc. 42. F).



Ryc. 42. Odsetek komórek NK i NKT w wartowniczych węzłach chłonnych po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi.

Wartownicze węzły chłonne pobierano od myszy w 18. (A, D, G), 20. (B, E, H) i 22. (C, F, I) dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej sLN wyodrębniono populacje komórek NK ($CD4^{\text{neg}}CD8^{\text{neg}}NK1.1^+$) oraz NKT ($CD4^+NK1.1^+$; $CD8^+NK1.1^+$). Określono odsetek komórek NK (A, B, C) oraz NKT (D, E, F) wśród leukocytów $CD45^+$. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$. *nt* – grupa kontrolna nietraktowana

Przeprowadzona analiza cytometryczna wykazała, że komórki dendrytyczne stanowią 0,1-0,3% wśród komórek wyizolowanych z wartowniczych węzłów chłonnych pobranych od myszy traktowanych DC transdukowanymi i stymulowanymi TAg, a obserwowane zmiany były podobne do tych wywołanych podaniem niestymulowanych DC. W 18. dniu doświadczenia, wykazano wzrost odsetka komórek dendrytycznych w grupach otrzymujących szczepionki komórkowe, a ich najwyższy udział procentowy odnotowano po podaniu DC/EGFP/TAg (Ryc. 43. A). Tę samą tendencję zróżnicowania między odsetkami DC zależną od rodzaju komórek szczepionkowych odnotowano w kolejnych dniach pobrań, przy czym jedynie 20. dnia doświadczenia istotne statystycznie zwiększenie wielkości ocenianej populacji DC wykazano po okołoguzowym podaniu DC/EGFP/TAg, DC/IL-18/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc. 43. B, C).



Ryc. 43. Odsetek komórek dendrytycznych w wartowniczych węzłach chłonnych po jednokrotnym podaniu komórek szczepionkowych transdukowanych genami cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi.

Wartownicze węzły chłonne pobierano od myszy w 18. (A, D, G), 20. (B, E, H) i 22. (C, F, I) dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej wśród komórek DAPI^{neg}CD45⁺ zidentyfikowano komórki mieloidalne CD11b⁺, a wśród nich wyodrębniono populację komórek dendrytycznych (CD11c⁺F4/80^{int}), a także określono poziom ekspresji cząsteczek MHC II na powierzchni DC. Określono odsetek komórek DC (A, B, C) oraz średnią intensywność fluorescencji cząsteczek MHC II na powierzchni DC (D, E, F, G, H, I). Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (B, D, F). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których p<0,05 (# - p<0,05; ## - p<0,01; ### - p<0,001 względem grupy nt, * - p<0,05 pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Komórki dendrytyczne oznaczone w wartowniczych węzłach chłonnych pobranych 18. dnia doświadczenia od myszy otrzymujących komórki szczepionkowe produkujące cytokiny charakteryzowały się znacznie niższą ekspresją cząsteczek MHC II (Ryc. 43. D, G). W dniu kolejnego pobrania nie obserwowano zmian w ekspresji cząsteczek MHC II na powierzchni DC (Ryc. 43. E, H), lecz w 22. dniu doświadczenia istotnie statystycznie obniżenie ekspresji MHC II na powierzchni DC wykazano jedynie po podaniu DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc. 43. F, I).

Podsumowując, jednokrotne, okołoguzowe podanie szczepionek na bazie transdukowanych DC stymulowanych TAg znacząco wpłynęło na obniżenie odsetka limfocytów T CD4⁺ oraz limfocytów T CD8⁺ w sLN już po 3 dniach. Ponadto podanie komórek szczepionkowych wpłynęło na wzrost poziomu aktywacji limfocytów, natomiast nie spowodowało istotnego wpływu na zmiany odsetka komórek NK i NKT. Co więcej, w wyniku zastosowania komórek szczepionkowych stymulowanych TAg, odsetek komórek dendrytycznych w sLN uległ podwyższeniu, a efekt ten utrzymywał się do końca trwania doświadczenia. Komórki te charakteryzowały się obniżoną ekspresją cząsteczek MHC II.

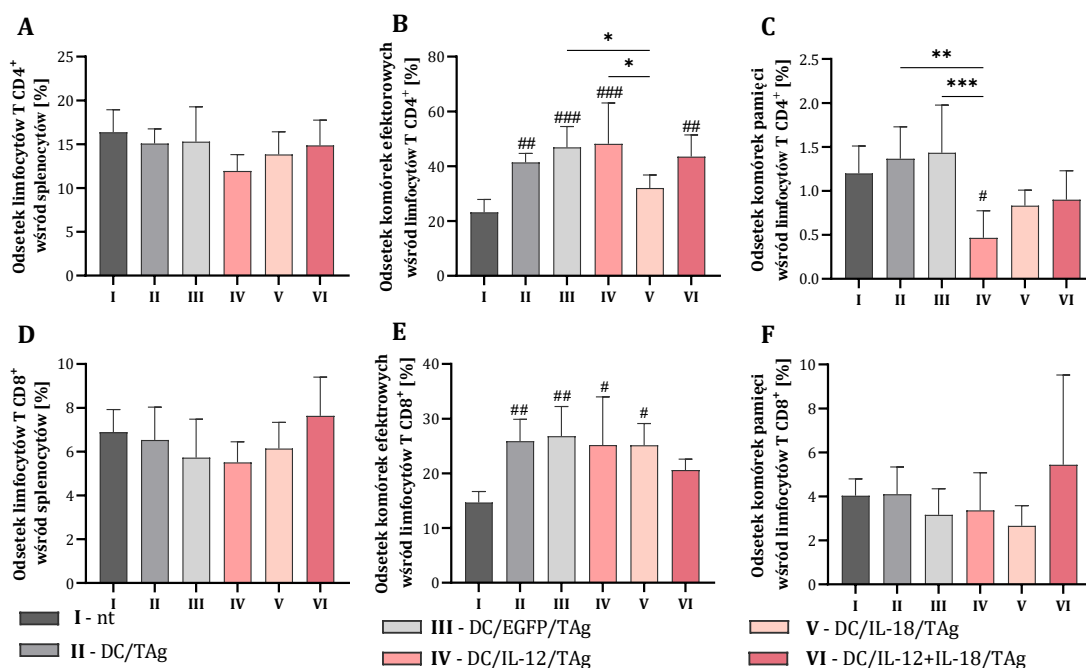
4.2.3.3. *Analiza zmian odsetka komórek limfoidalnych i mieloidalnych w śledzionie*

W celu określenia wpływu jednokrotnego podania komórek dendrytycznych transdukowanych do produkcji IL-12 i/lub IL-18 i stymulowanych antygenami nowotworowymi na aktywację ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej dokonano analizy aktywności i fenotypu komórek śledzionowych. Ze względu na czas rozwoju swoistej odpowiedzi ogólnoustrojowej ocenie poddano komórki śledzionowe pobrane od myszy w 22. dniu doświadczenia. Wśród komórek śledzionowych wyodrębniono populacje limfocytów T CD4⁺ oraz limfocytów T CD8⁺, a wśród nich oszacowano odsetek komórek efektorowych i komórek pamięci. Dodatkowo wyznaczono odsetek komórek dendrytycznych oraz poziom ekspresji cząsteczek MHCII na ich powierzchni (Ryc. 23). Poziom aktywacji restymulowanych komórek śledzionowych określono w oparciu o ich zdolność do produkcji cytokin oraz ich aktywność cytotoksyczną wobec komórek nowotworowych MC38.

Zastosowanie szczepionek nie wpłynęło znacząco na zmiany odsetka limfocytów T CD4⁺ wśród splenocytów, którego najwyższa wartość została odnotowana w grupie nietraktowanej, a najniższa po podaniu DC/IL-12/TAg (Ryc. 44. A). Natomiast podanie DC/TAg, DC/EGFP/TAg, DC/IL-12/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg wywołało statystycznie istotne zwiększenie odsetka komórek efektorowych wśród tych limfocytów (Ryc. 44. B) i był on ponad 2-rotnie wyższy po podaniu DC/IL-12/TAg, i jedynie nieco wyższy po zastosowaniu DC/IL-18/TAg. Z drugiej strony, zastosowanie komórek szczepionkowych wydzielających cytokiny, a szczególnie DC/IL-12/TAg, spowodowało znaczne obniżenie odsetka komórek pamięci wśród limfocytów T CD4⁺ (Ryc. 44. C).

Oceniając wielkość populacji limfocytów T CD8⁺ wśród splenocytów, nie wykazano znaczących zmian ich liczebności (Ryc. 44. D). Najwyższy odsetek tych komórek odnotowano po podaniu DC/IL-12+IL-18/TAg, a najniższy po szczepieniu DC/IL-12/TAg. Jednak podanie szczepionek takich jak DC/TAg, DC/EGFP/TAg, DC/IL-12/TAg lub DC/IL-18/TAg znacząco wpłynęło na wzrost odsetka komórek efektorowych wśród splenocytów T CD8⁺ w odniesieniu do kontroli nietraktowanej (Ryc. 44. E). Z drugiej strony, podanie DC/EGFP/TAg, DC/IL-12/TAg lub

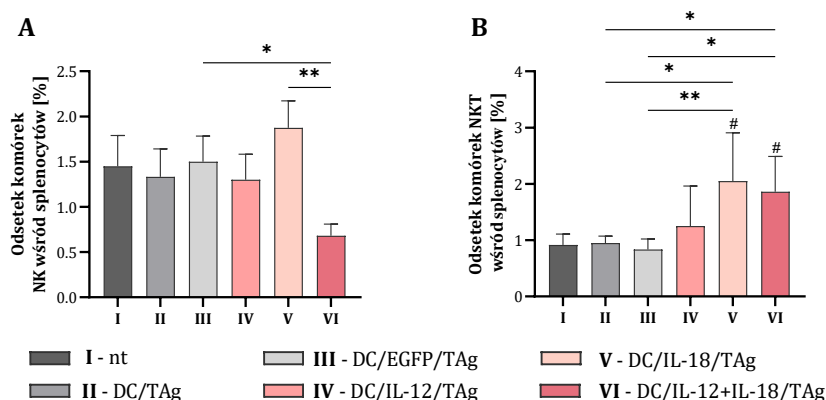
DC/IL-18/TAg spowodowało obniżenie odsetka komórek pamięci wśród limfocytów T CD8⁺ (Ryc. 44. F). Ocena efektu działania w przypadku grupy DC/IL-12+IL-18/TAg okazała się trudna do zinterpretowania ze względu na duży rozrzut danych.



Ryc. 44. Odsetek limfocytów T CD4⁺ i limfocytów T CD8⁺ wśród splenocytów pozyskanych od myszy po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi.

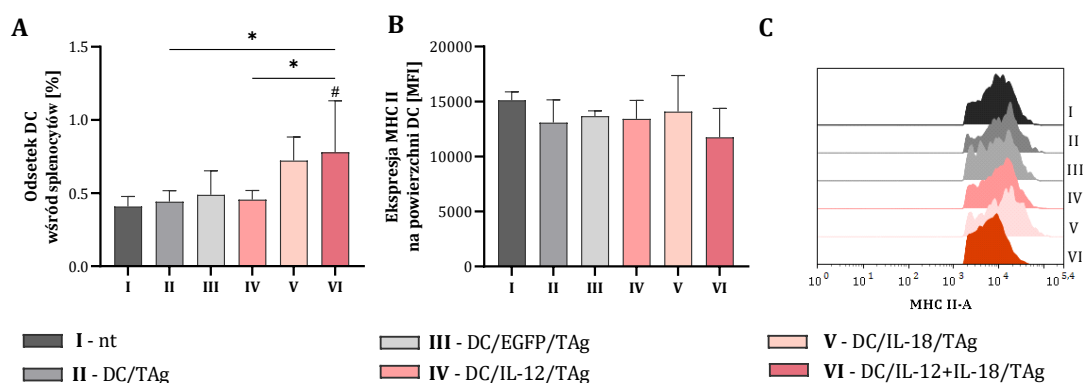
Śledziony pobrano od myszy w 22. dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej komórek śledzionowych wyodrębniono populacje limfocytów T CD4⁺ oraz limfocytów T CD8⁺ oraz oznaczono ekspresję cząsteczek CD62L i CD44 na powierzchni tych komórek. Określono odsetek limfocytów T CD4⁺ (A) oraz limfocytów T CD8⁺ (D) wśród splenocytów oraz odsetek komórek efektorowych (CD44⁺CD62L^{neg}) (B, E) i komórek pamięci (CD44⁺CD62L⁺) (C, F) wśród limfocytów T CD4⁺ oraz limfocytów T CD8⁺. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (B, C, E). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których p < 0,05 (# - p < 0,05; ## - p < 0,01; ### - p < 0,001; #### - p < 0,0001 względem grupy nt, * - p < 0,05 pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Analiza wielkości populacji komórek NK wśród splenocytów wykazała obniżenie odsetka tych komórek w grupach myszy traktowanych DC/TAg, DC/IL-12/TAg, a w szczególności po podaniu DC/IL-12+IL-18/TAg, jednak zmiany te nie były istotne statystycznie w odniesieniu do grupy nietraktowanej (Ryc. 45. A). Natomiast podczas analizy odsetka komórek NKT odnotowano istotny statystycznie wzrost udziału procentowego tych komórek po podaniu DC/IL-18/TAg oraz DC/IL-12+IL-18/TAg w porównaniu do wszystkich grup kontrolnych (nt, DC/TAg, DC/EGFP/TAg) (Ryc. 45. B).



Ryc. 45. Odsetek komórek NK i NKT wśród splenocytów uzyskanych od myszy po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi.

Śledziony pobrano od myszy w 22. dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej komórek śledzionowych wyodrębniono populacje komórek NK i NKT. Określono odsetek komórek NK (A) oraz komórek NKT (B) wśród splenocytów. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallis i testu *post hoc* Dunn'a (A) lub parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (B). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$ względem grupy nt; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana



Ryc. 46. Odsetek komórek dendrytycznych oraz stopień ich pobudzenia wśród splenocytów pobranych od myszy po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi.

Śledziony pobrano od myszy w 22. dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej wśród komórek DAPI^{neg}CD45⁺ zidentyfikowano komórki mieloidalne CD11b⁺, a wśród nich wyodrębniono populację komórek dendrytycznych (CD11c⁺F4/80^{int}), a także określono poziom ekspresji cząsteczek MHC II na powierzchni DC. Określono odsetek komórek DC (A) oraz średnią intensywność fluorescencji cząsteczek MHCII (B, C) na powierzchni tych komórek. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Na histogramach przedstawiono dane z prób reprezentatywnych. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$ względem grupy nt; * - $p < 0,05$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Ocena wielkości populacji komórek dendrytycznych uzyskanych ze śledzion oraz stopnia ich pobudzenia wykazała istotny wzrost odsetka tych komórek po podaniu szczepionek

zawierających DC/IL-12+IL-18/TA_g w porównaniu do grupy nietraktowanej (Ryc. 46. A). Komórki dendrytyczne wyodrębnione spośród splenocytów pobranych od myszy traktowanych szczepionkami komórkowymi charakteryzowały się obniżoną, w porównaniu do kontroli nietraktowanej, ekspresją cząsteczek MHC II, w szczególności po podaniu DC/IL-12+IL-18/TA_g (Ryc. 46. B).

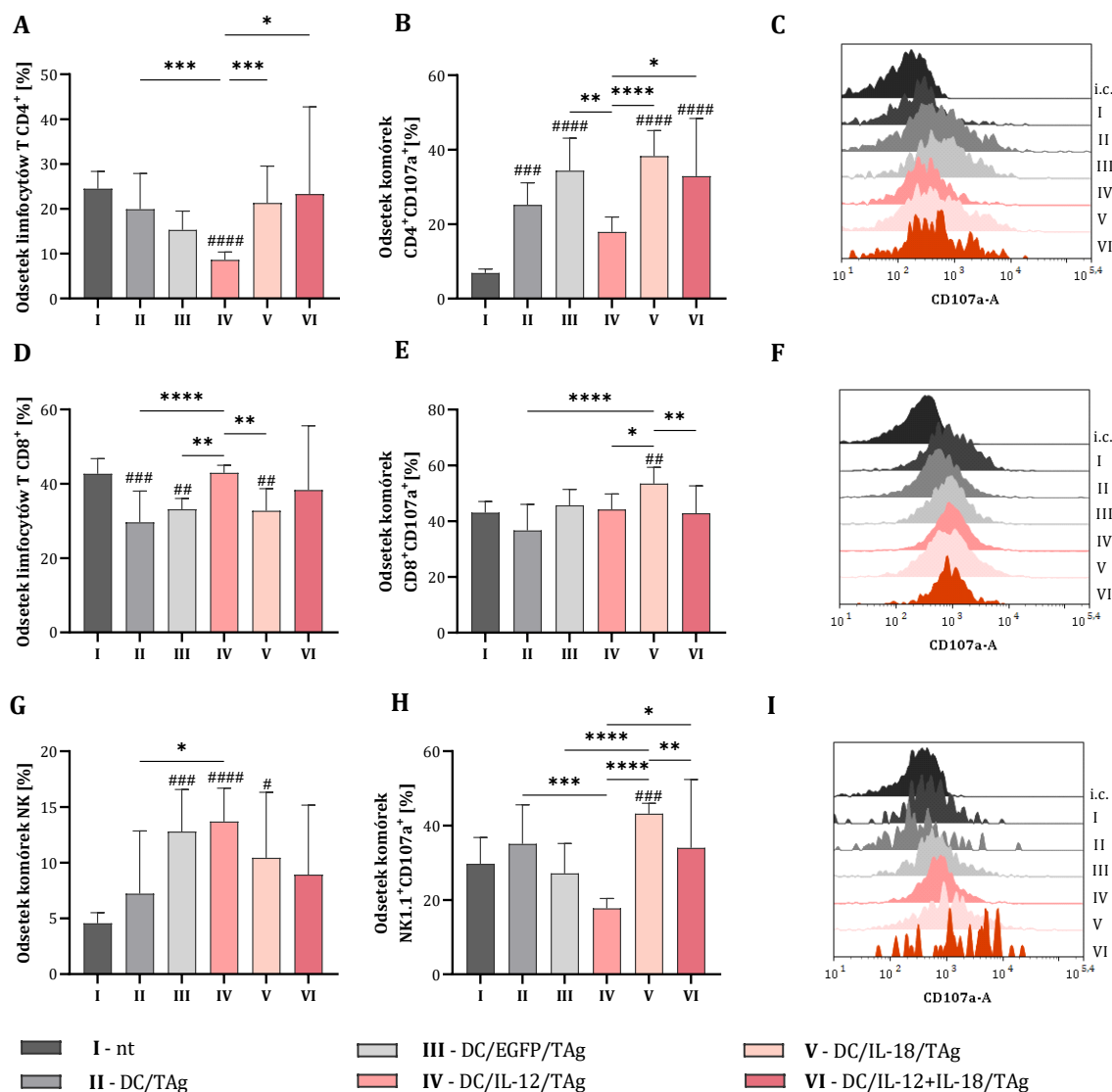
4.2.3.3.1. Aktywność restymulowanych splenocytów

Podobnie jak opisano w podrozdziale 4.2.2.3.2., aby ocenić zmiany w ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej, oznaczono aktywność restymulowanych komórek śledzionowych na podstawie zmian w wielkości populacji limfocytów T CD4⁺, T CD8⁺ oraz komórek NK, ekspresji powierzchniowych cząsteczek CD107a, a także zdolności restymulowanych splenocytów do zabijania komórek docelowych MC38 i profilu produkowanych cytokin.

Analiza zmian liczebności limfocytów T CD4⁺ wśród restymulowanych komórek śledzionowych wykazała obniżenie odsetka tych komórek po podaniu szczepionek, a w szczególności po zastosowaniu DC/IL-12/TA_g, w porównaniu do grupy nietraktowanej (Ryc. 47. A). Towarzyszył mu znaczący wzrost odsetka komórek zdolnych do wydzielania ziaren cytotoxicytnych wśród restymulowanych limfocytów T CD4⁺ pobranych od myszy traktowanych DC/TA_g, DC/EGFP/TA_g, DC/IL-18/TA_g lub DC/IL-12+IL-18/TA_g (Ryc. 47. B).

Zastosowanie DC/TA_g, DC/EGFP/TA_g lub DC/IL-18/TA_g wpłynęło na znaczne obniżenie odsetka limfocytów T CD8⁺ wśród restymulowanych splenocytów (Ryc. 47. D). Jednak ocena ekspresji cząsteczki CD107a na powierzchni limfocytów T CD8⁺ wykazała istotny wzrost odsetka limfocytów T CD8⁺CD107a⁺ po podaniu DC/IL-18/TA_g w porównaniu do grupy nietraktowanej (Ryc. 47. E).

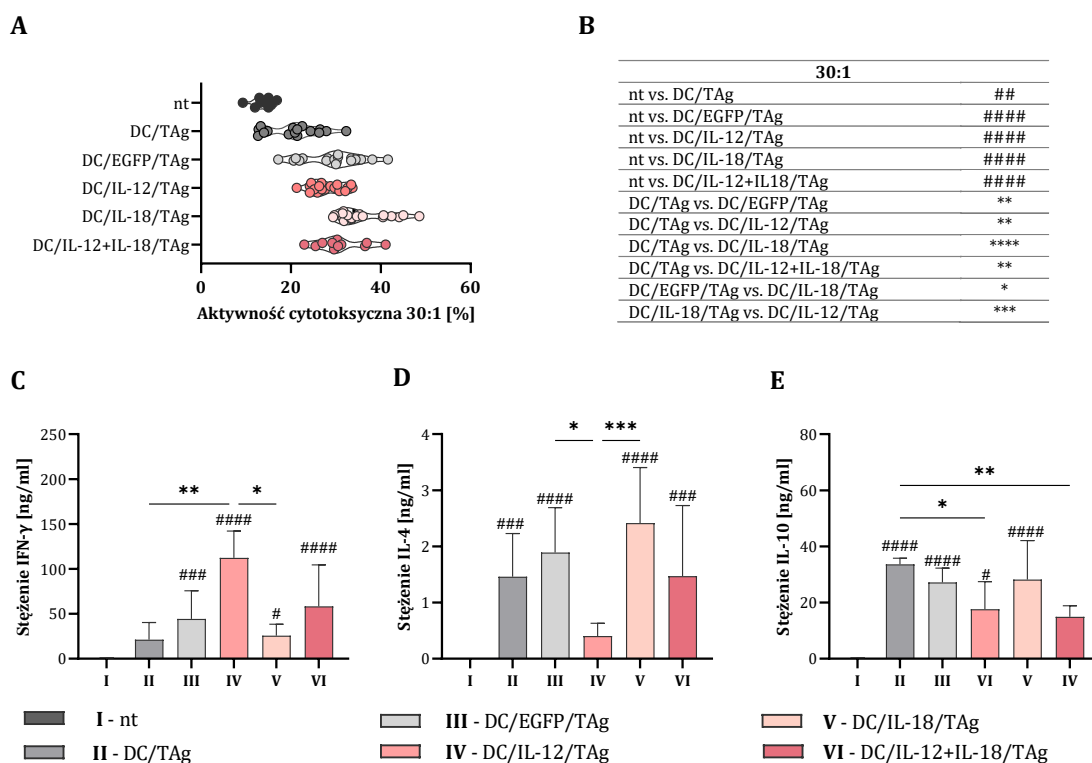
Kolejną populacją ocenianą wśród restymulowanych splenocytów były komórki NK. Wykazano znaczące zwiększenie odsetka tych komórek po podaniu DC/EGFP/TA_g, DC/IL-12/TA_g lub DC/IL-18/TA_g w porównaniu do restymulowanych splenocytów pobranych od myszy nietraktowanych (Ryc. 47. G). Największą zdolność do wydzielania ziaren cytotoxicytnych wykazywały komórki NK wyodrębnione spośród restymulowanych splenocytów pobranych od myszy traktowanych DC/IL-18/TA_g (Ryc. 47. H).



Ryc. 47. Odsetek limfocytów T CD4⁺, T CD8⁺ oraz komórek NK wśród restymulowanych splenocytów otrzymanych od myszy po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi.

Śledziony pobrano od myszy w 22. dniu doświadczenia. Restymulowane splenocyty inkubowano z komórkami nowotworowymi MC38 przez 2 godziny. Po tym czasie określono odsetek limfocytów T CD4⁺ (A), T CD8⁺ (D) oraz komórek NK (G) wśród restymulowanych splenocytów oraz odsetek komórek zdolnych do wydzielania ziaren cytotoksycznych (CD107a⁺) wśród tych komórek (B, C, E, F, H, I). Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Na histogramach przedstawiono dane z prób reprezentatywnych. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunn'a (A, B, D, E, G, H). Za istotnie statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$; #### - $p < 0,0001$ względem grupy nt; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Restymulowane splenocyty pochodzące od myszy z grup traktowanych szczepionkami komórkowymi, a szczególnie po podaniu DC/IL-18/TAG, charakteryzowały się znacznie wyższą aktywnością cytotoksyczną wobec komórek docelowych MC38 w porównaniu do splenocytów pobranych od myszy nietraktowanych (Ryc. 48. A, B).



Ryc. 48. Wpływ jednokrotnego podania komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi na zmiany aktywności restymulowanych splenocytów.

Aktywność cytotoksyczną restymulowanych komórek śledzionowych oceniono na podstawie odsetka martwych komórek nowotworowych MC38 po 4-godzinnej hodowli z komórkami efektorowymi w stosunku 1:30 (A, B). Stężenie IFN- γ (C), IL-4 (D) oraz IL-10 (E) sprawdzono w nadsączach znad 5-dniowej mieszanej hodowli splenocytów z komórkami nowotworowymi MC38. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 6-7 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallis (C, D, E) i testu *post hoc* Dunn'a lub parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A, B). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$; #### - $p < 0,0001$ względem grupy nt; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Komórki śledzionowe z mieszanej hodowli, uzyskane od myszy po podaniu DC transdukowanych i stymulowanych TAG, charakteryzowały się zwiększoną zdolnością do produkcji IFN- γ w porównaniu do splenocytów pobranych od myszy nietraktowanych lub otrzymujących DC/TAG (Ryc. 33. C). Najwyższe stężenie IFN- γ wykazano w nadsączach znad hodowli komórek nowotworowych MC38 oraz komórek śledzionowych pobranych od myszy szczepionych DC/IL-12/TAG. Natomiast zwiększoną zdolnością do produkcji IL-4 charakteryzowały się komórki śledzionowe pobrane od myszy otrzymujących DC/TAG, DC/EGFP/TAG, DC/IL-18/TAG lub DC/IL-12+IL-18/TAG w porównaniu do splenocytów pobranych od myszy nietraktowanych (Ryc. 48. E). Najwyższe stężenie IL-4 wykazano w nadsączach znad mieszanej hodowli komórek MC38 oraz splenocytów pobranych od myszy po podaniu DC/IL-18/TAG. Co więcej, komórki śledzionowe pobrane od wszystkich myszy otrzymujących szczepionki komórkowe, charakteryzowały się zdolnością do produkcji IL-10 w porównaniu do splenocytów pobranych od

myszy nietraktowanych (Ryc. 48. F). Najwyższe stężenie IL-10 wykazano w nadsączach z nad mieszanej hodowli komórek MC38 oraz komórek śledzionowych pobranych od myszy po podaniu DC/TAg.

Podsumowując, największy wpływ na zmiany odsetka komórek limfoidalnych w śledzionach, tak samo jak w przypadku komórek szczepionkowych niestymulowanych TAg, wykazano po podaniu DC/IL-12+IL-18/TAg. Zastosowanie tej szczepionki nie miało wpływu na zmiany w udziale procentowym obu populacji limfocytów T, ale znacząco zwiększyło odsetek komórek efektorowych wśród tych limfocytów. Ponadto po podaniu DC/IL-12+IL-18/TAg, wykazano istotne statystycznie obniżenie odsetka komórek NK i wzrost odsetka komórek dendrytycznych. Komórki szczepionkowe produkujące obie cytokiny okazały się mniej wydajne w pobudzaniu splenocytów od DC produkujących jedną cytokinę. DC/IL-18/TAg charakteryzowały się największą zdolnością do pobudzenia aktywności cytotoksycznej splenocytów. Natomiast najwyższa produkcja IFN- γ przez aktywowane splenocyty była stymulowana przez DC/IL-12/TAg, produkcja IL-4 – przez DC/IL-18/TAg, a produkcja IL-10 – przez DC/TAg.

4.2.4. Porównanie skuteczności działania szczepionek

W celu porównania efektu działania komórek szczepionkowych niestymulowanych (**transdukowanych DC**) i stymulowanych antygenami nowotworowymi (**modyfikowanych DC**) sporządzono poniższe tabele. Ze względu na to, że największe zmiany w wielkości badanych populacji leukocytów w pozyskanych tkankach i narządach wykazano 7 dni po jednokrotnym podaniu szczepionek (w 22. dniu doświadczeń), w tabelach przedstawiono średnie z wartości odsetka leukocytów oznaczone w dniu ostatniego pobrania.

W tabelach (Tabela 17; Tabela 18) porównano odsetek leukocytów naciekających guzy MC38 w odpowiedzi na podanie komórek szczepionkowych. Zaobserwowano zwiększenie odsetka leukocytów, w szczególności po podaniu DC/IL-12/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg, a wśród nich zwiększenie udziału procentowego limfocytów T CD8⁺. Nie wykazano natomiast istotnego wpływu podania szczepionek na zmiany odsetka limfocytów T CD4⁺ i komórek NK. Wzmocnienie efektu działania komórek szczepionkowych poprzez ich stymulację antygenową powodowało obniżenie wielkości nacieku DC i TAM do tkanki guzów.

Tabela 17. Średni odsetek komórek w guzach MC38 pobranych od myszy 7 dni po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin.

22. dzień doświadczenia		Tkanka nowotworowa MC38				
Grupy badane	CD45+[%]	CD4+[%]	CD8+[%]	NK [%]	DC [%]	TAM [%]
nt	1,89	16,94	11,70	7,03	6,97	31,94
DC	1,92	26,23	11,05	5,71	5,32	25,49
DC/EGFP	1,15	28,09	8,70	6,06	5,59	25,49
DC/IL-12	1,10	26,56	14,11	7,02	5,86	20,55
DC/IL-18	2,11	29,89	9,09	8,86	3,36	19,58
DC/IL-12+IL-18	1,71	23,74	9,52	4,76	4,71	19,69

Kolorem czerwonym wyróżniono najmniejszą wartość odsetka w danej populacji, natomiast kolorem zielonym największą z wartości. nt – grupa kontrolna nietraktowana

Tabela 18. Średni odsetek komórek w guzach MC38 pobranych od myszy 7 dni po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi (modyfikowanych DC).

22. dzień doświadczenia		Tkanka nowotworowa MC38				
Grupy badane	CD45+[%]	CD4+[%]	CD8+[%]	NK [%]	DC [%]	TAM [%]
nt	1,70	13,74	8,33	5,03	9,55	49,27
DC/TAg	2,26	21,20	17,14	4,12	6,05 [#]	36,60
DC/EGFP/TAg	2,63	24,24	15,98	5,10	5,30 ^{##}	27,78
DC/IL-12/TAg	3,72 [#]	21,98	20,89 [#]	5,57	5,52 [#]	30,28
DC/IL-18/TAg	2,02	22,16	8,94	4,80	6,38 [#]	34,21
DC/IL-12+IL-18/TAg	3,94 ^{##}	22,91	22,55 ^{##}	4,55	4,72 ^{##}	23,88

Kolorem czerwonym wyróżniono najmniejszą wartość odsetka w danej populacji, natomiast kolorem zielonym największą z wartości. Symbolem # oznaczono zmiany istotne statystycznie w odniesieniu do grupy nietraktowanej. Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$; #### - $p < 0,0001$). nt – grupa kontrolna nietraktowana

W kolejnych tabelach (Tabela 19; Tabela 20) zebrano średnie wartości z odsetka komórek limfoidalnych i mieloidalnych w wartowniczych węzłach chłonnych, pobranych 7 dni po zastosowaniu szczepionek. Stwierdzono znaczące obniżenie odsetka limfocytów T CD4⁺ po podaniu DC/IL-12/TAg oraz udziału procentowego limfocytów T CD8⁺ po podaniu wszystkich rodzajów komórek szczepionkowych stymulowanych TAg, czego nie obserwowano po podaniu transdukowanych DC. Co więcej, stymulacja antygenowa wpłynęła na zwiększenie odsetka komórek efektorowych wśród tych limfocytów (Ryc. 40.; Ryc. 41.). Ponadto nie odnotowano zmian odsetka komórek NK i DC po podaniu szczepionek.

Tabela 19. Średni odsetek komórek w wartowniczych węzłach chłonnych pobranych od myszy 7 dni po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin.

22. dzień doświadczenia		Wartownicze węzły chłonne			
Grupy badane	CD4+[%]	CD8+[%]	NK [%]	DC [%]	
nt	33,30	28,90	0,93	0,10	
DC	36,73	26,04	0,88	0,17	
DC/EGFP	30,16	26,04	0,84	0,11	
DC/IL-12	30,66	23,42	0,73	0,14	
DC/IL-18	25,84	24,75	0,80	0,09	
DC/IL-12+IL-18	31,96	24,26	0,54 [#]	0,08	

Kolorem czerwonym wyróżniono najmniejszą wartość odsetka w danej populacji, natomiast kolorem zielonym największą z wartości. Symbolem # oznaczono zmiany istotne statystycznie w odniesieniu do grupy nietraktowanej. Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$; #### - $p < 0,0001$). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Tabela 20. Średni odsetek komórek w wartowniczych węzłach chłonnych pobranych od myszy 7 dni po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi (modyfikowanych DC).

22. dzień doświadczenia		Wartownicze węzły chłonne			
Grupy badane	CD4+[%]	CD8+[%]	NK [%]	DC [%]	
nt	35,08	30,88	0,68	0,19	
DC/TAg	28,28	24,08 ^{##}	0,72	0,32	
DC/EGFP/TAg	28,00	21,58 ^{###}	0,87	0,32	
DC/IL-12/TAg	26,38 [#]	22,72 ^{###}	0,70	0,25	
DC/IL-18/TAg	31,45	25,02 [#]	0,77	0,22	
DC/IL-12+IL-18/TAg	26,95	22,94 ^{##}	0,80	0,21	

Kolorem czerwonym wyróżniono najmniejszą wartość odsetka w danej populacji, natomiast kolorem zielonym największą z wartości. Symbolem # oznaczono zmiany istotne statystycznie w odniesieniu do grupy nietraktowanej. Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$; #### - $p < 0,0001$). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Średnie wartości z odsetka w wybranych subpopulacjach splenocytów przedstawiono w Tabeli 21 i Tabeli 22. Największy wpływ na zmiany udziału procentowego komórek limfoidalnych w śledzionach wykazano po zastosowaniu szczepionek na bazie DC/IL-12+IL-18. Po podaniu tych komórek odnotowano zwiększenie odsetka limfocytów T CD4⁺ oraz CD8⁺, chociaż nie stwierdzono zwiększonego stopnia ich aktywacji (Ryc. 29.). Tymczasem stymulacja DC/IL-12+IL-18 antygenami nowotworowymi nie miała wpływu na zmiany odsetka obu populacji limfocytów T, ale znacząco zwiększyła odsetek komórek efektorowych wśród limfocytów T CD4⁺, w porównaniu do kontroli nietraktowanej (Ryc. 44.). Ponadto po podaniu DC/IL-12+IL-18, podobnie jak DC/IL-12+IL-18/TAg wykazano obniżenie odsetka komórek NK w śledzionach oraz wzrost odsetka komórek DC. W przypadku restymulowanych splenocytów, po podaniu DC/IL-12+IL-18 obserwowano wzrost udziału procentowego limfocytów T CD4⁺ i zmniejszenie wielkości populacji komórek NK, przy jednoczesnym wzroście odsetka komórek NK CD107a⁺.

Z drugiej strony, antygenowa stymulacja tych komórek szczepionkowych nie wpłynęła na zmiany odsetka restymulowanych splenocytów zwiększając jedynie udział procentowy limfocytów T CD4⁺CD107a⁺. Natomiast po zastosowaniu DC/IL-12/TAg lub DC/IL-18/TAg odnotowano zwiększenie odsetka komórek NK. Ta ostatnia szczepionka, generowała również zdolność restymulowanych splenocytów do wydzielania ziaren cytotoxicytnych.

Tabela 21. Zmiany fenotypowe i funkcjonalne splenocytów pobranych od myszy 7 dni po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin.

22. dzień doświadczenia	Komórki śledzionowe				Restymulowane komórki śledzionowe				
	CD4 ⁺ [%]	CD8 ⁺ [%]	NK [%]	DC [%]	CD4 ⁺ [%]	CD8 ⁺ [%]	NK [%]	Akt. cyt. [%]	IFN-γ [ng/ml]
nt	20,69	9,87	2,43	0,43	6,80	39,16	25,78	10,51	20,29
DC	26,32	10,80	2,23	0,68	8,18	34,18	15,06 ###	23,84 ####	54,20
DC/EGFP	27,26	11,04	2,28	0,68	12,32	40,90	17,60 ##	21,94 ####	53,87
DC/IL-12	23,47	8,31	2,00	0,80 ##	8,18	40,92	18,18 ####	30,84 ####	128,80 ##
DC/IL-18	20,91	10,42	2,35	0,58	6,72	43,64	13,00 ##	23,03 ####	30,93
DC/IL-12+IL-18	38,53 ###	14,40 #	1,57 ##	0,89 ###	21,84 ##	26,42	11,62 ####	22,04 ####	39,44

Kolorem czerwonym wyróżniono najmniejszą wartość odsetka w danej populacji, natomiast kolorem zielonym największą z wartości. Symbolem # oznaczono zmiany istotne statystycznie w odniesieniu do grupy nietraktowanej. Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$; #### - $p < 0,0001$). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Tabela 22. Zmiany fenotypowe i funkcjonalne splenocytów pobranych od myszy 7 dni po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi (modyfikowanych DC).

22. dzień doświadczenia	Komórki śledzionowe				Restymulowane komórki śledzionowe				
	CD4 ⁺ [%]	CD8 ⁺ [%]	NK [%]	DC [%]	CD4 ⁺ [%]	CD8 ⁺ [%]	NK [%]	Akt. cyt. [%]	IFN-γ [ng/ml]
nt	16,38	6,89	1,45	0,41	24,48	42,70	4,56	13,82	0,57
DC/TAg	15,07	6,53	1,33	0,44	19,92	29,67 ###	7,23	20,71 ##	21,57
DC/EGFP/TAg	15,28	5,73	1,50	0,49	15,31	33,14 ##	12,79 ###	29,27 ####	47,47 ###
DC/IL-12/TAg	11,95	5,51	1,30	0,46	8,61 ###	42,94	13,70 ####	28,02 ####	109,09 ####
DC/IL-18/TAg	13,83	6,14	1,88	0,72	21,32	32,76 ##	10,44 #	36,23 ####	23,50 #
DC/IL-12+IL-18/TAg	14,87	7,63	0,68	0,78 #	23,29	38,36	8,93	30,98 ####	59,85 ####

Kolorem czerwonym wyróżniono najmniejszą wartość odsetka w danej populacji, natomiast kolorem zielonym największą z wartości. Symbolem # oznaczono zmiany istotne statystycznie w odniesieniu do grupy nietraktowanej. Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$; #### - $p < 0,0001$). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Tak więc, wszystkie rodzaje modyfikowanych DC wydzielających cytokiny wpływały na miejscową reakcję przeciwko rosnącemu nowotworowi, co było najbardziej widoczne w nacieku

leukocytów do tkanki guzów. Co więcej, obserwowane w 7 dniu po podaniu szczepionek na bazie modyfikowanych DC, zwiększenie udziału procentowego limfocytów T efektorowych, może świadczyć o aktywacji reakcji ogólnoustrojowej. Jednokrotnie podanie tych szczepionek okazało się jednak niewystarczające do skutecznego pobudzenia ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej. W związku z powyższym do doświadczeń terapeutycznych wybrano komórki szczepionkowe stymulowane antygenami nowotworowymi (modyfikowane DC).

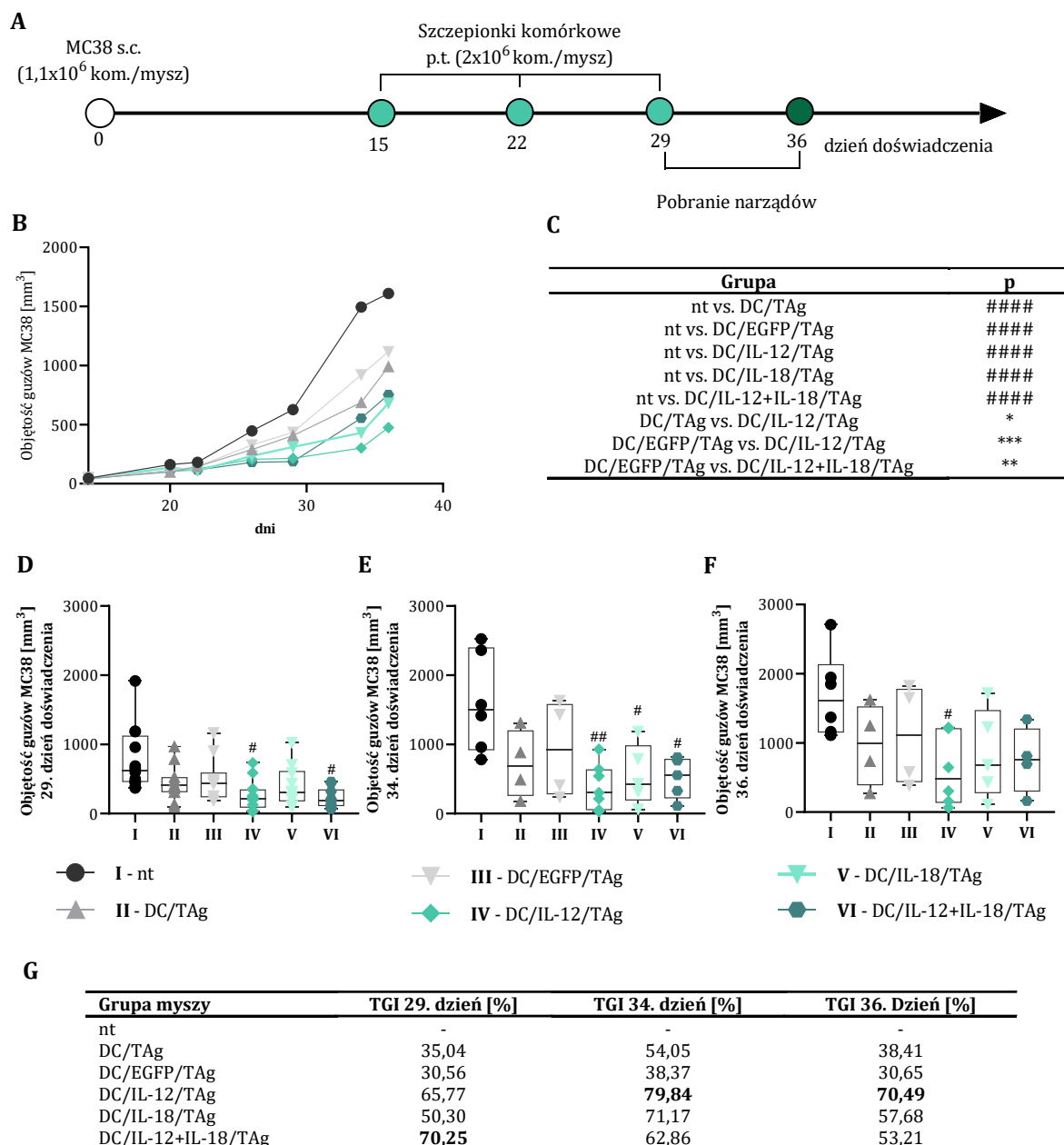
4.3. Ocena efektu przeciwnowotworowego immunoterapii z zastosowaniem komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi

W kolejnym etapie badań, w pełni scharakteryzowane szczepionki zawierające komórki dendrytyczne transdukowane do produkcji IL-12 i/lub IL-18 i stymulowane antygenami nowotworowymi wykorzystano w doświadczeniu immunoterapeutycznym myszy z rosnącym podskórnym guzem mysiego raka jelita grubego MC38. Piętnastego dnia po wszczępieniu komórek nowotworowych, okołoguzowo podano szczepionki (p.t.; 2×10^6 kom./mysz) zawierające komórki dendrytyczne (DC) transdukowane do produkcji samej IL-12 (DC/IL-12/TAg) lub IL-18 (DC/IL-18/TAg) oraz obu tych cytokin jednocześnie (DC/IL-12+IL-18/TAg) i stymulowane antygenami nowotworowymi (TAg). Jako szczepionki kontrolne podawano DC transdukowane wektorem kontrolnym i stymulowane TAg (DC/EGFP/TAg) oraz nietransdukowane DC stymulowane TAg (DC/TAg). W dalszej części pracy transdukowane komórki szczepionkowe stymulowane TAg określano również jako **modyfikowane DC**. Komórki podawano trzykrotnie w 15., 22. i 29. dniu doświadczenia. Schemat doświadczenia immunoterapeutycznego przedstawiono na Ryc. 49. A. Przez cały czas trwania immunoterapii monitorowano wzrost guzów w celu określenia zahamowania rozwoju nowotworu w grupach terapeutycznych (otrzymujących szczepionki) w 29., 34. i 36. dniu doświadczenia w odniesieniu do grupy nietraktowanej (nieleczonej). Aby określić wpływ zastosowanej immunoterapii na generowanie miejscowej i ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej, w 29. (7 dni po dwukrotnym podaniu szczepionek) i 36. dniu doświadczenia (7 dni po trzykrotnym podaniu szczepionek), od 7 myszy z każdej grupy pobrano guzy, wartownicze węzły chłonne oraz śledziony.

4.3.1. Wzrost guzów MC38 u myszy poddanych immunoterapii

Na podstawie pomiarów objętości guzów prowadzonych co 2-5 dni podczas trwania doświadczenia immunoterapeutycznego, sporządzono krzywe wzrostu guzów (Ryc. 49. B, C) oraz wykresy pudełkowe pozwalające określić kinetykę wzrostu nowotworu (Ryc. 49. D, E, F), a także określono stopień zahamowania rozwoju nowotworu w grupach poddanych terapii w porównaniu do grupy nietraktowanej (TGI) (Ryc. 49. G).

Zastosowanie szczepionek w znaczący sposób wpłynęło na zmniejszenie objętości guzów w grupach terapeutycznych w czasie trwania doświadczenia w porównaniu do grupy nietraktowanej (Ryc. 49. B, C). Istotnie statystycznie zahamowanie tempa wzrostu guzów wykazano po podaniu DC/IL-12/TAg w porównaniu do myszy traktowanych DC/TAg oraz DC/EGFP/TAg. Natomiast podanie szczepionek zawierających DC/IL-12+IL-18/TAg znacząco wpłynęło na zahamowanie tempa rozwoju nowotworu w porównaniu do grupy otrzymującej DC/EGFP/TAg.



Ryc. 49. Wzrost guzów MC38 u myszy poddanych immunoterapii z zastosowaniem komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi.

Myszom z rosnącymi podskórnie guzami MC38, okołoguzowo (p.t.) podano szczepionki na bazie komórek dendrytycznych transdukowanych do produkcji cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi (2×10^6 kom./mysz) w 15., 22. i 29. dniu doświadczenia. W 29. i 36. dniu doświadczenia od 7 myszy z każdej grupy badanej zostały pobrane śledziony, wartownicze węzły chłonne i tkanka nowotworowa do dalszych analiz *ex vivo* (A). Pomiary objętości guzów prowadzono co 2-5 dni. Na wykresie przedstawiono mediany objętości guzów obliczone na podstawie uzyskanych pomiarów (B). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (C). Na wykresach pudełkowych zaprezentowano mediany objętości guzów zmierzonych 29., 34. i 36. dnia doświadczenia (D, E, F). W tabeli umieszczono wartości zahamowania wzrostu guzów (TGI) obliczonych dla 29., 34. i 36. dnia doświadczenia (G). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu Brown-Forsythe i Welch ANOVA oraz testu *post hoc* T3 Dunnett'a (D) lub testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (E, F). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$. (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; #### - $p < 0,0001$ względem grupy nt, * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

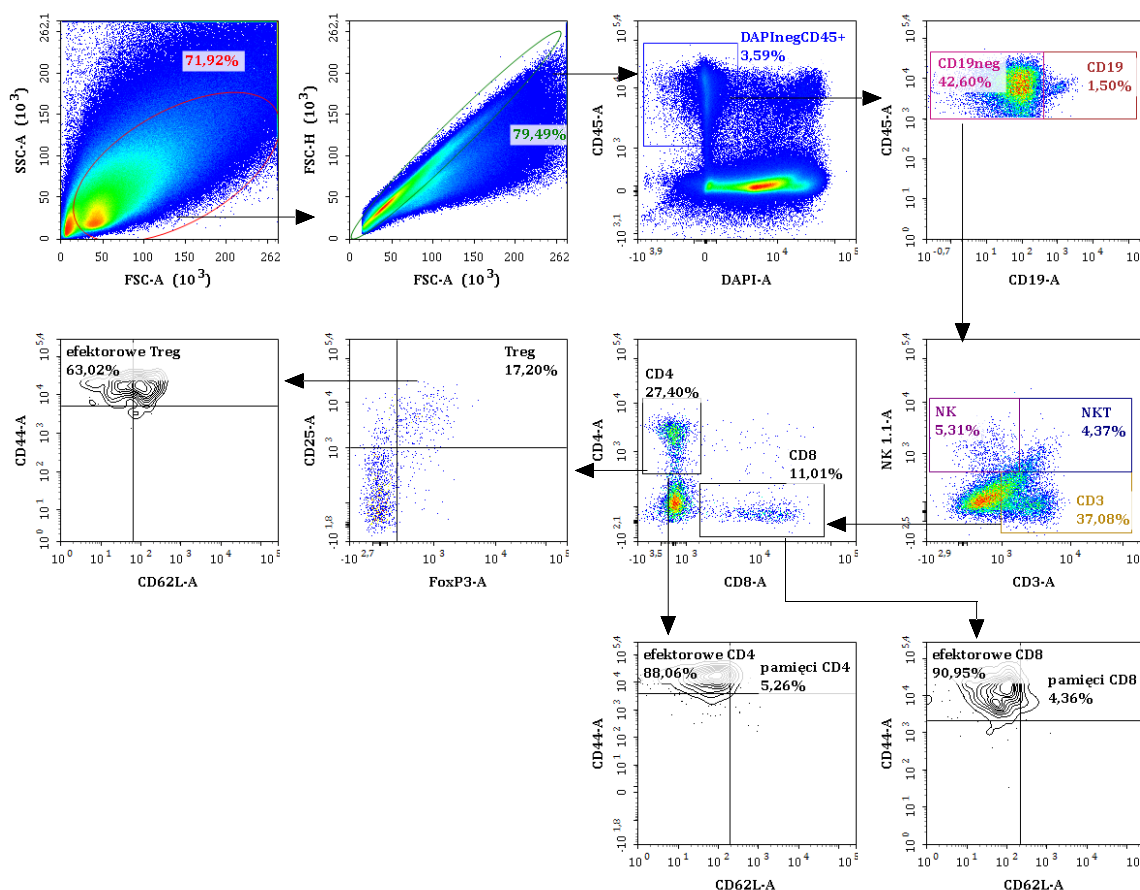
Efekt terapeutyczny zastosowania szczepionek określono na podstawie procentowego zahamowania wzrostu nowotworu (TGI) obliczonego w oparciu o pomiary objętości guzów we wszystkich grupach myszy w 29., 34. i 36. dniu doświadczenia w porównaniu do grupy myszy nietraktowanych. W 29. dniu doświadczenia, istotnie statystycznie zmniejszenie objętości guzów w porównaniu do grupy nietraktowanej odnotowano po podaniu DC/IL-12/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc. 49. D), natomiast najkorzystniejszy efekt terapeutyczny stwierdzono po zastosowaniu DC/IL-12+IL-18/TAg (TGI 70,25%, Ryc. 49. G). W 34. dniu doświadczenia, znaczące obniżenie objętości guzów odnotowano po podaniu DC/IL-12/TAg, DC/IL-18/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg, jednak w 36. dniu doświadczenia tylko po podaniu DC/IL-12/TAg (Ryc. 49. E). Oceniając kinetykę zahamowania wzrostu nowotworu pod wpływem działania szczepionek wykazano, że w 29. dniu doświadczenia najwyższa wartość TGI została wyliczona dla grupy traktowanej DC/IL-12+IL-18/TAg (TGI 70,25%), natomiast w 34. dniu – po podaniu DC/IL-12/TAg (79,84%) i DC/IL-18/TAg (71,17%), a w 36. dniu doświadczenia wysoka wartość TGI utrzymywała się jedynie w grupie myszy otrzymujących DC/IL-12/TAg (70,49%). Zatem skuteczność działania szczepionek zmieniała się stopniowo w zależności od ich rodzaju wskazując na duży wpływ cytokin wydzielanych przez komórki szczepionkowe na zahamowanie wzrostu guzów.

4.3.2. Ocena miejscowej odpowiedzi przeciwnowotworowej u myszy poddanych immunoterapii

W celu określenia wpływu zastosowanej immunoterapii na aktywację miejscowej odpowiedzi przeciwnowotworowej oceniano zmiany wielkości populacji komórek limfoidalnych i mieloidalnych wśród leukocytów naciekających guzy MC38 lub wartownicze węzły chłonne, a także określono stopień pobudzenia tych komórek.

4.3.2.1. Ocena zmian zachodzących w tkance nowotworowej

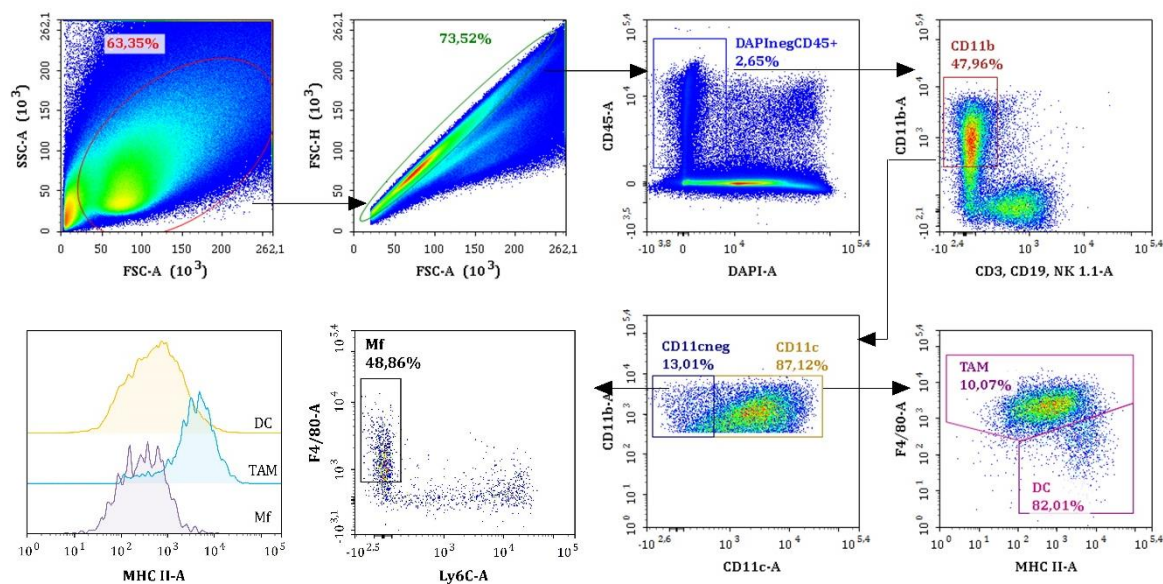
W pierwszym etapie analizy cytometrycznej, wyodrębniono żywe leukocyty (DAPI^{neg}CD45⁺), wśród nich zidentyfikowano limfocyty B (CD19⁺) oraz komórki CD19^{neg}. W populacji komórek CD19^{neg} oznaczono limfocyty T (CD3⁺NK1.1^{neg}), komórki NK (CD3^{neg}NK1.1⁺) oraz komórki NKT (CD3⁺NK1.1⁺). Następnie, w populacji limfocytów T (CD3⁺) wyodrębniono komórki CD4⁺ i CD8⁺, a wśród limfocytów T CD4⁺ oznaczono limfocyty T regulatorowe (Treg, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺). Na podstawie ekspresji markerów CD44 i CD62L, wśród limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ i Treg wyodrębniono komórki efektorowe (CD44⁺CD62L^{neg}) i komórki pamięci (CD44⁺CD62L⁺). Na podstawie otrzymanych wyników, określano zmiany w udziale procentowym wybranych populacji komórek (Ryc. 50).



Ryc. 50. Schemat analizy populacji komórek limfoidalnych naciekających guzy MC38 uzyskane od myszy poddanych immunoterapii.

Po wyeliminowaniu debris oraz zlepek komórkowych, w analizowanych guzach MC38 wyodrębniono żywe leukocyty ($\text{DAPI}^{\text{neg}}\text{CD45}^+$). Następnie wśród leukocytów oznaczono limfocyty B (CD19^+) oraz populację CD19^{neg} , wśród której zidentyfikowano limfocyty T ($\text{CD3}^+\text{NK1.1}^{\text{neg}}$), komórki NK ($\text{CD3}^{\text{neg}}\text{NK1.1}^+$) oraz komórki NKT ($\text{CD3}^+\text{NK1.1}^+$). Ponadto wśród limfocytów T (CD3^+), wyodrębniono komórki CD4^+ i CD8^+ , a następnie oznaczono limfocyty T regulatorowe (Treg, $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$). Wśród populacji limfocytów wyodrębniono komórki efektorowe ($\text{CD44}^+\text{CD62L}^{\text{neg}}$) i komórki pamięci ($\text{CD44}^+\text{CD62L}^+$) na podstawie ekspresji markerów CD44 i CD62L. Na rycinie przedstawiono reprezentatywną analizę guzów MC38 pobranych w 29. dniu doświadczenia od myszy traktowanej DC/TAg.

Podczas drugiej analizy, wśród komórek $\text{DAPI}^{\text{neg}}\text{CD45}^+$ zidentyfikowano komórki mieloidalne CD11b^+ , a wśród nich komórki CD11c^+ oraz $\text{CD11c}^{\text{neg}}$ (Ryc. 51). W populacji komórek CD11c^+ wyodrębniono DC ($\text{CD11c}^+\text{F4/80}^{\text{int}}\text{MHCII}^+$) oraz TAM ($\text{CD11c}^+\text{F4/80}^+$), a wśród komórek $\text{CD11c}^{\text{neg}}$ określono populację makrofagów (Mf, $\text{CD11c}^{\text{neg}}\text{F4/80}^+$). Dodatkowo na powierzchni wyodrębnionych komórek określono poziom ekspresji cząsteczek MHC II.



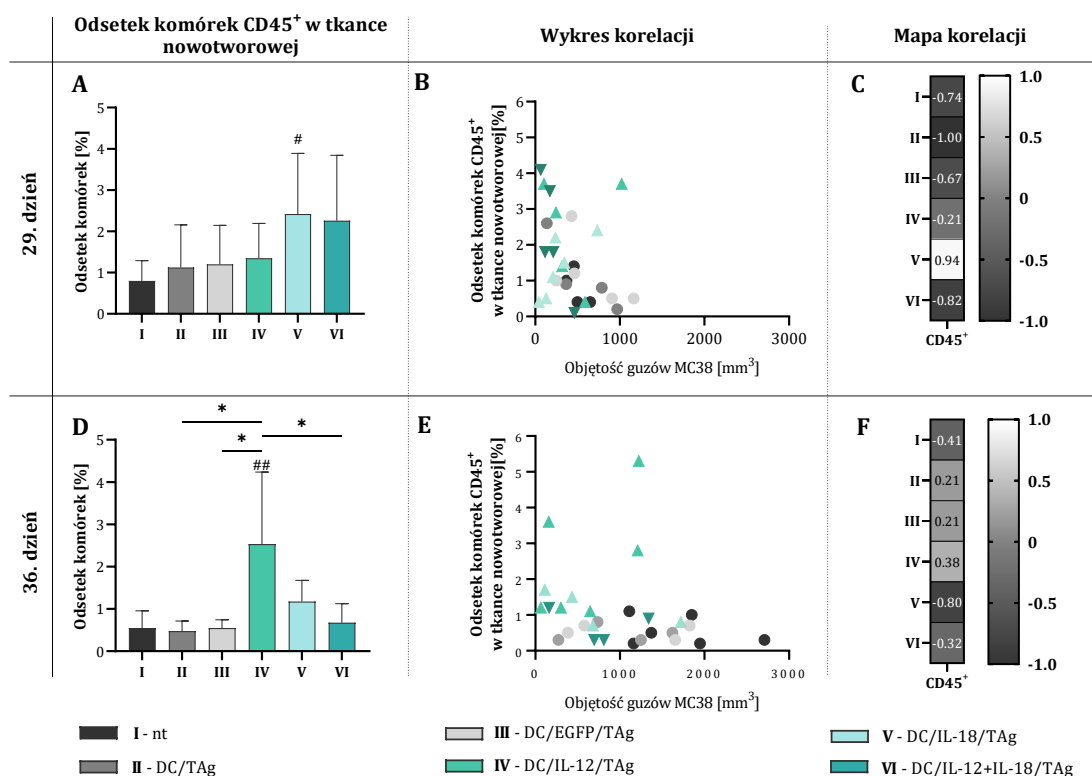
Ryc. 51. Schemat analizy populacji komórek mieloidalnych naciekających guzy MC38 uzyskane od myszy poddanych immunoterapii.

Podczas analizy komórek mieloidalnych wśród komórek DAPI^{neg}CD45⁺ zidentyfikowano komórki mieloidalne CD11b⁺, a wśród nich komórki CD11c⁺ oraz CD11c^{neg}. Wśród komórek CD11c⁺ wyodrębniono populacje DC (CD11c⁺F4/80^{int}MHCII⁺) oraz TAM (CD11c⁺F4/80⁺), a wśród komórek CD11c^{neg} wyznaczono populację Mf (CD11c^{neg}F4/80⁺). Ponadto w oparciu o poziom ekspresji cząsteczek MHC II określono stopień dojrzałości analizowanych komórek. Na rycinie przedstawiono reprezentatywną analizę guzów MC38 pobranych w 29. dniu doświadczenia od myszy traktowanej DC/TAg.

Wpływ dwukrotnego podania szczepionek oceniono w 29. dniu doświadczenia. Stwierdzono wzrost odsetka leukocytów (CD45⁺) w guzach we wszystkich grupach terapeutycznych (Ryc. 52. A), przy czym najwyższy udział procentowy tych komórek wykazano po podaniu DC/IL-18/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg. Natomiast istotny statystycznie wzrost odsetka leukocytów w odniesieniu do grupy nietraktowanej odnotowano jedynie po podaniu DC/IL-18/TAg.

Na podstawie indywidualnych pomiarów odsetka leukocytów naciekających tkankę nowotworową oraz objętości guzów przedstawionych na wykresie punktowym (Ryc. 52. B) możliwe było wyliczenie wartości współczynnika korelacji rang Spearmana (r_s), które przedstawiono na mapie korelacji (Ryc. 52. C). Otrzymane wartości r_s w przedziale $0 < r_s < 1$, świadczą o pozytywnej korelacji odsetka leukocytów naciekających tkankę nowotworową oraz objętości guzów, a wartości r_s w przedziale $-1 < r_s < 0$, świadczą o korelacji negatywnej. Opis zastosowanej metody statystycznej zamieszczono w podrozdziale 3.2.14.

Obliczona dla grupy traktowanej DC/IL-18/TAg wartość r_s potwierdziła bardzo silną korelację pozytywną ($r_s=0,94$), między zwiększeniem napływu limfocytów i wzrostem objętości guzów w 29. dniu doświadczenia. W pozostałych grupach wykazano negatywną korelację o różnej sile między odsetkiem leukocytów naciekających tkankę guzów a ich objętością.



Ryc. 52. Ocena wielkości nacieku leukocytów w guzach MC38 uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.

Guzy pobierano od myszy w 29. (A, B, C) i 36. dniu doświadczenia (D, E, F). W analizowanych guzach MC38 wyodrębniono żywe leukocyty (DAPI^{neg}CD45⁺) (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 51). Na wykresach kolumnowych przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 4-6 myszy z każdej grupy badanej (A, D). Na wykresach punktowych przedstawiono wartości odsetka komórek CD45⁺ naciekających guzy MC38 o wyznaczonej objętości (indywidualnie dla każdej myszy badanej) (B, E). Na mapie korelacji przedstawiono relację pomiędzy objętością guzów MC38, a odsetkiem komórek CD45⁺ naciekających do tkanki nowotworowej, dla każdej z badanych grup. W polach wykresu przedstawiono wartości r_s obliczone na pomocą nieparametrycznego testu korelacji Spearmana'a (C, F). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A, D). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$. (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$ względem grupy nt, * - $p < 0,05$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Tymczasem w 36. dniu doświadczenia (7 dni po trzykrotnym podaniu szczepionek) wykazano zwiększenie odsetka leukocytów (CD45⁺) w guzach pobranych od myszy otrzymujących DC/IL-12/TAg, DC/IL-18/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg, chociaż wzrost odsetka leukocytów w odniesieniu do grupy nieleczonej był istotny statystycznie jedynie po podaniu DC/IL-12/TAg (Ryc. 52. D). Zależność między odnotowanymi w tym dniu pomiarami objętości indywidualnych guzów oraz odsetka leukocytów naciekających tkankę nowotworową przedstawiono na wykresie punktowym (Ryc. 52. E), a wartości współczynnika korelacji rang Spearmana (r_s) na mapie korelacji (Ryc. 52. F). Obliczone wartości r_s wykazały słabą korelację pozytywną ($r_s = 0,38$) w grupie DC/IL-12/TAg, a więc w wyniku zastosowania tej szczepionki, zwiększonemu napływowi leukocytów towarzyszyło zwiększenie objętości guzów. Natomiast w grupach traktowanych DC/IL-18/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg wykazano negatywną korelację o słabej zależności

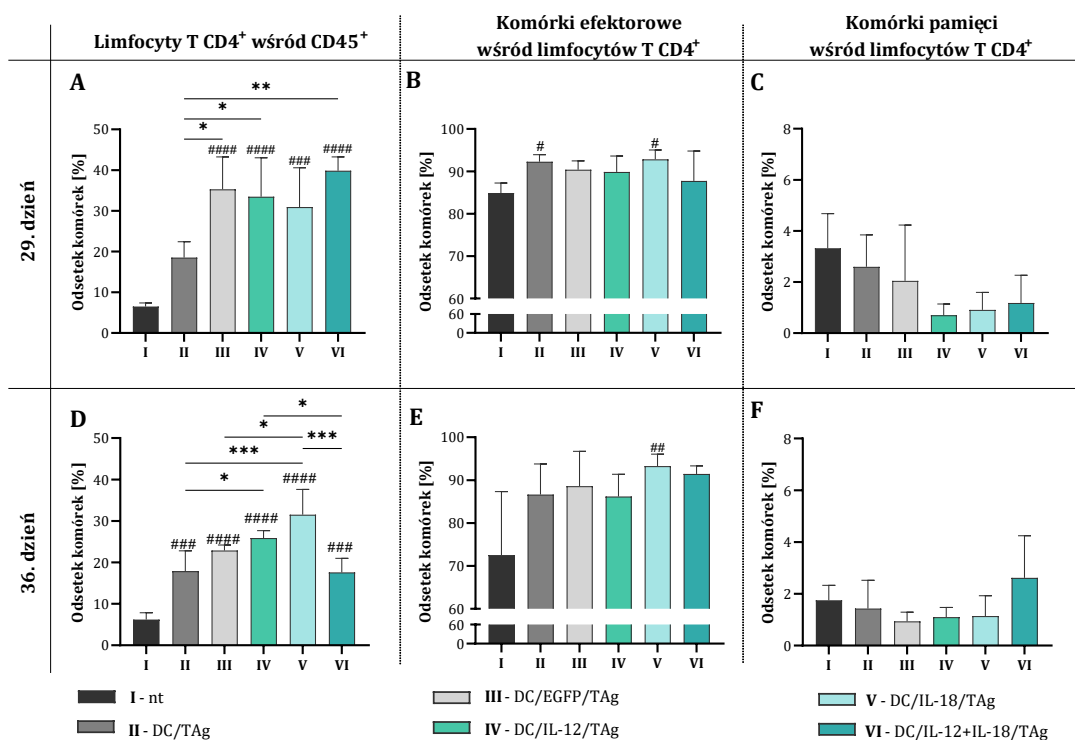
między odsetkiem leukocytów naciekających tkankę nowotworową oraz objętością guzów, co oznaczało, że większemu naciekowi leukocytów towarzyszyła mniejsza objętość guzów.

4.3.2.1.1. *Subpopulacje komórek limfoidalnych w guzach MC38*

W celu określenia zmian w odsetku oraz aktywności komórek limfoidalnych w guzach pobranych od myszy poddanych immunoterapii wykonano analizę cytometryczną (Ryc. 50.) i wyodrębniono populacje limfocytów T CD4⁺, limfocytów T CD8⁺, limfocytów T regulatorowych oraz komórek NK i NKT. Ponadto wśród limfocytów określono odsetek komórek efektorowych i komórek pamięci.

W 29. dniu doświadczenia (7 dni po dwukrotnym podaniu szczepionek) stwierdzono, że w wyniku podania transdukowanych DC stymulowanych TAg zwiększył się odsetek limfocytów T CD4⁺, przy czym najwyższy udział procentowy tych komórek odnotowano po zastosowaniu DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc. 53. A). Ponadto w porównaniu do grupy nieleczonej, we wszystkich grupach myszy poddanych immunoterapii, a szczególnie po podaniu DC/TAg lub DC/IL-18/TAg zaobserwowano zwiększony odsetek limfocytów T CD4⁺ efektorowych (Ryc. 53. B). Z drugiej strony, odsetek komórek pamięci wśród limfocytów T CD4⁺ w tych samych grupach był niższy niż w grupie myszy nieleczonych (Ryc. 53. C).

Tymczasem 7 dni po trzykrotnym podaniu szczepionek we wszystkich grupach terapeutycznych, w nacieku guzów stwierdzono znaczący wzrost wielkości populacji limfocytów T CD4⁺. W przeciwieństwie do poprzedniego pobrania, najwyższy odsetek tych komórek odnotowano po podaniu DC/IL-18/TAg (Ryc. 53. D). Co więcej, niezależnie od rodzaju zastosowanej szczepionki, wzrost udziału procentowego efektorowych komórek T CD4⁺ naciekających guzy utrzymywał się na podobnym poziomie, a istotny statystycznie wzrost odsetka tych komórek w porównaniu do grupy nieleczonej wykazano jedynie po podaniu DC/IL-18/TAg (Ryc. 53. E). Wśród limfocytów T CD4⁺ naciekających guzy pobrane od myszy nieleczonych, wykazano niewielką subpopulację komórek pamięci, która w guzach pobranych od myszy otrzymujących DC/IL-12+IL-18/TAg była najwyższa (Ryc. 53. F).

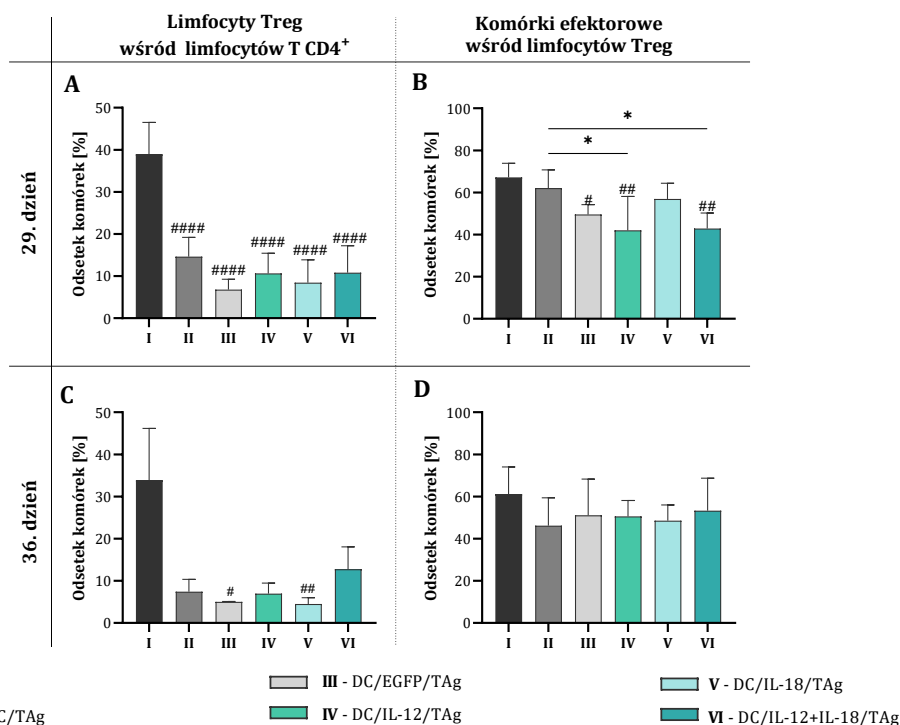


Ryc. 53. Odsetek limfocytów T CD4⁺ naciekających guzy MC38 uzyskane od myszy poddanych immunoterapii.

Guzy pobierano od myszy w 29. (A, B, C) i 36. dniu doświadczenia (D, E, F). Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej, wśród komórek limfoidalnych naciekających tkankę nowotworową wyodrębniono populację limfocytów T CD4⁺ oraz oznaczono ekspresję cząsteczek CD62L i CD44 na powierzchni tych komórek (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 50). Określono odsetek limfocytów T CD4⁺ wśród leukocytów CD45⁺ (A, D) oraz odsetek komórek efektorowych (CD44⁺CD62L^{neg}) (B, E) i komórek pamięci (CD44⁺CD62L⁺) (C, F) wśród limfocytów T CD4⁺. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa (E) i testu *post hoc* Dunn'a lub parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A, B, D). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$; #### - $p < 0,0001$ względem grupy nt, * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

We wszystkich grupach myszy poddanych terapii, w porównaniu do myszy nieleczonych, już po dwóch podaniach szczepionek zaobserwowano znaczące obniżenie odsetka limfocytów Treg wśród limfocytów T CD4⁺ naciekających guzy (Ryc. 54. A), a istotne statystycznie obniżenie odsetka komórek efektorowych wśród limfocytów Treg wykazano po podaniu DC/EGFP/TAg, DC/IL-12/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg, a w przypadku grup otrzymujących komórki wydzielające IL-12, różnica ta była również istotna w porównaniu do grupy DC/TAg (Ryc. 54. B).

Po trzykrotnym podaniu szczepionek obniżony poziom limfocytów Treg utrzymywał się we wszystkich grupach poddanych terapii, jednak istotne statystycznie obniżenie odsetka tych komórek w porównaniu do grupy nielezionej obserwowano jedynie po podaniu DC/EGFP/TAg lub DC/IL-18/TAg (Ryc. 54. C). Stwierdzono ponadto obniżony odsetek komórek efektorowych wśród limfocytów Treg w porównaniu do grupy kontrolnej, jednak efekt ten nie był istotny statystycznie (Ryc. 54. D).



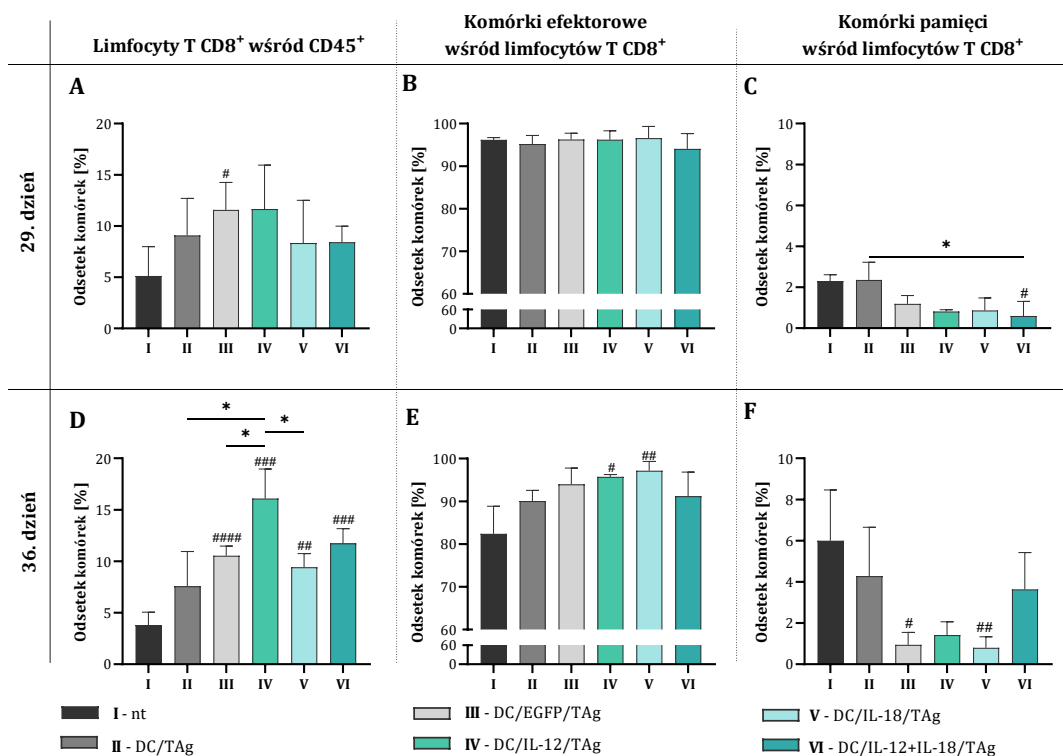
Ryc. 54. Odsetek limfocytów T regulatorowych (Treg) naciekających guzy MC38 uzyskane od myszy poddanych immunoterapii.

Guzy pobierano od myszy w 29. (A, B) i 36. dniu doświadczenia (C, D). Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej, wśród komórek limfoidalnych naciekających tkankę nowotworową wyodrębniono populacje limfocytów T CD4⁺, a wśród nich populację limfocytów Treg oraz oznaczono ekspresję cząsteczek CD62L i CD44 na powierzchni tych komórek (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 50). Określono odsetek limfocytów Treg wśród limfocytów T CD4⁺ (A, C) oraz odsetek komórek efektorowych (CD44⁺CD62L^{neg}) (B, D) wśród limfocytów Treg. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunn'a (C) lub parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A, B). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; #### - $p < 0,0001$ względem grupy nt; * - $p < 0,05$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Oceniając efekt dwukrotnego podania szczepionek, wykazano zmiany wielkości populacji limfocytów T CD8⁺ napływających do tkanki guzów, jednak istotny statystycznie wzrost odsetka tych komórek w stosunku do grupy nieleczzonej wykazano jedynie po podaniu DC/EGFP/TAg (Ryc. 55. A). Natomiast zastosowana terapia nie wpłynęła znacząco na zmiany odsetka komórek T CD8⁺ efektorowych (Ryc. 55. B). Podobnie jak w przypadku komórek T CD4⁺ pamięci, subpopulacja limfocytów T CD8⁺ pamięci okazała się niewielka i zmniejszyła się po podaniu DC produkujących cytokiny. Istotne statystycznie obniżenie odsetka tych komórek stwierdzono po podaniu DC/IL-12+IL-18/TAg w porównaniu do myszy nieleczonych oraz otrzymujących DC/TAg (Ryc. 55. C).

Siedem dni po trzykrotnym podaniu transdukowanych DC stymulowanych TAg znacząco zwiększył się udział procentowy limfocytów T CD8⁺ naciekających guzy (Ryc. 55. D), przy czym najwyższy odsetek tych komórek odnotowano po podaniu DC/IL-12/TAg. Wzrost wielkości subpopulacji efektorowych komórek T CD8⁺ wykazano we wszystkich grupach otrzymujących

szczepionki, a istotne statystycznie zmiany w porównaniu do grupy kontrolnej odnotowano po podaniu DC/IL-12/TAg lub DC/IL-18/TAg (Ryc. 55. E). Wielkość populacji limfocytów T CD8⁺ pamięci, w tym dniu doświadczenia, podobnie do poprzednich obserwacji była niższa po podaniu szczepionek niż w grupie nieleczonej, a znaczące obniżenie odsetka tych komórek wykazano w grupach traktowanych DC/EGFP/TAg lub DC/IL-18/TAg (Ryc. 55. F).

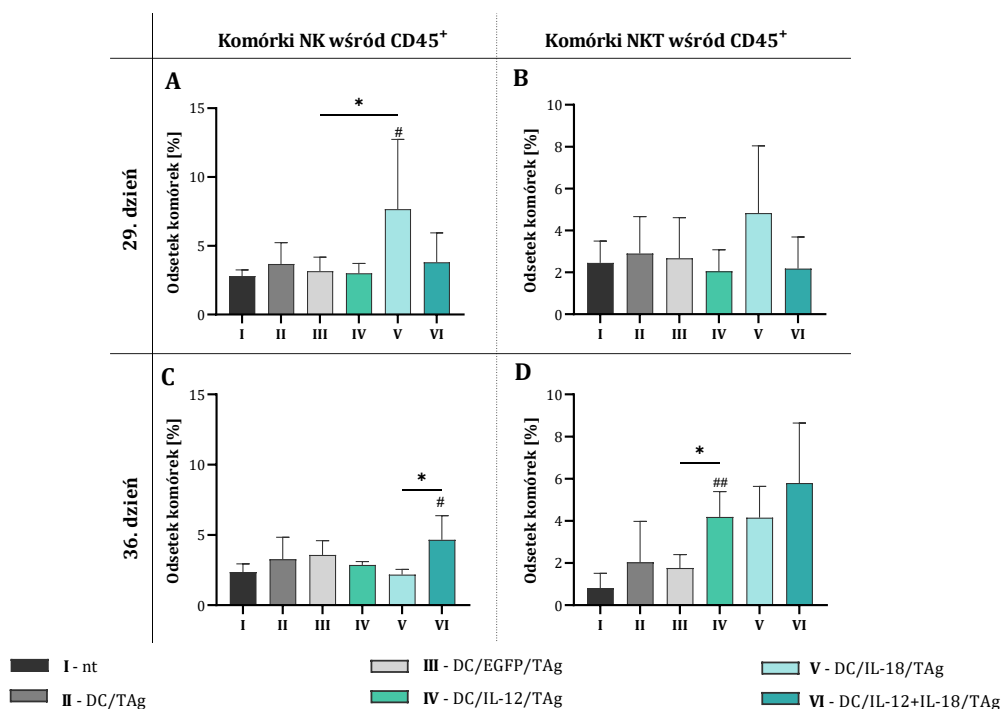


Ryc. 55. Odsetek limfocytów T CD8⁺ naciekających guzy MC38 uzyskane od myszy poddanych immunoterapii.

Guzy pobierano od myszy w 29. (A, B, C) i 36. dniu doświadczenia (D, E, F). Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej, wśród komórek limfoidalnych naciekających tkankę nowotworową wyodrębniono populacje limfocytów T CD8⁺ oraz oznaczono ekspresję cząsteczek CD62L i CD44 na powierzchni tych komórek (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 50). Określono odsetek limfocytów T CD8⁺ wśród leukocytów CD45⁺ (A, D) oraz odsetek komórek efektorowych (CD44⁺CD62L^{neg}) (B, E) i komórek pamięci (CD44⁺CD62L⁺) (C, F) wśród limfocytów T CD8⁺. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunn'a (C, E, F) lub parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A), lub parametrycznego testu Brown-Forsythe i Welch ANOVA oraz testu *post hoc* T3 Dunnett'a (D). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$; #### - $p < 0,0001$ względem grupy nt; * - $p < 0,05$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Dodatkowo wśród leukocytów naciekających guzy określono wielkość populacji komórek NK i NKT. Analiza wykazała, że dwukrotne podanie DC/IL-18/TAg znacząco wpłynęło na zwiększenie odsetka komórek NK w guzach w porównaniu do kontroli nieleczonej lub grupy otrzymującej DC/EGFP/TAg (Ryc. 56. A). Ponadto po dwukrotnym podaniu DC/IL-18/TAg odnotowano najwyższy odsetek komórek NKT, jednak efekt ten nie był istotny statystycznie w odniesieniu do pozostałych grup badanych.

Ocena przeprowadzona w 36. dniu doświadczenia wykazała znaczący wzrost odsetka komórek NK, jak i komórek NKT w guzach po podaniu DC/IL-12+IL-18/TAg w porównaniu do tkanki nowotworowej pobranej od myszy nieleczonych (Ryc. 56. C, D). Nie wykazano istotnego wpływu zastosowanych szczepionek na zmiany udziału procentowego limfocytów B (CD19⁺) w guzach MC38 (dane nieprezentowane).

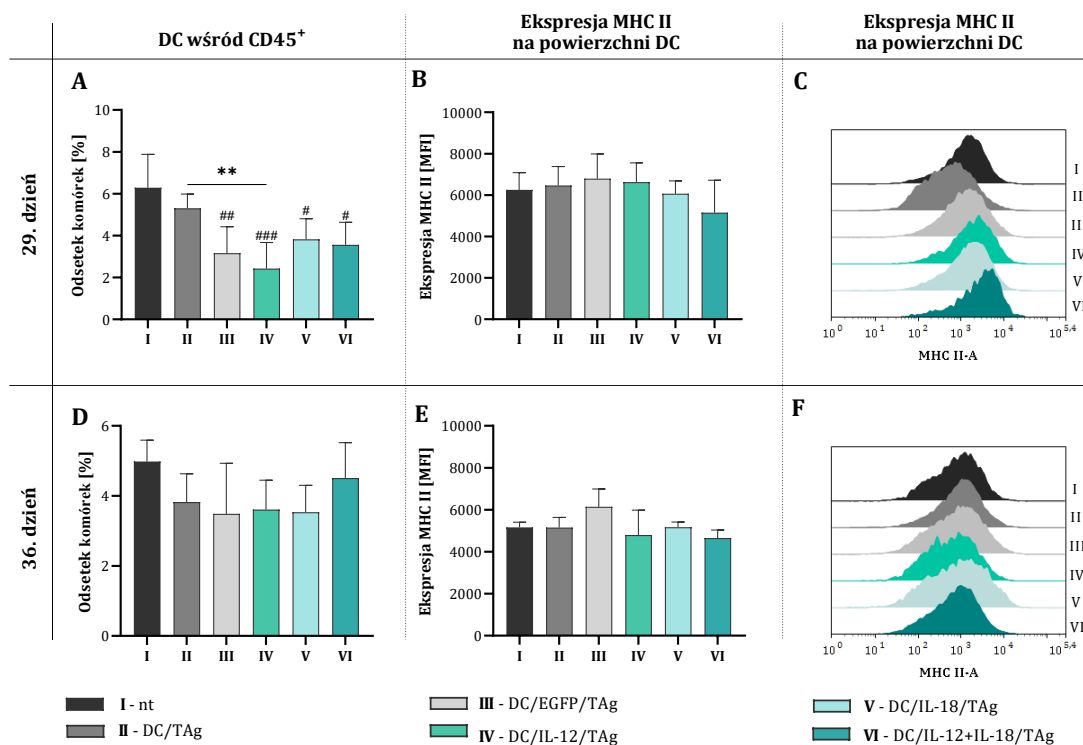


Ryc. 56. Odsetek komórek NK i NKT naciekających guzy MC38 uzyskane od myszy poddanych immunoterapii.

Guzy pobierano od myszy w 29. (A, B) i 36. dniu doświadczenia (C, D). Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej wśród komórek limfoidalnych naciekających tkankę nowotworową wyodrębniono populacje komórek NK (CD3⁺NK1.1⁺) oraz komórek NKT (CD3⁺NK1.1⁺) (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 50). Określono odsetek komórek NK (A, C) oraz NKT (B, D) wśród leukocytów CD45⁺. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A, C) lub parametrycznego testu Brown-Forsythe i Welch ANOVA oraz testu *post hoc* T3 Dunnett'a (D). Za istotnie statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$ względem grupy nt; * - $p < 0,05$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

4.3.2.1.2. Subpopulacje komórek mieloidalnych w guzach MC38

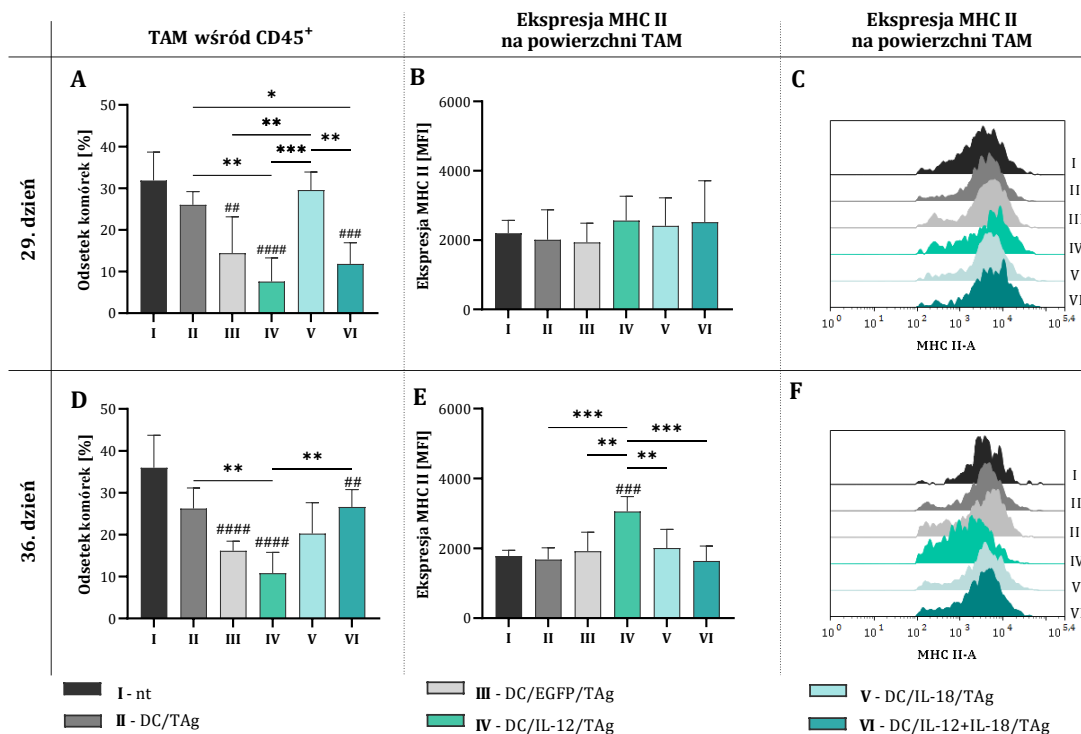
W celu określenia wpływu zastosowania immunoterapii na zmiany odsetka populacji komórek mieloidalnych naciekających guzy MC38 pobrane 29. lub 36. dnia doświadczenia, wykonano wieloparametrową analizę cytometryczną (Ryc. 51.) Wśród komórek mieloidalnych naciekających tkankę nowotworową wyodrębniono populacje DC, TAM oraz Mf. Ponadto określono stopień pobudzenia komórek mieloidalnych na podstawie poziomu ekspresji cząsteczek MHC II na powierzchni tych komórek.



Ryc. 57. Odsetek i stopień pobudzenia komórek dendrytycznych naciekających guzy MC38 uzyskane od myszy poddanych immunoterapii.

Guzy pobierano od myszy w 29. (A, B, C) i 36. dniu doświadczenia (D, E, F). Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej, wśród komórek mieloidalnych naciekających tkankę nowotworową wyodrębniono populację komórek dendrytycznych (DC, CD11c⁺F4/80^{neg}MHCII⁺) oraz określono ekspresję cząsteczek MHC II na powierzchni tych komórek (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 51). Określono odsetek komórek DC (A, D) wśród leukocytów CD45⁺ oraz średnią intensywność fluorescencji cząsteczek MHCII na powierzchni tych komórek (B, C, E, F). Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Na histogramach przedstawiono dane z prób reprezentatywnych. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A). Za istotnie statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$ względem grupy nt; ** - $p < 0,01$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

W tkance guzów pobranych od myszy po dwukrotnym podaniu szczepionek wykazano obniżenie odsetka DC w porównaniu do grupy nieleczonej, przy czym najniższy odsetek komórek infiltrujących tkankę wykazano po podaniu DC/IL-12/TAg (Ryc. 57. A). Po trzykrotnym podaniu szczepionek obserwowano obniżenie odsetka DC w guzach pobranych od myszy poddanych terapii w odniesieniu do grupy nieleczonej, jednak efekt ten nie był istotny statystycznie (Ryc. 57. D). Zarówno dwukrotne, jak i trzykrotne, okołoguzowe podanie szczepionek nie wpłynęło na zmiany poziomu ekspresji cząsteczek MHC II na powierzchni DC obecnych w tkance guzów (Ryc. 57. B, E).



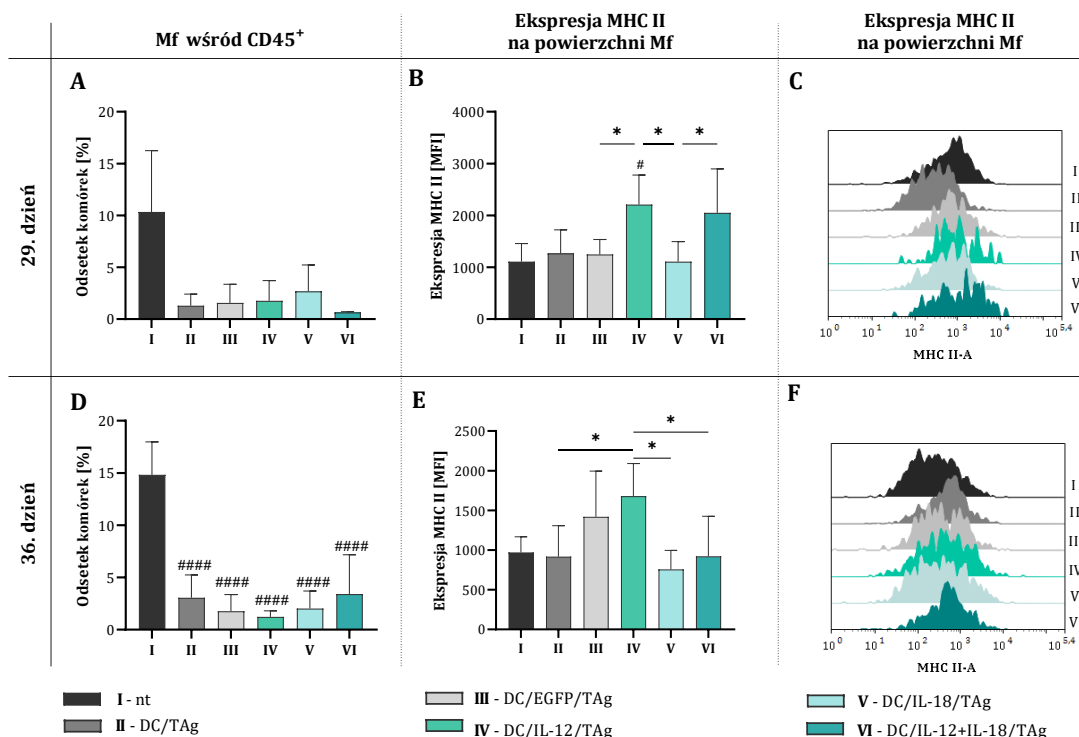
Ryc. 58. Odsetek i stopień pobudzenia makrofagów związanych z nowotworem (TAM) naciekających guzy MC38 uzyskane od myszy poddanych immunoterapii.

Guzy pobierano od myszy w 29. (A, B, C) i 36. dniu doświadczenia (D, E, F). Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej, wśród komórek mieloidalnych naciekających tkankę nowotworową wyodrębniono populację makrofagów związanych z nowotworem (TAM, CD11c⁺F4/80⁺) oraz określono ekspresję cząsteczek MHC II na powierzchni tych komórek (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 51). Określono odsetek komórek TAM (A, D) wśród leukocytów CD45⁺ oraz średnią intensywność fluorescencji cząsteczek MHCII na powierzchni tych komórek (B, C, E, F). Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Na histogramach przedstawiono dane z prób reprezentatywnych. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A, D, E). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$; #### - $p < 0,0001$ względem grupy nt; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Kolejną populacją komórek mieloidalnych ocenianą w tkance nowotworowej uzyskanej od myszy poddanych immunoterapii były makrofagi związane z nowotworem (TAM) (Ryc. 58). Dwukrotne podanie DC/EGFP/TAg, DC/IL-12/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg indukowało, zależne od rodzaju szczepionki, obniżenie odsetka TAM w guzach w porównaniu do grupy myszy nieleczonych, a najniższy odsetek tych komórek wykazano po podaniu DC/IL-12/TAg (Ryc. 58. A). Jednak wpływ podania szczepionki na zmiany w ekspresji cząsteczek MHC II okazał się odwrotny – modyfikowane DC produkujące cytokiny w nieznaczny sposób wpłynęły na wzrost ekspresji tych cząsteczek na powierzchni TAM (Ryc. 58. B).

Obniżony odsetek TAM u myszy traktowanych DC/EGFP/TAg, DC/IL-12/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg utrzymywał się także po trzecim podaniu komórek szczepionkowych, i tak jak 7 dni wcześniej, najniższy odsetek tych makrofagów wykazano po podaniu DC/IL-12/TAg (Ryc. 58. D). Co więcej, trzykrotne podanie szczepionki zawierających DC/IL-12/TAg znacząco

wpłynęło na zwiększenie ekspresji cząsteczek MHC II na powierzchni TAM w porównaniu do pozostałych grup badanych (Ryc. 58. E).



Ryc. 59. Odsetek i stopień pobudzenia makrofagów naciekających guzy MC38 uzyskane od myszy poddanych immunoterapii.

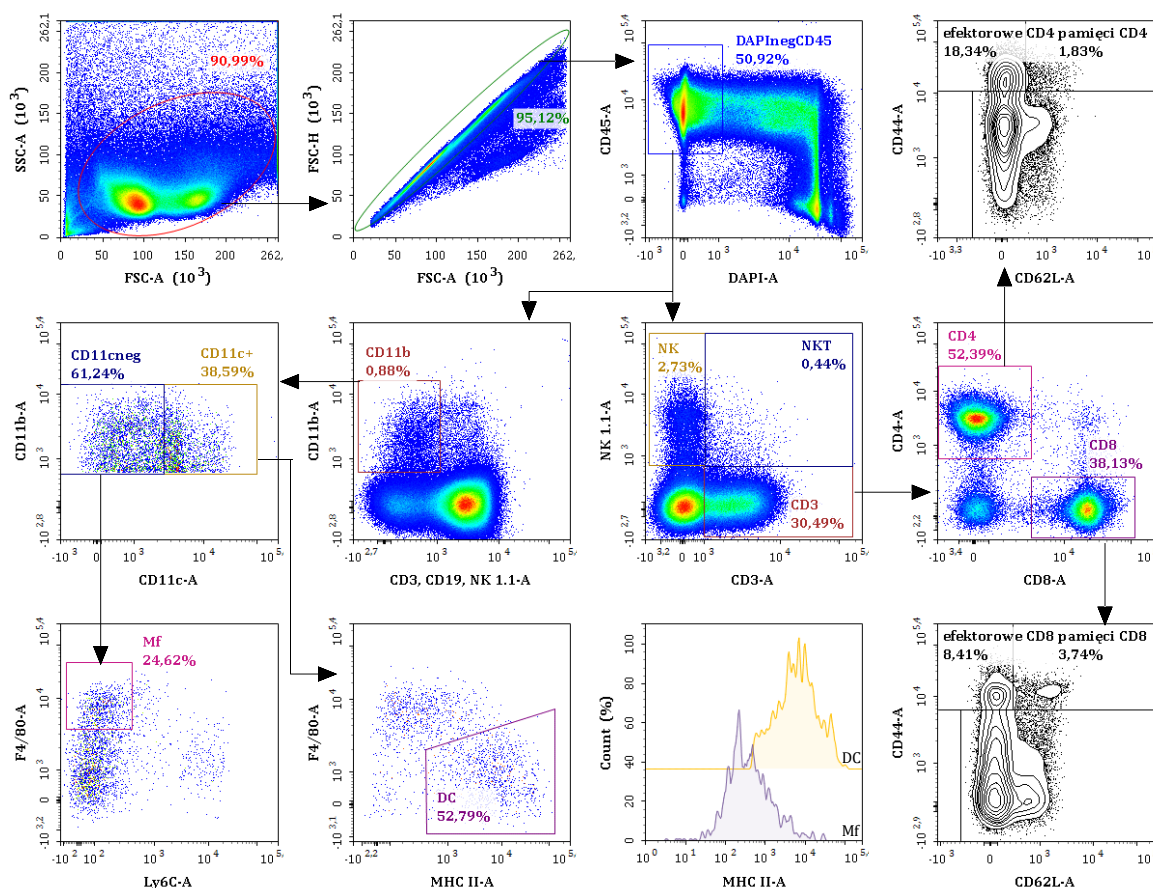
Guzy pobierano od myszy w 29. (A, B, C) i 36. dniu doświadczenia (D, E, F). Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej, wśród komórek mieloidalnych naciekających tkankę nowotworową wyodrębniono populację makrofagów (Mf, CD11c^{neg}F4/80⁺) oraz określono ekspresję cząsteczek MHC II na powierzchni tych komórek (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 51). Określono odsetek komórek Mf (A, D) wśród leukocytów CD45⁺ oraz średnią intensywność fluorescencji cząsteczek MHCII na powierzchni tych komórek (B, C, E, F). Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Na histogramach przedstawiono dane z prób reprezentatywnych. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu post hoc Tukey'a (B, D, E). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ##### - $p < 0001$ względem grupy nt; * - $p < 0,05$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Analiza udziału procentowego makrofagów o fenotypie CD11c^{neg}F4/80⁺, w guzach uzyskanych od myszy w obu punktach czasowych, wykazała obniżenie odsetka tych komórek po podaniu szczepionek, jednak zmiany istotne statystycznie w porównaniu do grupy nieleczonej odnotowano jedynie po trzykrotnym ich podaniu (Ryc. 59. A, D). Makrofagi te wykazywały zależne od rodzaju podanej szczepionki znaczne zróżnicowanie ekspresji MHC II, lecz jedynie podanie DC/IL-12/TAg indukowało wysoką ekspresję tych cząsteczek na ich powierzchni (Ryc. 59. B, E).

4.3.2.2. Ocena zmian zachodzących w wartowniczych węzłach chłonnych

Aby określić wpływ zastosowanej immunoterapii na aktywację przeciwnowotworowej odpowiedzi odpornościowej w wartowniczych węzłach chłonnych przeprowadzono analizę

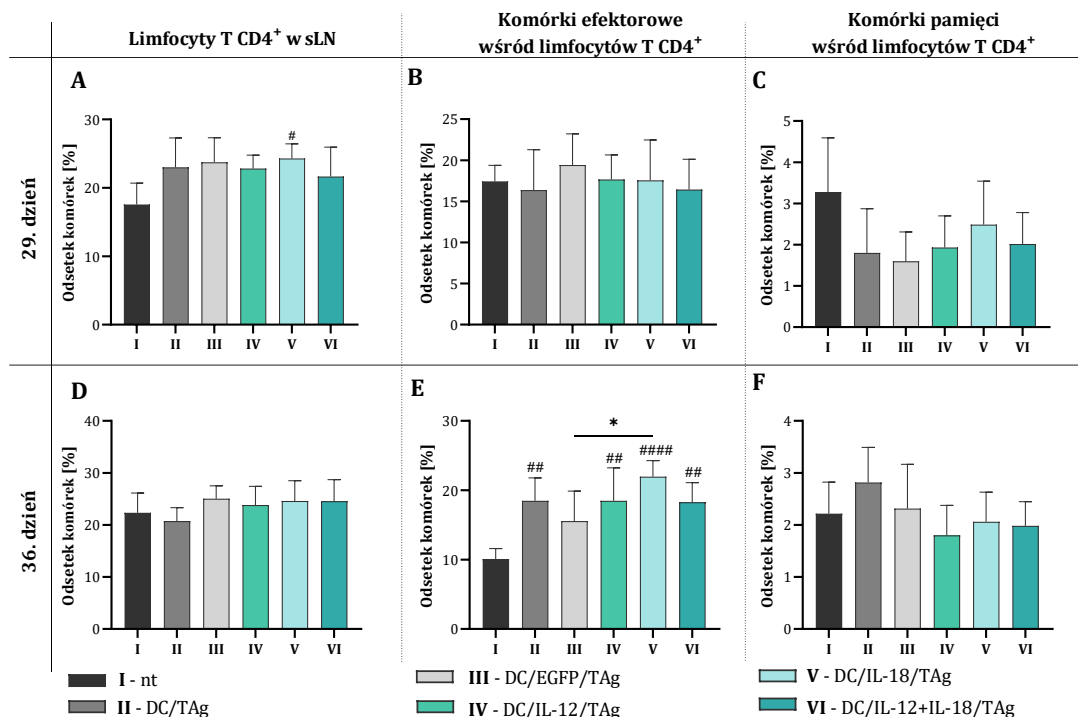
cytometryczną odsetka populacji komórek limfoidalnych i mieloidalnych w tych narządach (Ryc. 60). Oznaczono limfocyty T CD4⁺, limfocyty T CD8⁺, komórki NK i NKT oraz komórki dendrytyczne i makrofagi. Ponadto oszacowano wielkość populacji komórek efektorowych i komórek pamięci wśród limfocytów T CD4⁺ i limfocytów T CD8⁺, a także poziom ekspresji cząsteczek MHC II na powierzchni DC i Mf.



Ryc. 60. Schemat analizy populacji komórek mieloidalnych i limfoidalnych w wartowniczych węzłach chłonnych pobranych od myszy poddanych immunoterapii.

Po wyeliminowaniu debris oraz zlepow komórkowych, w analizowanych wartowniczych węzłach chłonnych wyodrębniono żywe leukocyty (DAPI^{neg}CD45⁺). Podczas analizy komórek limfoidalnych, wśród komórek DAPI^{neg}CD45⁺ zidentyfikowano limfocyty T (CD3⁺) oraz komórki NK (CD3^{neg}NK1.1⁺) i NKT (CD3⁺NK1.1⁺). Następnie wśród limfocytów, wyodrębniono komórki CD4⁺ oraz CD8⁺. Ponadto wśród limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ wyodrębniono komórki efektorowe (CD44⁺CD62L^{neg}) i komórki pamięci (CD44⁺CD62L⁺) na podstawie ekspresji markerów CD44 i CD62L. Podczas analizy komórek mieloidalnych wśród komórek DAPI^{neg}CD45⁺ zidentyfikowano komórki mieloidalne CD11b⁺, a wśród nich komórki CD11c⁺ oraz CD11c^{neg}. Wśród komórek CD11c⁺ wyodrębniono populację DC (CD11c⁺F4/80^{int}MHCII⁺), a wśród komórek CD11c^{neg} populację Mf (CD11c^{neg}F4/80⁺Ly6C^{neg}). Dodatkowo na powierzchni tych komórek określono poziom ekspresji cząsteczek MHC II (DC – żółty histogram, Mf – fioletowy histogram). Na rycinie przedstawiono reprezentatywną analizę wartowniczych węzłów chłonnych pobranych w 29. dniu doświadczenia od myszy traktowanej DC/Tag.

4.3.2.2.1. Subpopulacje komórek limfoidalnych w wartowniczych węzłach chłonnych



Ryc. 61. Odsetek limfocytów T CD4⁺ w wartowniczych węzłach chłonnych uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.

Wartownicze węzły chłonne pobierano od myszy w 29. (A, B, C) i 36. dniu doświadczenia (D, E, F). Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej sLN wyodrębniono populację limfocytów T CD4⁺ oraz oznaczono ekspresję cząsteczek CD62L i CD44 na powierzchni tych komórek (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 60). Określono odsetek limfocytów T CD4⁺ wśród leukocytów CD45⁺ (A, D) oraz odsetek komórek efektorowych (CD44⁺CD62L^{neg}) (B, E) i komórek pamięci (CD44⁺CD62L⁺) (C, F) wśród tych komórek. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A, E). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; #### - $p < 0,0001$ względem grupy nt; * - $p < 0,05$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

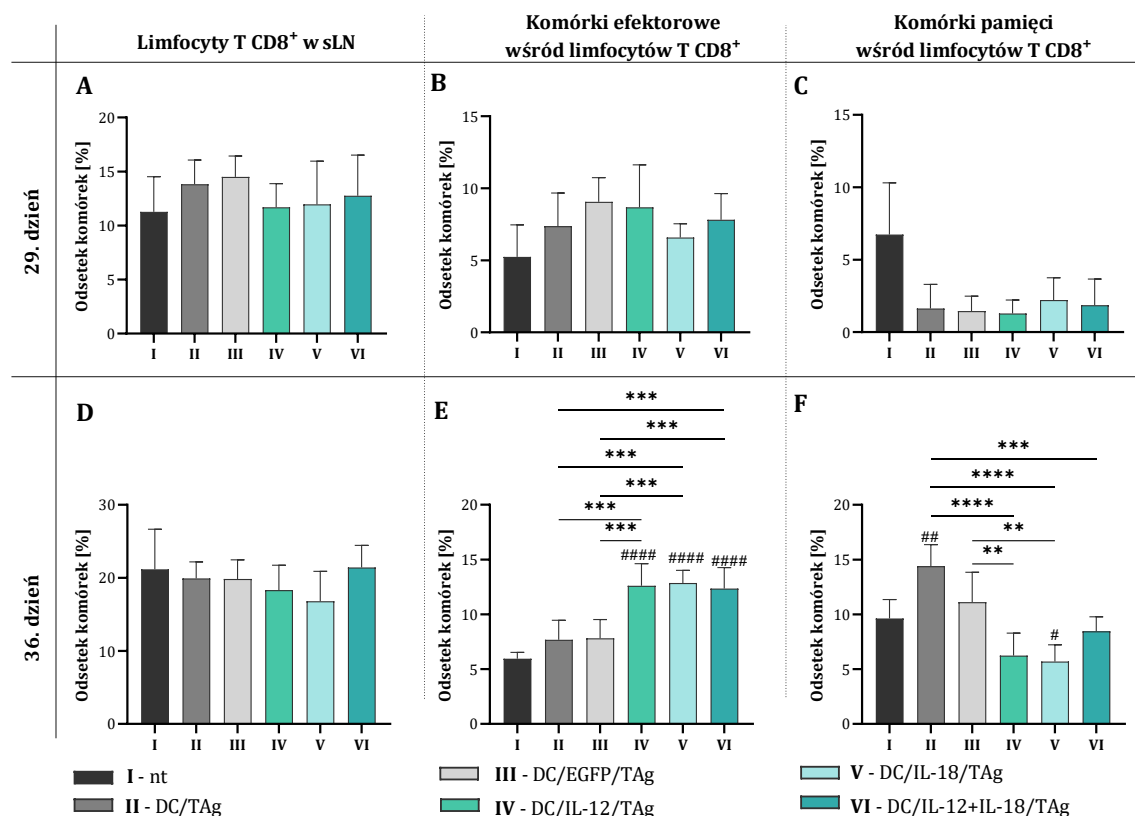
W sLN pobranych w 29. dniu doświadczenia od myszy nieleczonych udział procentowy limfocytów T CD4⁺ wynosił około 18% (Ryc. 61. A). Zastosowanie szczepionek wpłynęło na zwiększenie odsetka tych limfocytów, a po podaniu DC/IL-18/TAg zmiany te były istotne statystycznie. Natomiast nie wykazano znaczących zmian odsetka limfocytów T CD4⁺ efektorowych (Ryc. 61. B), a udział procentowy limfocytów T CD4⁺ pamięci po zastosowaniu immunoterapii okazał się niższy niż w grupie nieleczonej, przy czym najmniejszy odsetek tych komórek wykazano po podaniu DC/EGFP/TAg (Ryc. 61. C).

W dniu kolejnego pobrania, udział procentowy limfocytów T CD4⁺ w grupie myszy nieleczonych wynosił około 21%, a podanie modyfikowanych DC jedynie nieznacznie wpłynęło na wzrost odsetka tych limfocytów (Ryc. 61. D). Znacznie większe zróżnicowanie między grupami

myszy traktowanych odnotowano w przypadku efektorowych komórek T CD4⁺ i okazało się ono statystycznie istotne po podaniu DC/TAg, DC/IL-12/TAg, DC/IL-18/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg w porównaniu do grupy nieleczonej (Ryc. 61. D). Tymczasem po podaniu szczepionek, odsetek komórek pamięci wśród limfocytów T CD4⁺ w sLN uległ jedynie niewielkiemu obniżeniu (Ryc. 61. F). Po podaniu DC/TAg lub DC/EGFP/TAg odsetek tych komórek był wyższy niż w grupie nieleczonej, natomiast po podaniu DC transdukowanych do produkcji cytokin i stymulowanych TAg udział procentowy komórek T CD4⁺ pamięci obniżył się.

W 29. dniu doświadczenia odsetek komórek T CD8⁺ w sLN pobranych od myszy kontrolnych wynosił około 11%. Udział procentowy limfocytów T CD8⁺ oraz komórek efektorowych wśród tej populacji był wyższy w grupach myszy otrzymujących szczepionki niż w grupie nieleczonej, przy czym najwyższy odsetek tych komórek odnotowano po podaniu DC/EGFP/TAg, jednak zmiany te nie były istotne statystycznie (Ryc. 62. A, B). W przeciwieństwie do zmian w wielkości populacji komórek efektorowych, odsetek komórek CD8⁺ pamięci był niższy we wszystkich grupach poddanych immunoterapii niż w grupie nieleczonej (Ryc. 62. C).

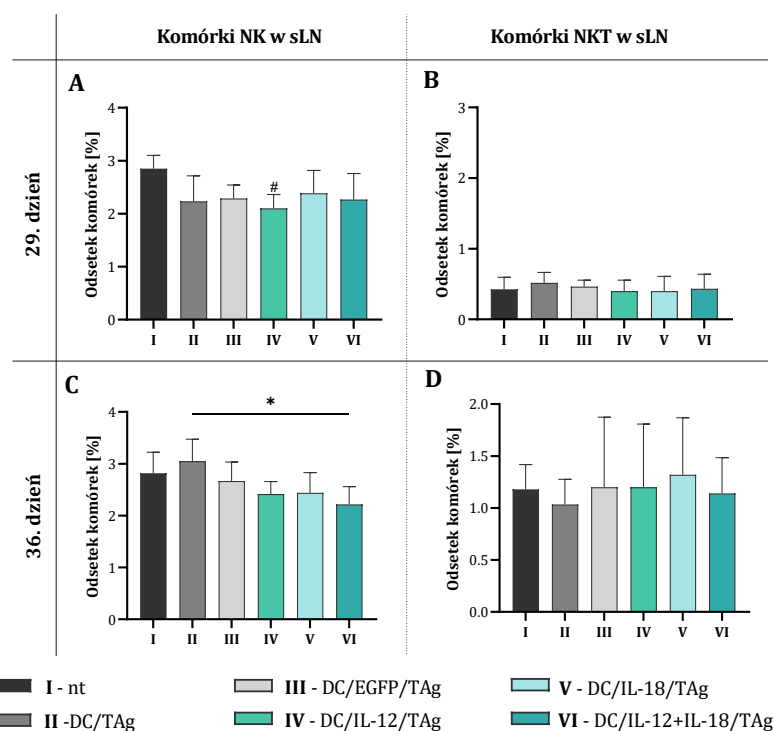
W 36. dniu doświadczenia udział procentowy limfocytów T CD8⁺ w sLN w grupie myszy nieleczonych wzrósł do około 20%, jednak podanie szczepionek nieznacznie wpłynęło na zmiany odsetka tych komórek (Ryc. 62. D). Z jednej strony, jedynie niewielkie obniżenie odsetka komórek CD8⁺, wykazano po podaniu DC/IL-12/TAg lub DC/IL-18/TAg. Z drugiej strony, zastosowanie immunoterapii wpłynęło na zwiększenie odsetka komórek efektorowych wśród limfocytów T CD8⁺, a największy istotny statystycznie wzrost wielkości tej populacji wykazano po podaniu DC transdukowanych do produkcji cytokin i stymulowanych TAg w porównaniu do wszystkich grup kontrolnych (Ryc. 62. E). Największemu zróżnicowaniu uległa natomiast wielkość populacji komórek pamięci wśród limfocytów T CD8⁺. W sLN zaobserwowano bowiem znaczący wzrost odsetka tych komórek po podaniu DC/TAg, a nawet niewielki wzrost udziału procentowego tych komórek odnotowany po podaniu DC/IL-18/TAg, który był niemal 2-krotnie większy niż 7 dni wcześniej (Ryc. 62. F).



Ryc. 62. Odsetek limfocytów T CD8⁺ w wartowniczych węzłach chłonnych uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.

Wartownicze węzły chłonne pobierano od myszy w 29. (A, B, C) i 36. dniu doświadczenia (D, E, F). Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej sLN wyodrębniono populację limfocytów T CD8⁺ oraz oznaczono ekspresję cząsteczek CD62L i CD44 na powierzchni tych komórek (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 60). Określono odsetek limfocytów T CD8⁺ wśród leukocytów CD45⁺ (A, D) oraz odsetek komórek efektorowych (CD44⁺CD62L^{neg}) (B, E) i komórek pamięci (CD44⁺CD62L⁺) (C, F) wśród tych komórek. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (E, F). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ##### - $p < 0,0001$ względem grupy nt; *** - $p < 0,001$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Kolejną populacją komórek limfoidalnych określaną w sLN pobranych od myszy były komórki NK i NKT (Ryc. 63). W 29. dniu doświadczenia, zastosowanie szczepionek wpłynęło na obniżenie odsetka tych komórek w porównaniu do grupy nieleczonej, jednak zmiany istotne statystycznie wykazano jedynie po podaniu DC/IL-12/TAg (Ryc. 63. A). W tym czasie, nie odnotowano jednak zmian udziału procentowego komórek NKT po zastosowaniu immunoterapii (Ryc. 63. B). W 36. dniu doświadczenia, odsetek komórek NK w sLN pobranych od myszy poddanych terapii utrzymywał się na niższym poziomie niż w grupie myszy nieleczonych, oprócz grupy traktowanej DC/TAg (Ryc. 63. C). Nie odnotowano wpływu podania szczepionek na zmiany wielkości populacji komórek NKT w sLN pobranych w tym dniu doświadczenia (Ryc. 63. D).

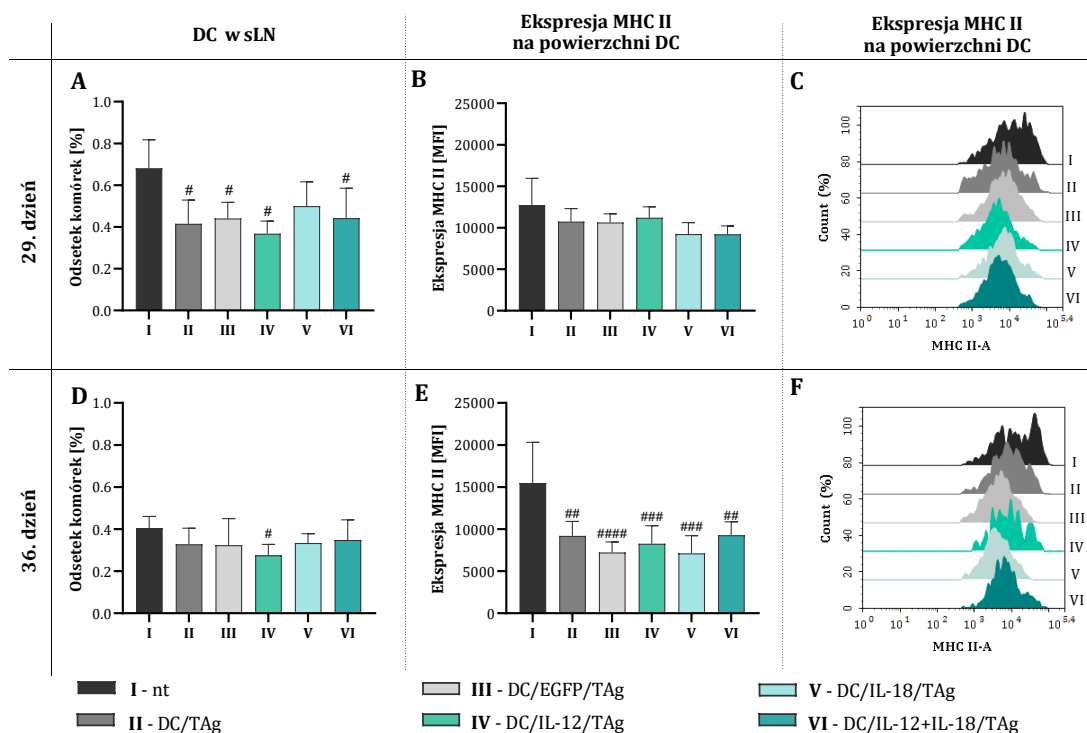


Ryc. 63. Odsetek komórek NK i NKT w wartowniczych węzłach chłonnych uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.

Wartownicze węzły chłonne pobierano od myszy w 29. (A, B, C) i 36. dniu doświadczenia (D, E, F). Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej sLN wyodrębniono populację komórek NK ($CD3^{neg}NK1.1^{+}$) oraz NKT ($CD3^{+}NK1.1^{+}$) (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 60). Określono odsetek komórek NK (A, C) oraz NKT (B, D) wśród leukocytów. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallis i testu *post hoc* Dunn'a (C) lub parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$ względem grupy nt; * - $p < 0,05$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

4.3.2.2.2. Subpopulacje komórek mieloidalnych w wartowniczych węzłach chłonnych

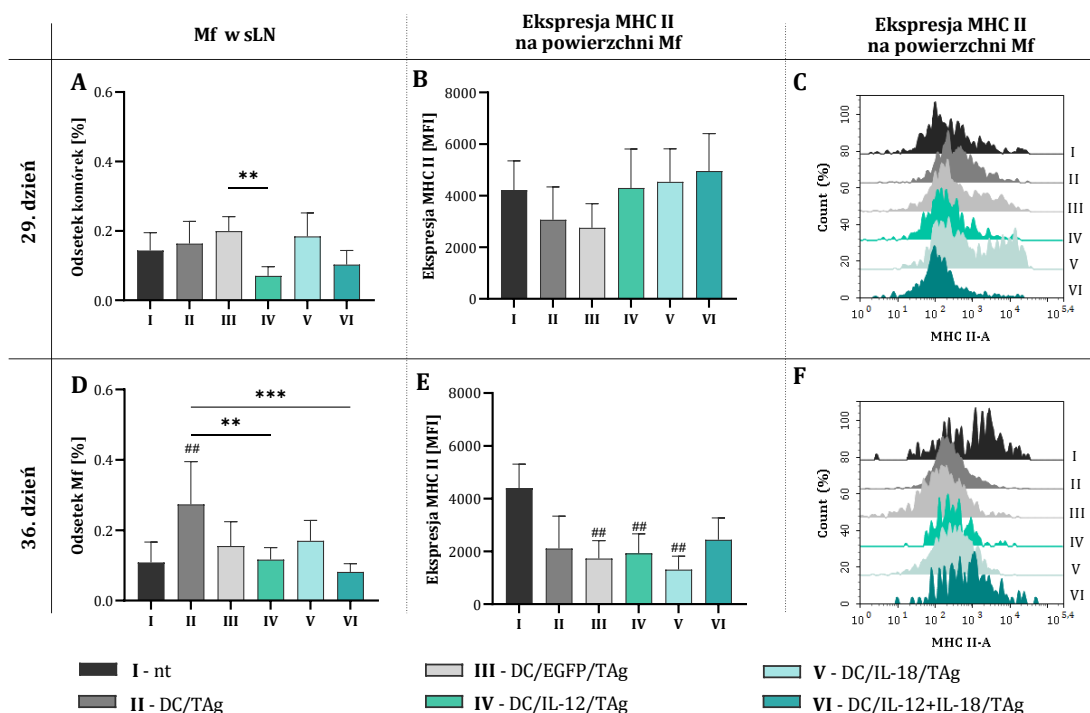
W 29. dniu doświadczenia, odsetek komórek dendrytycznych w sLN uzyskanych od myszy z grupy nietraktowanej wynosił około 0,6%, a zastosowanie szczepionek znacząco wpłynęło na obniżenie udziału procentowego tych komórek (Ryc. 64. A) Najniższy odsetek DC odnotowano po podaniu DC/IL-12/TAg. Komórki dendrytyczne w sLN pobranych od myszy poddanych immunoterapii charakteryzowały się obniżoną ekspresją cząsteczek MHC II, w szczególności po podaniu DC/IL-18/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg, jednak zmiany te nie były istotne statystycznie (Ryc. 64. B, C).



Ryc. 64. Ocena komórek dendrytycznych w wartowniczych węzłach chłonnych uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.

Wartownicze węzły chłonne pobierano od myszy w 29. (A, B, C) i 36. dniu doświadczenia (D, E, F). Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej wśród komórek DAPI^{neg}CD45⁺ zidentyfikowano komórki mieloidalne CD11b⁺, a wśród nich wyodrębniono populację komórek dendrytycznych (CD11c⁺F4/80^{int}), a także określono poziom ekspresji cząsteczek MHC II na powierzchni DC (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 60). Określono odsetek komórek DC (A, D) oraz średnią intensywność fluorescencji cząsteczek MHC II na powierzchni DC (B, C, E, F). Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Na histogramach przedstawiono dane z prób reprezentatywnych. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A, E) lub parametrycznego testu Brown-Forsythe i Welch ANOVA oraz testu *post hoc* T3 Dunnett'a (D). Za istotnie statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$; #### - $p < 0,0001$ względem grupy nt). nt – grupa kontrolna nietraktowana

W 36. dniu doświadczenia, ponownie wykazano obniżony odsetek DC w sLN pobranych od myszy otrzymujących szczepionki w porównaniu do grupy nieleczonej, jednak zmiany istotne statystycznie zaobserwowano jedynie po podaniu DC/IL-12/TAg (Ryc. 64. D). Natomiast DC oznaczone w sLN otrzymanych od myszy poddanych immunoterapii charakteryzowały się istotnie statystycznie obniżoną ekspresją cząsteczek MHC II w porównaniu do grupy nieleczonej (Ryc. 64. E, F), przy czym najniższy poziom ekspresji MHC II na powierzchni DC odnotowano po podaniu DC/EGFP/TAg lub DC/IL-18/TAg.



Ryc. 65. Ocena makrofagów w wartowniczych węzłach chłonnych uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.

Wartownicze węzły chłonne pobierano od myszy w 29. (A, B, C) i 36. dniu doświadczenia (D, E, F). Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej wśród komórek DAPI^{neg}CD45⁺ zidentyfikowano komórki mieloidalne CD11b⁺, a wśród nich wyodrębniono populację makrofagów (CD11c^{-neg}F4/80⁺), a także określono poziom ekspresji cząsteczek MHC II na powierzchni Mf (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 60). Określono odsetek komórek Mf (A, D) oraz średnią intensywność fluorescencji cząsteczek MHC II na powierzchni DC (B, C, E, F). Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Na histogramach przedstawiono dane z prób reprezentatywnych. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunn'a (A) lub parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (D), lub parametrycznego testu Brown-Forsythe i Welch ANOVA oraz testu *post hoc* T3 Dunnett'a (E). Za istotnie statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (## - $p < 0,01$ względem grupy nt; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ pomiędzy poszczególnymi grupami). *nt* – grupa kontrolna nietraktowana

Drugą populacją oznaczaną wśród komórek mieloidalnych w sLN były makrofagi (Ryc. 65). Odsetek tych komórek w sLN pobranych w 29. dniu doświadczenia od myszy nieleczonych wynosił około 0,2%. Zastosowanie DC/TAg, DC/EGFP/TAg lub DC/IL-18/TAg wpłynęło na niewielki wzrost odsetka tych komórek, natomiast podanie DC/IL-12/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg spowodowało jego obniżenie w sLN (Ryc. 65. A). Makrofagi wyodrębnione w sLN pobranych od myszy traktowanych DC/TAg lub DC/EGFP/TAg charakteryzowały się obniżoną ekspresją cząsteczek MHC II w porównaniu do grupy nieleczonej, podczas gdy Mf w sLN pobranych od myszy otrzymujących modyfikowane DC wykazywały zwiększoną ekspresję tych cząsteczek (Ryc. 65. B, C). Obserwowane zmiany nie były istotne statystycznie.

W 36. dniu doświadczenia, po podaniu DC/EGFP/TAg wykazano istotnie statystyczny wzrost odsetka Mf w sLN w odniesieniu do grupy myszy nieleczonych (Ryc. 65. D), jednak nie

tylko po podaniu DC/EGFP/TA_g, lecz również DC/IL-12/TA_g lub DC/IL-18/TA_g wykazano istotne statystycznie obniżenie ekspresji cząsteczek MHC II na powierzchni Mf (Ryc. 65. E, F).

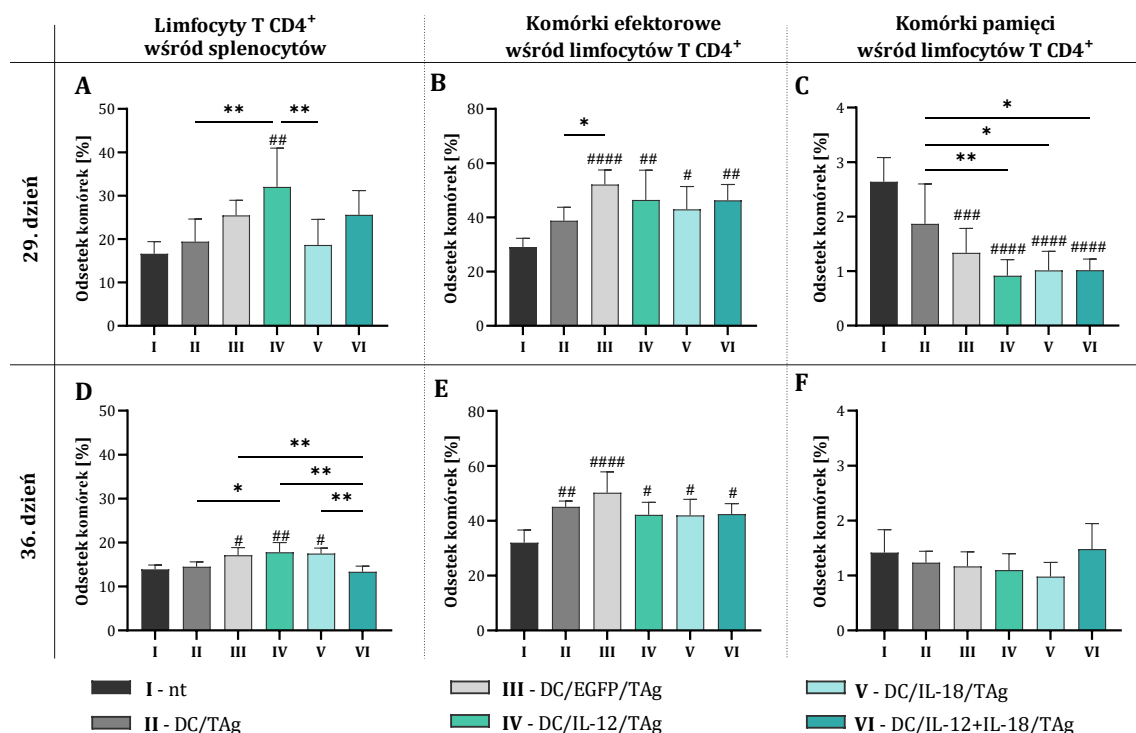
4.3.3. Ocena ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej u myszy poddanych immunoterapii

Celem badań przeprowadzonych w kolejnym etapie było określenie wpływu zastosowania immunoterapii na aktywację ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej. W śledzionach pobranych od myszy nieleczonych i poddanych immunoterapii oznaczono zmiany w wielkości populacji komórek limfoidalnych i mieloidalnych (Ryc. 66). Ponadto wyizolowane komórki śledzionowe poddano wtórnej stymulacji podczas pięciodniowej mieszanej hodowli z komórkami MC38 i określono ich aktywność cytotoksyczną wobec komórek nowotworowych oraz poziom produkcji cytokin przez restymulowane splenocyty.

W celu oznaczenia populacji komórek limfoidalnych uzyskanych ze śledzion, wśród komórek DAPI^{neg}CD45⁺ zidentyfikowano limfocyty B (CD19⁺) oraz komórki CD19^{neg}. W kolejnym etapie analizy oznaczono limfocyty T (CD3⁺NK1.1^{neg}), komórki NK (CD3^{neg}NK1.1⁺) oraz komórki NKT (CD3⁺NK1.1⁺) wśród komórek CD19^{neg}. Następnie, wśród populacji limfocytów T (CD3⁺) wyodrębniono komórki CD4⁺ i CD8⁺, a wśród limfocytów T CD4⁺ oznaczono limfocyty T regulatorowe (Treg, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺). Ponadto na podstawie ekspresji markerów CD44 i CD62L, wśród limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ i Treg wyodrębniono komórki efektorowe (CD44⁺CD62L^{neg}) i komórki pamięci (CD44⁺CD62L⁺). Aby określić zmiany w wielkości populacji komórek mieloidalnych, wśród splenocytów DAPI^{neg}CD45⁺ zidentyfikowano komórki CD11b⁺, a wśród nich komórki CD11c⁺ oraz CD11c^{neg} i wyodrębniono populację DC (CD11c⁺F4/80^{int}MHC II⁺), a wśród komórek CD11c^{neg} wyznaczono populację Mf (CD11c^{neg}F4/80⁺). Ponadto na powierzchni tych komórek określono poziom ekspresji cząsteczek MHC II. Na podstawie otrzymanych wyników, określano zmiany w udziale procentowym wybranych populacji komórek wśród leukocytów.

4.3.3.1. Subpopulacje komórek limfoidalnych w śledzionach uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii

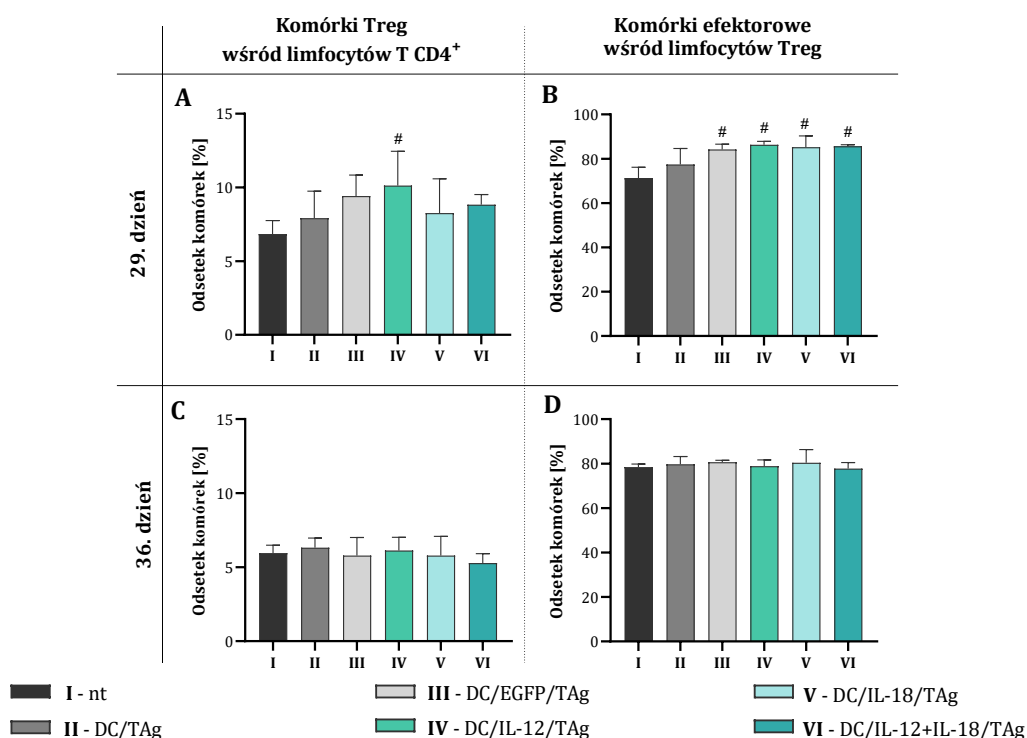
W 29. dniu doświadczenia odsetek limfocytów T CD4⁺ wśród splenocytów pobranych od myszy nieleczonych wynosił około 15%, a zastosowanie szczepionek wpłynęło na zwiększenie udziału procentowego tych komórek w śledzionach (Ryc. 67. A). Największy, istotny statystycznie wzrost odsetka limfocytów T CD4⁺ wśród splenocytów odnotowano po podaniu DC/IL-12/TAg w porównaniu do grupy myszy nietraktowanych lub otrzymujących DC/TAg. Ponadto zastosowanie wszystkich typów transdukowanych DC wpłynęło na istotny statystycznie wzrost odsetka komórek efektorowych (Ryc. 67. B) oraz obniżenie odsetka komórek pamięci (Ryc. 67. C) wśród limfocytów T CD4⁺ w odniesieniu do grupy nielezionej.



Ryc. 67. Odsetek i stopień aktywacji limfocytów T CD4⁺ wśród splenocytów uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.

Śledziony pobierano od myszy w 29. (A, B, C) i 36. dniu doświadczenia (D, E, F). Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej komórek śledzionowych wyodrębniono populację limfocytów T CD4⁺ oraz oznaczono ekspresję cząsteczek CD62L i CD44 na powierzchni tych komórek (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 66). Określono odsetek limfocytów T CD4⁺ (A, D) wśród splenocytów oraz odsetek komórek efektorowych (CD44⁺CD62L^{neg}) (B, E) i komórek pamięci (CD44⁺CD62L⁺) (C, F) wśród limfocytów T CD4⁺. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A, B, C, D, E, F). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$; #### - $p < 0,0001$ względem grupy nt; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Siedem dni po trzecim podaniu tj. w 36. dniu doświadczenia, odsetek limfocytów T CD4⁺ w śledzionach pobranych od myszy nietraktowanych uległ obniżeniu w stosunku do pierwszego pobrania, a różnice między poszczególnymi grupami, mimo że istotne statystycznie, okazały się dużo mniejsze (Ryc. 67. D). Podobną zależność zaobserwowano w przypadku efektorowych komórek CD4⁺, których odsetek we wszystkich grupach poddanych immunoterapii pozostał na poziomie podobnym do stwierdzonego siedem dni wcześniej (Ryc. 67. E). Nieco zaskakująca okazała się stabilna wielkość subpopulacji komórek pamięci w grupach otrzymujących modyfikowane DC w porównaniu do znacznego obniżenia odsetka tych limfocytów w grupie kontrolnej lub otrzymującej DC/TAg (Ryc. 67. F).

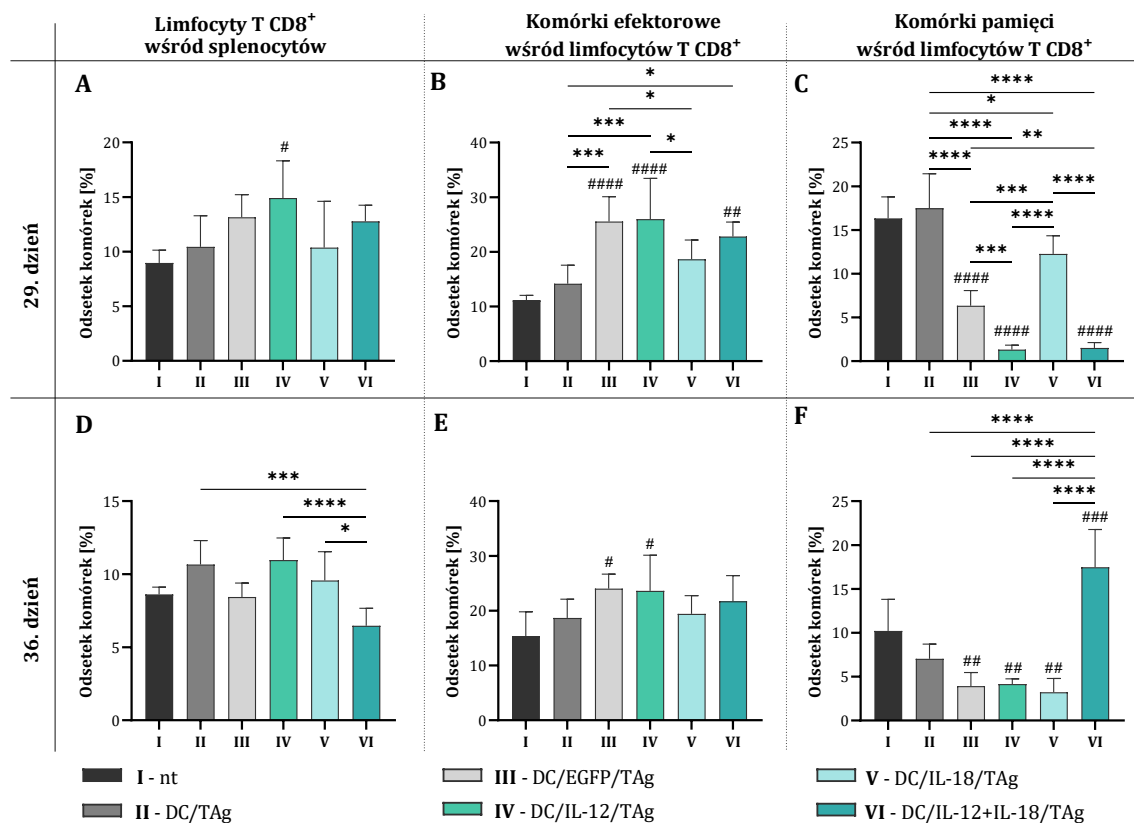


Ryc. 68. Odsetek i stopień aktywacji limfocytów T regulatorowych wśród splenocytów uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.

Śledziony pobierano od myszy w 29. (A, B) i 36. dniu doświadczenia (C, D). Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej komórek śledzionowych wyodrębniono populację limfocytów T CD4⁺, a wśród nich populację limfocytów Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) oraz oznaczono ekspresję cząsteczek CD62L i CD44 na powierzchni tych komórek (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 66). Określono odsetek limfocytów Treg wśród limfocytów T CD4⁺ (A, C) oraz odsetek komórek efektorowych (CD44⁺CD62L^{neg}) (B, D) wśród limfocytów Treg. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A) lub parametrycznego testu Brown-Forsythe i Welch ANOVA oraz testu *post hoc* T3 Dunnett'a (B). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$ względem grupy nt). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Wśród splenocytów pobranych 29. dnia doświadczenia od myszy nieleczonych, udział procentowy limfocytów Treg wśród komórek T CD4⁺ wynosił około 7%, a zastosowanie szczepionek wpłynęło na wzrost odsetka Treg, w szczególności po podaniu DC/IL-12/TAg (Ryc.

68. A). Ponadto zastosowanie modyfikowanych DC wpłynęło na istotne zwiększenie odsetka komórek efektorowych wśród Treg, w porównaniu do grupy nieleczonej (Ryc. 68. B). W 36. dniu doświadczenia nie wykazano wpływu zastosowania immunoterapii na zmiany odsetka limfocytów Treg oraz efektorowych komórek Treg (Ryc. 68. C, D).



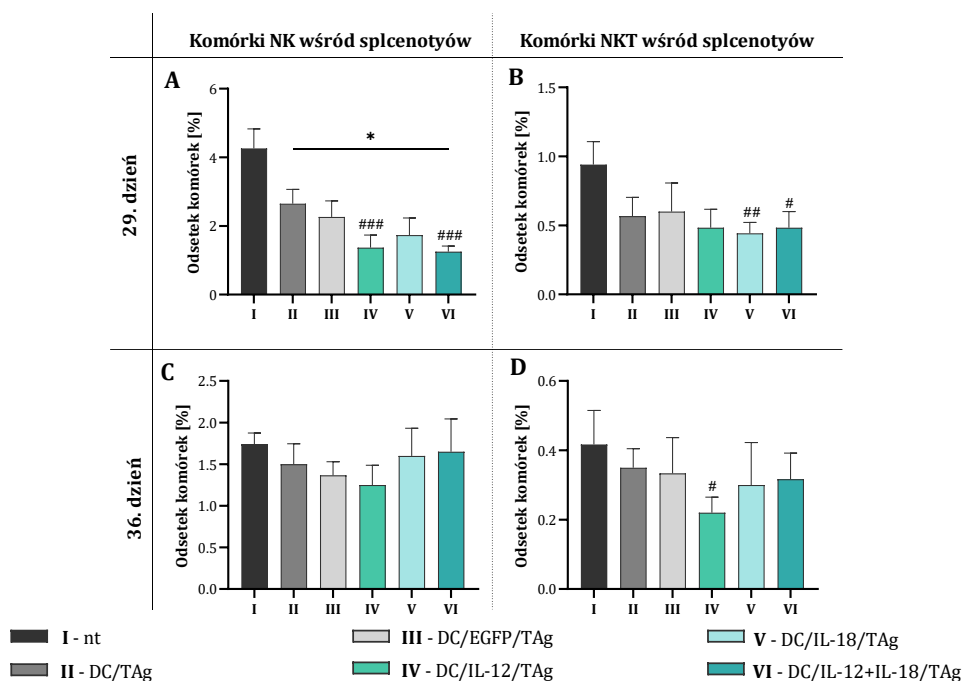
Ryc. 69. Odsetek i stopień aktywacji limfocytów T CD8⁺ wśród splenocytów uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.

Śledziona pobierano od myszy w 29. (A, B, C) i 36. dniu doświadczenia (D, E, F). Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej wśród splenocytów wyodrębniono populację limfocytów T CD8⁺ oraz oznaczono ekspresję cząsteczek CD62L i CD44 na powierzchni tych komórek (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 66). Określono odsetek limfocytów T CD8⁺ (A, D) wśród splenocytów oraz odsetek komórek efektorowych (CD44⁺CD62L^{neg}) (B, E) i komórek pamięci (CD44⁺CD62L⁺) (C, F) wśród limfocytów T CD8⁺. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunn'a (A) lub parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (B, C, D, E, F). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$; #### - $p < 0,0001$ względem grupy nt; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Kolejną oznaczaną populacją były limfocyty T CD8⁺. W 29. dniu doświadczenia, udział procentowy tych komórek w śledzionach myszy nietraktowanych wynosił około 8%, natomiast zastosowanie immunoterapii, szczególnie szczepionek na bazie DC/IL-12/TAg, wpłynęło na zwiększenie odsetka limfocytów T CD8⁺ (Ryc. 69. A). W tym dniu zaobserwowano istotne statystycznie zróżnicowanie udziału procentowego zarówno komórek efektorowych, jak i komórek pamięci. Silnemu wzrostowi odsetka limfocytów efektorowych po podaniu DC/EGFP/TAg, DC/IL-12/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg, w odniesieniu do grupy nietraktowanej

lub otrzymującej DC/TAg, odpowiadało znaczące obniżenie odsetka komórek pamięci (Ryc. 69. B, C).

W 36. dniu doświadczenia, odsetek limfocytów T CD8⁺ z jednej strony, uległ niewielkiemu obniżeniu, lecz z drugiej strony - znacznemu zróżnicowaniu zależnemu od rodzaju zastosowanych komórek szczepionkowych. Więcej nawet, statystycznie istotne różnice wykazano przede wszystkim w porównaniu do grupy DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc. 69. D). W tym dniu doświadczenia, zwiększony odsetek efektorowych komórek CD8⁺ w stosunku do grupy nietraktowanej utrzymywał się we wszystkich grupach poddanych immunoterapii, a zmiany istotne statystycznie odnotowano po podaniu DC/EGFP/TAg i DC/IL-12/TAg (Ryc. 69. E). Jednocześnie zaobserwowano obniżenie odsetka komórek pamięci wśród limfocytów T CD8⁺ w odniesieniu do grupy nieleczzonej, we wszystkich grupach otrzymujących szczepionki, z wyjątkiem myszy szczepionych DC/IL-12+IL-18/TAg. Podanie komórek szczepionkowych produkujących obie cytokiny wywołało zaskakująco wysoki wzrost odsetka limfocytów T CD8⁺ pamięci (Ryc. 69. F). Obserwacja ta może sugerować, że wygenerowanie subpopulacji komórek pamięci wymaga dłuższego czasu lub, że rozpoczął się proces powstawania *de novo* kolejnej populacji tych komórek gotowych na ponowną stymulację TAg.



Ryc. 70. Odsetek komórek NK i NKT wśród splenocytów uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii. Śledziony pobierano od myszy w 29. (A, B) i 36. (C, D) dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej komórek śledzionowych wyodrębniono populacje komórek NK (CD3^{neg}NK1.1⁺) oraz komórek NKT (CD3⁺NK1.1⁺) (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 66). Określono odsetek komórek NK (A, C) oraz NKT (B, D) wśród splenocytów. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallis i testu *post hoc* Dunn'a (A, B, D). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których p<0,05 (# - p<0,05; ## - p<0,01; ### - p<0,001 względem grupy nt; * - p<0,05 pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Wśród splenocytów pobranych 29. dnia doświadczenia od myszy nieleczonych, komórki NK stanowiły około 4%, a podanie szczepionek wpłynęło na obniżenie udziału procentowego tych komórek (Ryc. 70. A). Istotnie statystycznie zmiany odsetka tych komórek wykazano po podaniu DC/IL-12/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg. Komórki NKT stanowiły jedynie 1% splenocytów, a zastosowanie immunoterapii podobnie jak w przypadku komórek NK, spowodowało obniżenie odsetka tych komórek, przy czym zmiany istotnie statystycznie wykazano po podaniu DC/IL-18/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc. 70. B).

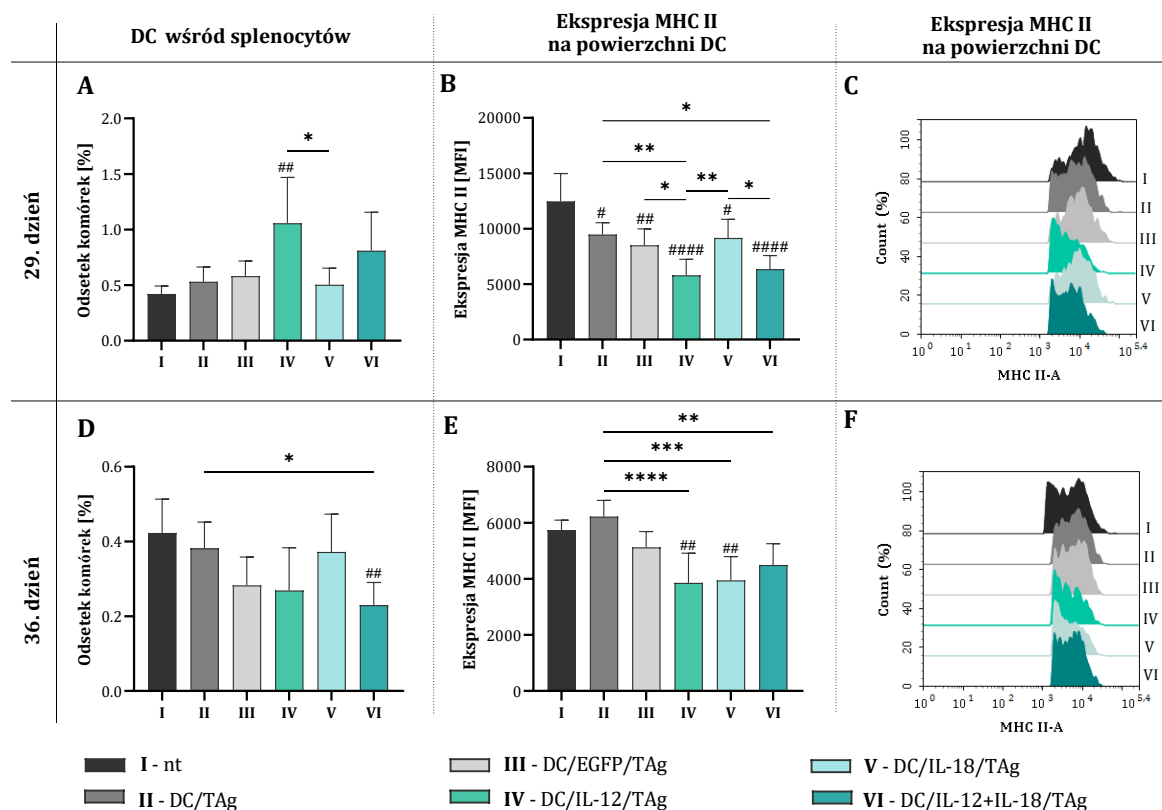
W 36. dniu doświadczenia, odsetek komórek NK w grupie myszy nieleczonych obniżył się do poziomu obserwowanego w grupach otrzymujących szczepionki, a niewielkie zmiany między grupami nie były istotnie statystycznie (Ryc. 70. C). Zastosowanie immunoterapii spowodowało obniżenie udziału procentowego komórek NKT w porównaniu do grupy nieleczonej, a zmiany istotnie statystycznie odnotowano po podaniu DC/IL-12/TAg (Ryc. 70. D).

4.3.3.2. *Subpopulacje komórek mieloidalnych w śledzionach uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii*

W śledzionach pobranych od myszy doświadczalnych oceniano zmiany udziału procentowego komórek dendrytycznych oraz makrofagów, a także stopień pobudzenia tych komórek.

W 29. dniu doświadczenia odsetek komórek dendrytycznych wśród splenocytów pobranych od myszy nietraktowanych wynosił poniżej 0,5%, a po podaniu szczepionek zwiększył się we wszystkich grupach terapeutycznych (Ryc. 71. A). Najwyższy odsetek DC wśród splenocytów w tym dniu, odnotowano po podaniu DC/IL-12/TAg. Komórki dendrytyczne wyodrębnione wśród komórek śledzionowych pobranych od myszy poddanych immunoterapii charakteryzowały się obniżoną ekspresją cząsteczek MHC II na ich powierzchni w stosunku do grupy nieleczonej, a najniższy poziom ekspresji MHC II na powierzchni śledzionowych DC odnotowano po podaniu szczepionek zawierających DC/IL-12/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc. 71. B, C).

W 36. dniu doświadczenia, odsetek DC wśród komórek śledzionowych był niższy w grupach myszy otrzymujących szczepionki w porównaniu do grupy nieleczonej, a istotnie statystycznie obniżenie udziału procentowego tych komórek wykazano po podaniu DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc. 71. D). Natomiast istotne obniżenie ekspresji cząsteczek MHC II na powierzchni DC wykazano po podaniu DC/IL-12/TAg lub DC/IL-18/TAg w porównaniu grupy nietraktowanej (Ryc. 71. E, F).



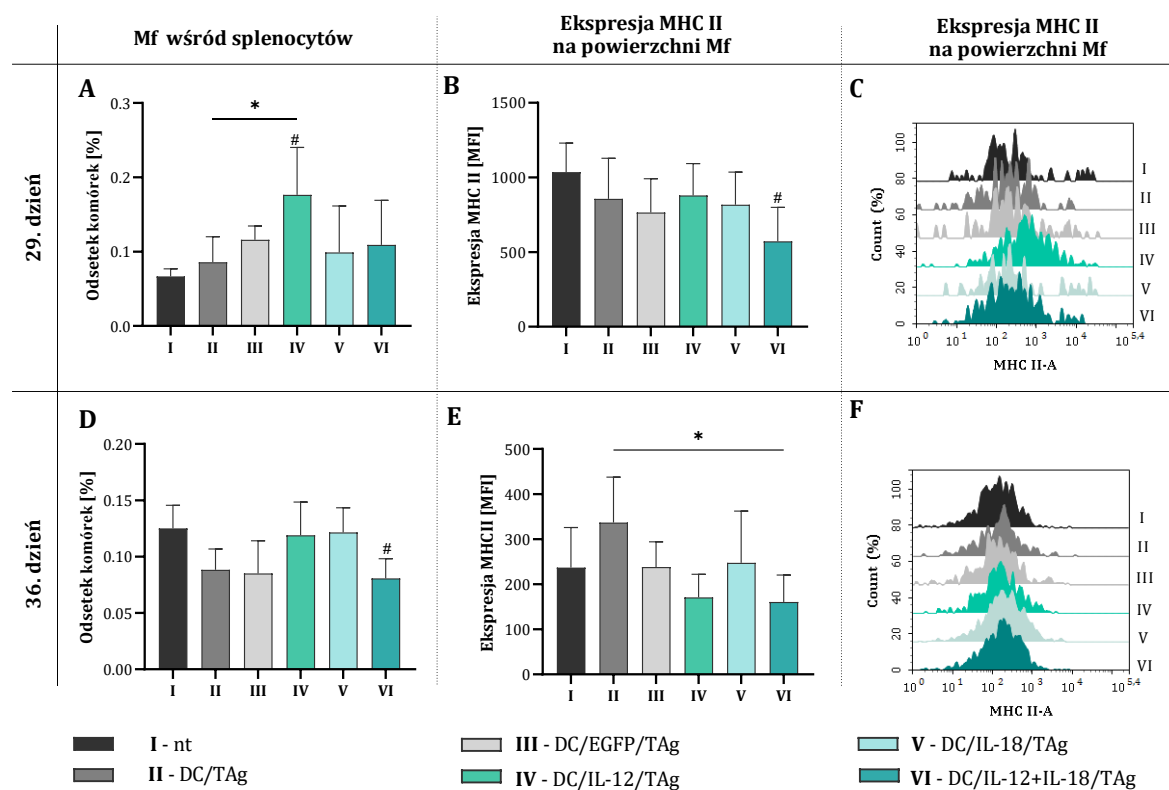
Ryc. 71. Odsetek i stopień pobudzenia komórek dendrytycznych wśród splenocytów uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.

Śledziony pobierano od myszy w 29. (A, B, C) i 36. dniu doświadczenia (D, E, F). Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej wśród komórek DAPI^{neg}CD45⁺ zidentyfikowano komórki mieloidalne CD11b⁺, a wśród nich wyodrębniono populację komórek dendrytycznych (CD11c⁺F4/80^{int}), a także określono poziom ekspresji cząsteczek MHC II na powierzchni DC (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 66). Określono odsetek komórek DC (A, D) oraz średnią intensywność fluorescencji cząsteczek MHC II (B, C, E, F) na powierzchni tych komórek. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Na histogramach przedstawiono dane z prób reprezentatywnych. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunn'a (A) lub parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (B, D, E). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; #### - $p < 0,0001$ względem grupy nt; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Odsetek makrofagów w śledzionach pobranych od myszy nietraktowanych w 29. dniu doświadczenia wynosił poniżej 0,1%. Zastosowanie szczepionki, podobnie jak w przypadku zmian populacji DC w śledzionach, spowodowało wzrost odsetka Mf w odniesieniu do grupy myszy nietraktowanych, w szczególności po podaniu DC/IL-12/TAg (Ryc. 72. A). Makrofagi oznaczone wśród splenocytów pobranych od myszy poddanych immunoterapii charakteryzowały się obniżoną ekspresją cząsteczek MHC II na ich powierzchni, jednak zmiany istotne statystycznie odnotowano jedynie po podaniu DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc. 72. B, C).

Po 7 dniach, odsetek Mf wśród splenocytów pobranych od myszy otrzymujących szczepionki był równy lub niższy niż w grupie myszy nieleczonych, a istotne statystycznie obniżenie udziału procentowego tych komórek wykazano po podaniu DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc.

72. D). Obniżenie ekspresji MHC II na powierzchni Mf wykazano po podaniu DC/IL-12/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg w odniesieniu do grupy nietraktowanej, jednak zmiany te nie były istotne statystycznie (Ryc. 72. E, F).

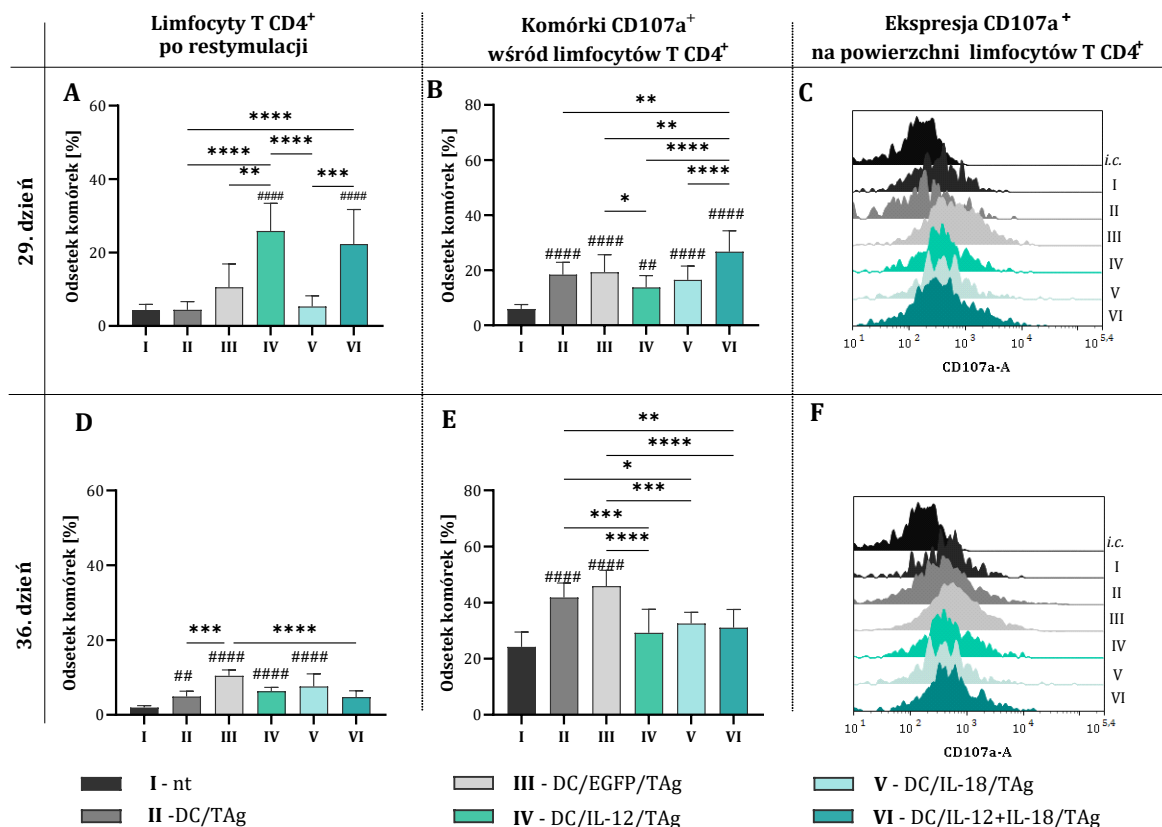


Ryc. 72. Odsetek i stopień pobudzenia makrofagów wśród splenocytów uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.

Śledziony pobierano od myszy w 29. (A, B, C) i 36. dniu doświadczenia (D, E, F). Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej wśród komórek DAPI^{neg}CD45⁺ zidentyfikowano komórki mieloidalne CD11b⁺, a wśród nich wyodrębniono populację makrofagów (CD11c^{neg}F4/80⁺), a także określono poziom ekspresji cząsteczek MHC II na powierzchni Mf (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 66). Określono odsetek Mf (A, D) oraz średnią intensywność fluorescencji cząsteczek MHCII (B, C, E, F) na powierzchni tych komórek. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Na histogramach przedstawiono dane z prób reprezentatywnych. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A, B, D, E). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$ względem grupy nt; * - $p < 0,05$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

4.3.3.3. Aktywność restymulowanych splenocytów uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii

Komórki śledzionowe, uzyskane od myszy poddanych immunoterapii oraz myszy nieleczonych, powtórnie ekspozowano na antygeny nowotworowe w pięciodniowej mieszanej hodowli *ex vivo* z komórkami MC38. Określono odsetek limfocytów T CD4⁺, T CD8⁺ oraz komórek NK, a także poziom ekspresji cząsteczek CD107a na powierzchni tych komórek. Ponadto oceniano aktywność cytotoksyczną komórek śledzionowych wobec komórek MC38 oraz poziom produkowanych cytokin.



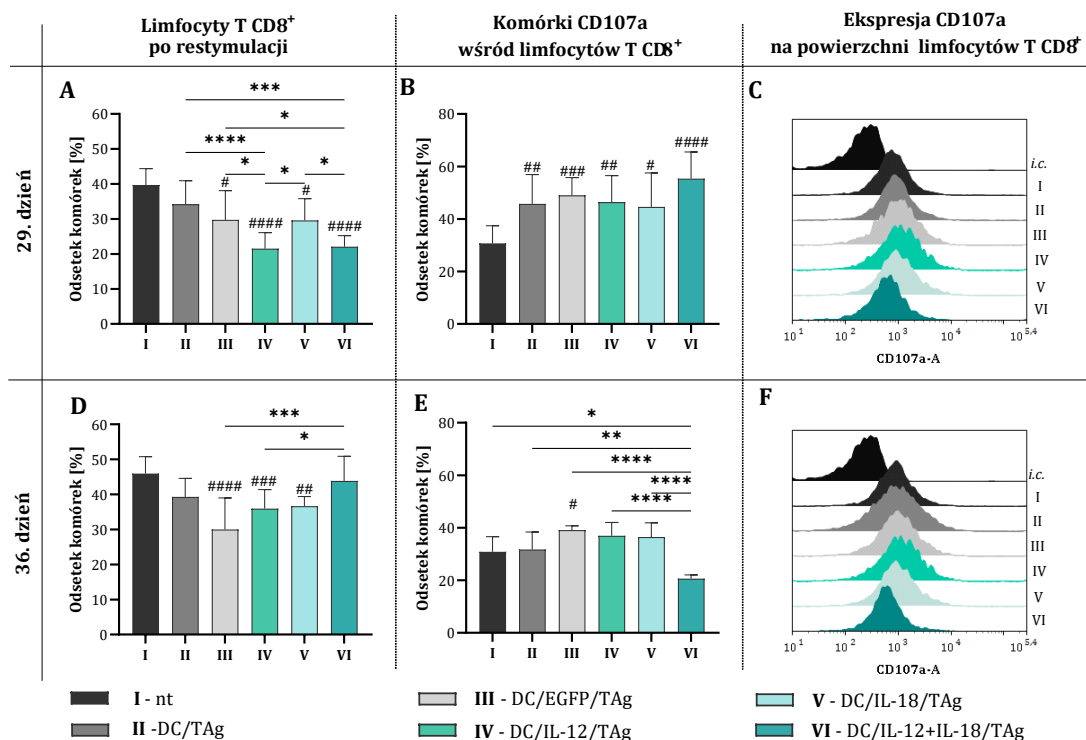
Ryc. 73. Odsetek limfocytów T CD4⁺ wśród restymulowanych splenocytów uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.

Śledziony pobierano od myszy w 29. (A, B, C) i 36. dniu doświadczenia (D, E, F). Restymulowane splenocyty inkubowano z komórkami nowotworowymi MC38 przez 2 godziny. Po tym czasie określono odsetek limfocytów T CD4⁺ (A, D) wśród restymulowanych splenocytów oraz odsetek komórek zdolnych do wydzielania ziaren cytolitycznych (CD107a⁺) wśród tych komórek (B, C, E, F). Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Na histogramach przedstawiono dane z prób reprezentatywnych. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunn'a (A, D, E) lub parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (B). Za istotnie statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (## - $p < 0,01$; ##### - $p < 0,0001$ względem grupy nt; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

W wyniku restymulacji splenocytów pobranych w 29. dniu doświadczenia odnotowano zależne od rodzaju podanej szczepionki silne zróżnicowanie odsetka limfocytów T CD4⁺. W odniesieniu do grupy nieleczonej, istotny statystycznie wzrost odsetka tych komórek wykazano po zastosowaniu DC/IL-12/TAg oraz DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc. 73. A). Mimo zależnych od rodzaju szczepionki zmian w wielkości tej populacji, limfocyty T CD4⁺ oznaczone wśród splenocytów pobranych od myszy otrzymujących szczepionki charakteryzowały się znacząco wyższą zdolnością do wydzielania ziaren cytolitycznych niż komórki pobrane od myszy nietraktowanych. Najwyższy wzrost odsetka komórek CD4⁺CD107a⁺ wykazano po podaniu DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc. 73. B, C).

Odpowiedź splenocytów uzyskanych w 36. dniu doświadczenia na stymulację *ex vivo* nie wywołała zmian w wielkości populacji limfocytów T CD4⁺ w stosunku do komórek pobranych 7

dni wcześniej. Niemniej jednak stwierdzono istotnie wyższy odsetek tych komórek we wszystkich grupach otrzymujących szczepionki, oprócz DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc. 73. D). Pięciodniowa stymulacja splenocytów uzyskanych z każdej z grup poddanych immunoterapii, wpłynęła natomiast na istotny statystycznie wzrost odsetka komórek CD4⁺ zdolnych do wydzielania ziaren cytotolitycznych (Ryc. 73. E, F).

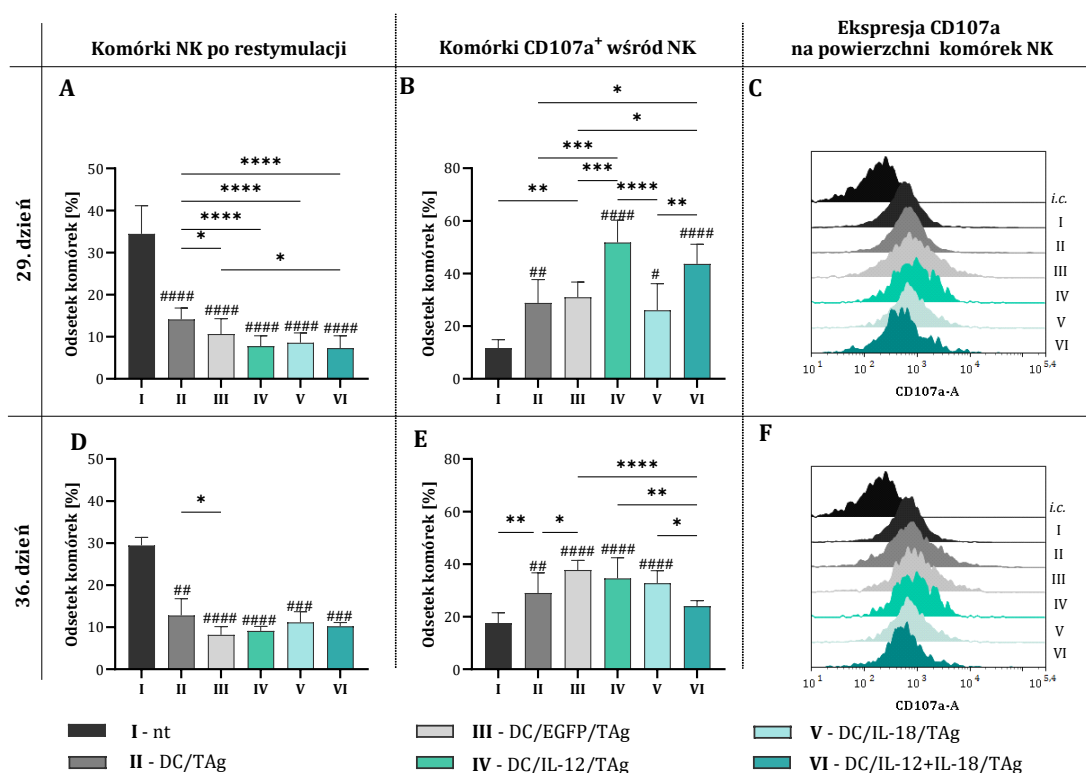


Ryc. 74. Odsetek limfocytów T CD8⁺ wśród restymulowanych splenocytów uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.

Śledziona pobierano od myszy w 29. (A, B, C) i 36. dniu doświadczenia (D, E, F). Restymulowane splenocyty inkubowano z komórkami nowotworowymi MC38 przez 2 godziny. Po tym czasie określono odsetek limfocytów T CD8⁺ (A, D) wśród restymulowanych splenocytów oraz odsetek komórek zdolnych do wydzielania ziaren cytotolitycznych (CD107a⁺) wśród tych komórek (B, C, E, F). Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Na histogramach przedstawiono dane z prób reprezentatywnych. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunn'a (A, B, D, E). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$; #### - $p < 0,0001$ względem grupy nt; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Znacznie mniejsze zróżnicowanie odsetka limfocytów T CD8⁺ wykazano wśród stymulowanych *ex vivo* komórek śledzionowych pobranych w 29. dniu doświadczenia. Jednak w tym przypadku stwierdzono wpływ podania transdukowanych DC na obniżenie udziału procentowego tych limfocytów. W porównaniu do grupy nieleczonej, podanie DC/IL-12/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg istotnie statystycznie zmniejszyło odsetek limfocytów T CD8⁺ (Ryc. 74. A). Pomimo mniejszego udziału procentowego limfocytów T CD8⁺, komórki te charakteryzowały się stosunkowo wysoką zdolnością do wydzielania ziaren cytotolitycznych, a najwyższy odsetek

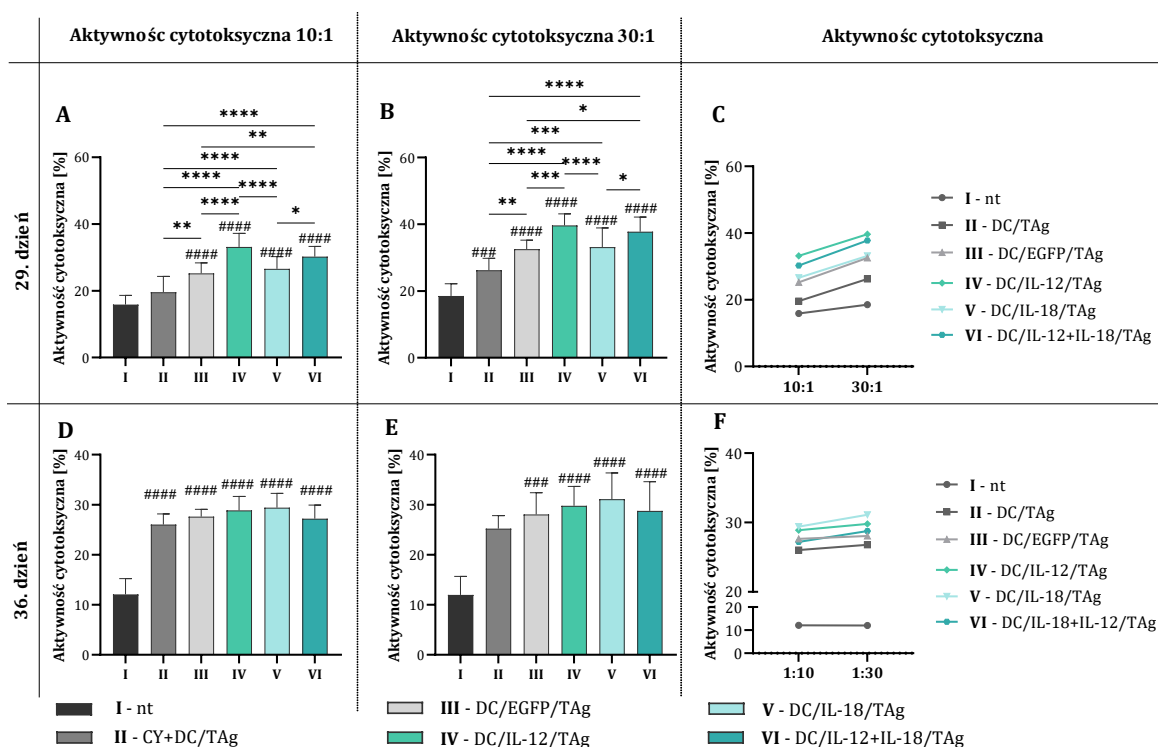
komórek CD8⁺CD107a⁺ wykazano po podaniu DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc. 74. B, C). Stymulacja *ex vivo* splenocytów pobranych 7 dni później wygenerowała niewielki wzrost odsetka limfocytów we wszystkich badanych grupach, jednak po zastosowaniu immunoterapii ponownie zaobserwowano obniżenie odsetka limfocytów T CD8⁺ w stosunku do grupy nieleczonej, a istotne statystycznie zmiany dotyczyły efektów podania DC/EGFP/TAg, DC/IL-12/TAg lub DC/IL-18/TAg (Ryc. 74. D). Różnice między odsetkami komórek CD8⁺CD107a⁺ okazały się dużo mniejsze w odniesieniu do grupy nieleczonej, mimo to po podaniu DC/EGFP/TAg stwierdzono istotny statystycznie wzrost odsetka tych komórek. Natomiast zastosowanie DC/IL-12+IL-18/TAg wpłynęło na obniżenie udziału procentowego limfocytów zdolnych do wydzielania ziaren cytolitycznych ocenianego w stosunku do pozostałych grup, jak i w odniesieniu do poprzedniego pobrania (Ryc. 74. E, F).



Ryc. 75. Odsetek komórek NK wśród restymulowanych splenocytów uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.

Śledzony pobierano od myszy w 29. (A, B, C) i 36. dniu doświadczenia (D, E, F). Restymulowane splenocyty inkubowano z komórkami nowotworowymi MC38 przez 2 godziny. Po tym czasie określono odsetek komórek NK (A, D) wśród restymulowanych splenocytów oraz odsetek komórek zdolnych do wydzielania ziaren cytolitycznych (CD107a⁺) wśród tych komórek (B, C, E, F). Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-6 myszy w każdej grupie badanej. Na histogramach przedstawiono dane z prób reprezentatywnych. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunn'a (A, B, D, E). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$; #### - $p < 0,0001$ względem grupy nt; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

W 5-dniowej mieszanej hodowli splenocytów pobranych od myszy nieleczonych, w 29. dniu doświadczenia, udział procentowy komórek NK wynosił około 35%, a zastosowanie immunoterapii znacząco wpłynęło na obniżenie odsetka tych komórek w hodowli (Ryc. 75. A). Najniższy odsetek komórek NK odnotowano po podaniu DC/IL-12/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg. Komórki NK wyodrębnione wśród restymulowanych splenocytów pobranych od myszy otrzymujących szczepionki, a w szczególności traktowanych DC/IL-12/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg, charakteryzowały się zwiększoną zdolnością do wydzielania ziaren cytotoxicywnych w porównaniu do pozostałych grup, zarówno do grupy nietraktowanej jak i do tych po immunoterapii (Ryc. 75. B, C). Wśród restymulowanych splenocytów uzyskanych w 36. dniu doświadczenia od myszy nieleczonych udział procentowy komórek NK uległ niewielkiemu obniżeniu i wynosił około 30%, tymczasem w grupach myszy poddanych immunoterapii pozostał na poprzednim poziomie (Ryc. 75. D). Z drugiej strony, właśnie wśród tych komórek wykazano zwiększony odsetek komórek NK CD107a⁺ w odniesieniu do grupy myszy nietraktowanych (Ryc. 75. E, F).

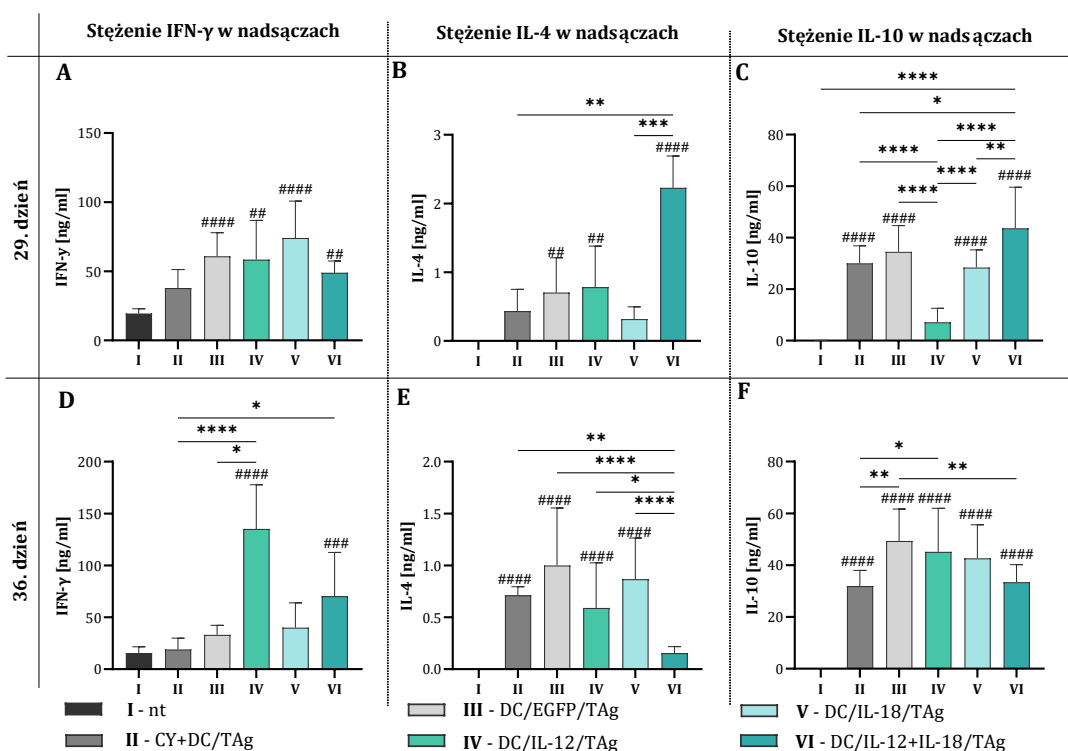


Ryc. 76. Aktywność cytotoxicywna restymulowanych splenocytów pozyskanych od myszy poddanych immunoterapii.

Śledzono pobierano od myszy w 29. (A, B, C) i 36. dniu doświadczenia (D, E, F). Aktywność cytotoxicywną restymulowanych komórek śledzionych oceniono na podstawie odsetka martwych komórek nowotworowych MC38 po 4-godzinnej hodowli z komórkami efektorowymi w stosunku 1:10 (A, D) i 1:30 (B, E). Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 6-7 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A, B, D, E). Za istotnie statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (### - $p < 0,001$; #### - $p < 0,0001$ względem grupy nt, * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Aby określić aktywność cytotoksyczną restymulowanych splenocytów oceniano odsetek martwych komórek nowotworowych MC38 po 4-godzinnej hodowli z komórkami efektorowymi w dwóch stosunkach: 1:10 oraz 1:30 (Ryc. 76). Niezależnie od stosunku komórek docelowych i efektorowych, restymulowane splenocyty pobrane w 29. dniu doświadczenia od myszy otrzymujących szczepionki, wykazywały wyższą aktywność cytotoksyczną wobec komórek MC38 niż komórki śledzionowe z grupy nietraktowanej (Ryc. 76. A, B, C). Najwyższą cytotoksycznością charakteryzowały się splenocyty pobrane od myszy po podaniu DC/IL-12/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg.

Podobnie jak w przypadku splenocytów pobranych 29. dnia doświadczenia, komórki śledzionowe uzyskane w dniu kolejnego pobrania od myszy poddanych immunoterapii wykazywały znacznie wyższą aktywność cytotoksyczną wobec komórek docelowych MC38 niż splenocyty z grupy nieleczonej (Ryc. 76. D, E), przy czym restymulowane splenocyty pobrane od myszy traktowanych DC/IL-18/TAg charakteryzowały się najwyższą zdolnością do zabijania komórek docelowych.



Ryc. 77. Stężenie cytokin w nadsączach z nadrestymulowanych splenocytów uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.

Śledziony pobierano od myszy w 29. (A, B, C) i 36. dniu doświadczenia (D, E, F). Stężenie IFN- γ (A, D), IL-4 (B, E) oraz IL-10 (C, F) sprawdzono w nadsączach z 5-dniowej mieszanej hodowli splenocytów z komórkami nowotworowymi MC38. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 6-7 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (C, D, E) lub nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallis i testu *post hoc* Dunn'a (A, B, F). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (### - $p < 0,01$; #### - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

W nadsączach znad 5-dniowej mieszanej hodowli splenocytów z komórkami nowotworowymi MC38 oceniano stężenie IFN- γ , IL-4 oraz IL-10 (Ryc. 77). Splenocyty pobrane w 29. dniu doświadczenia od myszy kontrolnych, w wyniku restymulacji zdolne były do produkcji IFN- γ na poziomie 25 ng/ml (Ryc. 77. A), natomiast nie produkowały IL-4 (Ryc. 77. B) ani IL-10 (Ryc. 77. C). Tymczasem uzyskane w tym dniu splenocyty od myszy traktowanych modyfikowanymi DC charakteryzowały się znacznie wyższą produkcją IFN- γ . Najwyższe stężenie tej cytokiny w nadsączach odnotowano w grupie, która otrzymywała DC/IL-18/TAg (Ryc. 77. A). Ponadto komórki śledzionowe pobrane od myszy traktowanych DC/EGFP/TAg, DC/IL-12/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg charakteryzowały się zdolnością do wydzielania IL-4, a najwyższe stężenie tej cytokiny (2 ng/ml), wykazano w nadsączach znad splenocytów pobranych od myszy traktowanych DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc. 77. B). Ponadto stwierdzono obecność IL-10 w nadsączach z mieszanej hodowli splenocytów pobranych od wszystkich grup terapeutycznych, przy czym istotny statystycznie wzrost stężenia tej cytokiny w porównaniu do grupy nieleczonej wykazano po podaniu DC/TAg, DC/EGFP/TAg, DC/IL-18/TAg, a szczególnie DC/IL-12+IL-18/TAg i w tym ostatnim przypadku wynosił on 40 ng/ml (Ryc. 77. C).

Komórki śledzionowe pobrane w 36. dniu doświadczenia od myszy nieleczonych były zdolne do produkcji IFN- γ na poziomie około 15 ng/ml, ale nie wydzielały IL-4 i IL-10 (Ryc. 77. D, E, F). Istotny statystycznie wzrost stężenia IFN- γ odnotowano w nadsączach znad mieszanych hodowli splenocytów pobranych od myszy traktowanych DC/IL-12/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg w porównaniu do grupy nieleczonej (Ryc. 77. D). Splenocyty uzyskane od myszy poddanych immunoterapii były zdolne do wydzielania IL-4, przy czym komórki śledzionowe pobrane od myszy traktowanych DC/IL-12+IL-18/TAg produkowały tę cytokinę w śladowych ilościach (Ryc. 77. E). Stężenie IL-10 w nadsączach znad mieszanych hodowli splenocytów uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii wynosiło około 30-40 ng/ml, a jego najwyższą wartość odnotowano w nadsączach znad komórek śledzionowych pobranych od myszy traktowanych DC/EGFP/TAg (Ryc. 77. F).

4.3.4. Podsumowanie

Wynikiem wielokrotnego zastosowania szczepionek na bazie DC transdukowanych do produkcji IL-12 i/lub IL-18 i stymulowanych antygenami nowotworowymi było znaczne zahamowanie tempa wzrostu guzów (TGI), chociaż kinetyka wzrostu nowotworów u myszy poddanych immunoterapii była zależna od rodzaju zastosowanej szczepionki oraz liczby ich podań, a więc długości czasu obserwacji.

Siedem dni po dwukrotnym podaniu szczepionek, największe zahamowanie wzrostu guzów (TGI 70,25%) wykazano w grupie myszy traktowanych DC/IL-12+IL-18/TAg, jednak efekt ten

stopniowo zanikał w kolejnych dniach obserwacji. Natomiast w grupach myszy traktowanych DC/IL-12/TAg lub DC/IL-18/TAg, najlepszy efekt terapeutyczny uzyskano 34. dnia doświadczenia, a więc 5 dni po trzecim podaniu szczepionek (odpowiednio 79,84% lub 71,17%). Po kolejnych dwóch dniach (36. dzień doświadczenia) efekt terapeutyczny podania każdego rodzaju szczepionki zanikał, a najwyższą wartość TGI (70,49%) stwierdzono po zastosowaniu DC/IL-12/TAg. Warto jednak podkreślić, że jedynie po podaniu DC/IL-12+IL-18/TAg mniejszej objętości guzów towarzyszyło zwiększenie nacieku leukocytów.

Dwukrotne podanie DC/IL-12+IL-18/TAg wpłynęło głównie na zwiększenie nacieku limfocytów T CD4⁺ do tkanki nowotworowej oraz zmniejszenie populacji limfocytów Treg, DC, jak również TAM. Nie obserwowano jednak istotnego wpływu podania tej szczepionki na zmiany wielkości populacji komórek limfoidalnych i mieloidalnych w wartowniczych węzłach chłonnych. Oceniając ogólnoustrojową odpowiedź przeciwnowotworową wywołaną przez podanie DC/IL-12+IL-18/TAg stwierdzono, że powtórna stymulacja antygenowa, jaką była restymulacja komórek śledzionowych *ex vivo*, wykazała znaczący wzrost udziału procentowego limfocytów T CD4⁺ oraz najwyższy odsetek komórek zdolnych do wydzielania ziaren cytolitycznych wśród limfocytów T CD4⁺ i T CD8⁺ w porównaniu do grupy nieleczonej. Restymulowane splenocyty uzyskane od myszy z tej grupy terapeutycznej charakteryzowały się zwiększoną aktywnością cytotoksyczną oraz zdolnością do produkcji IFN- γ , a także IL-4 i IL-10. Ciekawa jest gotowość restymulowanych splenocytów do wysokiej produkcji IL-4 i IL-10. Sugeruje to, że wraz ze wzrostem nowotworu, wzrasta jego presja na wyciszenie ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej wygenerowanej przez podanie DC/IL-12+IL-18/TAg.

Po trzykrotnym zastosowaniu DC/IL-12+IL-18/TAg obserwowano zwiększony naciek limfocytów T CD4⁺, a także limfocytów T CD8⁺ i komórek NK do guzów oraz zmniejszenie wielkości populacji TAM i makrofagów, jak również wzrost udziału procentowego efektorowych komórek T CD4⁺ i T CD8⁺ w wartowniczych węzłach chłonnych. Nie wykazano jednak istotnego wpływu trzykrotnego podania DC/IL-12+IL-18/TAg na przedłużenie wyindukowanej w 29. dniu doświadczenia ogólnoustrojowej odpowiedzi odpornościowej. Co prawda, nie obserwowano zwiększenia odsetka splenocytów zdolnych do wydzielania ziaren cytolitycznych, jednak restymulowane splenocyty były zdolne do skutecznego zabijania komórek nowotworowych i zwiększonej produkcji IFN- γ .

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że szczepionka zawierająca DC/IL-12+IL-18/TAg była zdolna do efektywnego pobudzenia zarówno miejscowej, jak i ogólnoustrojowej odpowiedzi odpornościowej we wczesnym etapie rozwoju nowotworu. Mimo że DC/IL-12+IL-18/TAg produkujące cytokiny na niższym poziomie niż DC/IL-12/TAg lub DC/IL-18/TAg generowały efekt przeciwnowotworowy na początkowym etapie leczenia, to ich

skuteczność w zwalczaniu rozwijającego się nowotworu zanikała w dłuższym okresie. Dlatego też, aby przedłużyć działanie wielokrotnego podania różnych komórek szczepionkowych i ostatecznie określić największą skuteczność jednej z ocenianych szczepionek, zaplanowano podanie cytostatyku immunomodulującego środowisko nowotworu i wzmacniającego efekt dotychczasowej terapii.

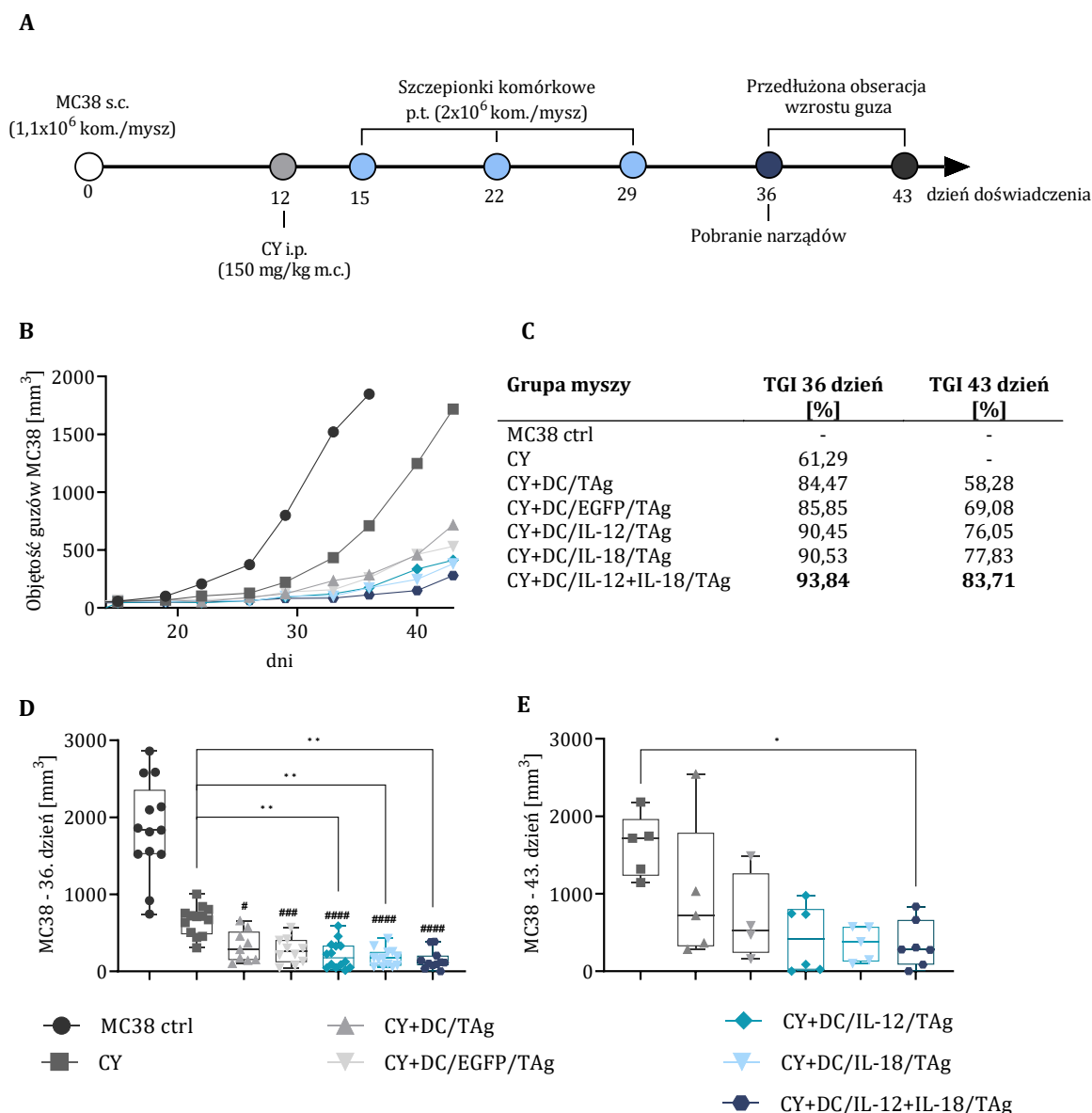
4.4. Ocena efektu przeciwnowotworowego chemioimmunoterapii z zastosowaniem cyklofosfamidu i komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi

Jako ostatni etap analizy, przeprowadzono doświadczenie chemioimmunoterapeutyczne myszy z rosnącymi podskórnymi guzami mysiego raka jelita grubego MC38. W terapii zastosowano cyklofosfamid oraz szczepionki na bazie komórek dendrytycznych transdukowanych do produkcji IL-12 i/lub IL-18 oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi. Schemat doświadczenia chemioimmunoterapeutycznego przedstawiono na Ryc. 78. A.

W 12. dniu doświadczenia, myszom z rosnącymi podskórnymi guzami podano dootrzewnowo cyklofosfamid (CY, i.p., 150 mg/kg). Następnie w 15., 22. i 29. dniu doświadczenia zastosowano okołoguzowo szczepionki (p.t.; 2×10^6 kom./mysz) na bazie modyfikowanych DC (**DC/IL-12/TAg**, **DC/IL-18/TAg**, **DC/IL-12+IL-18/TAg**), a jako szczepionki kontrolne podawano **DC/EGFP/TAg** oraz **DC/TAg**. Aby określić wpływ zastosowania cytostatyku na zwiększenie efektu immunoterapii w indukowaniu miejscowej i ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej, 7 dni po trzecim podaniu DC (w 36. dniu doświadczenia), od 7 myszy z każdej grupy zostały pobrane śledziony, wartownicze węzły chłonne i tkanka nowotworowa do dalszych analiz *ex vivo*. Po kolejnych 7 dniach (w 43. dniu doświadczenia) dokonano oceny zahamowania wzrostu guzów u pozostałych 4-7 myszy w każdej grupie badanej.

4.4.1. Wzrost guzów MC38 u myszy poddanych chemioimmunoterapii

Pomiary objętości guzów wykonane co 3-4 dni przez cały czas trwania doświadczenia pozwoliły na sporządzenie krzywych wzrostu guzów obrazujących kinetykę rozwoju nowotworu (Ryc. 78. B, C). Z uwagi na fakt, że w 36. dniu doświadczenia, objętość guzów u myszy z grupy kontrolnej, nietraktowanej zbliżała się do wartości 2000 mm^3 oraz ze względu na obniżoną kondycję i dobrostan zwierząt, zostały one poddane wcześniejszej humanitarnej eutanazji. Dalsze pomiary prowadzono w odniesieniu do grupy kontrolnej otrzymującej sam cytostatyk. Ponadto efekt terapeutyczny zastosowanego leczenia określono na podstawie procentowego zahamowania wzrostu nowotworu (TGI), w odniesieniu do **grup kontrolnych: nietraktowanej** (36. dzień doświadczenia) oraz grupy **traktowanej CY** (36. i 43. dzień doświadczenia) (Ryc. 78. D, E, F).



Ryc. 78. Wzrost guzów MC38 u myszy poddanych chemioimmunoterapii z zastosowaniem cyklofosfamid i komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi.

W 12. dniu doświadczenia, myszom z rosnącymi podskórnie guzami MC38 podano dootrzewnowo cyklofosfamid (150 mg/kg), a w 15., 22. i 29. dniu doświadczenia zastosowano okołoguzowo szczepionki na bazie komórek dendrytycznych transdukowanych do produkcji cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi (p.t.; 2x10⁶ kom./mysz). W 36. dniu doświadczenia od 7 myszy z każdej grupy badanej zostały pobrane śledziony, wartownicze węzły chłonne i tkanka nowotworowa do dalszych analiz *ex vivo*. Pomiar objętości guzów prowadzono co 3-4 dni do 43. dnia doświadczenia (A). Na wykresie przedstawiono mediany objętości guzów obliczone na podstawie uzyskanych pomiarów (B). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (C). Na wykresach pudełkowych przedstawiono mediany objętości guzów zmierzonych 36. i 43. dnia doświadczenia (D, E). W tabeli przedstawiono wartości zahamowania wzrostu guzów (TGI) obliczonych dla 36. (w odniesieniu do grupy nietraktowanej i otrzymującej CY) i 43. (w odniesieniu do grupy otrzymującej CY) dnia doświadczenia (F). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallis i testu *post hoc* Dunn'a (D, E). Za istotnie statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których p<0,05 (# - p<0,05; ### - p<0,001; ##### - p<0,0001 względem grupy nt; * - p<0,05; ** - p<0,01; **** - p<0,0001; pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

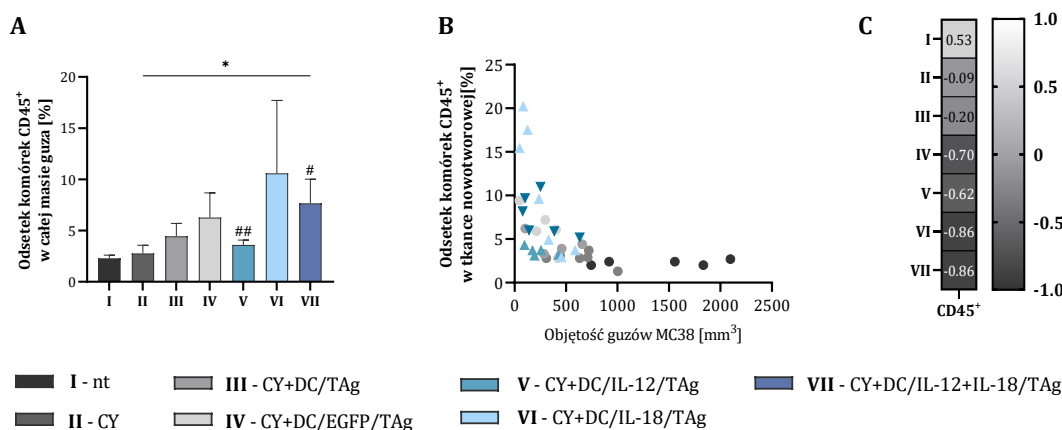
Zastosowanie chemioimmunoterapii u myszy obciążonych rosnącym nowotworem wpłynęło na zmniejszenie wielkości guzów (Ryc. 78. B, C). W 36. dniu doświadczenia, wykazano istotne statystycznie zmniejszenie objętości guzów w grupach myszy otrzymujących CY i szczepionki zawierające modyfikowane DC w odniesieniu do grupy nieleczonej lub traktowanej CY (Ryc. 78. D). Tak więc, choć podanie samego CY spowodowało zahamowanie wzrostu guzów o 61,29% w porównaniu do grupy nietraktowanej, to wprowadzenie po chemioterapii szczepionek wspomogło ten efekt. W grupach myszy otrzymujących CY i komórki szczepionkowe wartość TGI wynosiła od 84,47% w grupie traktowanej CY i DC/TAg, aż do 93,84% po podaniu CY i DC/IL-12+IL-18/TAg w porównaniu do grupy nietraktowanej. Natomiast w stosunku do grupy traktowanej samym CY - zakres TGI wynosił od 59,88% po podaniu CY i DC/TAg do 84,10% w grupie myszy otrzymujących CY i DC/IL-12+IL-18/TAg. W ostatnim dniu obserwacji (43. dzień doświadczenia, tj. 14 dni po ostatnim podaniu szczepionek) istotne statystycznie zmniejszenie objętości guzów, utrzymywało się na podobnym poziomie i wartości TGI wynosiły od 58,28% po podaniu CY i DC/TAg do 83,71% po zastosowaniu CY i DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc. 78. E). Tak więc, najlepszy, a przede wszystkim długotrwały efekt terapeutyczny myszy obciążonych rakiem jelita grubego wykazano po zastosowaniu terapii skojarzonej z udziałem cyklofosfamidu i komórek dendrytycznych transdukowanych do jednoczesnej produkcji IL-12 i IL-18 oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi.

4.4.2. Ocena miejscowej odpowiedzi przeciwnowotworowej u myszy poddanych chemioimmunoterapii

Wpływ zastosowanej chemioimmunoterapii na aktywację miejscowej odpowiedzi przeciwnowotworowej określono na podstawie zmian wielkości populacji i stopnia pobudzenia komórek limfoidalnych i mieloidalnych naciekających guzy oraz wartownicze węzły chłonne.

4.4.2.1. Ocena zmian zachodzących w tkance nowotworowej

Zmiany wielkości populacji i stopnia pobudzenia komórek limfoidalnych i mieloidalnych naciekających tkankę guzów uzyskanych od myszy poddanych chemioimmunoterapii określono na podstawie wieloparametrowej analizy cytometrycznej przeprowadzonej zgodnie z opisem przedstawionym w podrozdziale 4.3.2.1. Schematy analiz przedstawiono na Ryc. 50. i Ryc. 51. W pierwszym etapie analizy wyznaczono odsetek leukocytów (CD45⁺) naciekających guzy.



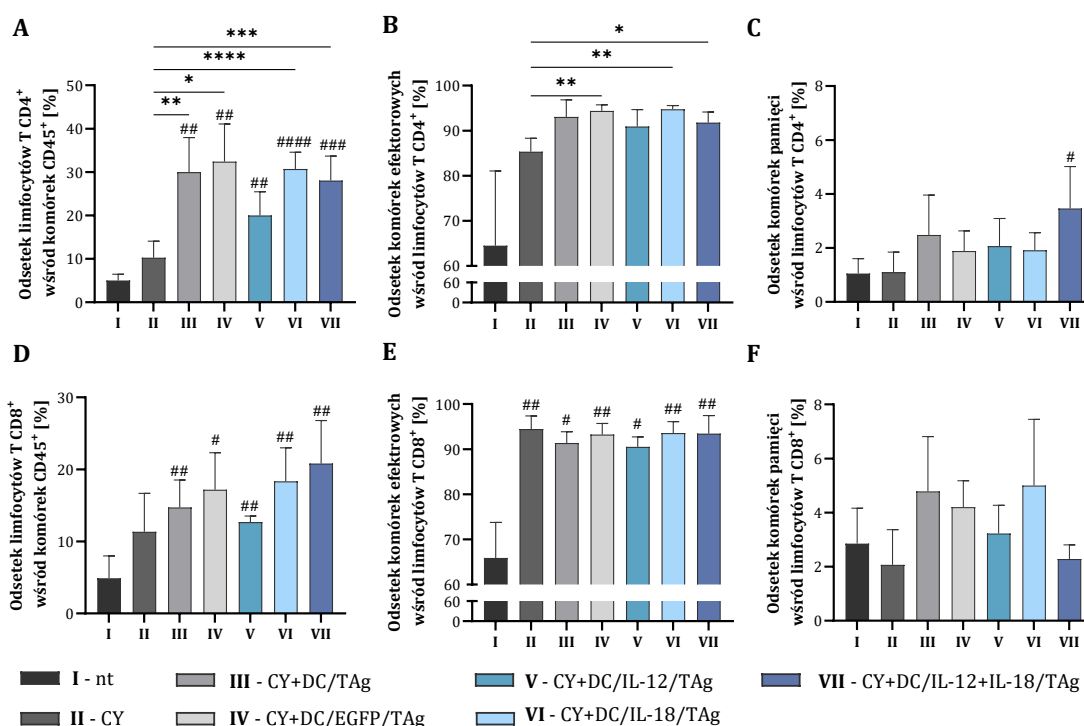
Ryc. 79. Ocena nacieku leukocytów w guzach MC38 uzyskanych od myszy poddanych chemioimmunoterapii.

Guzy pobierano od myszy w 36. dniu doświadczenia. W analizowanych guzach MC38 wyodrębniono żywe leukocyty (DAPI^{neg}CD45⁺) (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 51). Na wykresach kolumnowych przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 5-7 myszy z każdej grupy badanej (A). Na wykresach punktowych przedstawiono wartości odsetka komórek CD45⁺ naciekających guzy MC38 o wyznaczonej objętości (indywidualnie dla każdej myszy badanej) (B). Na mapie korelacji przedstawiono relację pomiędzy objętością guzów MC38, a odsetkiem komórek CD45⁺ naciekających do tkanki nowotworowej, dla każdej z badanych grup. W polach wykresu przedstawiono wartości r_s obliczone za pomocą nieparametrycznego testu korelacji Spearman'a (C). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu Brown-Forsythe i Welch ANOVA i testu *post hoc* Dunnett'a T3 (A). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$ względem grupy nt, * - $p < 0,05$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Zastosowanie samej chemioterapii w niewielkim stopniu wpłynęło na zwiększenie nacieku leukocytów (Ryc. 79. A). Natomiast terapia skojarzona wywołała znaczący wzrost udziału procentowego leukocytów, szczególnie w tkance guzów uzyskanych od myszy traktowanych CY i DC/IL-12/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg w odniesieniu do grupy nietraktowanej, a w przypadku CY i DC/IL-12+IL-18/TAg również w porównaniu do grupy traktowanej samym cytostatykiem. Mimo że najwyższy odsetek leukocytów wykazano po terapii CY i DC/IL-18/TAg, zmiana ta nie była istotna statystycznie. Otrzymane indywidualne pomiary odsetka leukocytów naciekających tkankę nowotworową oraz objętości guzów zaprezentowano na wykresie korelacji (Ryc. 79. B), a wyznaczone wartości współczynnika korelacji rang Spearmana (r_s) przedstawiono na mapie korelacji (Ryc. 79. C). Obliczona wartość r_s dla grupy nietraktowanej wykazała umiarkowaną zależność pozytywną (0,53), co oznacza, że w tej grupie zwiększony odsetek leukocytów występował jednocześnie ze zwiększeniem objętości guzów. We wszystkich grupach otrzymujących CY i szczepionki odnotowano ujemną zależność między odsetkiem leukocytów naciekających tkankę nowotworową oraz objętości guzów. Oznacza to, że większemu naciekowi leukocytów wywołanemu przez zastosowanie terapii skojarzonej, towarzyszyła mniejsza objętość guzów. Należy podkreślić, że najwyższą zależność spośród wszystkich badanych grup (-0,86) odnotowano po zastosowaniu CY i DC/IL-18/TAg lub CY i DC/IL-12+IL-18/TAg.

4.4.2.1.1. Subpopulacje komórek limfoidalnych w guzach MC38

Wśród leukocytów naciekających tkankę nowotworową określono udział procentowy populacji limfocytów T ($CD4^+$, $CD8^+$, Treg), komórek NK i NKT. Stopień aktywacji limfocytów określono na podstawie ekspresji cząsteczek CD44 i CD62L, oznaczając w ten sposób populacje komórek efektorowych i komórek pamięci.

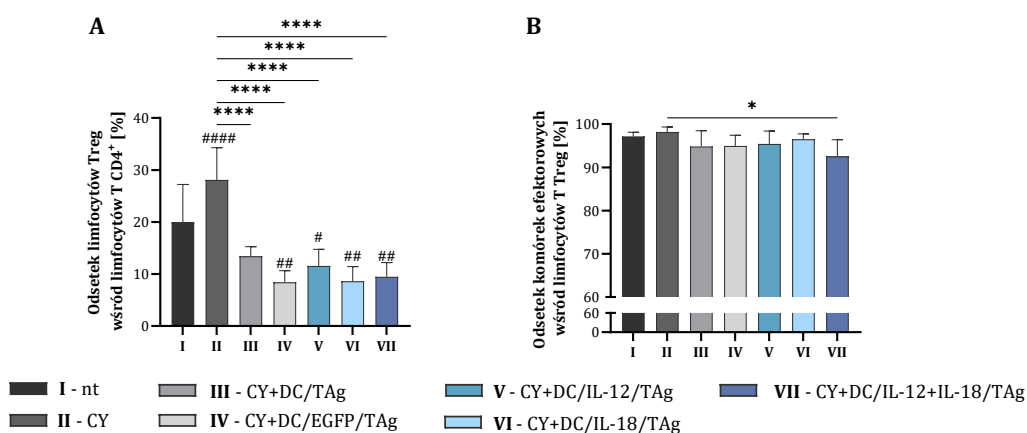


Ryc. 80. Odsetek i poziom aktywacji limfocytów T $CD4^+$ i T $CD8^+$ naciekających guzy MC38 uzyskane od myszy poddanych chemioimmunoterapii.

Guzy pobierano od myszy w 36. dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej, wśród komórek limfoidalnych naciekających tkankę nowotworową wyodrębniono populacje limfocytów T $CD4^+$ i limfocytów T $CD8^+$ oraz oznaczono ekspresję cząsteczek CD62L i CD44 na powierzchni tych komórek (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 50). Określono odsetek limfocytów T $CD4^+$ (A) i T $CD8^+$ (D) wśród leukocytów $CD45^+$ oraz odsetek komórek efektorowych ($CD44^+CD62L^{neg}$) (B, E) i komórek pamięci ($CD44^+CD62L^+$) (C, F) wśród obu populacji limfocytów T. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 6-7 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallis i testu *post hoc* Dunn'a (C) lub parametrycznego testu Brown-Forsythe i Welch ANOVA i testu *post hoc* Dunnett'a T3 (A, B, D, E). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$; #### - $p < 0,0001$ względem grupy nt; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Podanie cyklofosfamid i szczepionek wpłynęło na istotne statystycznie zwiększenie odsetka limfocytów T $CD4^+$ naciekających tkankę nowotworową w odniesieniu do grupy nietraktowanej (Ryc. 80. A). Natomiast zastosowaniem chemioterapii poprzedzające podanie DC/TAg, DC/EGFP/TAg, DC/IL-18/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg spowodowało wzrost odsetka tych komórek, także w porównaniu do grupy traktowanej samym cytostatykiem. Najwyższy

poziom istotności statystycznej w odniesieniu do obu grup kontrolnych wykazano po podaniu CY i DC/IL-18/TAg lub CY i DC/IL-12+IL-18/TAg. Oceniając udział procentowy komórek efektorowych wśród limfocytów T CD4⁺ odnotowano zwiększenie odsetka tych komórek po zastosowaniu samego CY, a podanie szczepionek wzmocniło ten efekt (Ryc. 80. B). Wzrost udziału procentowego tych limfocytów zaobserwowano po podaniu CY i szczepionek zawierających DC/EGFP/TAg, DC/IL-18/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg, choć był on statystycznie istotny w stosunku do grupy traktowanej CY. Zastosowana terapia wpłynęła także na zwiększenie odsetka limfocytów T CD4⁺ pamięci, przy czym zmianę istotną statystycznie odnotowano jedynie po podaniu CY i DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc. 80. C).



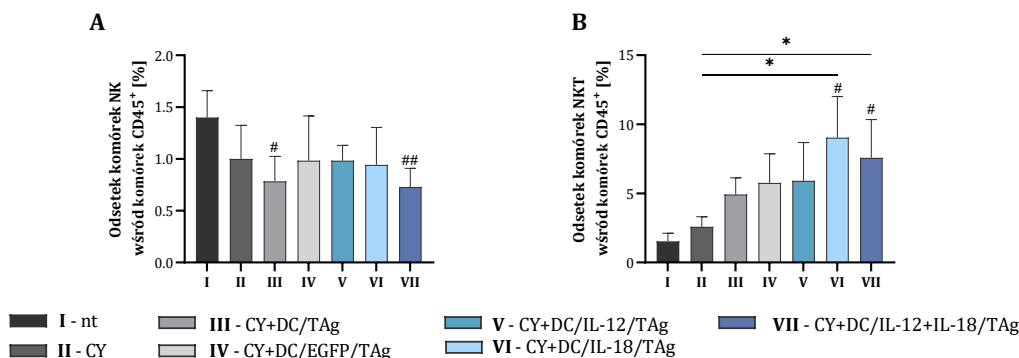
Ryc. 81. Odsetek i poziom aktywacji limfocytów T regulatorowych (Treg) naciekających guzy MC38 uzyskane od myszy poddanych chemioimmunoterapii.

Guzy pobierano od myszy w 36. dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej, wśród komórek limfoidalnych naciekających tkankę nowotworową wyodrębniono populację limfocytów T CD4⁺, a wśród nich populację limfocytów Treg oraz oznaczono ekspresję cząsteczek CD62L i CD44 na powierzchni tych komórek (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 50). Określono odsetek limfocytów Treg wśród limfocytów T CD4⁺ (A) oraz odsetek komórek efektorowych (CD44⁺CD62L^{neg}) (B) wśród limfocytów Treg. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 6-7 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A, B). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; #### - $p < 0,0001$ względem grupy nt; * - $p < 0,05$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Analizując wielkość populacji limfocytów T CD8⁺ wśród leukocytów naciekających guzy, odnotowano istotne statystycznie zwiększenie odsetka tych komórek po zastosowaniu terapii skojarzonej w odniesieniu do grupy nietraktowanej, a ich największy udział procentowy wykazano po podaniu CY i DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc. 80. D). Natomiast znaczący wzrost odsetka limfocytów T CD8⁺ efektorowych naciekających tkankę guzów nie był zależny od rodzaju zastosowanej terapii (Ryc. 80. E), w przeciwieństwie do komórek CD8⁺ pamięci, których najwyższy odsetek stwierdzono po podaniu CY i DC/IL-18/TAg, jednak zmiana ta nie była istotna statystycznie (Ryc. 80. F).

W guzach uzyskanych od myszy poddanych samej chemioterapii odnotowano zwiększenie udziału procentowego limfocytów Treg, jednak zastosowanie terapii skojarzonej znacząco wpłynęło na obniżenie odsetka tych komórek zarówno w odniesieniu do grupy nietraktowanej, jak i otrzymującej sam cytostatyk (Ryc. 81. A). Ponadto po podaniu CY i DC/IL-12+IL-18/TAg wykazano istotne statystycznie obniżenie odsetka limfocytów Treg efektorowych (Ryc. 81. B).

Wielkość nacieku komórek NK do tkanki nowotworowej, uzyskanej od myszy traktowanych, był niższy niż w grupie nieleczzonej (Ryc. 82. A). Jednak istotne statystycznie obniżenie odsetka tych komórek wykazano jedynie po podaniu CY i DC/TAg lub CY i DC/IL-12+IL-18/TAg. Stwierdzono natomiast, znaczący wzrost odsetka komórek NKT po podaniu CY i szczepionek na bazie DC/IL-18/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg w porównaniu do obu grup kontrolnych.



Ryc. 82. Odsetek komórek NK i NKT naciekających guzy MC38 uzyskane od myszy poddanych chemioimmunoterapii.

Guzy pobierano od myszy w 36. dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej wśród komórek limfoidalnych naciekających tkankę nowotworową wyodrębniono populacje komórek NK ($CD3^{neg}NK1.1^{+}$) oraz komórek NKT ($CD3^{+}NK1.1^{+}$) (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 50). Określono odsetek komórek NK (A) oraz NKT (B) wśród leukocytów $CD45^{+}$. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 6-7 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunn'a (A) lub parametrycznego testu Brown-Forsythe i Welch ANOVA oraz testu *post hoc* Dunnett'a T3 (B). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$ względem grupy nt; * - $p < 0,05$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

4.4.2.1.2. Subpopulacje komórek mieloidalnych w guzach MC38

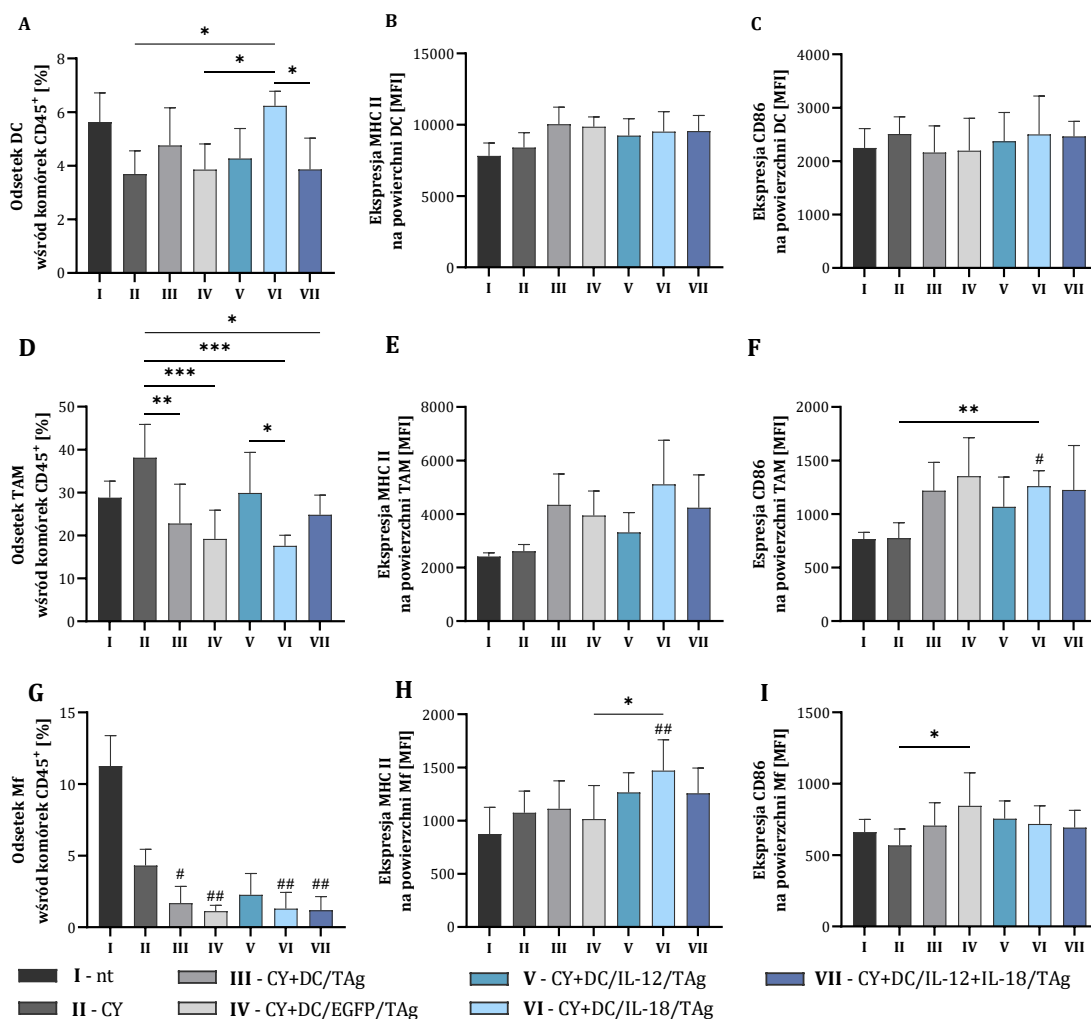
Zmiany wielkości populacji komórek mieloidalnych naciekających tkankę nowotworową zachodzące pod wpływem zastosowania chemioimmunoterapii określono w oparciu o udział procentowy DC, TAM i makrofagów (Mf) wśród leukocytów oraz stopień pobudzenia tych komórek na podstawie poziomu ekspresji cząsteczek MHC II i CD86 na ich powierzchni.

Zastosowanie cyklofosfamidu wpłynęło na obniżenie odsetka DC naciekających guzy w odniesieniu do grupy nieleczzonej (Ryc. 83. A), natomiast podanie DC/IL-18/TAg spowodowało

znaczący wzrost udziału procentowego DC obecnych w tkance guzów. Niezależnie od rodzaju podanej szczepionki, DC oznaczone w tkance nowotworowej pobranej od myszy poddanych terapii skojarzonej charakteryzowały się nieco wyższą ekspresją cząsteczek MHC II niż komórki w grupach kontrolnych, jednak zmiany te nie były istotne statystycznie (Ryc. 83. B). W żadnej z badanych grup, nie wykazano zmian w ekspresji cząsteczki CD86 (Ryc. 83. C).

Wielkość nacieku komórek TAM w guzach pobranych od myszy otrzymujących CY była nieco wyższa niż w grupie nietraktowanej, a połączenie go z podaniem szczepionek na bazie DC/TAg, DC/EGFP/TAg, DC/IL-12/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg wpłynęło na istotne statystycznie obniżenie odsetka tych komórek (Ryc. 83. D). Makrofagi związane z nowotworem oznaczone w guzach pobranych od myszy otrzymujących terapię skojarzoną charakteryzowały się zwiększonym poziomem ekspresji cząsteczek MHC II w odniesieniu do grupy nietraktowanej, a najwyższą ich ekspresję wykazano po podaniu CY i DC/IL-18/TAg (Ryc. 83. E). Zastosowanie chemioimmunoterapii wpłynęło także na zwiększenie poziomu ekspresji cząsteczki CD86 na powierzchni TAM. Mimo, że wzrost ekspresji tej cząsteczki odnotowany był we wszystkich grupach to okazał się istotny statystycznie jedynie po podaniu CY i DC/IL-18/TAg w porównaniu do obu grup kontrolnych (Ryc. 83. F).

Zastosowana terapia wpłynęła niezwykle znacząco na zmiany nacieku makrofagów w guzach. Podanie CY w połączeniu ze szczepionkami spowodowało wielokrotne obniżenie odsetka Mf w tkance nowotworowej w porównaniu do obu grup kontrolnych. Zmiany te były istotne statystycznie po podaniu CY i szczepionek DC/TAg, DC/EGFP/TAg, DC/IL-18/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc. 83. G). Niezależnie od rodzaju zastosowanej terapii, makrofagi charakteryzowały się wyższą ekspresją cząsteczek MHC II, a znaczący wzrost poziomu ekspresji tych cząsteczek stwierdzono po podaniu CY i DC/IL-18/TAg (Ryc. 83. H). Zmiany w ekspresji cząsteczki CD86 na powierzchni Mf okazały się niewielkie i jedynie podanie CY i DC/EGFP/TAg spowodowało istotny statystycznie wzrost jej poziomu w porównaniu do grupy traktowanej samym CY (Ryc. 83. I).



Ryc. 83. Odsetek i stopień pobudzenia komórek dendrytycznych, makrofagów związanych z nowotworem oraz makrofagów naciekających guzy MC38 uzyskane od myszy poddanych chemioimmunoterapii.

Guzy pobierano od myszy w 36. dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej, wśród komórek mieloidalnych naciekających tkankę nowotworową wyodrębniono populacje komórek dendrytycznych (DC, CD11c⁺F4/80^{neg}MHCII⁺), makrofagów związanych z nowotworem (TAM, CD11c⁺F4/80⁺) i makrofagów (Mf, CD11c^{neg}F4/80⁺) oraz określono ekspresję cząsteczek MHC II i CD86 na powierzchni tych komórek (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 51). Określono odsetek komórek DC (A), TAM (D) i Mf (G) wśród leukocytów CD45⁺ oraz średnią intensywność fluorescencji cząsteczek MHC II (B, E, H) i CD86 (C, F, I) na powierzchni tych komórek. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 6-7 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunn'a (G), parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A, D, H, I) lub parametrycznego testu Brown-Forsythe i Welch ANOVA i testu *post hoc* Dunnett'a T3 (F). Za istotnie statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których p<0,05 (# - p<0,05; ## - p<0,01 względem grupy nt; * - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001 pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

4.4.2.2. Ocena zmian zachodzących w wartowniczych węzłach chłonnych

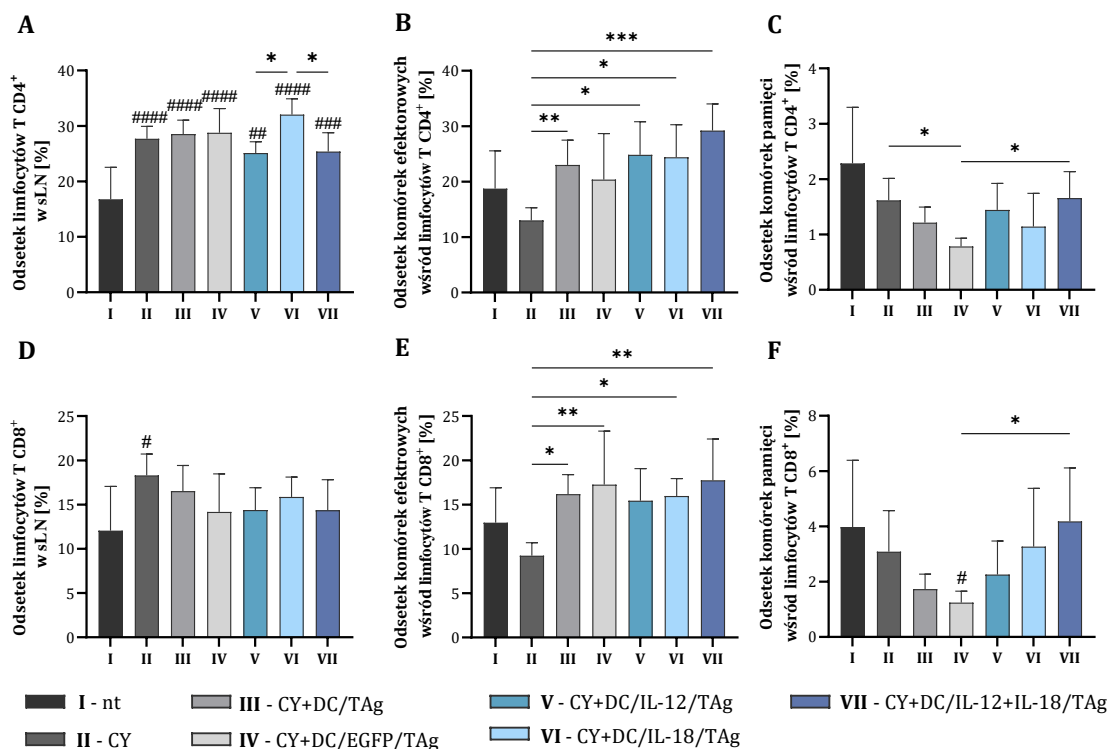
W celu określenia wpływu zastosowanej chemioimmunoterapii na aktywację odpowiedzi przeciwnowotworowej w wartowniczych węzłach chłonnych wykonano analizę cytometryczną zmian odsetka komórek limfoidalnych i mieloidalnych (schemat przedstawiono na Ryc. 60).

4.4.2.2.1. Subpopulacje komórek limfoidalnych w wartowniczych węzłach chłonnych

Podobnie jak podczas oceny skuteczności stosowania immunoterapii, w wartowniczych węzłach chłonnych pobranych od myszy z grupy nietraktowanej jak i grup otrzymujących chemioimmunoterapię, określano odsetek oraz stopień aktywacji limfocytów T CD4⁺ i T CD8⁺, a także zmiany w wielkości populacji komórek NK i NKT.

Pod wpływem zastosowania zarówno cyklofosfamidu, jak i terapii skojarzonej wykazano znaczący wzrost odsetka limfocytów T CD4⁺ w odniesieniu do grupy nietraktowanej (Ryc. 84. A), a najwyższy udział procentowy tych komórek odnotowano w grupie traktowanej CY i DC/IL-18/TAg. Znaczące zróżnicowanie odpowiedzi na terapię stwierdzono w przypadku limfocytów T CD4⁺ efektorowych - podanie samego CY spowodowało nieznaczne obniżenie, tymczasem terapia skojarzona wpłynęła na wzrost odsetka tych komórek. Istotnie statystycznie wzrost ich odsetka wykazano we wszystkich grupach otrzymujących szczepionki, lecz w sLN pobranych od myszy traktowanych CY i DC/IL-12+IL-18/TAg okazał się on najwyższy w stosunku do grupy otrzymującej sam CY (Ryc. 84. B). Tymczasem populacja limfocytów T CD4⁺ pamięci we wszystkich grupach poddanych terapii była niższa niż w grupie nietraktowanej. Jednak istotnie statystycznie zmiany odnotowano jedynie po podaniu CY i DC/EGFP/TAg i to w odniesieniu do grupy traktowanej samym CY, jak i otrzymującej CY i DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc. 84. C).

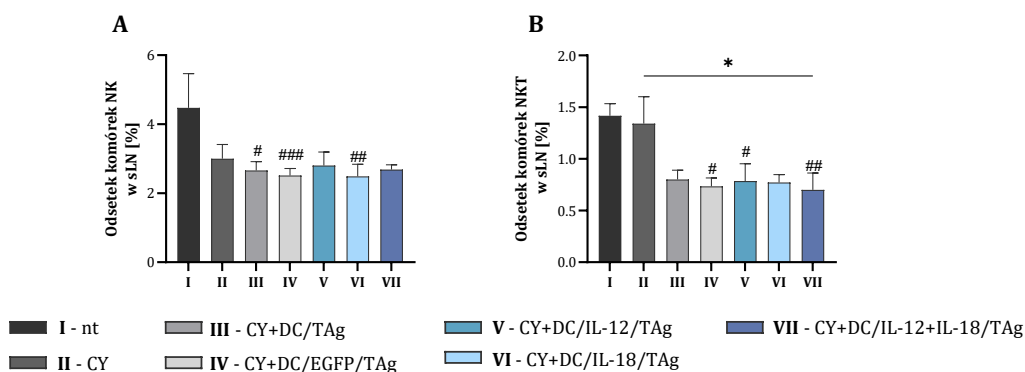
Wynikiem zastosowania terapii był wzrost odsetka limfocytów T CD8⁺ w sLN, nie mniej jednak zmiana ta była istotna statystycznie jedynie w przypadku grupy traktowanej samym cytostatykiem (Ryc. 84. D). Udział procentowy komórek efektorowych w populacji CD8⁺, podobnie jak w przypadku zmian w populacji limfocytów T CD4⁺, był niższy po zastosowaniu samego CY i znacząco wzrastał po podaniu szczepionek zawierających modyfikowane DC (Ryc. 84. E). Zróżnicowaniu zależnemu od rodzaju terapii, uległ także odsetek limfocytów T CD8⁺ pamięci. Istotnie statystycznie obniżenie odsetka tych komórek wykazano po podaniu CY i DC/EGFP/TAg w odniesieniu do grupy nietraktowanej lub otrzymującej CY i DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc. 84. F).



Ryc. 84. Odsetek i stopień aktywacji limfocytów T w wartowniczych węzłach chłonnych uzyskanych od myszy poddanych chemioimmunoterapii.

Wartownicze węzły chłonne pobierano od myszy w 36. dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej sLN wyodrębniono populacje limfocytów T CD4⁺ i limfocytów T CD8⁺ oraz oznaczono ekspresję cząsteczek CD62L i CD44 na powierzchni tych komórek (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 60). Określono odsetek limfocytów T CD4⁺ (A) i limfocytów T CD8⁺ (D) wśród leukocytów CD45⁺ oraz odsetek komórek efektorowych (CD44⁺CD62L^{neg}) (B, E) i komórek pamięci (CD44⁺CD62L⁺) (C, F) wśród tych populacji. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 6-7 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A, D, E, F) lub parametrycznego testu Brown-Forsythe i Welch ANOVA i testu *post hoc* Dunnett'a T3 (B, C). Za istotnie statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których p < 0,05 (# - p < 0,05; ## - p < 0,01; ### - p < 0,001; #### - p < 0,0001 względem grupy nt; * - p < 0,05; ** - p < 0,01; *** - p < 0,001 pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Odsetek komórek NK w sLN pobranych od myszy traktowanych samym CY lub w połączeniu ze szczepionkami komórkowymi, był niższy niż w grupie nietraktowanej, przy czym zmiany istotnie statystycznie wykazano po podaniu CY i szczepionek zawierających DC/TAg, DC/EGFP/TAg lub DC/IL-18/TAg (Ryc. 85. A). Natomiast terapia samym CY nie miała wpływu na zmiany odsetka komórek NKT w odniesieniu do grupy nietraktowanej, ale uzupełnienie chemioterapii podaniem modyfikowanych DC spowodowało obniżenie odsetka tych komórek w szczególności po podaniu DC/EGFP/TAg, DC/IL-12/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc. 85. B). Najniższy odsetek tych komórek w sLN wykazano w grupie myszy traktowanych CY i DC/IL-12+IL-18/TAg, a zmiana ta była istotna statystycznie, także w stosunku do grupy chemioterapeutycznej.



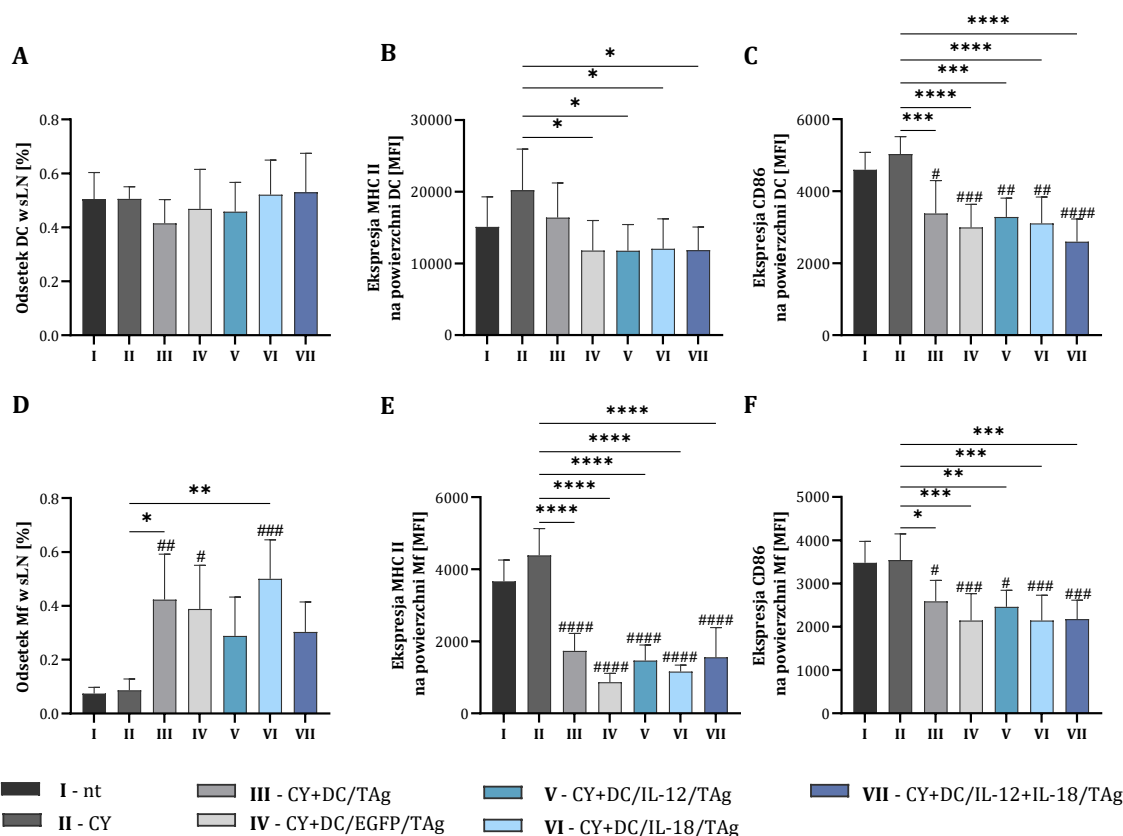
Ryc. 85. Odsetek komórek NK i NKT w wartowniczych węzłach chłonnych uzyskanych od myszy poddanych chemioimmunoterapii.

Wartownicze węzły chłonne pobierano od myszy w 36. dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej sLN wyodrębniono populację komórek NK ($CD3^{\text{neg}}NK1.1^+$) oraz NKT ($CD3^+NK1.1^+$) (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 60). Określono odsetek komórek NK (A) oraz NKT (B) wśród leukocytów. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 6-7 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunn'a (A, B). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$ względem grupy nt; * - $p < 0,05$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

4.4.2.2.2. Subpopulacje komórek mieloidalnych w wartowniczych węzłach chłonnych

W wartowniczych węzłach chłonnych uzyskanych od myszy poddanych chemioimmunoterapii, oznaczono zmiany w wielkości populacji i stopniu pobudzenia DC i Mf, określając odsetek tych komórek oraz poziom ekspresji cząsteczek MHC II i CD86 na ich powierzchni.

Nie odnotowano istotnych zmian odsetka DC w sLN po zastosowaniu CY i szczepionek (Ryc. 86. A), ale wykazano zróżnicowanie poziomu ekspresji cząsteczek MHC II i CD86 na powierzchni tych komórek. Podanie cytostatyku spowodowało niewielki wzrost ekspresji MHC II na DC w porównaniu do grupy nietraktowanej, a uzupełnienie terapii szczepionkami na bazie modyfikowanych DC, wpłynęło na istotne statystycznie obniżenie ekspresji tych cząsteczek w stosunku do grupy traktowanej samym CY (Ryc. 86. B). Oceniając poziom ekspresji cząsteczki CD86 na powierzchni DC odnotowano te same tendencje, przy czym zmiany wykazane po zastosowaniu chemioimmunoterapii były istotne statystycznie w odniesieniu do grupy nieleczonej, jak i traktowanej samym cytostatykiem (Ryc. 86. C). Najniższy poziom ekspresji CD86 na powierzchni DC wykazano w sLN pobranych od myszy otrzymujących CY i DC/IL-12+IL-18/TAg.



Ryc. 86. Odsetek i stopień pobudzenia komórek dendrytycznych i makrofagów w wartowniczych węzłach chłonnych uzyskanych od myszy poddanych chemioimmunoterapii.

Wartownicze węzły chłonne pobierano od myszy w 36. dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej wśród komórek DAPI^{neg}CD45⁺ zidentyfikowano komórki mieloidalne CD11b⁺, a wśród nich wyodrębniono populacje komórek dendrytycznych (CD11c⁺F4/80^{int}) i makrofagów (CD11c^{neg}F4/80⁺), a także określono poziom ekspresji cząsteczek MHC II i CD86 na powierzchni tych komórek (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 60). Określono odsetek komórek DC (A) i Mf (D) oraz średnią intensywność fluorescencji cząsteczek MHC II (B, E) i CD86 (C, F) na powierzchni tych komórek. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 6-7 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (B, C, D, E, F). Za istotnie statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$; #### - $p < 0,0001$ względem grupy nt; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Odsetek Mf w sLN pobranych od myszy poddanych chemioimmunoterapii był wyższy niż w grupie kontrolnej i traktowanej samym CY, w szczególności po podaniu CY i szczepionek zawierających DC/TAg, DC/EGFP/TAg lub DC/IL-18/TAg (Ryc. 86. D). Ponadto zastosowanie terapii skojarzonej znacząco wpłynęło na obniżenie poziomu ekspresji cząsteczek MHC II i CD86 na powierzchni Mf w odniesieniu do obu grup kontrolnych (Ryc. 86. E, F). Jednak nie wykazano wpływu rodzaju zastosowanej szczepionki na zróżnicowanie stopnia pobudzenia tych komórek.

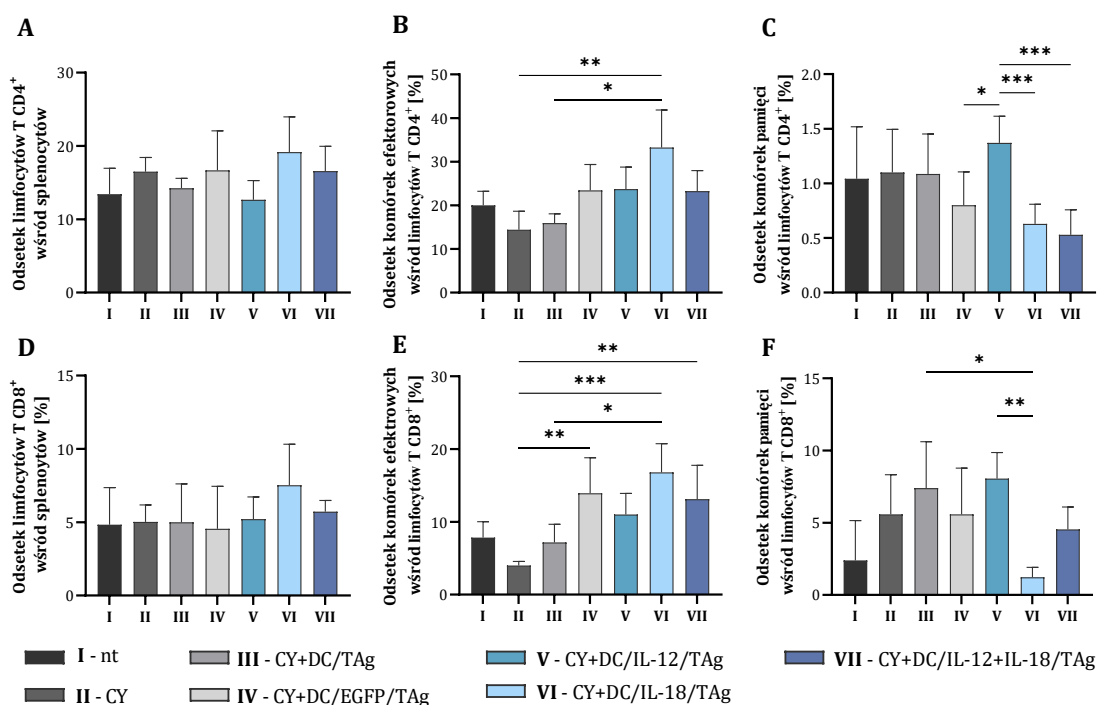
4.4.3. Ocena ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej u myszy poddanych chemioimmunoterapii

Ostatnim etapem prowadzonych badań było określenie wpływu zastosowania chemioimmunoterapii na aktywację ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej. W śledzionach pobranych od myszy doświadczalnych 36. dnia doświadczenia oznaczono zmiany w wielkości populacji komórek limfoidalnych i mieloidalnych oraz sprawdzano aktywność tych komórek po wtórnej stymulacji z komórkami nowotworowymi MC38. W tym celu przeprowadzono wieloparametrową analizę cytometryczną splenocytów, której opis przedstawiono w rozdziale 4.3.3., a schemat na Ryc. 66.

4.4.3.1. Subpopulacje komórek limfoidalnych w śledzionach uzyskanych od myszy poddanych chemioimmunoterapii

Wielkość populacji limfocytów T CD4⁺ wśród splenocytów nie zmieniała się istotnie po zastosowaniu chemioimmunoterapii, a najwyższy odsetek tych komórek wykazano po podaniu CY i DC/IL-18/TAg (Ryc. 87. A). W tej samej grupie wykazano istotny statystycznie wzrost odsetka efektorowych limfocytów T CD4⁺ w odniesieniu do splenocytów wyizolowanych od myszy traktowanych samym CY, jak i w połączeniu z DC/TAg (Ryc. 87. B). Ponadto w grupach myszy otrzymujących terapię skojarzoną, zaobserwowano zróżnicowanie odsetka komórek T CD4⁺ pamięci jednak zmiany te nie były istotne statystycznie w odniesieniu do grupy nietraktowanej. Najwyższy odsetek tych komórek wykazano po podaniu CY i DC/IL-12/TAg, a najniższy po terapii cytostatykiem i DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc. 87. C).

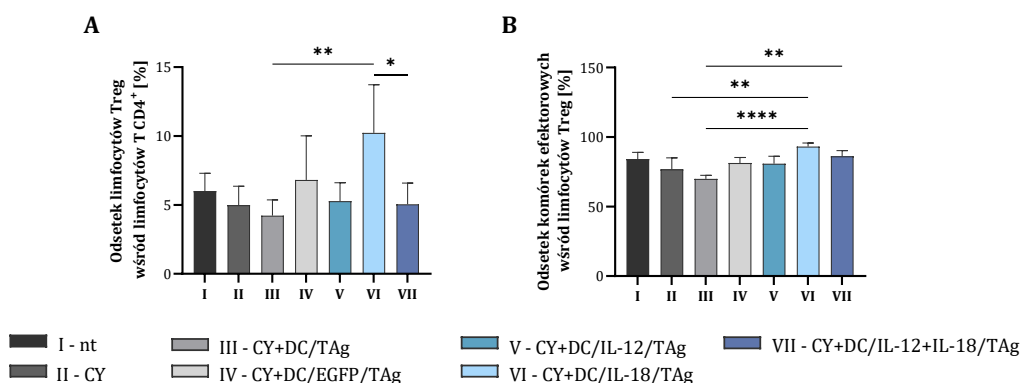
Nie wykazano też znaczących zmian odsetka limfocytów T CD8⁺ wśród splenocytów pobranych od myszy otrzymujących CY i szczepionki. Zaobserwowano jedynie niewielki wzrost odsetka tych komórek po podaniu CY i DC/IL-18/TAg (Ryc. 87. D). Natomiast udział procentowy limfocytów T CD8⁺ efektorowych okazał się zróżnicowany po podaniu CY wraz ze szczepionkami, szczególnie w grupie traktowanej CY i DC/IL-18/TAg (Ryc. 87. E). Zmiana ta była istotna statystycznie w odniesieniu do grupy traktowanej samym CY, jak i w połączeniu z DC/TAg. Po podaniu CY i DC/IL-18/TAg, odsetek komórek pamięci wśród limfocytów T CD8⁺ był najniższy spośród wszystkich badanych grup (Ryc. 87. F).



Ryc. 87. Odsetek i stopień aktywacji limfocytów T wśród splenocytów uzyskanych od myszy poddanych chemoimmunoterapii.

Śledzony pobierano od myszy w 36. dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej komórek śledzionowych wyodrębniono populacje limfocytów T CD4⁺ i T CD8⁺ oraz oznaczono ekspresję cząsteczek CD62L i CD44 na powierzchni tych komórek (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 66). Określono odsetek limfocytów T CD4⁺ (A) i T CD8⁺ (D) wśród splenocytów oraz odsetek komórek efektorowych (CD44⁺CD62L^{neg}) (B, E) i komórek pamięci (CD44⁺CD62L⁺) (C, F) wśród tych populacji. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 6-7 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu post hoc Dunn'a (E, F) lub parametrycznego testu Brown-Forsythe i Welch ANOVA i testu post hoc Dunnett'a T3 (B, C). Za istotnie statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ pomiędzy poszczególnymi grupami). *nt* – grupa kontrolna nietraktowana

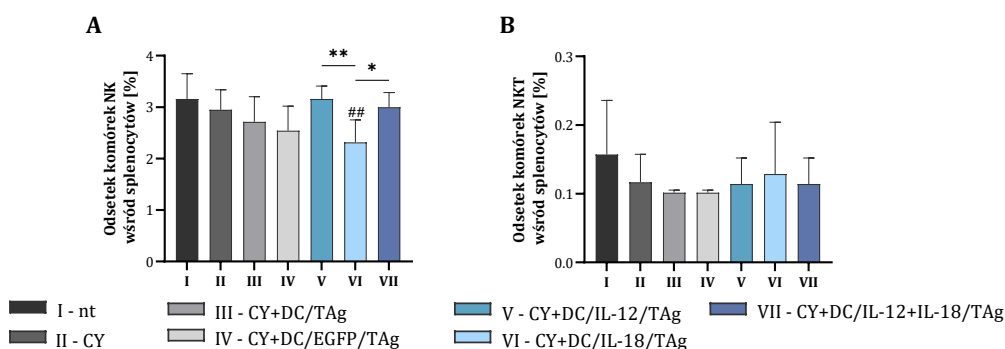
Analiza wpływu terapii skojarzonej na zmiany w odsetku komórek Treg wykazała, że udział procentowy tych komórek w śledzionach pobranych od myszy traktowanych CY i DC/EGFP/TAg lub CY i DC/IL-18/TAg był wyższy niż w grupie nieleczonej (Ryc. 88. A). Niezależnie od wielkości populacji limfocytów Treg, większość z nich stanowiły komórki efektorowe, a w śledzionach myszy otrzymujących CY i DC/IL-18/TAg, odsetek tych komórek był najwyższy (Ryc. 88. B).



Ryc. 88. Odsetek i stopień aktywacji limfocytów T regulatorowych wśród splenocytów pozyskanych od myszy poddanych chemioimmunoterapii.

Śledziony pobierano od myszy w 36. dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej komórek śledzionowych wyodrębniono populację limfocytów T CD4⁺, a wśród nich populację limfocytów Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) oraz oznaczono ekspresję cząsteczek CD62L i CD44 na powierzchni tych komórek (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 66). Określono odsetek limfocytów Treg wśród limfocytów T CD4⁺ (A) oraz odsetek komórek efektorowych (CD44⁺CD62L^{neg}) (B) wśród limfocytów Treg. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 6-7 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunn'a (A, B). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; **** - $p < 0,0001$ pomiędzy poszczególnymi grupami). *nt* – grupa kontrolna nietraktowana

Odsetek komórek NK i NKT wśród splenocytów pobranych od myszy po terapii był niższy niż w grupie nietraktowanej (Ryc. 89.). Istotne statystycznie obniżenie udziału procentowego komórek NK wykazano po podaniu CY i DC/IL-18/TAg w stosunku do grupy nieleczonej, ale także po terapii CY i DC/IL-12/TAg lub CY i DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc. 89. A). Natomiast zastosowanie chemioimmunoterapii nie miało istotnego wpływu na zmiany odsetka komórek NKT w śledzionach (Ryc. 89. B).

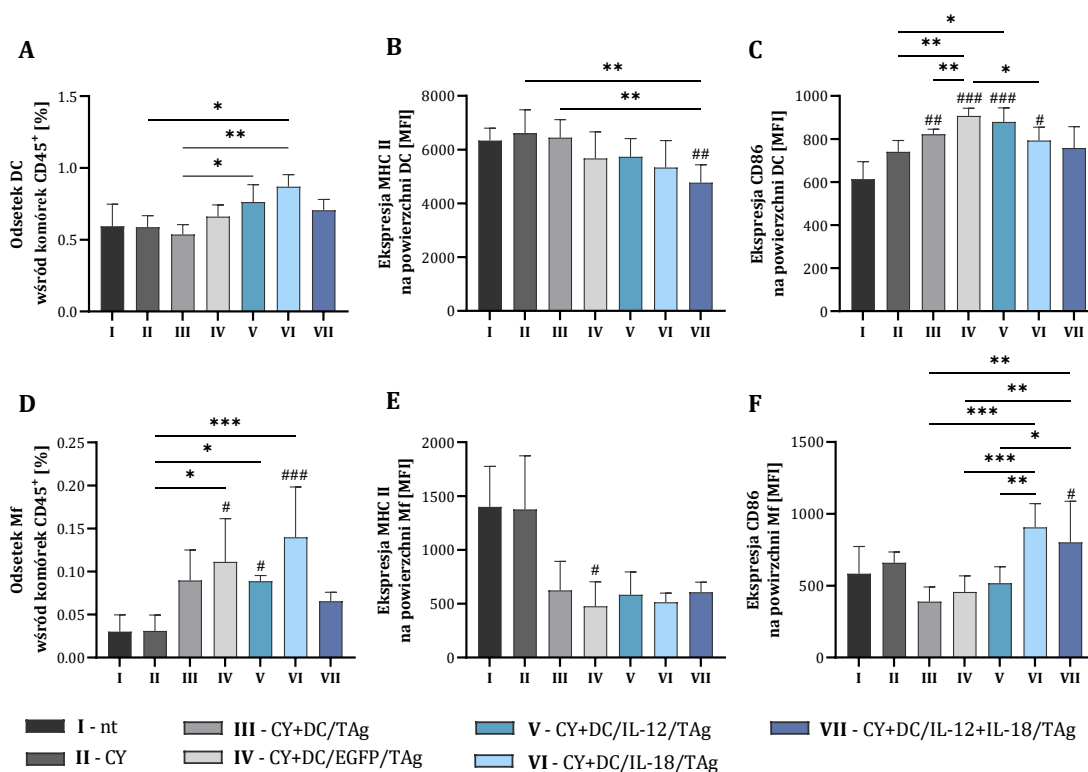


Ryc. 89. Odsetek komórek NK i NKT wśród splenocytów uzyskanych od myszy poddanych chemioimmunoterapii.

Śledziony pobierano od myszy w 36. dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej komórek śledzionowych wyodrębniono populacje komórek NK (CD3^{neg}NK1.1⁺) oraz komórek NKT (CD3⁺NK1.1⁺) (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 66). Określono odsetek komórek NK (A) oraz NKT (B) wśród splenocytów. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 6-7 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Tukey'a (A) lub parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (## - $p < 0,01$ względem grupy *nt*; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ pomiędzy poszczególnymi grupami). *nt* – grupa kontrolna nietraktowana

4.4.3.2. Subpopulacje komórek mieloidalnych w śledzionach uzyskanych od myszy poddanych chemioimmunoterapii

Zastosowanie CY i szczepionek na bazie transdukowanych DC stymulowanych TAG wpłynęło na zwiększenie odsetka komórek dendrytycznych wśród splenocytów w porównaniu do populacji DC w śledzionach pobranych od myszy nietraktowanych i otrzymujących sam CY lub CY i DC/TAG. Najwyższy odsetek tych komórek odnotowano po podaniu CY i DC/IL-18/TAG, a zmiana ta była istotna statystycznie w odniesieniu do grupy traktowanej samym CY lub CY i DC/TAG (Ryc. 90. A).



Ryc. 90. Odsetek i stopień pobudzenia komórek dendrytycznych i makrofagów wśród splenocytów uzyskanych od myszy poddanych chemioimmunoterapii.

Śledziony pobierano od myszy w 36. dniu doświadczenia. Podczas wieloparametrowej analizy cytometrycznej wśród komórek DAPI^{neg}CD45⁺ zidentyfikowano komórki mieloidalne CD11b⁺, a wśród nich wyodrębniono populacje komórek dendrytycznych (DC, CD11c⁺F4/80^{int}) i makrofagów (Mf, CD11c^{neg}F4/80⁺), a także określono poziom ekspresji cząsteczek MHC II i CD86 na powierzchni tych komórek (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 66). Określono odsetek komórek DC (A) i Mf (D) oraz średnią intensywność fluorescencji cząsteczek MHC II (B, E) i CD86 (C, F) na powierzchni tych komórek. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 6-7 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallis i testu *post hoc* Dunn'a (A, D), parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (B, F) lub parametrycznego testu Brown-Forsythe i Welch ANOVA i testu *post hoc* Dunnett'a T3 (C, E). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$ względem grupy nt; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Natomiast zastosowanie terapii skojarzonej spowodowało zmniejszoną ekspresję cząsteczek MHC II na powierzchni DC obecnych w śledzionach, a najniższy jej poziom wykazano po podaniu CY i DC/IL-12+IL-18/TAg. Zmiana ta była istotna statystycznie w odniesieniu do kontroli nietraktowanej, otrzymującej sam CY lub CY i DC/TAg (Ryc. 90. B). W przeciwieństwie do niższej ekspresji MHC II, we wszystkich grupach terapeutycznych odnotowano zwiększoną ekspresję cząsteczek CD86 na powierzchni DC, a zmiany istotne statystycznie obserwowano szczególnie wobec kontroli nietraktowanej i traktowanej CY (Ryc. 90. C).

Odsetek makrofagów w śledzionach w żadnej z badanych grup nie przekroczył 0,2%, jednak zaobserwowano wzrost udziału procentowego tych komórek po zastosowaniu terapii skojarzonej w porównaniu do grupy nietraktowanej lub traktowanej samym CY (Ryc. 90. D). Z drugiej strony, makrofagi w śledzionach pobranych od myszy otrzymujących chemioimmunoterapię charakteryzowały się obniżoną ekspresją cząsteczek MHC II (Ryc. 90. E), ale zwiększonym poziomem ekspresji CD86 w grupach traktowanych CY i DC/IL-18/TAg lub CY i DC/IL-12+IL-18/TAg (Ryc. 90. F).

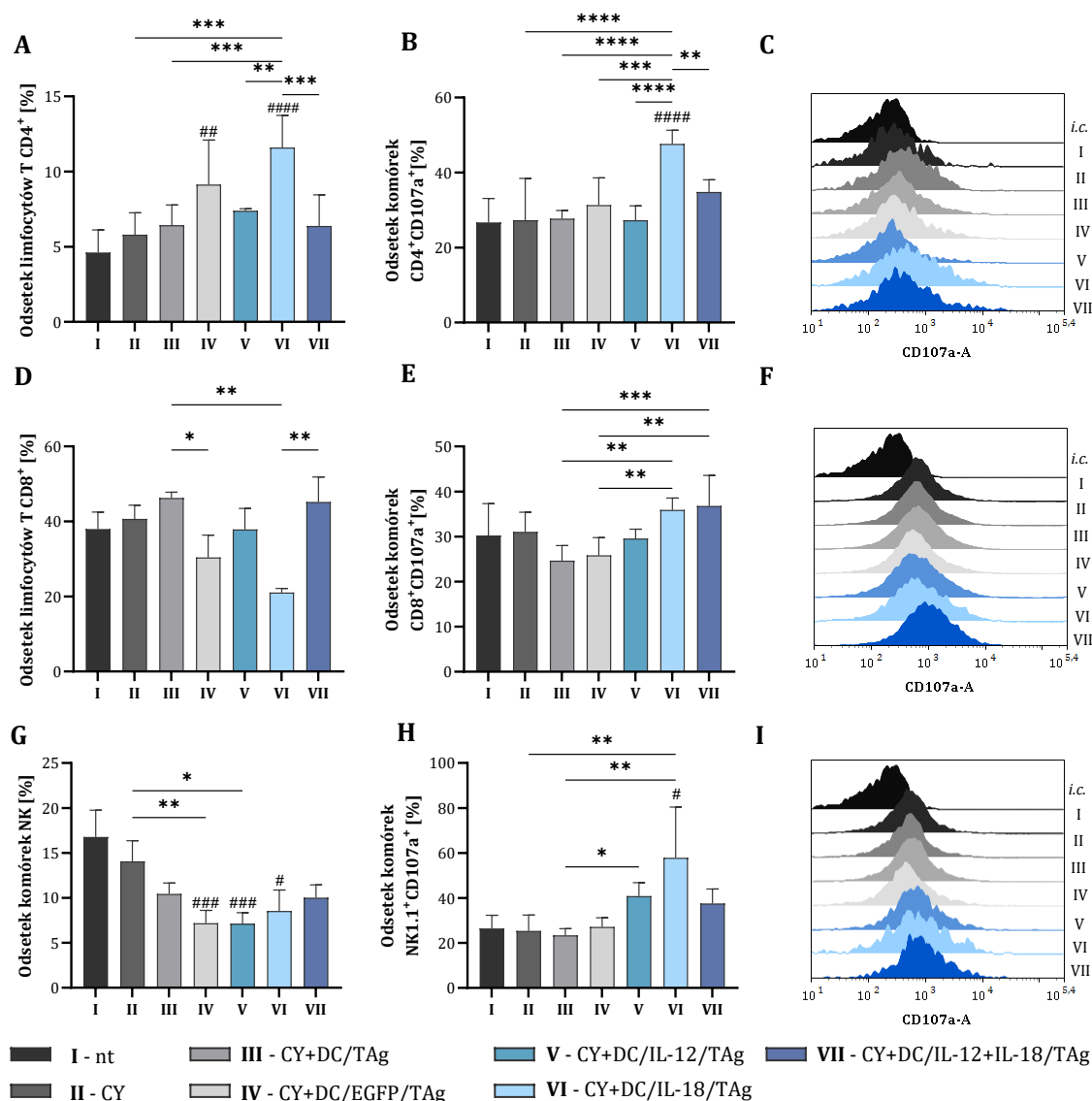
4.4.3.3. Aktywność restymulowanych splenocytów uzyskanych od myszy poddanych chemioimmunoterapii

Splenocyty pobrane od myszy otrzymujących terapię skojarzoną poddano wtórnej stymulacji z komórkami nowotworowymi MC38. Po 5 dniach, wśród restymulowanych splenocytów oznaczono odsetek limfocytów T CD4⁺, T CD8⁺ oraz komórek NK, a także poziom ekspresji cząsteczek CD107a na powierzchni tych komórek. Ponadto oceniano aktywność cytotoksyczną komórek śledzionowych wobec komórek MC38 oraz poziom produkowanych cytokin.

Wśród restymulowanych komórek śledzionowych pobranych od myszy nietraktowanych, odsetek limfocytów T CD4⁺ wynosił około 4,5%, a zastosowanie chemioterapeutyku w niewielkim stopniu wpłynęło na zwiększenie odsetka tych komórek (Ryc. 91. A). Natomiast uzupełnienie terapii przez podanie szczepionek, w szczególności CY i DC/EGFP/TAg lub CY i DC/IL-18/TAg wpłynęło na wzmocnienie efektu działania CY. Ponadto limfocyty T CD4⁺ z mieszanej hodowli splenocytów traktowanych CY i DC/IL-18/TAg charakteryzowały się wysoką zdolnością do wydzielania ziaren cytotoxicytnych.

Analiza udziału procentowego limfocytów T CD8⁺ wśród restymulowanych splenocytów wykazała znaczne zróżnicowanie odsetka tych komórek zależne od rodzaju zastosowanej terapii (Ryc. 91. D). Najniższy ich odsetek wykazano po podaniu CY i DC/IL-18/TAg, a najwyższy po zastosowaniu CY i DC/IL-12+IL-18/TAg, jednak zmiany te nie były istotne statystycznie w odniesieniu do grup kontrolnych. Limfocyty T CD8⁺ z mieszanej hodowli, pochodzące od myszy

traktowanych CY i DC/IL-18/TAg lub CY i DC/IL-12+IL-18/TAg charakteryzowały się nieco zwiększoną ekspresją cząsteczek CD107a na ich powierzchni.

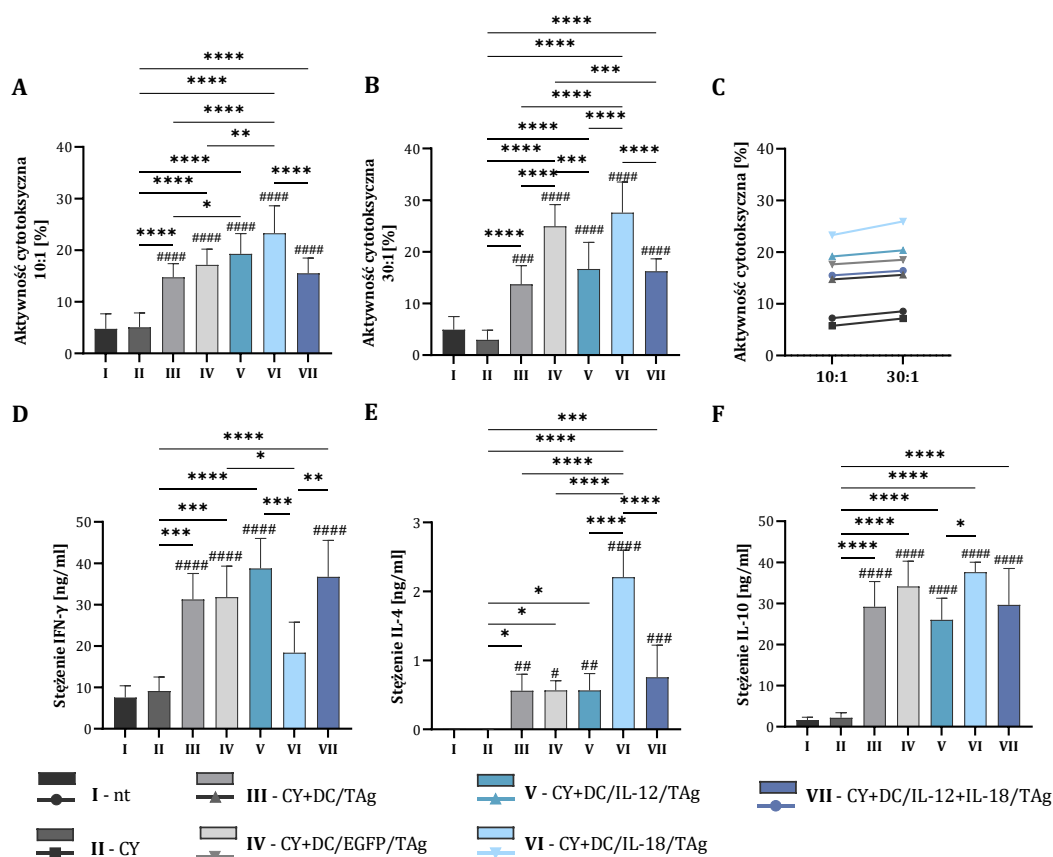


Ryc. 91. Odsetek komórek limfoidalnych wśród restymulowanych splenocytów uzyskanych od myszy poddanych chemioimmunoterapii.

Śledziony pobierano od myszy w 36. dniu doświadczenia. Restymulowane splenocyty inkubowano z komórkami nowotworowymi MC38 przez 2 godziny. Po tym czasie określono odsetek limfocytów T CD4⁺ (A), T CD8⁺ (D) oraz komórek NK (G) wśród restymulowanych splenocytów oraz odsetek komórek zdolnych do wydzielania ziaren cytolitycznych (CD107a⁺) wśród tych populacji (B, C, E, F, H, I). Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 6-7 myszy w każdej grupie badanej. Na histogramach przedstawiono dane z prób reprezentatywnych. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu ANOVA Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunn'a (D, G, H) lub parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A, B, E). Za istotnie statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$; #### - $p < 0,0001$ względem grupy nt; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Zastosowanie CY wpłynęło na zmniejszenie odsetka komórek NK wśród restymulowanych komórek śledzionowych, a uzupełnienie terapii komórkami szczepionkowymi wzmocniło ten efekt,

szczególnie po podaniu DC/EGFP/TAg, DC/IL-12/TAg, lub DC/IL-18/TAg (Ryc. 91. G). Natomiast komórki NK pochodzące od myszy poddanych terapii skojarzonej były zdolne do zwiększonego wydzielania ziaren cytotoxicywnych (Ryc. 91. H).



Ryc. 92. Aktywność restymulowanych splenocytów uzyskanych od myszy poddanych chemioimmunoterapii.

Śledziony pobierano od myszy w 36. dniu doświadczenia. Aktywność cytotoxicywną restymulowanych komórek śledzionowych oceniono na podstawie odsetka martwych komórek nowotworowych MC38 po 4-godzinnej hodowli z komórkami efektorowymi w stosunku 1:10 (A, C) oraz 1:30 (B, C). Stężenie IFN-γ (D), IL-4 (E) oraz IL-10 (F) sprawdzono w nadsączach z nad 5-dniowej mieszanej hodowli splenocytów z komórkami nowotworowymi MC38. Na wykresach przedstawiono wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym (+SD) uzyskane w wyniku analizy materiału pobranego od 6-7 myszy w każdej grupie badanej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a. Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy grupami, dla których $p < 0,05$ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$; #### - $p < 0,0001$ względem grupy nt; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$ pomiędzy poszczególnymi grupami). nt – grupa kontrolna nietraktowana

Aktywność cytotoxicywną restymulowanych splenocytów pełniących rolę komórek efektorowych określano na podstawie odsetka martwych docelowych komórek nowotworowych MC38 ocenianego po 4-godzinnej mieszanej hodowli. Test przeprowadzono w dwóch stosunkach: 10:1 i 30:1 (komórki efektorowe : komórki docelowe). W obu przypadkach wykazano, że komórki śledzionowe pobrane od myszy poddanych chemioimmunoterapii były zdolne do zabijania komórek nowotworowych, a zmiany te były istotne statystycznie w odniesieniu do obu grup

kontrolnych (Ryc. 92. A, B, C). Najwyższy odsetek martwych komórek docelowych wykazano w grupie myszy traktowanej CY i DC/IL-18/TAg.

W nadsączach znad 5-dniowej hodowli komórek nowotworowych i splenocytów pochodzących od myszy traktowanych terapią skojarzoną wykazano znaczny wzrost stężenia IFN- γ w odniesieniu do grupy nietraktowanej lub otrzymującej sam cytostatyk, przy czym jedynie w grupie myszy traktowanych CY i DC/IL-18/TAg zmiana ta nie była istotna statystycznie (Ryc. 92. D). Najwyższe stężenie tej cytokiny wykazano w nadsączach znad hodowli restymulowanych splenocytów pochodzących od myszy otrzymujących CY w połączeniu z DC/IL-12/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg.

Restymulowane splenocyty uzyskane od myszy otrzymujących terapię skojarzoną były też zdolne do zwiększonej produkcji IL-4 i IL-10 w porównaniu do komórek śledzionowych pobranych od myszy nietraktowanych i traktowanej samym cytostatykiem (Ryc. 92. E, F). Najwyższe stężenia tych cytokin wykazano w nadsączach znad mieszanej hodowli splenocytów myszy otrzymujących CY i DC/IL-18/TAg.

4.4.4. Podsumowanie

Po zastosowaniu terapii skojarzonej składającej się z cyklofosfamidu i DC/IL-12+IL-18/TAg odnotowano najlepszy efekt terapeutyczny spośród wszystkich badanych grup, wykazując znaczące zahamowanie wzrostu nowotworu (TGI vs nt, 36 dzień: 93,84%; TGI vs CY, 36. dzień 84,10%), a efekt ten utrzymywał się do 14 dni od zakończenia terapii (TGI vs CY, 43. dzień: 83,71%). Co ważne, mniejsza objętość guzów w tej grupie badanej korelowała ze zwiększonym naciekiem leukocytów do tkanki nowotworowej.

Chemoimmunoterapia z udziałem cyklofosfamidu i DC/IL-12+IL-18/TAg wpłynęła głównie na zmiany w mikrośrodowisku nowotworu, generując zwiększony napływ limfocytów T CD4⁺, T CD8⁺, a wśród nich komórek efektorowych oraz komórek NKT. Ponadto ten rodzaj zastosowanej terapii powodował zmniejszenie wielkości populacji komórek supresorowych tj. limfocytów Treg, efektorowych limfocytów Treg oraz makrofagów obecnych w tkance nowotworowej, ale jednocześnie zwiększenie odsetka limfocytów T CD4⁺ oraz komórek efektorowych T CD4⁺ i T CD8⁺ w wartowniczych węzłach chłonnych.

Oceniając ogólnoustrojową odpowiedź przeciwnowotworową wykazano, że podanie CY i DC/IL-12+IL-18/TAg, spowodowało nieznaczny w odniesieniu do grupy nieleczonej wzrost odsetka limfocytów T CD4⁺ i T CD8⁺, a wśród nich komórek efektorowych. Jednak po wtórnej stymulacji komórek śledzionowych pochodzących od myszy otrzymujących CY i DC/IL-12+IL-18/TAg, można było zauważyć nieco wyższy niż w grupie nietraktowanej, odsetek limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ oraz komórek NK zdolnych do wydzielania ziaren cytolitycznych. Zwiększoną

aktywność cytotoksyczną restymulowanych splenocytów wykazano we wszystkich grupach myszy otrzymujących cyklofosfamid i szczepionki, jednak komórki śledzionowe pobrane od myszy traktowanych CY i DC/IL-12+IL-18/TAg charakteryzowały się najwyższą produkcją IFN- γ , co sugeruje indukowanie ogólnoustrojowej odpowiedzi komórkowej typu Th1.

Drugą równie skuteczną pod względem efektu terapeutycznego szczepionką zastosowaną w terapii skojarzonej były DC/IL-18/TAg. Podanie cyklofosfamidu poprzedzające zastosowanie szczepionek zawierających DC/IL-18/TAg wpłynęło na zwiększenie skuteczności działania tej szczepionki wywołując nie tylko silniejszy i przedłużony efekt terapeutyczny (TGI vs. CY, 77,83% w 43. dniu doświadczenia) niż po podaniu samej immunoterapii, ale przede wszystkim istotne zmiany w mikrośrodkowisku nowotworu, wartowniczych węzłach chłonnych oraz aktywację ogólnoustrojowej odpowiedzi odpornościowej. W guzach pobranych od myszy traktowanych CY i DC/IL-18/TAg odnotowano największy naciek leukocytów spośród wszystkich badanych grup, co jednocześnie korelowało ze zmniejszoną objętością guzów.

W tkance nowotworowej uzyskanej od myszy traktowanych CY i DC/IL-18/TAg, podobnie jak po podaniu CY i DC/IL-12+IL-18/TAg odnotowano zwiększony udział procentowy limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺, a wśród nich komórek efektorowych i najwyższy udział procentowy komórek NKT. Ponadto odsetek limfocytów Treg i TAM w tkance nowotworowej po zastosowaniu tej terapii był najniższy spośród wszystkich badanych grup, a udział procentowy limfocytów T CD4⁺ w wartowniczych węzłach chłonnych uzyskanych z tej grupy badanej był najwyższy.

Zastosowanie DC/IL-18/TAg poprzedzone podaniem cyklofosfamidu wpłynęło głównie na zmiany wielkości populacji komórek układu odpornościowego w śledzionach, a tym samym na aktywację ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Wśród splenocytów uzyskanych od myszy poddanych tej terapii odnotowano najwyższy odsetek limfocytów T CD4⁺, T CD8⁺ oraz komórek efektorowych. Co więcej, po wtórnej stymulacji komórek śledzionowych z komórkami nowotworowymi, splenocyty z tej grupy cechowały się najwyższą spośród wszystkich badanych grup zdolnością do wydzielania ziaren cytotoxicytnych przez komórki CD4⁺, CD8⁺ i NK oraz do zabijania komórek MC38. Natomiast w nadsączach znad 5-dniowej mieszanej hodowli komórek śledzionowych uzyskanych po podaniu CY i DC/IL-18/TAg odnotowano najwyższe stężenie IL-4 i IL-10, ale nieznaczny wzrost stężenia IFN- γ , co może wskazywać na indukowanie odpowiedzi odpornościowej typu Th2.

Podanie cyklofosfamidu w dawce modulującej działanie komórek układu odpornościowego, korzystnie wzmocniło miejscowy i ogólnoustrojowy efekt terapeutyczny zastosowanych szczepionek, a w szczególności DC/IL-18/TAg oraz DC/IL-12+IL-18/TAg. Z drugiej strony, uwypukliło różnice umożliwiając tym samym określenie kierunku polaryzacji odpowiedzi.

4.5. Rekapitulacja wyników

Przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie najskuteczniejszej szczepionki przeciwnowotworowej, na bazie komórek dendrytycznych zdolnych do produkcji IL-12 i/lub IL-18 oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi.

Aby tego dokonać komórki dendrytyczne uzyskane z różnicującej hodowli mysich komórek szpikowych, transdukowano wektorami lentiwirusowymi niosącymi geny IL-12, IL-18 lub obu tych cytokin, a następnie stymulowano lizatem uzyskanym z komórek nowotworowych MC38. Na podstawie analizy fenotypu powierzchniowego stwierdzono, że komórki dendrytyczne transdukowane do produkcji samej IL-12 lub jednoczesnej produkcji IL-12 i IL-18, niezależnie od stymulacji antygenowej charakteryzowały się zwiększonym stopniem dojrzałości. Ze względu na to, że transdukcja DC do jednoczesnej produkcji cytokin za pomocą dwóch wektorów niosących geny IL-12 lub IL-18 była bardziej wydajna niż transdukcja DC jednym wektorem zawierającym sekwencję genów obu cytokin jednocześnie, do dalszych badań wybrano komórki DC/IL-12+IL-18 oraz DC/IL-12+IL-18/TAg.

We wstępnych badaniach *ex vivo* określono skuteczność działania DC/IL-12+IL-18/TAg. Wykazano znaczący wpływ tych komórek na indukowanie swoistej odpowiedzi komórkowej, poprzez aktywację limfocytów T CD4⁺, T CD8⁺ oraz komórek NK, a tym samym zwiększenie aktywności cytotoksycznej tych komórek oraz ich zdolności do produkcji IFN- γ .

Stwierdzono również korzystny wpływ stymulacji antygenowej na zdolność transdukowanych komórek dendrytycznych do naciekania tkanki guzów i migracji do wartowniczych węzłów chłonnych. Zaobserwowano przy tym zróżnicowanie w mobilności komórek szczepionkowych, bowiem DC/IL-12+IL-18/TAg charakteryzowały się największą zdolnością do naciekania tkanki guzów, natomiast DC/TAg najbardziej efektywnie migrowały do wartowniczych węzłów chłonnych.

Na podstawie oceny kinetyki powstawania miejscowej odpowiedzi przeciwnowotworowej w wyniku jednokrotnego podania transdukowanych DC stwierdzono, że stymulacja antygenowa korzystnie wpłynęła na zwiększenie zdolności komórek szczepionkowych do aktywacji miejscowej odpowiedzi przeciwnowotworowej, a największe zmiany obserwowano 7 dni po podaniu szczepionek. Podanie DC/IL-12+IL-18/TAg indukowało wzrost odsetka leukocytów w tkance nowotworowej, a w szczególności limfocytów T CD8⁺. Natomiast nie obserwowano zmian w udziale procentowym limfocytów T CD4⁺ i komórek NK, a jedynie zmniejszenie wielkości populacji DC i TAM w guzach. W wartowniczych węzłach chłonnych odnotowano znaczące obniżenie odsetka limfocytów T CD8⁺ po zastosowaniu wszystkich rodzajów modyfikowanych DC, a po podaniu DC/IL-12/TAg także limfocytów T CD4⁺. Co ważne, podanie modyfikowanych

DC znacząco wpłynęło na wzrost poziomu aktywacji tych limfocytów. Ponadto podanie DC/IL-12+IL-18/TAg zwiększyło odsetek limfocytów T CD4⁺ efektorowych w śledzionach uzyskanych od myszy, a wśród restymulowanych splenocytów odnotowano zwiększenie populacji limfocytów T CD4⁺ zdolnych do wydzielania ziaren cytolitycznych.

Tak więc, mimo że jednokrotne podanie DC/IL-12+IL-18/TAg wywołało pobudzenie miejscowej reakcji przeciwnowotworowej, okazało się niewystarczające do skutecznego pobudzenia odpowiedzi ogólnoustrojowej.

Kinetyka wzrostu nowotworów u myszy poddanych immunoterapii zależała od rodzaju komórek szczepionkowych oraz liczby ich podań, a wynikiem wielokrotnego zastosowania szczepionek było znaczne zahamowanie tempa wzrostu guzów (TGI).

Dwukrotne podanie DC/IL-12+IL-18/TAg wywołało największe zahamowanie wzrostu guzów (TGI 70,25%), zwiększyło naciek limfocytów T CD4⁺ do tkanki nowotworowej oraz wpłynęło na zmniejszenie populacji limfocytów Treg, DC i TAM. Jednak nie wykazano istotnego wpływu podania tej szczepionki na zmiany wielkości populacji komórek limfoidalnych i mieloidalnych w wartowniczych węzłach chłonnych. Oceniając ogólnoustrojową odpowiedź przeciwnowotworową wywołaną przez podanie DC/IL-12+IL-18/TAg, wśród restymulowanych *ex vivo* splenocytów stwierdzono znaczący wzrost udziału procentowego limfocytów T CD4⁺ oraz najwyższy odsetek limfocytów T CD4⁺ i T CD8⁺ zdolnych do wydzielania ziaren cytolitycznych. Splenocyty uzyskane od myszy z tej grupy terapeutycznej charakteryzowały się ponadto zwiększoną aktywnością cytotoksyczną oraz zdolnością do produkcji IFN- γ , IL-4 i IL-10. Wysoka produkcja IL-4 i IL-10 przez restymulowane splenocyty sugeruje, że wraz ze wzrostem nowotworu, wzrasta jego presja na wyciszenie ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej wygenerowanej przez podanie DC/IL-12+IL-18/TAg.

Trzykrotne zastosowanie szczepionek nie przedłużyło efektu terapeutycznego, choć jego wielkość zmieniała się zależnie od rodzaju zastosowanej szczepionki. Warto jednak podkreślić, że wyłącznie po podaniu DC/IL-12+IL-18/TAg mniejszej objętości guzów towarzyszył wzrost nacieku leukocytów. Szczególnie było to widoczne w zwiększonym odsetku limfocytów T CD4⁺, limfocytów T CD8⁺ i komórek NK. Spowolnieniu wzrostu guzów towarzyszył również wzrost odsetka efektorowych komórek T CD4⁺ i T CD8⁺ w wartowniczych węzłach chłonnych. Nie wykazano jednak istotnego wpływu trzykrotnego podania DC/IL-12+IL-18/TAg na przedłużenie ogólnoustrojowej odpowiedzi odpornościowej, chociaż restymulowane splenocyty były zdolne do skutecznego zabijania komórek nowotworowych i zwiększonej produkcji IFN- γ . Zatem, DC/IL-12+IL-18/TAg mimo niższej sekrecji cytokin w porównaniu do DC/IL-12/TAg lub DC/IL-18/TAg, zdolne były do wygenerowania miejscowego, jak i ogólnoustrojowego efektu

przeciwnowotworowego, jednak ich skuteczność w zwalczaniu rozwijającego się nowotworu ograniczała się do początkowego etapu leczenia.

Dlatego też, aby przedłużyć działanie wielokrotnego podania komórek szczepionkowych i określić, która z opracowanych szczepionek wywołuje najlepszy efekt terapeutyczny zaplanowano podanie cytostatyku immunomodulującego środowisko nowotworu i wzmacniającego rezultat dotychczasowej terapii.

Terapia skojarzona z udziałem cyklofosfamidu i DC/IL-12+IL-18/TAg wywołała najlepszy efekt terapeutyczny (TGI 84,10%), który utrzymywał się nawet 14 dni od zakończenia terapii (TGI 83,71%). Towarzyszył temu zjawisku zwiększony napływ limfocytów T CD4⁺, T CD8⁺ oraz komórek NKT, jak również zmniejszenie wielkości populacji komórek supresorowych w tkance nowotworowej. Jednocześnie w wartowniczych węzłach chłonnych zwiększeniu uległ odsetek limfocytów T CD4⁺ oraz komórek efektorowych T CD4⁺ i T CD8⁺. Zwiększoną aktywność cytotoksyczną restymulowanych splenocytów stwierdzono we wszystkich grupach myszy otrzymujących cyklofosfamid i szczepionki. Ponadto po podaniu CY i DC/IL-12+IL-18/TAg, odnotowano zwiększony w odniesieniu do grupy nietraktowanej, odsetek limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ i komórek NK zdolnych do wydzielania ziaren cytolitycznych oraz najwyższą produkcję IFN- γ , co sugeruje indukowanie ogólnoustrojowej odpowiedzi komórkowej typu Th1. Tak więc, zastosowanie immunomodulującej dawki cyklofosfamidu wspomaga działanie komórek układu odpornościowego, korzystnie wzmacniając miejscowy i ogólnoustrojowy efekt terapeutyczny zastosowanych szczepionek, a w szczególności DC/IL-18/TAg oraz DC/IL-12+IL-18/TAg.

Po wykonaniu serii doświadczeń terapeutycznych oceniających skuteczność komórek dendrytycznych produkujących IL-12 i/lub IL-18 i stymulowanych TAg wykazano znaczący wpływ ilości uwalnianych przez nie cytokin, stopnia dojrzałości komórek szczepionkowych, jak i liczby ich podań na ostateczny efekt przeciwnowotworowy zastosowanej terapii. Niewątpliwie istotny wpływ na efekt działania szczepionek miało mikrośrodowisko nowotworu. Doskonałym przykładem był immunomodulujący wpływ CY, który wzmocnił działanie DC/IL-18/TAg w terapii skojarzonej, podczas gdy zastosowanie immunoterapii wykazało dominujący efekt przeciwnowotworowy komórek uwalniających samą IL-12. Niezależnie od stwierdzonych różnic w oddziaływaniu cytokin uwalnianych przez komórki szczepionkowe na powstawanie i utrzymywanie się odpowiedzi przeciwnowotworowej, najbardziej obiecującą szczepionką okazała się DC/IL-12+IL-18/TAg, szczególnie w środowisku wcześniej zmodyfikowanym przez cytostatyki.

5. Dyskusja

Zastosowanie nowych metod immunoterapeutycznych stanowi obiecujący sposób leczenia chorób nowotworowych. W ciągu ostatnich lat znaczącą rolę w rozwoju immunoterapii odegrały szczepionki przeciwnowotworowe, a w szczególności szczepionki na bazie komórek dendrytycznych (Filin i in., 2021). Mechanizm ich działania opiera się głównie na stymulowaniu i wspieraniu odpowiedzi przeciwnowotworowej, mającej na celu wyeliminowanie komórek nowotworowych z organizmu. Komórki dendrytyczne jako profesjonalne komórki prezentujące antygeny (APC), dzięki zdolności do migracji do węzłów chłonnych mogą indukować pobudzenie limfocytów T cytotoksycznych (CTL), stanowiących główną populację komórek biorących udział w zwalczaniu nowotworu (Allan i in., 2006; Hampton i Chtanova, 2019). Opracowane do tej pory metody aktywacji DC *ex vivo* za pomocą antygenów nowotworowych (TAg) znacznie zwiększają skuteczność działania szczepionek, jednak pomimo obiecujących badań klinicznych, ich podanie prowadzi jedynie do okresowego spowolnienia wzrostu guza. Dlatego też, niezbędne jest wspomaganie ich działania m.in. poprzez zastosowanie cytokin takich jak np. IL-12 lub IL-18. Systemowe podanie IL-12 wiąże się z wystąpieniem ciężkich skutków ubocznych (Atkins i in., 1997), z tego względu poszukiwane są alternatywne drogi i sposoby jej podawania (Indrová i in., 2009; Jinushi i Tahara, 2009; Mikyšková i in., 2011; Portielje i in., 2003). Natomiast wstępne badania kliniczne nad zastosowaniem IL-18 w terapii przeciwnowotworowej wykazały, że efekt działania tej cytokiny jest silnie uzależniony od dawki i może zarówno hamować jak i promować rozwój nowotworu (Palma i in., 2013). Dodatkowym elementem wspomagającym działanie szczepionek na bazie komórek dendrytycznych może być także zastosowanie konwencjonalnych leków cytostatycznych, które szczególnie w niskich dawkach mają działanie immunomodulujące (Landreneau i in., 2013).

W niniejszej pracy określono efekt zastosowania komórek dendrytycznych transdukowanych do produkcji IL-12 i/lub IL-18 oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi (TAg) w immunoterapii lub w chemioimmunoterapii z udziałem cyklofosfamidu. Oceniano skuteczność terapeutyczną opracowanych szczepionek oraz ich wpływ na aktywację odpowiedzi przeciwnowotworowej w modelu mysiego raka jelita grubego MC38.

Transdukcję komórek dendrytycznych za pomocą nośników genów IL-12 i IL-18, przeprowadzono przy użyciu systemu lentiwirusowego trzeciej generacji. Metoda ta jest znacznie bardziej wydajna niż stosowane rutynowo wektory retrowirusowe oraz indukuje bardziej stabilną i długotrwałą ekspresję genów. Ponadto umożliwia wprowadzenie do komórki docelowej stosunkowo dużych sekwencji genów bez wpływu na miano wektorów (Dull i in., 1998). Zastosowana metoda transdukcji okazała się skutecznym narzędziem do przygotowania

szczepionek i umożliwiła uzyskanie wysokiej ekspresji genów oraz produkcji IL-12 i IL-18 przez modyfikowane komórki dendrytyczne. Jednak transdukcja komórek dendrytycznych wektorem niosącym geny obu cytokin jednocześnie okazała się znacznie mniej wydajna niż transdukcja DC za pomocą dwóch wektorów niosących geny IL-12 lub IL-18. Efekt ten mógł być spowodowany zbyt dużym obciążeniem plazmidu transferowego (12 107 bp), mimo że nie zaobserwowano wpływu wielkości plazmidów na miano wirusów produkowanych przez komórki pakujące i zastosowano tę samą liczbę cząstek wirusów na każdą komórkę docelową. Nadszcza znad komórek dendrytycznych transdukowanych wektorami lentiwirusowymi kodującymi geny IL-12 lub IL-18 po 24 godzinach hodowli zawierały ok. 100-400 pg/ml IL-12 oraz ok. 75-150 pg/ml IL-18. Ponadto produkcja cytokin była skorelowana ze zwiększoną ekspresją ich genów w komórkach. Należy jednak podkreślić, że stymulacja transdukowanych DC antygenami nowotworowymi uzyskanymi z lizatu komórek nowotworowych MC38, nie miała jednoznacznego wpływu na poziom ekspresji genów i produkcji IL-12 i IL-18. Natomiast wydłużenie hodowli modyfikowanych komórek dendrytycznych do 72 godzin (dane nieprezentowane) doprowadziła do wzrostu stężenia IL-12 do 20 ng/ml i utrzymującą się na poziomie ok. 100 pg/ml produkcję IL-18. Dowodzi to, że otrzymane komórki są zdolne do długotrwałej sekrecji cytokin. Podobne obserwacje poczynili Vujanovic i wsp., którzy w swoich badaniach transdukowali DC wektorami adenowirusowymi niosącymi geny IL-12 lub IL-18 i wykazali produkcję tych cytokin na poziomie około 10-20 ng/ml IL-12p70 i 200-300 pg/ml IL-18 po 48 godzinach inkubacji (Vujanovic i in., 2006).

Wiedząc, że uzyskane w wyniku modyfikacji genetycznej DC są zdolne do produkcji IL-12 i/lub IL-18, oceniono wpływ procesu transdukcji oraz stymulacji TAg na poziom zróżnicowania tych komórek. Wykazano istotny wzrost ekspresji cząsteczek MHC II i CD86 na powierzchni DC transdukowanych do produkcji samej IL-12 oraz obu cytokin jednocześnie. Z drugiej strony, transdukcja genem IL-18 nieznacznie wpłynęła na zmiany ekspresji cząsteczek MHC II i CD86 na powierzchni DC. Podobne obserwacje w swoich badaniach uzyskali Stober i wsp., którzy opisali zwiększenie ekspresji cząsteczek MHC II, ale nie CD86 na powierzchni DC pod wpływem egzogennej IL-12 oraz niewielki efekt działania IL-18 na zmiany poziomu ekspresji tych cząsteczek po 48 godzinach stymulacji cytokinami (Stober i in., 2001). Warto również podkreślić, że opracowane w ramach prezentowanych badań DC transdukowane do jednoczesnej produkcji IL-12 i IL-18, mimo wytwarzania mniejszej ilości tych cytokin niż komórki transdukowane do produkcji jednej z nich, charakteryzowały się nieco wyższym poziomem aktywacji. W badaniach prowadzonych w ramach niniejszej pracy zaobserwowano jedynie niewielkie różnice w ekspresji cząsteczki CD80 na powierzchni transdukowanych DC po stymulacji TAg. Należy podkreślić, że analizę fenotypową komórek szczepionkowych przeprowadzono już 24 godziny po transdukcji

i stymulacji TAg. Z danych innych autorów wynika, że dopiero po 48 lub 72 godzinach po stymulacji 25 ng/ml IL-12 i 100 ng/ml IL-18 w warunkach *in vitro*, komórki dendrytyczne wykazywały zwiększony poziom ekspresji cząsteczki CD80 lub CD86 (Eaton i in., 2003). Według innych doniesień maksymalna ekspresja cząsteczki CD86 przez APC jest generowana wkrótce po aktywacji komórki (6-8 godzin), natomiast ekspresja cząsteczki CD80 dopiero po 24 lub 48 godzinach po stymulacji (Rutkowski i in., 2002). Dlatego też analiza fenotypowa potencjalnych komórek szczeniowych, uzyskanych w ramach prezentowanej rozprawy przeprowadzona 24 godziny po transdukcji, pozwoliła wykazać zmiany jedynie w ekspresji cząsteczki CD86 na powierzchni DC. Niewielkie zmiany w ekspresji cząsteczki CD80, która pojawia się na powierzchni komórki nieco później, obserwowano jedynie po stymulacji transdukowanych DC antygenami nowotworowymi. Należy podkreślić, że w przypadku DC transdukowanych wektorami lentiwirusowymi za zmiany w ekspresji MHC II i cząsteczek kostymulujących odpowiadała sama obecność cząstek lentiwirusowych. Świadczy o tym nieco wyższy w odniesieniu do nietransdukowanych DC odsetek komórek MHC II⁺ lub CD86⁺ wśród DC transdukowanych wektorem kontrolnym. Dane innych autorów wskazują, że wektory lentiwirusowe mogą stymulować DC poprzez receptory TLR3 i TLR7, co powoduje dojrzewanie tych komórek, a w konsekwencji zwiększoną ekspresję MHC II i cząsteczek kostymulujących (Escors i Breckpot, 2010). Pomimo zwiększonej aktywacji DC/IL-12/IL-18 oraz DC/IL-12/IL-18/TAg, komórki te były zdolne do produkcji IL-12 i IL-18 w niewielkich ilościach w porównaniu do komórek transdukowanych dwoma wektorami. Ze względu na fakt, że głównym celem prowadzonych doświadczeń jest opracowanie szczepionek będących znaczącym źródłem IL-12 i IL-18, w dalszych badaniach wykorzystywano komórki DC/IL-12+IL-18 oraz DC/IL-12+IL-18/TAg.

W ramach wstępnej charakterystyki funkcjonalnej komórek szczeniowych oceniano zdolność transdukowanych DC stymulowanych TAg do aktywacji swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Wśród splenocytów hodowanych w obecności transdukowanych DC stymulowanych TAg określono zmiany odsetka limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ i komórek NK (NK1.1⁺) oraz odsetek komórek zdolnych do wydzielania ziaren cytolitycznych (CD107a⁺). Ponadto oceniano aktywność cytotoksyczną komórek śledzionowych z mieszanej hodowli wobec komórek nowotworowych MC38. Ocena pierwotnego pobudzenia komórek śledzionowych z mieszanej hodowli z transdukowanymi DC niestymulowanymi TAg wykazała niewielkie zmiany odsetka limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ i komórek NK zdolnych do wydzielania ziaren cytolitycznych (dane nieprezentowane w rozprawie (Mierzejewska i in., 2022)), jednak ta obserwacja pozwala stwierdzić, że odpowiedź odpornościowa generowana przez modyfikowane DC jest swoista wobec antygenów nowotworowych. Komórki śledzionowe z mieszanej hodowli z DC/IL-12/TAg lub DC/IL-12+IL-18/TAg cechowała największa aktywność cytotoksyczna wobec komórek

nowotworowych MC38. Należy jednak podkreślić, że największą zdolnością do wydzielania ziaren cytolitycznych charakteryzowały się limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺ oraz komórki NK hodowane w obecności DC/IL-12+IL-18/TAg. Ponadto splenocyty w mieszanej hodowli z tymi komórkami, podobnie jak po stymulacji DC/IL-12/TAg, wykazywały najwyższy potencjał do wytwarzania IFN- γ . Można znaleźć doniesienia o porównaniu wpływu IL-12 i IL-18 na efektorowe limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺. Okamoto i wsp. wykazali, że IL-18 skutecznie indukuje rozwój efektorowych komórek T CD8⁺ typu I o silnej aktywności cytotoksycznej. Tymczasem sama IL-12 hamuje różnicowanie limfocytów T CD8⁺ do CTL produkujących IFN- γ , ale promuje dojrzewanie komórek efektorowych T CD4⁺ wytwarzających ten interferon (Okamoto i in., 1999). Natomiast inni badacze wykazali, że IL-12 i IL-18 współdziałają w promowaniu wydzielania IFN-y przez komórki Th1 i sprzyjają proliferacji komórek efektorowych T CD4⁺. IL-12 indukuje ekspresję receptora IL-18 (IL-18R) na powierzchni limfocytów T, podczas gdy IL-18 nasila różnicowanie komórek Th1 inicjowane przez IL-12 (Vujanovic i in., 2006). Ponadto wiele badań wykazało synergistyczny wpływ IL-12 i IL-18 na komórki NK. Chaix i wsp. donieśli, że stymulacja NK za pomocą IL-18 jest konieczna do wytwarzania IFN- γ przez te komórki w odpowiedzi na IL-12 (Chaix i in., 2008). Podobne obserwacje odnotowali Martinović i wsp. dowodząc, że jednoczesna stymulacja tymi cytokinami indukowała większą aktywność cytotoksyczną komórek NK oraz ekspresję cząsteczki CD107a na ich powierzchni, a także produkcję IFN- γ niż niezależna stymulacja samą IL-12 lub IL-18 (Mirjačić Martinović i in., 2015). Inni badacze opisali synergistyczne działanie IL-12 i IL-18 na wytwarzanie *ex vivo* interleukiny 8 przez komórki NK pochodzące z krwi obwodowej (Poznanski i in., 2017). Zatem doniesienia innych autorów uzasadniają poczynione na wstępie niniejszej pracy badania *in vitro* i *ex vivo* wskazujące, że komórki dendrytyczne wytwarzające IL-12 i/lub IL-18 oraz stymulowane TAg mogą być potencjalnym składnikiem terapii przeciwnowotworowej.

Do tej pory przetestowano różne drogi podania szczepionek na bazie komórek dendrytycznych: podskórną, doguzową, dożylną, śródskórną, dowęzłową, a nawet dolimfatyczną (Seyfizadeh i in., 2016). Niemniej jednak jedyna zatwierdzona klinicznie szczepionka na bazie autologicznych komórek dendrytycznych stymulowanych *ex vivo* białkiem fuzyjnym składającym się z PAP (Prostatic Acid Phosphatase) i GM-SCF - Sipuleucel-T jest podawana dożylnie pacjentom chorym na bezobjawowego przerzutowego hormonoopornego raka prostaty (hRGK) (Cheever i Higano, 2011). Ze względu na fakt, że do uzyskania efektu terapeutycznego niezbędne jest wielokrotne podanie szczepionek na bazie DC, w doświadczeniach zaplanowanych w ramach niniejszej pracy, zdecydowano się na wykorzystanie drogi okołoguzowej. Najskuteczniejszy sposób dostarczania DC jest mimo wszystko nadal przedmiotem dyskusji i może być związany ze

sposobem ich modyfikacji, liczbą podawanych DC, ale przede wszystkim - typem nowotworu (de Winde i in., 2020).

Większość badań dotyczących szczepionek na bazie DC koncentruje się na zwiększeniu poziomu aktywacji DC, a ocena mobilności tych komórek jest często pomijana. Związanie skuteczności szczepionki z formą modyfikacji zastosowanych DC pozostaje w bezpośredniej relacji z ich zdolnością do migracji do wartowniczych węzłów chłonnych (sLN). Albowiem zdolność DC do migracji do węzłów chłonnych drenujących guzy lub tkanki nowotworowej jest jedną z najważniejszych cech warunkujących pobudzenie limfocytów T, a tym samym skuteczność działania szczepionek (Wculek i in., 2020).

Pierwszym etapem badań było określenie predyspozycji komórek szczepionkowych do migracji do wartowniczych węzłów chłonnych i naciekania tkanki nowotworowej mysiego raka jelita grubego MC38. Komórki dendrytyczne, wyznakowane barwnikiem fluorescencyjnym CFDA-SE, identyfikowano w tkance guzów i sLN w 3., 5. i 7. dniu po jednokrotnym podaniu szczepionek. Liczba komórek szczepionkowych była zależna głównie od rodzaju zastosowanej szczepionki i czasu obserwacji. DC transdukowane do produkcji obu cytokin jednocześnie infiltrowały tkankę nowotworową najszybciej i najskuteczniej w porównaniu z innymi komórkami szczepionkowymi. Świadczyła o tym najwyższa liczba zidentyfikowanych w guzach DC/IL-12+IL-18 już w 3. dniu po ich podaniu. Stymulacja antygenami nowotworowymi wpłynęła na zwiększenie efektywności naciekania tkanki nowotworowej DC/IL-12+IL-18/TAg, jednak DC/IL-12+IL-18 dłużej pozostawały w tkance guzów w podobnej liczbie. Inaczej kształtowała się zdolność komórek szczepionkowych do migracji do wartowniczych węzłów chłonnych. Największą mobilnością charakteryzowały się nietransdukowane DC, a stymulacja antygenami nowotworowymi (DC/TAg) znacząco wpłynęła na zwiększenie liczby tych komórek w sLN. Obserwacje te potwierdzają wyniki badań opisanych wcześniej przez Rossowską i wsp. oraz Inguli i wsp. (Ingulli i in., 1997; Rossowska i in., 2007). Co więcej, Inguli i wsp. wykazali, że DC stymulowane antygenami, w przeciwieństwie do niestymulowanych DC, po dotarciu do węzłów chłonnych skupiały wokół siebie wiele naiwnych limfocytów T, ale już po 48 godzinach zanikały.

Istnieje wiele publikacji opisujących wpływ poszczególnych składników mikrośrodowiska nowotworowego na napływ komórek odpornościowych do tkanki guzów. Należą do nich zarówno nadekspresja cytokin superesorowych (TGF- β , IL-10), jak i obniżenie wydzielania cytokin prozapalnych przez naciekające komórki. Znacznie mniej liczne są doniesienia omawiające zmiany wielkości populacji komórek migrujących do sLN drenujących nowotwór, a szczególnie wpływ dostarczanych egzogennych cytokin na to zjawisko (de Winde i in., 2020).

W przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy badaniach *in vivo*, dokonano nie tylko oceny mobilności komórek szczepionkowych, ale również porównania kinetyki powstawania

odpowiedzi przeciwnowotworowej w wyniku podania DC transdukowanych do produkcji IL-12 i/lub IL-18 niestymulowanych lub stymulowanych TAg. W tym celu od myszy nietraktowanych i otrzymujących szczepionki pobierano tkankę nowotworową, wartownicze węzły chłonne (sLN) oraz śledziony. Na podstawie obserwacji dokonanej podczas oceny zdolności migracyjnych komórek szczepionkowych założono, że DC/IL-12+IL-18/TAg charakteryzujące się zdolnością do najsilniejszego infiltrowania tkanki nowotworowej okażą się najskuteczniejsze w rekrutacji limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ i komórek NK oraz w ich aktywacji odpowiedzialnej za zmiany równowagi cytokinowej w mikrośrodkowisku tego nowotworu.

Niemniej jednak po jednokrotnym okołoguzowym podaniu nie tylko DC/IL-12+IL18/TAG stwierdzono zależność między wielkością nacieku leukocytów a rodzajem podanych DC. Zwiększony napływ limfocytów T CD4⁺ do guzów obserwowany był dopiero w 7 dniu, ale po podaniu każdej z przygotowanych szczepionek, przy czym stymulacja TAg nie miała wpływu na zmiany wielkości tej populacji. Stąd można stwierdzić, że już sama obecność dojrzałych DC w środowisku nowotworu wspomaga rekrutację tych komórek do guzów.

Bardzo istotnym efektem działania IL-12 po wprowadzeniu do mikrośrodkowiska nowotworowego za pośrednictwem DC, było zwiększenie odsetka limfocytów T CD8⁺, a dodatkowa stymulacja TAg wzmocniła ten efekt. Jak podkreślają inni badacze, pobudzenie tych limfocytów przez komórki prezentujące antygen do różnicowania w komórki cytotoksyczne uczestniczące w tworzeniu odpowiedzi odpornościowej jest gwarancją skuteczności immunoterapii przeciwnowotworowej (Cui i Kaech, 2010; Raskov i in., 2021).

W przeciwieństwie do zwiększenia nacieku komórek T CD8⁺, jednej z najważniejszych populacji leukocytów efektorowych, podanie DC/IL-12+IL-18, szczególnie stymulowanych za pomocą TAg (DC/IL-12+IL-18/TAg), spowodowało obniżenie odsetka makrofagów związanych z nowotworem (TAM). Piątego dnia po podaniu szczepionek zmiana ta była istotna statystycznie. Zmniejszenie nacieku TAM już po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych sugeruje wysoką skuteczność zastosowania terapeutycznych szczepionek wydzielających obie cytokiny w związku z licznymi doniesieniami, że wysoka liczebność TAM u pacjentów onkologicznych skutkuje złym rokowaniem. Jest to bezpośrednio związane z obecnością szczególnego rodzaju makrofagów - subpopulacją makrofagów M2, które wydzielają duże ilości IL-10 i TGF. Cytokiny te są odpowiedzialne za zmniejszoną aktywność komórek NK, efektorowych limfocytów Th i CTL, zwiększenie nacieku limfocytów Treg, a także hamowanie wydzielania IL-12 przez DC (Yang i Zhang, 2017).

Nawet jednokrotne podanie szczepionek na bazie DC transdukowanych do produkcji IL-12 i/lub IL-18, szczególnie gdy były również stymulowane za pomocą TAg, okazało się odpowiedzialne za obniżenie odsetka limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ oraz komórek NK

w wartowniczych węzłach chłonnych. Obserwowaną zmianę można wyjaśnić silnym pobudzeniem komórek limfoidalnych w wyniku bezpośredniego oddziaływania szczepionek migrujących do sLN. Może to być związane z wybiórczą zdolnością DC do migracji, dotyczącą przede wszystkim komórek szczepionkowych stymulowanych jedynie TAg, ale też może to być związane z aktywacją dziewiczych limfocytów T znajdujących się w węzłach chłonnych, ich proliferacją i zróżnicowaniem się w kierunku komórek efektorowych i komórek pamięci. Warto też podkreślić, że DC/IL-12+IL-18/TAg charakteryzowały się niewielką zdolnością migracyjną do sLN, ale największym stopniem pobudzenia, a więc już niewielka liczba tych komórek mogła być zdolna do skutecznej aktywacji dziewiczych limfocytów T CD4⁺. Potwierdza to zwiększony odsetek limfocytów T CD4⁺ efektorowych w sLN uzyskanych w 5. i 7. dniu po podaniu szczepionek, od myszy otrzymujących modyfikowane DC, a w szczególności DC/IL-12+IL-18/TAg. Natomiast najwyższy udział procentowy limfocytów T CD8⁺ efektorowych wykazano w sLN uzyskanych od myszy traktowanych DC/IL-18/TAg już w 3. i 5. dniu po podaniu szczepionek, co potwierdza silny wpływ IL-18 produkowanej przez komórki szczepionkowe na aktywację limfocytów T CD8⁺. Należy jednak pamiętać, że limfocyty T efektorowe tracą zdolność do zasiedlania tkanek limfatycznych, uwalniane są na obwód i migrują do tkanek docelowych. W związku z czym, mniejszy udział procentowy populacji limfocytów T w wartowniczych węzłach chłonnych, może świadczyć o ich migracji np. do tkanki nowotworowej, w wyniku ich większej podatności na chemotaktyczne działanie obu cytokin, opisywane już od dekad (Krummel i in., 2016). Obserwowane zmiany potwierdzają korzystny wpływ szczepionek na bazie modyfikowanych DC na aktywację miejscowej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Zwłaszcza, że zdolność komórek szczepionkowych do pierwotnej stymulacji komórek limfoidalnych została już wcześniej potwierdzono we wstępnych badaniach *ex vivo* przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy.

Oceniano także efekt jednokrotnego podania szczepionek na powstawanie ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Wykazano znaczący wpływ stymulacji antygenowej komórek szczepionkowych na zmiany w aktywacji limfocytów T w śledzionach. Wprawdzie wśród splenocytów pobranych od myszy traktowanych DC/IL-12+IL-18 wykazano zwiększenie odsetka limfocytów T CD4⁺, a także T CD8⁺, jednak nie obserwowano wśród nich wzrostu udziału procentowego komórek efektorowych. Natomiast zastosowanie DC/IL-12+IL-18/TAg warunkowało obecność komórek efektorowych wśród obu populacji limfocytów T. Kluczowe znaczenie stymulacji komórek szczepionkowych za pomocą antygenów nowotworowych odnotowano w przypadku restymulowanych splenocytów uzyskanych od myszy po jednokrotnym podaniu szczepionek. Przykładowo, podanie DC/IL-12 nie wyindukowało zmian w wielkości populacji limfocytów T i komórek NK w mieszanej hodowli, lecz pobudziło najwyższą aktywność cytotoksyczną splenocytów i ich zdolność do produkcji IFN- γ . Z drugiej strony, nie

obserwowano wpływu podania DC/IL-18 samej lub w połączeniu IL-12 na zmiany aktywności cytotoksycznej splenocytów i ich zdolności do produkcji cytokin. Zastosowanie komórek szczepionkowych stymulowanych TAg spowodowało zwiększony odsetek komórek zdolnych do produkcji ziaren cytolitycznych wśród populacji limfocytów T CD4⁺, CD8⁺, komórek NK oraz największy w grupie traktowanych DC/IL-18/TAg wzrost aktywności cytotoksycznej restymulowanych splenocytów, któremu towarzyszyła znacznie podwyższona produkcja IL-4. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że stymulacja antygenami nowotworowymi wspomaga działanie IL-18 produkowanej przez transdukowane DC do aktywacji ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Należy jednak podkreślić, że generowanie ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej, nawet po jednokrotnym podaniu komórek szczepionkowych, jest ściśle związane ze zmianami w wielkości populacji leukocytów naciekających tkankę nowotworową lub migrujących do wartowniczych węzłów chłonnych. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że już jednokrotne podanie opracowanych szczepionek na bazie DC transdukowanych do produkcji IL-12 i/lub IL-18 oraz stymulowanych TAg znacząco wpływa na korzystne względem zwalczania nowotworu zmiany w tkance guzów i aktywację miejscowej odpowiedzi odpornościowej. Dlatego też, wielokrotne podanie szczepionek zawierających modyfikowane DC, opracowanych w ramach niniejszej pracy powinno przynieść obiecujące rezultaty w immunoterapii myszy obciążonych nowotworem.

W kolejnym etapie badań, wykorzystano szczepionki na bazie modyfikowanych DC w immunoterapii mysiego raka jelita grubego MC38 opierającej się na trzykrotnym podaniu szczepionek w odstępach siedmiodniowych. Schemat ten zaproponowano na podstawie wieloletniego doświadczenia zespołu dr hab. E. Pajtasz-Piaseckiej w prowadzeniu immunoterapii z udziałem komórek dendrytycznych (Rossowska i in., 2007, 2009) i oceny powstawania odpowiedzi przeciwnowotworowej po jednokrotnym podaniu szczepionek.

W efekcie wielokrotnego podania szczepionek zaobserwowano znaczne zahamowanie tempa wzrostu guzów, jednak kinetyka rozwoju nowotworów u myszy poddanych immunoterapii była ściśle zależna od rodzaju zastosowanej szczepionki. Już dwukrotne podanie DC/IL-12+IL-18/TAg (29. dzień doświadczenia) wywołało najlepszy efekt terapeutyczny. Jednak po trzykrotnym podaniu opracowanych szczepionek efekt terapeutyczny obserwowany w grupach myszy traktowanych DC/IL-12/TAg lub DC/IL-18/TAg był korzystniejszy niż po podaniu DC zdolnych do produkcji obu cytokin jednocześnie. Można więc przypuszczać, że jednoczesne dostarczanie IL-12 i IL-18 nawet w niewielkich ilościach, ale na początkowym etapie leczenia wywołuje szybszy i skuteczniejszy efekt terapeutyczny. Wraz z rozwojem nowotworu i silniejszym wpływem czynników supresorowych na zmiany w tkance guzów, niezbędne okazało się dostarczenie większych ilości tych cytokin, aby możliwe było pogłębienie efektu terapeutycznego.

Choi i wsp. w swoich badaniach zaobserwowali, że trzykrotna (0, 2, 4 dzień doświadczenia), doguzowa, jednoczesna iniekcja wektorów adenowirusowych niosących geny IL-12 i IL-18, spowodowała najlepszy efekt terapeutyczny w leczeniu myszy obciążonych czerniakiem B16F10. Zdolność transdukowanych komórek nowotworowych do wydzielania cytokin zależała jednakże od środowiska transdukcji. W nadsączach z hodowli tkanki guzów pobranych od myszy obciążonych czerniakiem B16F10 w 3. dniu po ostatnim podaniu wirusów poziom stężenia IL-12 i IL-18 był ponad trzykrotnie wyższy niż po podaniu wektorów niosących geny samej IL-12 lub IL-18. Tymczasem w warunkach *in vitro* transdukcja komórek B16F10 wektorami niosącymi geny obu cytokin generowała ponad połowę niższą produkcję IL-12 i IL-18 niż komórki transdukowane do produkcji samej IL-12 lub IL-18, pomimo zastosowania tej samej liczby cząstek wirusa (Choi i in., 2011).

Jak to zostało podkreślone powyżej, jednokrotne podanie szczepionek na bazie DC/IL-12+IL-18/TA_g ujawnia potencjał tych komórek do aktywacji miejscowej odpowiedzi przeciwnowotworowej, ale nie ogólnoustrojowej. Po trzykrotnym podaniu tej szczepionki wykazano znaczne zwiększenie nacieku limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ i komórek NK do guzów, zmniejszenie wielkości populacji TAM i makrofagów oraz zwiększenie wielkości populacji efektorowych komórek T CD4⁺ i CD8⁺ w sLN, co świadczy o silnej aktywacji miejscowej odpowiedzi odpornościowej. Jednak wraz ze wzrostem nowotworu obserwowany efekt terapeutyczny ulegał obniżeniu. Może to być związane z niewielkim wpływem tej szczepionki, pomimo wielokrotnego jej podania, na aktywację ogólnoustrojowej odpowiedzi odpornościowej, której silne pobudzenie mogłoby wygenerować przedłużony efekt terapeutyczny. We wcześniejszych opracowaniach opublikowanych przez zespół E. Pajtasz-Piaseckiej niejednokrotnie podnoszono wpływ wielokrotnego podania na ostateczny efekt zastosowanej immunoterapii (Pajtasz-Piasecka i in., 2007; Rossowska i in., 2015, 2018, 2019; Szczygieł i in., 2021; Wojas-Turek i in., 2016), podkreślając jednocześnie, że końcowy efekt zależy będzie od odpowiedniego modelowania środowiska, zarówno przez podawanie zestawów cytokin, warunkowanie go przez zastosowanie cytostatyków lub wyciszenie genów cytokin supresorowych.

Schemat terapii skojarzonej oparty na podaniu cyklofosfamidu przed zastosowaniem immunoterapii zaproponowano na podstawie wyników wcześniejszych badań prowadzonych przez zespół E. Pajtasz-Piaseckiej oraz licznych publikacji wskazujących na immunomodulujące właściwości tego leku (Hughes i in., 2018; Rossowska i in., 2014). Udowodniono bowiem, że podanie cyklofosfamidu w niskich dawkach przyczynia się nie tylko do okresowego spowolnienia wzrostu nowotworu, ale także wzmocnienia odpowiedzi odpornościowej poprzez selektywną eliminację limfocytów T regulatorowych, generowanie limfocytów T pamięci oraz zwiększenie

aktywności limfocytów T efektorowych (Abu Eid i in., 2016; Rossowska i in., 2014; Veltman i in., 2010).

W doświadczeniu chemioimmunoterapeutycznym zaprezentowanym w ramach niniejszej rozprawy, okresowe spowolnienie wzrostu guzów wywołane podaniem CY w dawce 150 mg/kg mc. silnie wpłynęło na pogłębienie efektu terapeutycznego zastosowanych szczepionek, a w szczególności DC/IL-12+IL-18/TAg. Obserwowane w 7 dniu po trzykrotnym podaniu szczepionek zahamowanie wzrostu guzów wynosiło ponad 84% w odniesieniu do grupy myszy traktowanych samym CY (93% vs. nt) i utrzymywało się przez kolejne 7 dni na tym samym poziomie. Natomiast nie odnotowano wpływu CY na obniżenie odsetka limfocytów Treg wśród komórek T CD4⁺ w tkance nowotworowej. Jest to wypadkową dwóch czynników. Z jednej strony, dawki immunizującej działanie komórek odpornościowych, której nadir występował w przedziale od 3-5 dni, a opóźnienie wzrostu guzów w porównaniu do guzów nietraktowanych wynosiło średnio 10 dni (Rossowska i in., 2014, 2015; Wojas-Turek i in., 2016). Z drugiej strony, czasu który minął od podania cytostatyku, bowiem guzy zostały pobrane od myszy w 36. dniu doświadczenia, a więc po 24 dniach od podania CY. Nasze własne obserwacje pokrywają się z danymi innych autorów. Lutsiak i wsp. wykazali, że podanie cyklofosfamidu prowadzi do apoptozy limfocytów T regulatorowych po 48 godzinach od jego podania, a najmniejszą liczbę tych komórek obserwowano po 4 dniach. Jednak efekt ten nie był długotrwały, bo już po 10 dniach od podania CY zidentyfikowano w pełni funkcjonalną populację tych komórek (Lutsiak i in., 2005). Tak więc, prawdopodobnie w 36. dniu doświadczenia opisanego w niniejszej pracy, populacja limfocytów T regulatorowych uległa już odnowieniu. Z drugiej strony, w tym dniu doświadczenia, po podaniu cytostatyku odnotowano znaczący wzrost odsetka limfocytów T CD4⁺ oraz CD8⁺ efektorowych naciekających tkankę nowotworową, zwiększenie całej populacji komórek T CD4⁺ i T CD8⁺ w sLN oraz niewielki wzrost udziału procentowego limfocytów T CD8⁺ pamięci w śledzionie. Podobny efekt podania niskich dawek CY (50 mg/kg mc.) odnotowano w modelu mysiego raka prostaty TRAMP-C2, w którym badacze wykazali znaczący wzrost odsetka komórek efektorowych T CD4⁺ i T CD8⁺ w śledzionie (Mackiewicz i in., 2015). W prezentowanym w niniejszej pracy doświadczeniu, nie odnotowano jednak wpływu CY na zmiany wielkości populacji i stopnia pobudzenia DC i makrofagów zidentyfikowanych w guzach MC38, sLN i w śledzionie.

Terapia skojarzona z udziałem cyklofosfamidu i szczepionek na bazie modyfikowanych DC pogłębiła korzystne zmiany mikrośrodowiska nowotworu obserwowane po zastosowaniu samej immunoterapii. Wykazano zwiększony napływ limfocytów T CD4⁺, CD8⁺, a wśród nich komórek efektorowych oraz limfocytów T CD4⁺ pamięci i komórek NKT. Ponadto odnotowano istotne zmniejszenie wielkości populacji komórek supresorowych tj. limfocytów Treg, efektorowych limfocytów Treg oraz makrofagów obecnych w tkance nowotworowej. Warto także podkreślić, że

komórki TAM w guzach pobranych od myszy otrzymujących terapię skojarzoną, a w szczególności CY i DC/IL-18/TAg charakteryzowały się zwiększoną ekspresją cząsteczek MHC II na ich powierzchni, co może świadczyć o korzystnej względem zwalczania nowotworu polaryzacji tych komórek w kierunku populacji M1 (Movahedi i in., 2010; B. Wang i in., 2011). Jak wynika z wcześniejszych badaniach zespołu dowiedziono, że jednokrotne podanie CY w dawce 150 mg/kg mc, powoduje jedynie okresowe spowolnienie wzrostu guzów, ale w połączeniu ze szczepionkami na bazie DC/TAg i DC/IL-12/TAg wpływa na zmniejszenie liczby komórek Treg w tkance nowotworowej (Rossowska i in., 2014). Ten sam efekt odnotowano po zastosowaniu terapii z udziałem CY i DC/IL-12+IL-18/TAg.

Należy szczególnie podkreślić, że uzupełnienie immunoterapii poprzez podanie CY istotnie wpłynęło na aktywację ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Podanie CY i DC/IL-12+IL-18/TAg, spowodowało nieznaczny w odniesieniu do grupy nieleczonej wzrost odsetka limfocytów T CD4⁺ i T CD8⁺, a wśród nich komórek efektorowych w śledzionach. Natomiast wtórna stymulacja komórek śledzionowych uzyskanych od myszy traktowanych CY i DC/IL-12+IL-18/TAg spowodowała odnotowanie nieco wyższego niż w grupie nietraktowanej, odsetka limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ oraz komórek NK zdolnych do wydzielania ziaren cytolytycznych. Zwiększoną aktywność cytotoksyczną restymulowanych splenocytów wykazano we wszystkich grupach myszy otrzymujących terapię skojarzoną, jednak najwyższą zdolnością do produkcji IFN- γ charakteryzowały się komórki śledzionowe pobrane od myszy traktowanych CY i DC/IL-12+IL-18/TAg, co może sugerować indukowanie ogólnoustrojowej odpowiedzi komórkowej typu Th1. Znaczący wpływ terapii skojarzonej na skuteczne pobudzenie ogólnoustrojowej odpowiedzi odpornościowej może mieć kluczowe znaczenie w generowaniu pamięci immunologicznej, a tym samym przedłużeniu efektu terapeutycznego opracowanych szczepionek na bazie modyfikowanych DC.

W celu zwiększenia skuteczności immunoterapii zaproponowanej w pracy, warto rozważyć zastosowanie szczepionek opartych na DC zawierających komórki DC/IL-12+IL-18/TAg, które charakteryzują się zwiększoną zdolnością do naciekania tkanki nowotworowej oraz DC/TAg – najskuteczniej migrujących do wartowniczych węzłów chłonnych. Dzięki tej strategii możliwe byłoby dostarczanie komórek szczepionkowych zarówno do tkanki nowotworowej, jak i do sLN, a tym samym dostarczanie modyfikowanych DC do mikrośrodowiska, gdzie wspierałyby aktywność komórek efektorowych poprzez produkcję cytokin, oraz do sLN, w których aktywowałyby dziewicze limfocyty T poprzez prezentację antygenów nowotworowych. Co więcej, na podstawie oceny zdolności migracyjnych komórek szczepionkowych można przypuszczać, że niewielka modyfikacja schematu podawania szczepionek polegająca na skróceniu czasu pomiędzy okołoguzowymi iniekcjami DC do 5 dni oraz zwiększenie liczby podań do 4, może pogłębić efekt

terapeutyczny szczepionki na bazie DC/IL-12+IL-18/TAg. Ze względu na to, że komórki te produkują cytokiny na niewielkim poziomie, efekty uboczne wywołane zbyt wysokim stężeniem IL-12 lub IL-18 nie powinny zostać zaobserwowane w organizmie. Należy jednak zaznaczyć, że ze względu na różnice w zdolności DC/IL-12/TAg i DC/IL-18/TAg do migracji, zastosowanie szczepionki składającej się obu typów komórek może nie przynieść oczekiwanego efektu jak w przypadku podania DC/IL-12+IL-18/TAg. Kluczową zaletą tej szczepionki jest jednoczesne dostarczenie obu cytokin do tkanki nowotworowej, co warunkuje ich wspólne działanie w mikrośrodowisku nowotworu. W celu przedłużenia efektu terapeutycznego niezbędne jest także połączenie immunoterapii z zastosowaniem DC/IL-12+IL-18/TAg z terapią konwencjonalną np. radioterapią, chemioterapią lub leczeniem chirurgicznym. Warto podkreślić, że istotnym aspektem w terapii skojarzonej opartej na chemioterapii i szczepionkach na bazie DC jest rodzaj oraz dawka zastosowanego cytostatyku. Odpowiednio dobrana chemioimmunoterapia stanowi bowiem główny fundament do ukierunkowania rozwoju odpowiedzi przeciwnowotworowej inicjowanej przez podanie szczepionki na bazie DC/IL-12+IL-18/TAg.

6. Wnioski

1. Komórki dendrytyczne transdukiowane za pomocą wektorów lentiwirusowych niosących geny IL-12 lub IL-18, stymulowane antygenami nowotworowymi są zdolne do zwiększonej produkcji IL-12 i/lub IL-18 oraz aktywacji swoistej odpowiedzi komórkowej w warunkach *ex vivo*.
2. Komórki szczepionkowe wydzielające cytokiny, a szczególnie DC/IL-12+IL-18/TA_g, charakteryzują się zwiększoną zdolnością do naciekania tkanki nowotworowej, a ich jednokrotne, okołoguzowe podanie wykazuje potencjał do aktywacji miejscowej odpowiedzi przeciwnowotworowej.
3. Wielokrotne podanie DC/IL-12+IL-18/TA_g generuje krótkotrwały efekt terapeutyczny związany ze zmianami w mikrośrodowisku nowotworu oraz aktywację ogólnoustrojowej odpowiedzi odpornościowej.
4. Terapia skojarzona z udziałem cyklofosfamidu i DC/IL-12+IL-18/TA_g prowadzi do wydłużenia czasu zahamowania wzrostu guzów MC38, poprzez zwiększenie wielkości populacji efektorowych limfocytów T i komórek NKT, zmniejszenie udziału procentowego komórek Treg i TAM w tkance guzów, jak i indukowanie ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej.

Spis rycin i tabel

Ryciny

Ryc. 1. Rola komórek układu odpornościowego w procesie immunoedycji.	22
Ryc. 2. Wpływ IL-12 i IL-18 na proliferację i aktywność komórek układu odpornościowego.....	30
Ryc. 3. Wpływ cyklofosfamidu na aktywność limfocytów T.	35
Ryc. 4. Mapy plazmidów transferowych.....	41
Ryc. 5. Schemat przygotowania szczepionek na bazie komórek dendrytycznych pochodzenia szpikowego transdukowanych za pomocą wektorów lentiwirusowych trzeciej generacji kodujących geny IL-12 i/lub IL-18 oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi.....	48
Ryc. 6. Charakterystyka fenotypowa i funkcjonalna szczepionek komórek dendrytycznych pochodzenia szpikowego - schemat doświadczeń <i>in vitro</i>	50
Ryc. 7. Charakterystyka funkcjonalna szczepionek na bazie komórek dendrytycznych – schemat doświadczeń <i>in vivo</i>	58
Ryc. 8. Schemat doświadczenia immunoterapeutycznego.	63
Ryc. 9. Schemat doświadczenia chemioimmunoterapeutycznego.	67
Ryc. 10. Wydajność transdukcji komórek dendrytycznych za pomocą wektorów lentiwirusowych kodujących geny IL-12 i/lub IL-18.	71
Ryc. 11. Ocena poziomu zróżnicowania komórek dendrytycznych transdukowanych do produkcji IL-12 i/lub IL-18.	73
Ryc. 12. Zdolność komórek dendrytycznych transdukowanych genami IL-12 i/lub IL-18 oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi do pierwotnego pobudzenia komórek śledzionowych.	74
Ryc. 13. Wpływ komórek szczepionkowych na aktywację efektorowych komórek śledzionowych.	76
Ryc. 14. Ocena infiltracji tkanki nowotworowej przez komórki dendrytyczne transdukowane genami cytokin i/lub stymulowane antygenami nowotworowymi.....	79
Ryc. 15. Ocena zdolności migracyjnych komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i/lub stymulowanych antygenami nowotworowymi do wartowniczych węzłów chłonnych.	82
Ryc. 16. Schemat analizy populacji komórek limfoidalnych i mieloidalnych naciekających tkankę nowotworową w wyniku jednokrotnego podania szczepionek.	84
Ryc. 17. Odsetek leukocytów naciekających tkankę nowotworową w wyniku jednokrotnego podania komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin.....	85
Ryc. 18. Odsetek limfocytów T CD4 ⁺ naciekających tkankę nowotworową w wyniku jednokrotnego podania komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin.....	86

Ryc. 19. Odsetek limfocytów T CD8 ⁺ naciekających tkankę nowotworową w wyniku jednokrotnego podania komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin.....	88
Ryc. 20. Odsetek komórek NK i NKT naciekających tkankę nowotworową w wyniku jednokrotnego podania komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin.....	89
Ryc. 21. Odsetek i stopień aktywacji komórek dendrytycznych naciekających tkankę nowotworową w wyniku jednokrotnego podania komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin. .	90
Ryc. 22. Odsetek i stopień pobudzenia makrofagów związanych z nowotworem (TAM) w guzach MC38 po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin. .	91
Ryc. 23. Schemat analizy populacji komórek mieloidalnych i limfoidalnych w wartowniczych węzłach chłonnych pobranych od myszy po jednokrotnym podaniu szczepionek.	93
Ryc. 24. Odsetek limfocytów T CD4 ⁺ w wartowniczych węzłach chłonnych po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin.....	94
Ryc. 25. Odsetek limfocytów T CD8 ⁺ w wartowniczych węzłach chłonnych po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin.....	96
Ryc. 26. Odsetek komórek NK i NKT w wartowniczych węzłach chłonnych po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin.....	97
Ryc. 27. Ocena komórek dendrytycznych w wartowniczych węzłach chłonnych po jednokrotnym podaniu komórek szczepionkowych transdukowanych genami cytokin.....	98
Ryc. 28. Schemat analizy populacji komórek mieloidalnych i limfoidalnych wśród splenocytów pobranych od myszy po jednokrotnym podaniu szczepionek.	101
Ryc. 29. Odsetek limfocytów T CD4 ⁺ i limfocytów T CD8 ⁺ wśród splenocytów uzyskanych od myszy po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin.	102
Ryc. 30. Odsetek komórek NK i NKT wśród splenocytów uzyskanych od myszy po jednokrotnym, okołoguzowym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin.....	103
Ryc. 31. Odsetek komórek dendrytycznych wśród splenocytów po jednokrotnym, okołoguzowym podaniu szczepionek.....	103
Ryc. 32. Odsetek limfocytów T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ oraz komórek NK wśród restymulowanych splenocytów otrzymanych od myszy po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin.	105
Ryc. 33. Wpływ jednokrotnego podania komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin na zmiany aktywności restymulowanych splenocytów.....	106
Ryc. 34. Odsetek leukocytów naciekających tkankę nowotworową w wyniku jednokrotnego podania komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi.....	108
Ryc. 35. Odsetek limfocytów T CD4 ⁺ naciekających tkankę nowotworową w wyniku jednokrotnego podania komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi.....	109

Ryc. 36. Odsetek limfocytów T CD8 ⁺ naciekających tkankę nowotworową w wyniku jednokrotnego podania komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi.....	110
Ryc. 37. Odsetek komórek NK i NKT naciekających tkankę nowotworową w wyniku jednokrotnego podania komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi.....	112
Ryc. 38. Odsetek i stopień aktywacji komórek dendrytycznych naciekających tkankę nowotworową w wyniku jednokrotnego podania komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi.....	113
Ryc. 39. Odsetek i stopień pobudzenia makrofagów związanych z nowotworem w guzach MC38 po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi.....	114
Ryc. 40. Odsetek limfocytów T CD4 ⁺ w wartowniczych węzłach chłonnych po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi.....	116
Ryc. 41. Odsetek limfocytów T CD8 ⁺ w wartowniczych węzłach chłonnych po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi.	117
Ryc. 42. Odsetek komórek NK i NKT w wartowniczych węzłach chłonnych po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi.....	119
Ryc. 43. Odsetek komórek dendrytycznych w wartowniczych węzłach chłonnych po jednokrotnym podaniu komórek szczepionkowych transdukowanych genami cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi.	120
Ryc. 44. Odsetek limfocytów T CD4 ⁺ i limfocytów T CD8 ⁺ wśród splenocytów pozyskanych od myszy po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi.....	122
Ryc. 45. Odsetek komórek NK i NKT wśród splenocytów uzyskanych od myszy po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi.....	123
Ryc. 46. Odsetek komórek dendrytycznych oraz stopień ich pobudzenia wśród splenocytów pobranych od myszy po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi.....	123
Ryc. 47. Odsetek limfocytów T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ oraz komórek NK wśród restymulowanych splenocytów otrzymanych od myszy po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi.....	125
Ryc. 48. Wpływ jednokrotnego podania komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi na zmiany aktywności restymulowanych splenocytów.....	126

Ryc. 49. Wzrost guzów MC38 u myszy poddanych immunoterapii z zastosowaniem komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi.....	133
Ryc. 50. Schemat analizy populacji komórek limfoidalnych naciekających guzy MC38 uzyskane od myszy poddanych immunoterapii.....	135
Ryc. 51. Schemat analizy populacji komórek mieloidalnych naciekających guzy MC38 uzyskane od myszy poddanych immunoterapii.....	136
Ryc. 52. Ocena wielkości nacieku leukocytów w guzach MC38 uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.	137
Ryc. 53. Odsetek limfocytów T CD4 ⁺ naciekających guzy MC38 uzyskane od myszy poddanych immunoterapii.	139
Ryc. 54. Odsetek limfocytów T regulatorowych (Treg) naciekających guzy MC38 uzyskane od myszy poddanych immunoterapii.....	140
Ryc. 55. Odsetek limfocytów T CD8 ⁺ naciekających guzy MC38 uzyskane od myszy poddanych immunoterapii.	141
Ryc. 56. Odsetek komórek NK i NKT naciekających guzy MC38 uzyskane od myszy poddanych immunoterapii.	142
Ryc. 57. Odsetek i stopień pobudzenia komórek dendrytycznych naciekających guzy MC38 uzyskane od myszy poddanych immunoterapii.....	143
Ryc. 58. Odsetek i stopień pobudzenia makrofagów związanych z nowotworem (TAM) naciekających guzy MC38 uzyskane od myszy poddanych immunoterapii.	144
Ryc. 59. Odsetek i stopień pobudzenia makrofagów naciekających guzy MC38 uzyskane od myszy poddanych immunoterapii.	145
Ryc. 60. Schemat analizy populacji komórek mieloidalnych i limfoidalnych w wartowniczych węzłach chłonnych pobranych od myszy poddanych immunoterapii.	146
Ryc. 61. Odsetek limfocytów T CD4 ⁺ w wartowniczych węzłach chłonnych uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.	147
Ryc. 62. Odsetek limfocytów T CD8 ⁺ w wartowniczych węzłach chłonnych uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.	149
Ryc. 63. Odsetek komórek NK i NKT w wartowniczych węzłach chłonnych uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.	150
Ryc. 64. Ocena komórek dendrytycznych w wartowniczych węzłach chłonnych uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.....	151
Ryc. 65. Ocena makrofagów w wartowniczych węzłach chłonnych uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.	152
Ryc. 66. Schemat analizy populacji komórek mieloidalnych i limfoidalnych wśród splenocytów pobranych od myszy po jednokrotnym podaniu szczepionek.	154

Ryc. 67. Odsetek i stopień aktywacji limfocytów T CD4 ⁺ wśród splenocytów uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.....	155
Ryc. 68. Odsetek i stopień aktywacji limfocytów T regulatorowych wśród splenocytów uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.....	156
Ryc. 69. Odsetek i stopień aktywacji limfocytów T CD8 ⁺ wśród splenocytów uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.....	157
Ryc. 70. Odsetek komórek NK i NKT wśród splenocytów uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.....	158
Ryc. 71. Odsetek i stopień pobudzenia komórek dendrytycznych wśród splenocytów uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.....	160
Ryc. 72. Odsetek i stopień pobudzenia makrofagów wśród splenocytów uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.....	161
Ryc. 73. Odsetek limfocytów T CD4 ⁺ wśród restymulowanych splenocytów uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.....	162
Ryc. 74. Odsetek limfocytów T CD8 ⁺ wśród restymulowanych splenocytów uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.....	163
Ryc. 75. Odsetek komórek NK wśród restymulowanych splenocytów uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.....	164
Ryc. 76. Aktywność cytotoksyczna restymulowanych splenocytów pozyskanych od myszy poddanych immunoterapii.....	165
Ryc. 77. Stężenie cytokin w nadsączach z nad restymulowanych splenocytów uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.....	166
Ryc. 78. Wzrost guzów MC38 u myszy poddanych chemioimmunoterapii z zastosowaniem cyklofosfamidu i komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin oraz stymulowanych antygenami nowotworowymi.....	171
Ryc. 79. Ocena nacieku leukocytów w guzach MC38 uzyskanych od myszy poddanych chemioimmunoterapii.....	173
Ryc. 80. Odsetek i poziom aktywacji limfocytów T CD4 ⁺ i T CD8 ⁺ naciekających guzy MC38 uzyskane od myszy poddanych chemioimmunoterapii.....	174
Ryc. 81. Odsetek i poziom aktywacji limfocytów T regulatorowych (Treg) naciekających guzy MC38 uzyskane od myszy poddanych chemioimmunoterapii.....	175
Ryc. 82. Odsetek komórek NK i NKT naciekających guzy MC38 uzyskane od myszy poddanych chemioimmunoterapii.....	176
Ryc. 83. Odsetek i stopień pobudzenia komórek dendrytycznych, makrofagów związanych z nowotworem oraz makrofagów naciekających guzy MC38 uzyskane od myszy poddanych chemioimmunoterapii.....	178
Ryc. 84. Odsetek i stopień aktywacji limfocytów T w wartowniczych węzłach chłonnych uzyskanych od myszy poddanych chemioimmunoterapii.....	180

Ryc. 85. Odsetek komórek NK i NKT w wartowniczych węzłach chłonnych uzyskanych od myszy poddanych chemioimmunoterapii.	181
Ryc. 86. Odsetek i stopień pobudzenia komórek dendrytycznych i makrofagów w wartowniczych węzłach chłonnych uzyskanych od myszy poddanych chemioimmunoterapii.	182
Ryc. 87. Odsetek i stopień aktywacji limfocytów T wśród splenocytów uzyskanych od myszy poddanych chemioimmunoterapii.	184
Ryc. 88. Odsetek i stopień aktywacji limfocytów T regulatorowych wśród splenocytów pozyskanych od myszy poddanych chemioimmunoterapii.	185
Ryc. 89. Odsetek komórek NK i NKT wśród splenocytów uzyskanych od myszy poddanych chemioimmunoterapii.	185
Ryc. 90. Odsetek i stopień pobudzenia komórek dendrytycznych i makrofagów wśród splenocytów uzyskanych od myszy poddanych chemioimmunoterapii.	186
Ryc. 91. Odsetek komórek limfoidalnych wśród restymulowanych splenocytów uzyskanych od myszy poddanych chemioimmunoterapii.	188
Ryc. 92. Aktywność restymulowanych splenocytów uzyskanych od myszy poddanych chemioimmunoterapii.	189

Tabele

Tabela 1. Linie komórkowe.	39
Tabela 2. Plazmidy pomocnicze.	40
Tabela 3. Plazmidy transferowe.	40
Tabela 4. Sondy do oznaczeń ekspresji genów metodą PCR w czasie rzeczywistym.	43
Tabela 5. Zestawy testów ELISA stosowane do oznaczania stężenia cytokin w nadsączach hodowlanych.	44
Tabela 6. Przeciwciała monoklonalne stosowane w oznaczeniach cytometrycznych.	44
Tabela 7. Opracowane szczepionki przeciwnowotworowe na bazie komórek dendrytycznych pochodzenia szpikowego.	50
Tabela 8. Przeciwciała monoklonalne skoniugowane z fluorochromami wykorzystane do oznaczeń cytometrycznych guzów, sLN i splenocytów pobranych od myszy 3, 5 i/lub 7 dni po jednokrotnym podaniu szczepionek.	60
Tabela 9. Charakterystyka populacji komórek identyfikowanych w guzach i sLN pobranych od myszy 3, 5, i 7 dni po jednokrotnym podaniu szczepionek.	61
Tabela 10. Charakterystyka populacji komórek identyfikowanych w śledzionach pobranych od myszy 7 dni po jednokrotnym podaniu szczepionek.	61

Tabela 11. Przeciwciała monoklonalne skoniugowane z fluorochromami wykorzystane do oznaczeń cytometrycznych guzów, sLN i splenocytów uzyskanych od myszy poddanych terapii.	65
Tabela 12. Charakterystyka populacji komórek identyfikowanych w guzach i śledzionach uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.....	65
Tabela 13. Charakterystyka populacji komórek identyfikowanych w sLN uzyskanych od myszy poddanych immunoterapii.....	66
Tabela 14. Interpretacja współczynnika korelacji Spearmana.	68
Tabela 15. Odsetek komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i/lub stymulowanych antygenami nowotworowymi w tkance nowotworowej pobranej od myszy po jednokrotnym, okołoguzowym podaniu szczepionek.	81
Tabela 16. Odsetek komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i/lub stymulowanych antygenami nowotworowymi w wartowniczych węzłach chłonnych pobranych od myszy po jednokrotnym, okołoguzowym podaniu szczepionek.	83
Tabela 17. Średni odsetek komórek w guzach MC38 pobranych od myszy 7 dni po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin.....	128
Tabela 18. Średni odsetek komórek w guzach MC38 pobranych od myszy 7 dni po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi (modyfikowanych DC).....	128
Tabela 19. Średni odsetek komórek w wartowniczych węzłach chłonnych pobranych od myszy 7 dni po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin.	129
Tabela 20. Średni odsetek komórek w wartowniczych węzłach chłonnych pobranych od myszy 7 dni po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi (modyfikowanych DC).....	129
Tabela 21. Zmiany fenotypowe i funkcjonalne splenocytów pobranych od myszy 7 dni po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin.	130
Tabela 22. Zmiany fenotypowe i funkcjonalne splenocytów pobranych od myszy 7 dni po jednokrotnym podaniu komórek dendrytycznych transdukowanych genami cytokin i stymulowanych antygenami nowotworowymi (modyfikowanych DC).....	130

Piśmiennictwo

- Abel, A. M.,** Yang, C., Thakar, M. S., Malarkannan, S. (2018). Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Frontiers in Immunology*, 9, 1869.
- Abu Eid, R.,** Razavi, G. S. E., Mkrtychyan, M., Janik, J., Khleif, S. N. (2016). Old-School Chemotherapy in Immunotherapeutic Combination in Cancer, A Low-cost Drug Repurposed. *Cancer Immunology Research*, 4(5), 377–382.
- Ahlmann, M.,** Hempel, G. (2016). The effect of cyclophosphamide on the immune system: Implications for clinical cancer therapy. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 78(4), 661–671.
- Allan, R. S.,** Waithman, J., Bedoui, S., Jones, C. M., Villadangos, J. A., Zhan, Y., Lew, A. M., Shortman, K., Heath, W. R., Carbone, F. R. (2006). Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming. *Immunity*, 25(1), 153–162.
- Alvarez, D.,** Vollmann, E. H., von Andrian, U. H. (2008). Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. *Immunity*, 29(3), 325–342.
- Anderson, D. A.,** Dutertre, C.-A., Ginhoux, F., Murphy, K. M. (2021). Genetic models of human and mouse dendritic cell development and function. *Nature Reviews. Immunology*, 21(2), 101–115.
- Anguille, S.,** Smits, E. L., Bryant, C., Van Acker, H. H., Goossens, H., Lion, E., Fromm, P. D., Hart, D. N., Van Tendeloo, V. F., Berneman, Z. N. (2015). Dendritic Cells as Pharmacological Tools for Cancer Immunotherapy. *Pharmacological Reviews*, 67(4), 731–753.
- Arend, W. P.,** Palmer, G., Gabay, C. (2008). IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunological Reviews*, 223(1), 20–38.
- Atkins, M. B.,** Robertson, M. J., Gordon, M., Lotze, M. T., DeCoste, M., DuBois, J. S., Ritz, J., Sandler, A. B., Edington, H. D., Garzone, P. D., Mier, J. W., Canning, C. M., Battiatto, L., Tahara, H., Sherman, M. L. (1997). Phase I evaluation of intravenous recombinant human interleukin 12 in patients with advanced malignancies. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 3(3), 409–417.
- Banchereau, J.,** Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, 18, 767–811.
- Barry, M.,** Bleackley, R. C. (2002). Cytotoxic T lymphocytes: All roads lead to death. *Nature Reviews. Immunology*, 2(6), 401–409.
- Beer, T. M.,** Schellhammer, P. F., Corman, J. M., Glodé, L. M., Hall, S. J., Whitmore, J. B., Frohlich, M. W., Penson, D. F. (2013). Quality of life after sipuleucel-T therapy: Results from a randomized, double-blind study in patients with androgen-dependent prostate cancer. *Urology*, 82(2), 410–415.
- Böttcher, J. P.,** Reis e Sousa, C. (2018). The Role of Type 1 Conventional Dendritic Cells in Cancer Immunity. *Trends in Cancer*, 4(11), 784–792.
- Brimnes, M. K.,** Vangsted, A. J., Knudsen, L. M., Gimsing, P., Gang, A. O., Johnsen, H. E., Svane, I. M. (2010). Increased level of both CD4+FOXP3+ regulatory T cells and CD14+HLA-DR^{low} myeloid-derived suppressor cells and decreased level of dendritic cells in patients with multiple myeloma. *Scandinavian Journal of Immunology*, 72(6), 540–547.
- Bronte, V.,** Brandau, S., Chen, S.-H., Colombo, M. P., Frey, A. B., Greten, T. F., Mandruzzato, S., Murray, P. J., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S., Rodriguez, P. C., Sica, A., Umansky, V., Vonderheide, R. H., Gabrilovich, D. I. (2016). Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nature Communications*, 7, 12150.
- Busse, D.,** de la Rosa, M., Hobiger, K., Thurley, K., Flossdorf, M., Scheffold, A., Höfer, T. (2010). Competing feedback loops shape IL-2 signaling between helper and regulatory T lymphocytes in cellular microenvironments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(7), 3058–3063.

- Cao, X.**, Cai, S. F., Fehniger, T. A., Song, J., Collins, L. I., Piwnica-Worms, D. R., Ley, T. J. (2007). Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity*, 27(4), 635–646.
- Carroll, H. P.**, Paunovic, V., Gadina, M. (2008). Signalling, inflammation and arthritis: Crossed signals: the role of interleukin-15 and -18 in autoimmunity. *Rheumatology*, 47(9), 1269–1277.
- Caux, C.**, Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Van Kooten, C., Durand, I., Banchereau, J. (1994). Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *The Journal of Experimental Medicine*, 180(4), 1263–1272.
- Cavazzana-Calvo, M.**, Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J. L., Bousoo, P., Deist, F. L., Fischer, A. (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science (New York, N.Y.)*, 288(5466), 669–672.
- Cazzetta, V.**, Franzese, S., Carezza, C., Della Bella, S., Mikulak, J., Mavilio, D. (2021). Natural Killer–Dendritic Cell Interactions in Liver Cancer: Implications for Immunotherapy. *Cancers*, 13(9), 2184.
- Chaix, J.**, Tessmer, M. S., Hoebe, K., Fuséri, N., Ryffel, B., Dalod, M., Alexopoulou, L., Beutler, B., Brossay, L., Vivier, E., Walzer, T. (2008). Cutting edge: Priming of NK cells by IL-18. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 181(3), 1627–1631.
- Chávez-Galán, L.**, Arenas-Del Angel, M. C., Zenteno, E., Chávez, R., Lascrain, R. (2009). Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cellular & Molecular Immunology*, 6(1), 15–25.
- Cheever, M. A.**, Higano, C. S. (2011). PROVENGE (Sipuleucel-T) in prostate cancer: The first FDA-approved therapeutic cancer vaccine. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 17(11), 3520–3526.
- Cheng, E. M.**, Tsarovsky, N. W., Sondel, P. M., Rakhmievich, A. L. (2022). Interleukin-12 as an in situ cancer vaccine component: A review. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*.
- Choi, I.-K.**, Lee, J.-S., Zhang, S.-N., Park, J., Sonn, C. H., Lee, K.-M., Yun, C.-O. (2011). Oncolytic adenovirus co-expressing IL-12 and IL-18 improves tumor-specific immunity via differentiation of T cells expressing IL-12R β 2 or IL-18R α . *Gene Therapy*, 18(9), 898–909.
- Constantino, J.**, Gomes, C., Falcão, A., Cruz, M. T., Neves, B. M. (2016). Antitumor dendritic cell-based vaccines: Lessons from 20 years of clinical trials and future perspectives. *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 168, 74–95.
- Conti, P.**, Kempuraj, D., Kandere, K., Di Gioacchino, M., Barbacane, R. C., Castellani, M. L., Felaco, M., Boucher, W., Letourneau, R., Theoharides, T. C. (2003). IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always. *Immunology Letters*, 86(2), 123–129.
- Corbett, T. H.**, Griswold, D. P., Roberts, B. J., Peckham, J. C., Schabel, F. M. (1975). Tumor induction relationships in development of transplantable cancers of the colon in mice for chemotherapy assays, with a note on carcinogen structure. *Cancer Research*, 35(9), 2434–2439.
- Corzo, C. A.**, Condamine, T., Lu, L., Cotter, M. J., Youn, J.-I., Cheng, P., Cho, H.-I., Celis, E., Quiceno, D. G., Padhya, T., McCaffrey, T. V., McCaffrey, J. C., Gabrilovich, D. I. (2010). HIF-1 α regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(11), 2439–2453.
- Coughlin, C. M.**, Salhany, K. E., Gee, M. S., LaTemple, D. C., Kotenko, S., Ma, X., Gri, G., Wysocka, M., Kim, J. E., Liu, L., Liao, F., Farber, J. M., Pestka, S., Trinchieri, G., Lee, W. M. (1998). Tumor cell responses to IFN γ affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis. *Immunity*, 9(1), 25–34.
- Cui, W.**, Kaech, S. M. (2010). Generation of effector CD8⁺ T cells and their conversion to memory T cells. *Immunological Reviews*, 236, 151–166.
- Curiel-Lewandrowski, C.**, Mahnke, K., Labeur, M., Roters, B., Schmidt, W., Granstein, R. D., Luger, T. A., Schwarz, T., Grabbe, S. (1999). Transfection of immature murine bone marrow-derived dendritic

- cells with the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene potently enhances their in vivo antigen-presenting capacity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 163(1), 174–183.
- Darmanin, S.**, Chen, J., Zhao, S., Cui, H., Shirkoohi, R., Kubo, N., Kuge, Y., Tamaki, N., Nakagawa, K., Hamada, J., Moriuchi, T., Kobayashi, M. (2007). All-trans retinoic acid enhances murine dendritic cell migration to draining lymph nodes via the balance of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 179(7), 4616–4625.
- Daurkin, I.**, Eruslanov, E., Stoffs, T., Perrin, G. Q., Algood, C., Gilbert, S. M., Rosser, C. J., Su, L.-M., Vieweg, J., Kusmartsev, S. (2011). Tumor-associated macrophages mediate immunosuppression in the renal cancer microenvironment by activating the 15-lipoxygenase-2 pathway. *Cancer Research*, 71(20), 6400–6409.
- de Jong, E. C.**, Smits, H. H., Kapsenberg, M. L. (2005). Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Seminars in Immunopathology*, 26(3), 289–307.
- de Jonge, M. E.**, Huitema, A. D. R., Rodenhuis, S., Beijnen, J. H. (2005). Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. *Clinical Pharmacokinetics*, 44(11), 1135–1164.
- de Winde, C. M.**, Munday, C., Acton, S. E. (2020). Molecular mechanisms of dendritic cell migration in immunity and cancer. *Medical Microbiology and Immunology*, 209(4), 515–529.
- Dinarello, C. A.**, Novick, D., Kim, S., Kaplanski, G. (2013). Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Frontiers in Immunology*, 4, 289.
- Djuretic, I. M.**, Levanon, D., Negreanu, V., Groner, Y., Rao, A., Ansel, K. M. (2007). Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nature Immunology*, 8(2), 145–153.
- Dull, T.**, Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D., Naldini, L. (1998). A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. *Journal of Virology*, 72(11), 8463–8471.
- Dunn, G. P.**, Old, L. J., Schreiber, R. D. (2004). The three Es of cancer immunoediting. *Annual Review of Immunology*, 22, 329–360.
- Eaton, A. D.**, Xu, D., Garside, P. (2003). Administration of exogenous interleukin-18 and interleukin-12 prevents the induction of oral tolerance. *Immunology*, 108(2), 196–203.
- Escors, D.**, Breckpot, K. (2010). Lentiviral vectors in gene therapy: Their current status and future potential. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis*, 58(2), 107–119.
- Fabbi, M.**, Carbotti, G., Ferrini, S. (2015). Context-dependent role of IL-18 in cancer biology and counter-regulation by IL-18BP. *Journal of Leukocyte Biology*, 97(4), 665–675.
- Feng, M.**, Zhou, S., Yu, Y., Su, Q., Li, X., Lin, W. (2021). Regulation of the Migration of Distinct Dendritic Cell Subsets. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9.
- Filin, I. Y.**, Kitaeva, K. V., Rutland, C. S., Rizvanov, A. A., Solovyeva, V. V. (2021). Recent Advances in Experimental Dendritic Cell Vaccines for Cancer. *Frontiers in Oncology*, 11, 730824.
- Galluzzi, L.**, Vacchelli, E., Bravo-San Pedro, J.-M., Buqué, A., Senovilla, L., Baracco, E. E., Bloy, N., Castoldi, F., Abastado, J.-P., Agostinis, P., Apte, R. N., Aranda, F., Ayyoub, M., Beckhove, P., Blay, J.-Y., Bracci, L., Caignard, A., Castelli, C., Cavallo, F., ... Kroemer, G. (2014). Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget*, 5(24), 12472–12508.
- Gándara, C.**, Affleck, V., Stoll, E. A. (2018). Manufacture of Third-Generation Lentivirus for Preclinical Use, with Process Development Considerations for Translation to Good Manufacturing Practice. *Human Gene Therapy Methods*, 29(1), 1–15.
- Gately, M. K.**, Carvajal, D. M., Connaughton, S. E., Gillessen, S., Warriar, R. R., Kolinsky, K. D., Wilkinson, V. L., Dwyer, C. M., Higgins, G. F., Podlaski, F. J., Faherty, D. A., Familletti, P. C., Stern, A. S., Presky, D. H. (1996). Interleukin-12 antagonist activity of mouse interleukin-12 p40 homodimer in vitro and in vivo. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 795, 1–12.

- Ge, Y.,** Domschke, C., Stoiber, N., Schott, S., Heil, J., Rom, J., Blumenstein, M., Thum, J., Sohn, C., Schneeweiss, A., Beckhove, P., Schuetz, F. (2012). Metronomic cyclophosphamide treatment in metastasized breast cancer patients: Immunological effects and clinical outcome. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 61(3), 353–362.
- Ghiringhelli, F.,** Menard, C., Puig, P. E., Ladoire, S., Roux, S., Martin, F., Solary, E., Le Cesne, A., Zitvogel, L., Chauffert, B. (2007). Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 56(5), 641–648.
- Ghorbaninezhad, F.,** Asadzadeh, Z., Masoumi, J., Mokhtarzadeh, A., Kazemi, T., Aghebati-Maleki, L., Shotorbani, S. S., Shadbad, M. A., Baghbanzadeh, A., Hemmat, N., Bakhshivand, M., Baradaran, B. (2022). Dendritic cell-based cancer immunotherapy in the era of immune checkpoint inhibitors: From bench to bedside. *Life Sciences*, 297, 120466.
- Giovarelli, M.,** Musiani, P., Modesti, A., Dellabona, P., Casorati, G., Allione, A., Consalvo, M., Cavallo, F., di Pierro, F., De Giovanni, C. (1995). Local release of IL-10 by transfected mouse mammary adenocarcinoma cells does not suppress but enhances antitumor reaction and elicits a strong cytotoxic lymphocyte and antibody-dependent immune memory. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 155(6), 3112–3123.
- Gu, Y.,** Zhao, X., Song, X. (2020). Ex vivo pulsed dendritic cell vaccination against cancer. *Acta Pharmacologica Sinica*, 41(7), 959–969.
- Guilliams, M.,** Dutertre, C.-A., Scott, C. L., McGovern, N., Sichien, D., Chakarov, S., Van Gassen, S., Chen, J., Poidinger, M., De Prijck, S., Tavernier, S. J., Low, I., Irac, S. E., Mattar, C. N., Sumatoh, H. R., Low, G. H. L., Chung, T. J. K., Chan, D. K. H., Tan, K. K., ... Ginhoux, F. (2016). Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. *Immunity*, 45(3), 669–684.
- Hampton, H. R.,** Chtanova, T. (2019). Lymphatic Migration of Immune Cells. *Frontiers in Immunology*, 10, 1168.
- Hamza, T.,** Barnett, J. B., Li, B. (2010). Interleukin 12 a key immunoregulatory cytokine in infection applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(3), 789–806.
- Hanahan, D.** (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46.
- Hanahan, D.,** Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70.
- Hanahan, D.,** Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
- Hargadon, K. M.** (2016). Dysregulation of TGFβ1 Activity in Cancer and Its Influence on the Quality of Anti-Tumor Immunity. *Journal of Clinical Medicine*, 5(9), E76.
- Hathcock, K. S.,** Laszlo, G., Pucillo, C., Linsley, P., Hodes, R. J. (1994). Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: Expression and function. *The Journal of Experimental Medicine*, 180(2), 631–640.
- Hsu, F. J.,** Benike, C., Fagnoni, F., Liles, T. M., Czerwinski, D., Taidi, B., Engleman, E. G., Levy, R. (1996). Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nature Medicine*, 2(1), 52–58.
- Hu, C.-E.,** Gan, J., Zhang, R.-D., Cheng, Y.-R., Huang, G.-J. (2011). Up-regulated myeloid-derived suppressor cell contributes to hepatocellular carcinoma development by impairing dendritic cell function. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 46(2), 156–164.
- Huang, F.,** Wan, J., Hao, S., Deng, X., Chen, L., Ma, L. (2017). TGF-β1-silenced leukemia cell-derived exosomes target dendritic cells to induce potent anti-leukemic immunity in a mouse model. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 66(10), 1321–1331.
- Hubo, M.,** Trinschek, B., Kryczanowsky, F., Tuettenberg, A., Steinbrink, K., Jonuleit, H. (2013). Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Frontiers in Immunology*, 4, 82.

- Hughes, E.**, Scurr, M., Campbell, E., Jones, E., Godkin, A., Gallimore, A. (2018). T-cell modulation by cyclophosphamide for tumour therapy. *Immunology*, 154(1), 62–68.
- Hwang, E. S.**, Szabo, S. J., Schwartzberg, P. L., Glimcher, L. H. (2005). T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5708), 430–433.
- Inaba, K.**, Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S., Steinman, R. M. (1992). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *The Journal of Experimental Medicine*, 176(6), 1693–1702.
- Indrová, M.**, Bieblová, J., Rossowska, J., Kuropka, P., Pajtasz-Piasecka, E., Bubeník, J., Reinis, M. (2009). HPV 16-associated tumours: IL-12 can repair the absence of cytotoxic and proliferative responses of tumour infiltrating cells after chemotherapy. *International Journal of Oncology*, 34(1), 173–179.
- Ingulli, E.**, Mondino, A., Khoruts, A., Jenkins, M. K. (1997). In vivo detection of dendritic cell antigen presentation to CD4(+) T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 185(12), 2133–2141.
- Ito, H.**, Seishima, M. (2010). Regulation of the Induction and Function of Cytotoxic T Lymphocytes by Natural Killer T Cell. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 641757.
- Jinushi, M.**, Tahara, H. (2009). Cytokine gene-mediated immunotherapy: Current status and future perspectives. *Cancer Science*, 100(8), 1389–1396.
- Kantoff, P. W.**, Higano, C. S., Shore, N. D., Berger, E. R., Small, E. J., Penson, D. F., Redfern, C. H., Ferrari, A. C., Dreicer, R., Sims, R. B., Xu, Y., Frohlich, M. W., Schellhammer, P. F., IMPACT Study Investigators. (2010). Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *The New England Journal of Medicine*, 363(5), 411–422.
- Kaplan, D. H.**, Shankaran, V., Dighe, A. S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L. J., Schreiber, R. D. (1998). Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(13), 7556–7561.
- Khader, S. A.**, Partida-Sanchez, S., Bell, G., Jelley-Gibbs, D. M., Swain, S., Pearl, J. E., Ghilardi, N., Desauvage, F. J., Lund, F. E., Cooper, A. M. (2006). Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after Mycobacterium tuberculosis infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(7), 1805–1815.
- Kicielińska, J.***, Pajtasz-Piasecka, E. (2014). [The role of IL-10 in the modulation of the immune response in normal conditions and the tumor environment]. *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej (Online)*, 68, 879–892.
- Kim, R.**, Emi, M., Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, 121(1), 1–14.
- Kobayashi, M.**, Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R. M., Clark, S. C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B., Trinchieri, G. (1989). Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 170(3), 827–845.
- Krneta, T.**, Gillgrass, A., Poznanski, S., Chew, M., Lee, A. J., Kolb, M., Ashkar, A. A. (2017). M2-polarized and tumor-associated macrophages alter NK cell phenotype and function in a contact-dependent manner. *Journal of Leukocyte Biology*, 101(1), 285–295.
- Krummel, M. F.**, Bartumeus, F., Gérard, A. (2016). T cell migration, search strategies and mechanisms. *Nature Reviews. Immunology*, 16(3), 193–201.
- Kumar, S.**, Jeong, Y., Ashraf, M. U., Bae, Y.-S. (2019). Dendritic Cell-Mediated Th2 Immunity and Immune Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), E2159.
- Landreneau, J. P.**, Shurin, M. R., Agassandian, M. V., Keskinov, A. A., Ma, Y., Shurin, G. V. (2013). Immunological Mechanisms of Low and Ultra-Low Dose Cancer Chemotherapy. *Cancer Microenvironment*, 8(2), 57–64.

- Lasek, W.**, Zagożdżon, R., Jakobisiak, M. (2014). Interleukin 12: Still a promising candidate for tumor immunotherapy? *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 63(5), 419–435.
- Lazarevic, V.**, Chen, X., Shim, J.-H., Hwang, E.-S., Jang, E., Bolm, A. N., Oukka, M., Kuchroo, V. K., Glimcher, L. H. (2011). T-bet represses T(H)17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding ROR γ t. *Nature Immunology*, 12(1), 96–104.
- Lazarevic, V.**, Glimcher, L. H., Lord, G. M. (2013). T-bet: A bridge between innate and adaptive immunity. *Nature Reviews. Immunology*, 13(11), 777–789.
- Lee, J.** hyun, Cho, D. H., Park, H. J. (2015). IL-18 and Cutaneous Inflammatory Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 29357–29369.
- Li, C.**, Jiang, P., Wei, S., Xu, X., Wang, J. (2020). Regulatory T cells in tumor microenvironment: New mechanisms, potential therapeutic strategies and future prospects. *Molecular Cancer*, 19(1), 116.
- Li, Q.**, Carr, A. L., Donald, E. J., Skitzki, J. J., Okuyama, R., Stoolman, L. M., Chang, A. E. (2005). Synergistic effects of IL-12 and IL-18 in skewing tumor-reactive T-cell responses towards a type 1 pattern. *Cancer Research*, 65(3), 1063–1070.
- Li, S.-F.**, Gong, M.-J., Zhao, F.-R., Shao, J.-J., Xie, Y.-L., Zhang, Y.-G., Chang, H.-Y. (2018). Type I Interferons: Distinct Biological Activities and Current Applications for Viral Infection. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 51(5), 2377–2396.
- Liechtenstein, T.**, Perez-Janices, N., Escors, D. (2013). Lentiviral vectors for cancer immunotherapy and clinical applications. *Cancers*, 5(3), 815–837.
- Lorenzo-Herrero, S.**, Sordo-Bahamonde, C., Gonzalez, S., López-Soto, A. (2019). CD107a Degranulation Assay to Evaluate Immune Cell Antitumor Activity. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1884, 119–130.
- Luckheeram, R. V.**, Zhou, R., Verma, A. D., Xia, B. (2012). CD4⁺T cells: Differentiation and functions. *Clinical & Developmental Immunology*, 2012, 925135.
- Lutsiak, M. E. C.**, Semnani, R. T., De Pascalis, R., Kashmiri, S. V. S., Schlom, J., Sabzevari, H. (2005). Inhibition of CD4(+)25⁺ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. *Blood*, 105(7), 2862–2868.
- Mackiewicz, J.**, Kotlarski, M., Dondajewska, E., Nowicka-Kotlarska, A., Krokowicz, Ł., Kazmierczak, U. (2015). Cell-based Hyper-interleukin 6 or Hyper-interleukin 11 secreting vaccines combined with low dose cyclophosphamide in an orthotopic murine prostate cancer model. *Contemporary Oncology*, 19(3), 187–194.
- Mannino, M. H.**, Zhu, Z., Xiao, H., Bai, Q., Wakefield, M. R., Fang, Y. (2015). The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer Letters*, 367(2), 103–107.
- Mellman, I.** (2013). Dendritic Cells: Master Regulators of the Immune Response. *Cancer Immunology Research*, 1(3), 145–149.
- Merad, M.**, Sathe, P., Helft, J., Miller, J., Mortha, A. (2013). The dendritic cell lineage: Ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annual Review of Immunology*, 31, 563–604.
- Merten, O.-W.**, Hebben, M., Bovolenta, C. (2016). Production of lentiviral vectors. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, 3, 16017.
- Mierzejewska, J.**, Węgierek-Ciura, K., Rossowska, J., Szczygieł, A., Anger-Góra, N., Szermer-Olearnik, B., Geneja, M., Pajtasz-Piasecka, E. (2022). The Beneficial Effect of IL-12 and IL-18 Transduced Dendritic Cells Stimulated with Tumor Antigens on Generation of an Antitumor Response in a Mouse Colon Carcinoma Model. *Journal of Immunology Research*, 2022, 7508928.
- Mikyšková, R.**, Indrová, M., Símová, J., Bieblová, J., Bubeník, J., Reiniš, M. (2011). Genetically modified tumour vaccines producing IL-12 augment chemotherapy of HPV16-associated tumours with gemcitabine. *Oncology Reports*, 25(6), 1683–1689.

- Milone, M. C.,** O'Doherty, U. (2018). Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia*, 32(7), 1529–1541.
- Mirjačić Martinović, K.,** Babović, N., Džodić, R., Jurišić, V., Matković, S., Konjević, G. (2015). Favorable in vitro effects of combined IL-12 and IL-18 treatment on NK cell cytotoxicity and CD25 receptor expression in metastatic melanoma patients. *Journal of Translational Medicine*, 13, 120.
- Mirlekar, B.,** Pylayeva-Gupta, Y. (2021). IL-12 Family Cytokines in Cancer and Immunotherapy. *Cancers*, 13(2), E167.
- Mocellin, S.,** Panelli, M., Wang, E., Rossi, C. R., Pilati, P., Nitti, D., Lise, M., Marincola, F. M. (2004). IL-10 stimulatory effects on human NK cells explored by gene profile analysis. *Genes and Immunity*, 5(8), 621–630.
- Morel, A.-S.,** Quaratino, S., Douek, D. C., Londei, M. (1997). Split activity of interleukin-10 on antigen capture and antigen presentation by human dendritic cells: Definition of a maturative step. *European Journal of Immunology*, 27(1), 26–34.
- Motoyoshi, Y.,** Kaminoda, K., Saitoh, O., Hamasaki, K., Nakao, K., Ishii, N., Nagayama, Y., Eguchi, K. (2006). Different mechanisms for anti-tumor effects of low- and high-dose cyclophosphamide. *Oncology Reports*, 16(1), 141–146.
- Movahedi, K.,** Laoui, D., Gysemans, C., Baeten, M., Stangé, G., Van den Bossche, J., Mack, M., Pipeleers, D., In't Veld, P., De Baetselier, P., Van Ginderachter, J. A. (2010). Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer Research*, 70(14), 5728–5739.
- Nakamura, K.,** Bald, T., Smyth, M. J. (2020). Cancer-killing, decoy-resistant interleukin-18. *Immunology & Cell Biology*, 98(6), 434–436.
- Nakamura, K.,** Okamura, H., Wada, M., Nagata, K., Tamura, T. (1989). Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production. *Infection and Immunity*, 57(2), 590–595.
- Nguyen, K. G.,** Vrabel, M. R., Mantooth, S. M., Hopkins, J. J., Wagner, E. S., Gabaldon, T. A., Zaharoff, D. A. (2020). Localized Interleukin-12 for Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 11, 575597.
- O'Garra, A.,** Vieira, P. L., Vieira, P., Goldfeld, A. E. (2004). IL-10-producing and naturally occurring CD4⁺ Tregs: Limiting collateral damage. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(10), 1372–1378.
- Ohue, Y.,** Nishikawa, H. (2019). Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? *Cancer Science*, 110(7), 2080–2089.
- Okamoto, I.,** Kohno, K., Tanimoto, T., Ikegami, H., Kurimoto, M. (1999). Development of CD8⁺ effector T cells is differentially regulated by IL-18 and IL-12. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 162(6), 3202–3211.
- Okamura, H.,** Tsutsi, H., Komatsu, T., Yutsudo, M., Hakura, A., Tanimoto, T., Torigoe, K., Okura, T., Nukada, Y., Hattori, K. (1995). Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature*, 378(6552), 88–91.
- Olver, S.,** Apte, S. H., Baz, A., Kelso, A., Kienzle, N. (2013). Interleukin-4-induced loss of CD8 expression and cytolytic function in effector CD8 T cells persists long term in vivo. *Immunology*, 139(2), 187–196.
- Pajtasz-Piasecka, E.,** Rossowska, J., Szyda, A., Krawczenko, A., Dus, D. (2007). Generation of anti-tumor response by JAWS II mouse dendritic cells transduced with murine interleukin 12 genes. *Oncology Reports*, 17(5), 1249–1257.
- Pajtasz-Piasecka, E.,** Szyda, A., Rossowska, J., Krawczenko, A., Indrová, M., Grabarczyk, P., Wysocki, P., Mackiewicz, A., Duś, D. (2004). Loss of tumorigenicity of murine colon carcinoma MC38/0 cell line after transduction with a retroviral vector carrying murine IL-12 genes. *Folia Biologica*, 50(1), 7–14.

- Palma, G.,** Barbieri, A., Bimonte, S., Palla, M., Zappavigna, S., Caraglia, M., Ascierto, P. A., Ciliberto, G., Arra, C. (2013). Interleukin 18: Friend or foe in cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1836(2), 296–303.
- Paluskiewicz, C. M.,** Cao, X., Abdi, R., Zheng, P., Liu, Y., Bromberg, J. S. (2019). T Regulatory Cells and Priming the Suppressive Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 10.
- Pan, Y.,** Yu, Y., Wang, X., Zhang, T. (2020). Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.583084>
- Portielje, J. E.,** Gratama, J., van Ojik, H. H., Stoter, G., Kruit, W. H. (2003). IL-12: A promising adjuvant for cancer vaccination. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 52(3), 133–144.
- Poschke, I.,** Mao, Y., Adamson, L., Salazar-Onfray, F., Masucci, G., Kiessling, R. (2012). Myeloid-derived suppressor cells impair the quality of dendritic cell vaccines. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 61(6), 827–838.
- Poznanski, S. M.,** Lee, A. J., Nham, T., Lusty, E., Larché, M. J., Lee, D. A., Ashkar, A. A. (2017). Combined Stimulation with Interleukin-18 and Interleukin-12 Potently Induces Interleukin-8 Production by Natural Killer Cells. *Journal of Innate Immunity*, 9(5), 511–525.
- Radojicic, V.,** Bezak, K. B., Skarica, M., Pletneva, M. A., Yoshimura, K., Schulick, R. D., Luznik, L. (2010). Cyclophosphamide resets dendritic cell homeostasis and enhances antitumor immunity through effects that extend beyond regulatory T cell elimination. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 59(1), 137–148.
- Randolph, G. J.,** Angeli, V., Swartz, M. A. (2005). Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nature Reviews. Immunology*, 5(8), 617–628.
- Randolph, G. J.,** Ochando, J., Partida-Sánchez, S. (2008). Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annual Review of Immunology*, 26, 293–316.
- Raskov, H.,** Orhan, A., Christensen, J. P., Gögenur, I. (2021). Cytotoxic CD8+ T cells in cancer and cancer immunotherapy. *British Journal of Cancer*, 124(2), 359–367.
- Rodriguez-Galán, M. C.,** Bream, J. H., Farr, A., Young, H. A. (2005). Synergistic effect of IL-2, IL-12, and IL-18 on thymocyte apoptosis and Th1/Th2 cytokine expression. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 174(5), 2796–2804.
- Rossowska, J.,** Anger, N., Kicielińska, J., Pajtasz-Piasecka, E., Bielawska-Pohl, A., Wojas-Turek, J., Duś, D. (2015). Temporary elimination of IL-10 enhanced the effectiveness of cyclophosphamide and BMDC-based therapy by decrease of the suppressor activity of MDSCs and activation of antitumour immune response. *Immunobiology*, 220(3), 389–398.
- Rossowska, J.,** Anger, N., Szczygieł, A., Mierzejewska, J., Pajtasz-Piasecka, E. (2018). Reprogramming the murine colon cancer microenvironment using lentivectors encoding shRNA against IL-10 as a component of a potent DC-based chemoimmunotherapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 37(1), 126.
- Rossowska, J.,** Anger, N., Wegierek, K., Szczygieł, A., Mierzejewska, J., Milczarek, M., Szermer-Olearnik, B., Pajtasz-Piasecka, E. (2019a). Antitumor Potential of Extracellular Vesicles Released by Genetically Modified Murine Colon Carcinoma Cells With Overexpression of Interleukin-12 and shRNA for TGF- β 1. *Frontiers in Immunology*, 10, 211.
- Rossowska, J.,** Pajtasz-Piasecka, E., Anger, N., Wojas-Turek, J., Kicielińska, J., Piasecki, E., Duś, D. (2014a). Cyclophosphamide and IL-12-transduced DCs enhance the antitumor activity of tumor antigen-stimulated DCs and reduce Tregs and MDSCs number. *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)*, 37(9), 427–439.
- Rossowska, J.,** Pajtasz-Piasecka, E., Szyda, A., Krawczyński, A., Zietara, N., Dus, D. (2009). Tumour antigen-loaded mouse dendritic cells maturing in the presence of inflammatory cytokines are potent activators of immune response in vitro but not in vivo. *Oncology Reports*, 21(6), 1539–1549.

- Rossowska, J.**, Pajtasz-Piasecka, E., Szyda, A., Zietara, N., Duś, D. (2007). Tissue localization of tumor antigen-loaded mouse dendritic cells applied as an anti-tumor vaccine and their influence on immune response. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 45(4), 349–355.
- Ruffell, B.**, Chang-Strachan, D., Chan, V., Rosenbusch, A., Ho, C. M. T., Pryer, N., Daniel, D., Hwang, E. S., Rugo, H. S., Coussens, L. M. (2014). Macrophage IL-10 blocks CD8⁺ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells. *Cancer Cell*, 26(5), 623–637
- Rutkowski, R.**, Moniuszko, T., Stasiak-Barmuta, A., Rutkowska-Rogacz, D., Siergiejko, Z. (2002). [The effect of inactivation of co-stimulated particles B7.1 (CD80), B7.2 (CD86) on T lymphocyte activity]. *Polski Merkuriusz Lekarski: Organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, 12(69), 185–189.
- Sabado, R. L.**, Balan, S., Bhardwaj, N. (2017). Dendritic cell-based immunotherapy. *Cell Research*, 27(1), 74–95.
- Sallusto, F.**, Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *The Journal of Experimental Medicine*, 179(4), 1109–1118.
- Salminen, A.**, Kaarniranta, K., Kauppinen, A. (2019). Immunosenescence: The potential role of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in age-related immune deficiency. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 76(10), 1901–1918.
- Sánchez-Paulete, A. R.**, Teijeira, A., Cueto, F. J., Garasa, S., Pérez-Gracia, J. L., Sánchez-Arráez, A., Sancho, D., Melero, I. (2017). Antigen cross-presentation and T-cell cross-priming in cancer immunology and immunotherapy. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 28(suppl_12), xii74.
- Sato, K.**, Kawasaki, H., Nagayama, H., Enomoto, M., Morimoto, C., Tadokoro, K., Juji, T., Takahashi, T. A. (2000). TGF-beta 1 reciprocally controls chemotaxis of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells via chemokine receptors. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 164(5), 2285–2295.
- Schiavoni, G.**, Sistigu, A., Valentini, M., Mattei, F., Sestili, P., Spadaro, F., Sanchez, M., Lorenzi, S., D'Urso, M. T., Belardelli, F., Gabriele, L., Proietti, E., Bracci, L. (2011). Cyclophosphamide synergizes with type I interferons through systemic dendritic cell reactivation and induction of immunogenic tumor apoptosis. *Cancer Research*, 71(3), 768–778.
- Schreiber, R. D.**, Old, L. J., Smyth, M. J. (2011). Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science (New York, N.Y.)*, 331(6024), 1565–1570.
- Seyfizadeh, N.**, Muthuswamy, R., Mitchell, D. A., Nierkens, S., Seyfizadeh, N. (2016). Migration of dendritic cells to the lymph nodes and its enhancement to drive anti-tumor responses. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 107, 100–110.
- Shadbad, M. A.**, Hajiasgharzadeh, K., Derakhshani, A., Silvestris, N., Baghbanzadeh, A., Racanelli, V., Baradaran, B. (2021). From Melanoma Development to RNA-Modified Dendritic Cell Vaccines: Highlighting the Lessons From the Past. *Frontiers in Immunology*, 12.
- Siegel, R. M.**, Muppidi, J., Roberts, M., Porter, M., Wu, Z. (2003). Death receptor signaling and autoimmunity. *Immunologic Research*, 27(2–3), 499–512.
- Sims, J. E.**, Smith, D. E. (2010). The IL-1 family: Regulators of immunity. *Nature Reviews. Immunology*, 10(2), 89–102.
- Sistigu, A.**, Viaud, S., Chaput, N., Bracci, L., Proietti, E., Zitvogel, L. (2011). Immunomodulatory effects of cyclophosphamide and implementations for vaccine design. *Seminars in Immunopathology*, 33(4), 369–383.
- Smeltz, R. B.**, Chen, J., Hu-Li, J., Shevach, E. M. (2001). Regulation of interleukin (IL)-18 receptor alpha chain expression on CD4(+) T cells during T helper (Th)1/Th2 differentiation. Critical downregulatory role of IL-4. *The Journal of Experimental Medicine*, 194(2), 143–153.

- Srivastava, S.,** Salim, N., Robertson, M. J. (2010). Interleukin-18: Biology and role in the immunotherapy of cancer. *Current Medicinal Chemistry*, 17(29), 3353–3357.
- Steinman, R. M.** (2012). Decisions about dendritic cells: Past, present, and future. *Annual Review of Immunology*, 30, 1–22.
- Steinman, R. M.,** Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of Experimental Medicine*, 137(5), 1142–1162.
- Stern, A. S.,** Podlaski, F. J., Hulmes, J. D., Pan, Y. C., Quinn, P. M., Wolitzky, A. G., Familletti, P. C., Stremlo, D. L., Truitt, T., Chizzonite, R. (1990). Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(17), 6808–6812.
- Stober, D.,** Schirmbeck, R., Reimann, J. (2001). IL-12/IL-18-dependent IFN-gamma release by murine dendritic cells. *Journal of immunology*.
- Strioga, M.,** Schijns, V., Powell, D. J., Pasukoniene, V., Dobrovolskiene, N., Michalek, J. (2013). Dendritic cells and their role in tumor immunosurveillance. *Innate Immunity*, 19(1), 98–111.
- Subleski, J. J.,** Hall, V. L., Back, T. C., Ortaldo, J. R., Wiltout, R. H. (2006). Enhanced antitumor response by divergent modulation of natural killer and natural killer T cells in the liver. *Cancer Research*, 66(22), 11005–11012.
- Suzuki, S.,** Umezumi, Y., Saijo, Y., Satoh, G., Abe, Y., Satoh, K., Nukiwa, T. (1998). Exogenous recombinant human IL-12 augments MHC class I antigen expression on human cancer cells in vitro. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 185(3), 223–226.
- Szczygiel, A.,** Anger-Góra, N., Węgierek-Ciura, K., Mierzejewska, J., Rossowska, J., Goszczyński, T. M., Świtalska, M., Pajtasz-Piasecka, E. (2021). Immunomodulatory potential of anticancer therapy composed of methotrexate nanoconjugate and dendritic cell-based vaccines in murine colon carcinoma. *Oncology Reports*, 45(3), 945–962.
- Świst, K.,** Pajtasz-Piasecka, E. (2011). [The influence of transcription factors on CD4+ T cell differentiation]. *Postępy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej (Online)*, 65, 414–426.
- Terhune, J.,** Berk, E., Czerniecki, B. J. (2013). Dendritic Cell-Induced Th1 and Th17 Cell Differentiation for Cancer Therapy. *Vaccines*, 1(4), 527–549.
- Tiberio, L.,** Del Prete, A., Schioppa, T., Sozio, F., Bosisio, D., Sozzani, S. (2018). Chemokine and chemotactic signals in dendritic cell migration. *Cellular & Molecular Immunology*, 15(4), 346–352.
- Trinchieri, G.** (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Reviews. Immunology*, 3(2), 133–146.
- Vanmeerbeek, I.,** Sprooten, J., De Ruyscher, D., Tejpar, S., Vandenberghe, P., Fucikova, J., Spisek, R., Zitvogel, L., Kroemer, G., Galluzzi, L., Garg, A. D. (2020). Trial watch: Chemotherapy-induced immunogenic cell death in immuno-oncology. *Oncoimmunology*, 9(1), 1703449.
- Vannucci, L.,** Lai, M., Chiuppesi, F., Ceccherini-Nelli, L., Pistello, M. (b.d.). Viral vectors: A look back and ahead on gene transfer technology. *Viral Vectors*, 22.
- Veltman, J. D.,** Lambers, M. E. H., van Nimwegen, M., de Jong, S., Hendriks, R. W., Hoogsteden, H. C., Aerts, J. G. J. V., Hegmans, J. P. J. J. (2010). Low-dose cyclophosphamide synergizes with dendritic cell-based immunotherapy in antitumor activity. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010, 798467.
- Vujanovic, L.,** Ranieri, E., Gambotto, A., Olson, W. C., Kirkwood, J. M., Storkus, W. J. (2006). IL-12p70 and IL-18 gene-modified dendritic cells loaded with tumor antigen-derived peptides or recombinant protein effectively stimulate specific Type-1 CD4+ T-cell responses from normal donors and melanoma patients in vitro. *Cancer Gene Therapy*, 13(8), 798–805.

- Walker, J. A.,** McKenzie, A. N. J. (2018). TH2 cell development and function. *Nature Reviews. Immunology*, 18(2), 121–133.
- Wang, B.,** Li, Q., Qin, L., Zhao, S., Wang, J., Chen, X. (2011). Transition of tumor-associated macrophages from MHC class III_{hi} to MHC class III_{low} mediates tumor progression in mice. *BMC Immunology*, 12, 43.
- Wang, Y.,** Xiang, Y., Xin, V. W., Wang, X.-W., Peng, X.-C., Liu, X.-Q., Wang, D., Li, N., Cheng, J.-T., Lyv, Y.-N., Cui, S.-Z., Ma, Z., Zhang, Q., Xin, H.-W. (2020). Dendritic cell biology and its role in tumor immunotherapy. *Journal of Hematology & Oncology*, 13(1), 107. h
- Wculek, S. K.,** Cueto, F. J., Mujal, A. M., Melero, I., Krummel, M. F., Sancho, D. (2020). Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nature Reviews. Immunology*, 20(1), 7–24.
- Weiss, J. M.,** Subleski, J. J., Wigginton, J. M., Wiltout, R. H. (2007). Immunotherapy of cancer by IL-12-based cytokine combinations. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 7(11), 1705–1721.
- Westermann, J.,** Aicher, A., Qin, Z., Cayeux, Z., Daemen, K., Blankenstein, T., Dörken, B., Pezzutto, A. (1998). Retroviral interleukin-7 gene transfer into human dendritic cells enhances T cell activation. *Gene Therapy*, 5(2), 264–271.
- Wojas-Turek, J.,** Szczygieł, A., Kicielińska, J., Rossowska, J., Piasecki, E., Pajtasz-Piasecka, E. (2016). Treatment with cyclophosphamide supported by various dendritic cell-based vaccines induces diversification in CD4⁺ T cell response against MC38 colon carcinoma. *International Journal of Oncology*, 48(2), 493–505.
- Woo, S.-R.,** Corrales, L., Gajewski, T. F. (2015). Innate immune recognition of cancer. *Annual Review of Immunology*, 33, 445–474.
- Worbs, T.,** Hammerschmidt, S. I., Förster, R. (2017). Dendritic cell migration in health and disease. *Nature Reviews. Immunology*, 17(1), 30–48.
- Yang, L.,** Zhang, Y. (2017). Tumor-associated macrophages: From basic research to clinical application. *Journal of Hematology & Oncology*, 10(1), 58.
- Yao, Y.,** Li, W., Kaplan, M. H., Chang, C.-H. (2005). Interleukin (IL)-4 inhibits IL-10 to promote IL-12 production by dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(12), 1899–1903.
- Yasuda, K.,** Nakanishi, K., Tsutsui, H. (2019). Interleukin-18 in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 649.
- Yu, J.,** Sun, H., Cao, W., Song, Y., Jiang, Z. (2022). Research progress on dendritic cell vaccines in cancer immunotherapy. *Experimental Hematology & Oncology*, 11(1), 3.
- Zelante, T.,** Fric, J., Wong, A. Y. W., Ricciardi-Castagnoli, P. (2012). Interleukin-2 production by dendritic cells and its immuno-regulatory functions. *Frontiers in Immunology*, 3, 161.
- Zhao, J.,** Cao, Y., Lei, Z., Yang, Z., Zhang, B., Huang, B. (2010). Selective depletion of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells by low-dose cyclophosphamide is explained by reduced intracellular ATP levels. *Cancer Research*, 70(12), 4850–4858.
- Zheng, X.,** Turkowski, K., Mora, J., Brüne, B., Seeger, W., Weigert, A., Savai, R. (2017). Redirecting tumor-associated macrophages to become tumoricidal effectors as a novel strategy for cancer therapy. *Oncotarget*, 8(29), 48436–48452.
- Zhou, T.,** Damsky, W., Weizman, O.-E., McGeary, M. K., Hartmann, K. P., Rosen, C. E., Fischer, S., Jackson, R., Flavell, R. A., Wang, J., Sanmamed, M. F., Bosenberg, M. W., Ring, A. M. (2020). IL-18BP is a secreted immune checkpoint and barrier to IL-18 immunotherapy. *Nature*, 583(7817), 609–614.
- Zhu, J.** (2018). T Helper Cell Differentiation, Heterogeneity, and Plasticity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(10), a030338.

*Kicielińska J. (Mierzejewska J. z d. Kicielińska J.)