

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



ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr Agnieszka Szczygieł

**Ocena aktywności przeciwnowotworowej chemioimmunoterapii
z udziałem nanokoniugatów metotreksatu oraz szczepionek
na bazie komórek dendrytycznych z wyciszoną ekspresją
receptora IL-10**

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 wprowadzenie mnie do świata komórek dendrytycznych,
za wysiłek włożony w rozwój moich umiejętności,
za cierpliwość, zaufanie, poświęcony czas
oraz za nieocenioną pomoc, na którą zawsze mogłam liczyć.*

***Dr hab. Joannie Rossowskiej**
za dzielenie się swoją wiedzą i umiejętnościami,
za otrzymaną pomoc oraz cenne wskazówki i rady.*

***Dr hab. Tomaszowi Goszczyńskiemu**
za przygotowanie chemioterapeutyków.*

***Dr Marcie Świtalskiej**
za życzliwą pomoc.*

*Wyrazy wdzięczności kieruję do moich Koleżanek:
Jagody Mierzejewskiej, Katarzyny Węgierek-Ciury,
Natalii Anger-Góry i Anny Wróblewskiej,
za otrzymaną pomoc i wspaniałe towarzystwo,
za ogromną motywację do dalszego działania
oraz liczne dyskusje i wnikliwe analizy.*

***Moim Najbliższym**
za zrozumienie, cierpliwość i wsparcie.*

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

„Ocena aktywności przeciwnowotworowej chemioimmunoterapii z udziałem nanokoniugatów metotreksatu oraz szczepionek na bazie komórek dendrytycznych z wyciszoną ekspresją receptora IL-10”

nr projektu: 2015/19/N/NZ6/02908

kierownik: mgr Agnieszka Szczygieł

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

W ramach pracy opublikowano:

Szczygiel A., Anger-Góra N., Węgierek-Ciura K., Mierzejewska J., Rossowska J., Goszczyński TM., Świtalska M., Pajtasz-Piasecka E.; *Immunomodulatory potential of anticancer therapy composed of methotrexate nanoconjugate and dendritic cell-based vaccines in murine colon carcinoma*; *Oncology Reports* 2021; 45(3): 945-962;

Szczygiel A., Pajtasz-Piasecka E., *Między biologią a medycyną: perspektywy wykorzystania komórek dendrytycznych w terapii przeciwnowotworowej*; *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 2017; 71: 921-941.

Spis treści

Wykaz skrótów	9
Streszczenie.....	12
Abstract.....	13
1. Wstęp.....	14
1.1. Rola komórek dendrytycznych w aktywowaniu odpowiedzi przeciwnowotworowej	14
1.2. Rola układu odpornościowego w progresji choroby nowotworowej	17
1.2.1. Immunoredagowanie odpowiedzi przeciwnowotworowej	18
1.2.2. Komórki układu odpornościowego obecne w mikrośrodkowisku nowotworu i ich rola w tłumieniu odpowiedzi przeciwnowotworowej.....	19
1.2.2.1. Komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego	20
1.2.2.2. Makrofagi związane z nowotworem	22
1.2.2.3. Limfocyty T regulatorowe	23
1.2.2.4. Komórki dendrytyczne.....	23
1.2.3. Rola IL-10 w tworzeniu odpowiedzi przeciwnowotworowej.....	24
1.3. Wykorzystanie komórek dendrytycznych w immunoterapii przeciwnowotworowej	27
1.4. Zniesienie negatywnego wpływu IL-10 na komórki dendrytyczne jako potencjalna strategia w terapii przeciwnowotworowej.....	28
1.5. Wykorzystanie zjawiska interferencji RNA jako metody regulacji ekspresji genów	30
1.6. Wektory lentiwirusowe jako narzędzie do modyfikacji genetycznej komórek	32
1.7. Modulowanie odpowiedzi przeciwnowotworowej za pomocą chemioterapeutyków	35
1.7.1. Nanokoniugat metotreksatu i hydroksyetyloskrobi	36
2. Założenia i cel pracy	39
3. Materiały i metody	41
3.1. Materiały	41
3.1.1. Myszy	41
3.1.2. Odczynniki.....	41
3.1.3. Nanokoniugat metotreksatu i hydroksyetyloskrobi	42
3.1.4. Płyny wykorzystywane w hodowlach komórkowych	42
3.1.4.1. Pożywki wykorzystywane w hodowlach komórek prokariotycznych	42
3.1.4.2. Podłoża hodowlane wykorzystywane w hodowlach komórek eukariotycznych	43
3.1.5. Rekombinowane cytokiny	43
3.1.6. Bufory i przeciwciała monoklonalne wykorzystywane w analizach cytometrycznych ...	43
3.1.7. Bufory i roztwory wykorzystywane w testach ELISA	45
3.1.8. Plazmidy stosowane w systemie lentiwirusowym III generacji	46
3.1.9. Zestawy odczynników wykorzystywane w oznaczeniu ekspresji mRNA.....	47
3.2. Metody.....	48
3.2.1. Prowadzenie eukariotycznych hodowli komórkowych in vitro oraz ex vivo.....	48
3.2.2. Przygotowanie lizatu z komórek nowotworowych.....	49
3.2.3. Izolacja splenocytów ze śledzion pobranych od zdrowych myszy szczepu C57BL/6	49
3.2.4. Hodowla komórek dendrytycznych pochodzenia szpikowego w warunkach ex vivo.....	49

3.2.5. Określenie fenotypu powierzchniowego komórek dendrytycznych z wykorzystaniem cytometrii przepływowej	50
3.2.6. Ocena fosforylacji czynnika STAT3 w komórkach dendrytycznych z wykorzystaniem cytometrii przepływowej	50
3.2.7. Ocena zahamowania proliferacji komórek nowotworowych z wykorzystaniem kolorymetrycznego testu MTT	51
3.2.8. Oznaczenie poziomu ekspresji genów z wykorzystaniem metody PCR w czasie rzeczywistym	51
3.2.8.1. Izolacja całkowitego RNA z komórek	51
3.2.8.2. Oznaczanie stężenia i czystości RNA	52
3.2.8.3. Reakcja odwrotnej transkrypcji	52
3.2.8.4. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym	53
3.2.9. Ocena stężenia cytokin w nadsączach z nad hodowli komórkowych z wykorzystaniem testu ELISA	53
3.2.10. Produkcja plazmidowego DNA	54
3.2.10.1. Transformacja bakterii chemikompetentnych metodą szoku cieplnego	54
3.2.10.2. Izolacja plazmidowego DNA „na małą skalę”	55
3.2.10.3. Izolacja plazmidowego DNA „na dużą skalę”	55
3.2.10.4. Oznaczanie stężenia i czystości plazmidowego DNA oraz analiza restrykcyjna DNA	56
3.2.11. Produkcja i zagęszczanie wektorów lentiwirusowych	57
3.2.12. Oznaczanie miana wektorów lentiwirusowych	57
3.2.13. Transdukcja komórek dendrytycznych z wykorzystaniem wektorów lentiwirusowych ..	58
3.2.14. Ocena zdolności transdukowanych DC do pierwotnego pobudzenia komórek śledzionowych	59
3.2.14.1. Ocena fenotypu powierzchniowego pobudzonych komórek śledzionowych oraz ich zdolności do degranulacji określana na podstawie poziomu ekspresji cząsteczki CD107a	60
3.2.14.2. Ocena aktywności cytotoksycznej pobudzonych komórek śledzionowych	60
3.2.15. Doświadczenia terapeutyczne	61
3.2.15.1. Wszczepienie komórek nowotworowych	61
3.2.15.2. Przygotowanie szczepionek komórkowych na bazie dojrzałych komórek dendrytycznych	61
3.2.15.3. Schematy doświadczeń terapeutycznych	61
3.2.16. Oznaczenie wielkości populacji komórek limfoidalnych i mieloidalnych w śledzionach oraz guzach metodą cytometrii przepływowej	63
3.2.17. Oznaczenie wielkości populacji komórek limfoidalnych i komórek dendrytycznych w węzłach chłonnych drenujących nowotwór metodą cytometrii przepływowej	64
3.2.18. Restymulacja komórek śledzionowych	65
3.2.18.1. Przygotowanie jednowarstwowej hodowli komórek MC38	65
3.2.18.2. Przygotowanie komórek efektorowych	65
3.2.18.3. Ocena aktywności restymulowanych komórek śledzionowych	66
3.2.19. Analiza statystyczna wyników	66
4. Wyniki	67
4.1. Wpływ metotreksatu oraz nanokoniugatu metotreksatu i hydroksyetyloskrobi na zahamowanie proliferacji komórek linii nowotworowych	67

4.2. Określenie efektu przeciwnowotworowego chemioterapii z udziałem metotreksatu lub nanokoniuugatu metotreksatu i hydroksyetyloskrobi.....	69
4.2.1. Wzrost guzów MC38 u myszy poddanych chemioterapii	69
4.2.2. Ocena lokalnej odpowiedzi przeciwnowotworowej u myszy poddanych chemioterapii .	71
4.2.2.1. Populacje komórek limfoidalnych w guzach MC38.....	71
4.2.2.2. Populacje komórek mieloidalnych w guzach MC38	75
4.2.3. Ocena ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej u myszy poddanych chemioterapii	86
4.2.3.1. Populacje komórek limfoidalnych w śledzionach pobranych od myszy obarczonych nowotworem MC38	86
4.2.3.2. Populacje komórek mieloidalnych w śledzionach pobranych od myszy obarczonych nowotworem MC38	90
4.2.3.3. Zdolność komórek śledzionowych do aktywowania swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej w następstwie ponownego kontaktu z komórkami MC38...	94
4.2.4. Podsumowanie.....	97
4.3. Określenie efektu przeciwnowotworowego chemioimmunoterapii z udziałem MTX lub HES-MTX oraz szczepionek komórkowych na bazie dojrzałych komórek dendrytycznych.....	98
4.3.1. Wzrost guzów MC38 u myszy poddanych chemioimmunoterapii.....	98
4.3.2. Ocena lokalnej odpowiedzi przeciwnowotworowej u myszy poddanych chemioimmunoterapii	100
4.3.2.1. Populacje komórek limfoidalnych w guzach MC38.....	100
4.3.2.2. Populacje komórek mieloidalnych w guzach MC38	103
4.3.2.3. Populacje komórek limfoidalnych w węzłach chłonnych drenujących nowotwór MC38	106
4.3.2.4. Aktywność komórek dendrytycznych obecnych w węzłach chłonnych drenujących nowotwór MC38	109
4.3.3. Ocena ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej u myszy poddanych chemioimmunoterapii	111
4.3.3.1. Populacje komórek limfoidalnych w śledzionach pobranych od myszy obarczonych nowotworem MC38	111
4.3.3.2. Populacje komórek mieloidalnych w śledzionach pobranych od myszy obarczonych nowotworem MC38	113
4.3.3.3. Zdolność komórek śledzionowych do aktywowania swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej w następstwie ponownego kontaktu z komórkami MC38.	114
4.3.4. Podsumowanie.....	117
4.4. Określenie aktywności komórek dendrytycznych z wyciszoną ekspresją IL-10R	119
4.4.1. Określenie supresorowego wpływu IL-10 na dojrzewanie komórek dendrytycznych ...	119
4.4.2. Określenie czynników indukujących zwiększenie ekspresji IL-10R oraz fosforylacji czynnika STAT3 w komórkach dendrytycznych.....	120
4.4.3. Określenie kinetyki i skuteczności wyciszenia IL-10R w komórkach dendrytycznych z wykorzystaniem wybranych sekwencji shRNA	121
4.4.3.1. Kinetyka wyciszenia IL-10R w komórkach dendrytycznych po stymulacji LPS...	122
4.4.3.2. Kinetyka wyciszenia IL-10R w komórkach dendrytycznych po stymulacji TAg ..	123

4.4.3.3. Określenie wpływu wyciszenia ekspresji IL-10R na zmiany w fenotypie i w aktywności komórek dendrytycznych stymulowanych TAg	123
4.4.4. Podsumowanie	129
4.5. Określenie efektu przeciwnowotworowego chemioimmunoterapii z udziałem MTX lub HES-MTX oraz szczepionek komórkowych na bazie dojrzałych komórek dendrytycznych z wyciszoną ekspresją receptora IL-10.....	130
4.5.1. Wzrost guzów MC38 u myszy poddanych chemioimmunoterapii	130
4.5.2. Ocena lokalnej odpowiedzi przeciwnowotworowej u myszy poddanych chemioimmunoterapii	132
4.5.2.1. Populacje komórek limfoidalnych w guzach MC38	132
4.5.2.2. Populacje komórek mieloidalnych w guzach MC38	135
4.5.2.3. Populacje komórek limfoidalnych w węzłach chłonnych drenujących nowotwór .	139
4.5.2.4. Aktywność komórek dendrytycznych w węzłach chłonnych drenujących nowotwór MC38	141
4.5.3. Ocena ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej u myszy poddanych chemioimmunoterapii	142
4.5.3.1. Populacje komórek limfoidalnych w śledzionach myszy obciążonych nowotworem MC38	142
4.5.3.2. Populacje komórek mieloidalnych w śledzionach myszy obciążonych nowotworem MC38	144
4.5.3.3. Zdolność komórek śledzionowych do aktywowania swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej w następstwie ponownego kontaktu z komórkami MC38.	146
4.5.4. Podsumowanie	149
4.6. Końcowe podsumowanie wyników	151
5. Dyskusja.....	153
6. Wnioski	164
7. Suplement	165
Spis rycin i tabel	168
Piśmiennictwo	173

Wykaz skrótów

- APC** (*antigen presenting cells*) – komórki prezentujące antygen;
- CAR** (*chimeric antigen receptor*) – chimeryczny receptor antygenowy;
- CCL** (*CC chemokine ligand*) – chemokina CC;
- CCR** (*CC chemokine receptor*) – receptor chemokin CC;
- CD** (*cluster of differentiation*) – kompleks różnicowania;
- cDC** (*classical DC*) – klasyczne DC;
- CDP** (*common DC progenitor*) – wspólna komórka progenitorowa DC;
- CTLA-4** (*cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*) – antygen 4 związany z limfocytom T cytotoksycznym ;
- CXCL** (*CXC chemokine ligand*) – chemokina CXC;
- DAMP** (*damage-associated molecular patterns*) – wzorce molekularne związane z uszkodzeniem;
- DAPI** (*4',6-diamidino-2-phenylindole*) – 4',6-diamidyno-2-fenylindol;
- DC** (*dendritic cells*) – komórki dendrytyczne;
- DMEM** (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) – podłoże hodowlane;
- dsRNA** (*double strand RNA*) – podwójna nić RNA;
- EDTA** (*ethylenediaminetetraacetic acid*) – kwas etylenodiaminotetraoctowy;
- EGF** (*epidermal growth factor*) – nabłonkowy czynnik wzrostu;
- ELISA** (*enzyme-linked immunosorbent assay*) – test immunoenzymatyczny;
- EMA** (*European Medicines Agency*) – Europejska Agencja Leków;
- EPR** (*enhanced vascular permeability and retention*) – zwiększona przepuszczalność i retencja naczyń krwionośnych;
- FasL** (*Fas ligand*) – ligand Fas;
- FBS** (*fetal bovine serum*) – płodowa surowica bydłęca;
- FDA** (*Food and Drug Administration*) – amerykańska Agencja Żywności i Leków;
- FR** (*folate receptor*) – receptor folianów;
- GM-CSF** (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów;
- HES** (*hydroxyethyl starch*) – hydroksyetyloskrobia;
- HES-MTX** – nanokoniugat metotreksatu i hydroksyetyloskrobi;
- HIV** (*human immunodeficiency virus*) – ludzki wirus niedoboru odporności;
- HMGB1** (*high mobility group box 1*) – białko o dużej ruchliwości elektroforetycznej;
- HSC** (*hematopoietic stem cell*) – hematopoetyczna komórka macierzysta;
- i.c.** (*isotype control*) – kontrola izotypowa;
- i.v.** (*intravenously*) – dożylnie;
- IDO** (*indoleamine 2,3-dioxygenase*) – 2,3-dioksygenaza indoloaminy;
- IFN** (*interferon*) – interferon;
- IL** (*interleukin*) – interleukina;
- IL-10R** – receptor IL-10;
- JAK1** (*Janus-activated kinase 1*) – kinaza Janusowa 1;
- LB** (*lysogeny broth*) – pożywka hodowlana;
- LDL** (*low density lipoprotein*) – lipoproteina o niskiej gęstości;

LPS – lipopolisacharyd;	PD-1 (<i>programmed death 1</i>) – receptor 1 programowanej śmierci;
LTR (<i>long terminal repeats</i>) – powtarzalna sekwencja końcowa;	pDC (<i>plasmacytoid DC</i>) – plazmacytoidalne DC;
LV (<i>lentivirus</i>) – lentiwirus;	PD-L (<i>programmed death ligand</i>) – ligand receptora programowanej śmierci;
MAGE-3 (<i>melanoma-associated antigen 3</i>) – antygen 3 związany z czerniakiem;	PEG (<i>polyethylene glycol</i>) – glikol polietylenowy;
MART-1 (<i>melanoma antigen recognized by T cells 1</i>) – antygen 1 czerniaka rozpoznawany przez limfocyty T;	PEI (<i>polyethylenimine</i>) – polietylenoimina;
M-CSF (<i>macrophage colony-stimulating factor</i>) – czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów;	PI (<i>propidium iodide</i>) – jodek propidyny;
MDSC (<i>myeloid-derived suppressor cells</i>) – komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego;	PMA (<i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i>) – 12-mirystynian, 13-octan forbolu;
MHC (<i>major histocompatibility complex</i>) – główny układ zgodności tkankowej;	PMN-MDSC (<i>polymorphonuclear MDSC</i>) – granulocytarne MDSC;
miRNA – mikroRNA;	PRR (<i>pattern-recognition receptors</i>) – receptory rozpoznające wzorce;
M-MDSC (<i>monocytic MDSC</i>) – monocytarne MDSC;	RFC (<i>reduced folate carrier</i>) – przenośnik zredukowanych folianów;
MTT (<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>) – bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenyloitetrazoliowy;	RISC (<i>RNA-induced silencing complex</i>) – indukowany przez RNA kompleks wyciszający;
MTX (<i>methotrexate</i>) – metotreksat;	RNAi (<i>RNA interference</i>) – interferencja RNA;
NK (<i>natural killer</i>) – naturalna komórka cytotoksyczna;	RNS (<i>reactive nitrogen species</i>) – reaktywne formy azotu;
NKG2D (<i>natural-killer group 2, member D</i>) – aktywujący receptor komórek NK;	ROS (<i>reactive oxygen species</i>) – reaktywne formy tlenu;
NKT (<i>natural killer T cells</i>) – naturalna komórka cytotoksyczna mająca cechy limfocytu T;	RPMI (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>) – podłoże hodowlane;
OVA (<i>ovalbumin</i>) – owalbumina;	RRE (<i>Rev response element</i>) – element odpowiedzi Rev;
p.t. (<i>peritumorally</i>) – okołoguzowo;	s.c. (<i>subcutaneously</i>) – podskórnice;
PAP (<i>prostatic acid phosphatase</i>) – kwaśna fosfataza prostaty;	shIL-10R – sekwencja shRNA skierowana przeciwko mysiemu genowi kodującemu IL-10R;
PBS (<i>phosphate-buffered saline</i>) – zbuforowany roztwór soli fizjologicznej;	shN – sekwencja shRNA skierowana przeciwko ludzkiemu genowi kodującemu GAPDH;

- shRNA** (*short hairpin RNA*) – krótkie RNA o strukturze spinki do włosów;
- siRNA** (*small interfering RNA*) – krótkie interferujące RNA;
- SOC** (*super optimal catabolite repression*) – pożywka hodowlana;
- STAT** (*signal transducer and activator of transcription*) – transduktor sygnału i aktywator transkrypcji;
- TAA** (*tumor associated antigens*) – antygeny związane z nowotworem;
- TAg** (*tumor antigens*) – antygeny nowotworowe obecne w lizacie komórek MC38;
- TAM** (*tumor-associated macrophages*) – makrofagi związane z nowotworem;
- TCR** (*T cell receptor*) – receptor limfocytu T;
- TGF- β** (*transforming growth factor β*) – transformujący czynnik wzrostu β ;
- TGI** (*tumor growth inhibition*) – zahamowanie wzrostu nowotworu;
- Th** (*T helper*) – limfocyty T pomocnicze;
- TLR** (*Toll like receptor*) – receptor Toll-podobny;
- TMB** (*3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine*) – tetrametylobenzydina;
- TME** (*tumor microenvironment*) – mikrośrodowisko nowotworu;
- TNF** (*tumor necrosis factor*) – czynnik martwicy nowotworu;
- TRAIL** (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) – ligand TNF indukujący apoptozę;
- TRAIL-R** (*TRAIL receptor*) – receptor TRAIL;
- Treg** (*T regulatory*) – limfocyt T regulatorowy;
- Tyk2** (*non-receptor tyrosine-protein kinase 2*) – kinaza tyrozynowa 2;
- VEGF** (*vascular endothelial growth factor*) – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego;
- VSV-G** (*vesicular stomatitis virus G glycoprotein*) – glikoproteina G wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej.

Streszczenie

Wykorzystanie szczepionek na bazie komórek dendrytycznych (DC) w terapii przeciwnowotworowej jest obiecującym rozwiązaniem stosowanym w badaniach przedklinicznych i klinicznych. Jednak pomimo ogromnego potencjału DC w pobudzaniu swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej, efekt terapeutyczny obserwowany po ich podaniu jest umiarkowany. Jednym z powodów zmniejszających skuteczność tej terapii jest obecność w mikrośrodkowisku nowotworu (TME) interleukiny 10 (IL-10), która zaburza prawidłowe funkcjonowanie DC. Z tego względu podejmowane są próby odpowiedniego przygotowania szczepionkowych DC zdolnych do inicjowania wydajnej odpowiedzi przeciwnowotworowej w niekorzystnych warunkach środowiskowych. Dodatkowo, w celu zwiększenia skuteczności immunoterapii, schematy leczenia uzupełnia się o podanie cytostatyków, które użyte w odpowiedniej dawce doprowadzą do eliminacji komórek nowotworowych oraz modulacji odpowiedzi odpornościowej. Ten efekt może zostać zwiększony poprzez zastosowanie chemioterapeutyków przyłączonych do nośników, które zapewniają wydajniejszą akumulację leku w tkance nowotworowej.

Celem niniejszej pracy było określenie aktywności przeciwnowotworowej skojarzonej terapii opartej na immunomodulującej dawce nanokoniugatu metotreksatu i hydroksyetyloskrobi (HES-MTX) oraz dojrzałych komórek dendrytycznych z wyciszoną ekspresją receptora IL-10 (DC/IL-10R/TAg) stosowanej w mysim modelu raka jelita grubego MC38.

Zastosowanie nanokoniugatu w dawce 20 mg/kg doprowadziło do modulacji odpowiedzi odpornościowej oraz do zahamowania wzrostu nowotworu. Efektem tej terapii było zwiększenie wielkości populacji komórek efektorowych oraz wzmocnienie ich aktywności cytotoksycznej. W rezultacie stworzone zostały korzystne warunki do inicjowania odpowiedzi przeciwnowotworowej przez podawane okołoguzowo szczepionki na bazie dojrzałych DC. Jednak ze względu na obecność IL-10 w TME odpowiedź odpornościowa uległa osłabieniu. Rozwiązaniem tego problemu było wyciszenie ekspresji receptora IL-10 w DC prowadzące do obniżenia wrażliwości tych komórek na supresorowy wpływ tej cytokiny. Zastosowanie terapii złożonej z immunomodulującej dawki nanokoniugatu oraz DC/IL-10R/TAg spowodowało znaczące zahamowanie rozwoju guzów MC38. Było to spowodowane zwiększonym napływem efektorowych komórek odpornościowych do tkanki guza, przy jednoczesnej redukcji wielkości populacji komórek o cechach supresorowych oraz indukcji wydajnej i swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki wskazują, że po podaniu HES-MTX w dawce 20 mg/kg doszło do wytworzenia korzystnej niszy środowiskowej. Umożliwiło to szczepionkowym DC rozwój odpowiedzi przeciwnowotworowej, a efekt terapeutyczny został zwiększony w rezultacie zastosowania DC o obniżonej wrażliwości na działanie IL-10 obecnej w nowotworze MC38.

Abstract

Estimation of antitumor activity of chemoimmunotherapy with nanoconjugates of methotrexate and vaccines based on dendritic cells with silenced IL-10 receptor expression

The use of dendritic cell (DCs)-based vaccines in anti-cancer therapy is a promising strategy for preclinical and clinical trials. However, despite of DC's great potential to stimulate a specific anti-tumor immune response, the therapeutic effect observed after their administration is moderate. Factors influencing this include, but are not limited to, the presence of interleukin-10 (IL-10) in the tumor microenvironment (TME), which hampers the proper function of DCs. Therefore, attempts are being made to prepare DCs capable of initiating an efficient anti-tumor immune response in adverse environmental conditions. Moreover, in order to improve the effectiveness of immunotherapy, the treatment strategies are supplemented with the administration of cytostatics which administered in an appropriate dose, lead to the cancer cells elimination and the modulation of the immune response. Furthermore, this effect can be enhanced by the use of cytostatics attached to carriers ensuring more efficient accumulation of drug in the tumor tissue.

The aim of this study was to determine the antitumor activity of chemoimmunotherapy with methotrexate and hydroxyethyl starch nanoconjugate (HES-MTX) applied in immunomodulating dose and supported by vaccines based on mature DCs with IL-10 receptor silenced expression (DC/IL-10R/TAg) in murine colon carcinoma MC38 model.

The use of nanoconjugate in the dose of 20 mg/kg contributed to the modulation of the immune response and inhibition of tumor growth. This treatment resulted in an increase in the size of the effector cell populations and an enhancement of their cytotoxic activity. Consequently, beneficial conditions for initiation of an anti-tumor immune response by injected peritumorally mature DC were created. However, due to the presence of IL-10 in TME, the immune response was impaired. In order to solve this obstacle, the expression of the IL-10 receptor in DCs was downregulated. This, in turn, led to obtaining DCs with reduced sensitivity to the suppressive influence of this cytokine. The application of the therapy consisting of an immunomodulating dose of HES-MTX and DC/IL-10R/TAg caused a significant inhibition of MC38 tumor development. This was due to the increased influx of effector cells into the tumor tissue, accompanied by a reduction in the size of the population of cells with suppressor activity, as well as the induction of an efficient and specific anti-cancer immune response.

The results presented in this study indicate that a favorable environmental niche was created after the administration of 20 mg/kg of HES-MTX. This enabled the DC to develop an anti-tumor immune response, and the therapeutic effect was enhanced as a result of the use of DCs with decreased sensitivity to the influence of IL-10 present in MC38 tumor.

1. Wstęp

1.1. Rola komórek dendrytycznych w aktywowaniu odpowiedzi przeciwnowotworowej

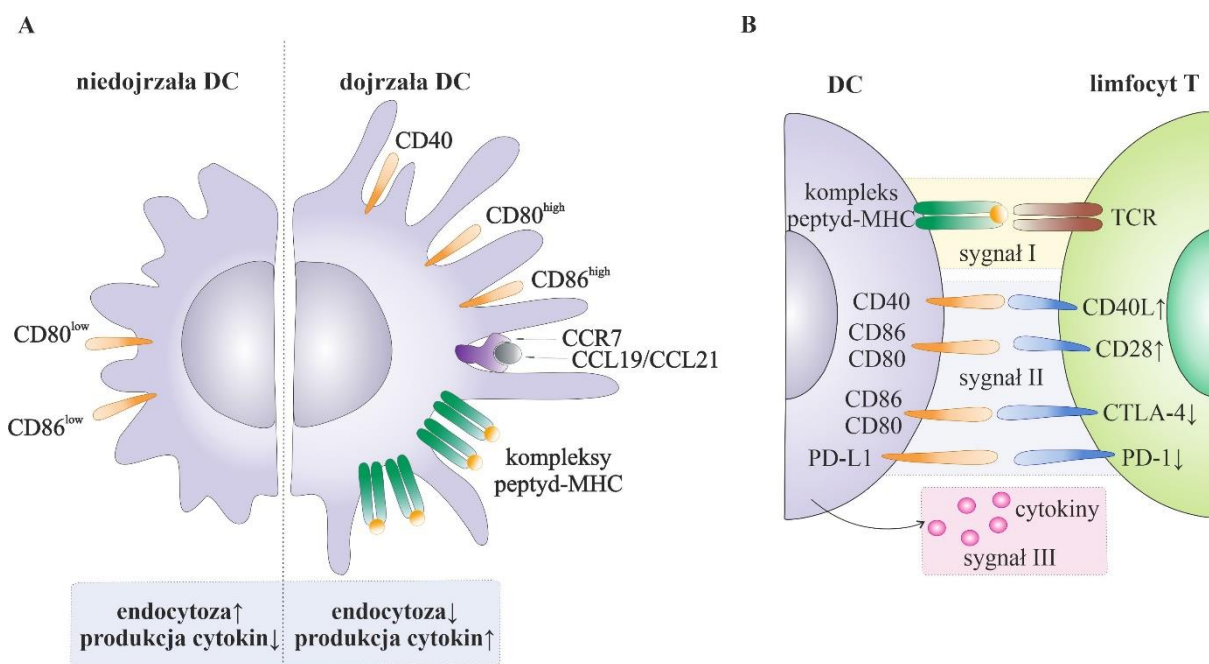
Eliminacja komórek nowotworowych jest możliwa dzięki wysoce skoordynowanemu działaniu wielu populacji komórek układu odpornościowego. Aktywowanie swoistych wobec nowotworu limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ głównie zależy od komórek prezentujących antygen (ang. *antigen presenting cells*; APC), które wychwytyują, przetwarzają i prezentują antygeny dziewiczym limfocytom T. Do APC zaliczamy m.in. komórki dendrytyczne, limfocyty B oraz makrofagi. Komórki dendrytyczne (ang. *dendritic cells*; DC) są uznawane za profesjonalne APC, głównie ze względu na swoją precyzję i skuteczność w inicjowaniu odpowiedzi odpornościowej [Palucka, Banchereau 2012; Steinman 2012].

Populacja DC została po raz pierwszy zidentyfikowana przez zespół Ralphi Steinmana [Steinman, Cohn 1973]. Przez kolejne lata poznano ich funkcje jako profesjonalnych komórek prezentujących antygeny. Wyodrębniono także poszczególne subpopulacje DC i określono ich biologiczne właściwości [Banchereau i in. 2000; Guilliama i in. 2016] oraz opracowano protokoły pozwalające na otrzymywanie DC w warunkach *ex vivo* [Inaba i in. 1992; Sallusto, Lanzavecchia 1994]. Wszystkie te osiągnięcia, które dokonały się na przestrzeni kilku dekad, pozwoliły na wykorzystanie w terapii przeciwnowotworowej niebywałego potencjału DC do aktywowania swoistej odpowiedzi odpornościowej.

Komórki te stanowią wysoce heterogenną populację, w której można wydzielić wiele subpopulacji, w zależności od przyjętego kryterium podziału (funkcji, fenotypu, umiejscowienia w tkankach organizmu). Jednak najczęściej stosuje się podział DC na subpopulacje plazmacytoidalnych DC (pDC) lub mieloidalnych DC, zwanych także klasycznymi (cDC). Obie te subpopulacje powstają w szpiku kostnym i wywodzą się z hematopoetycznych komórek macierzystych (ang. *hematopoietic stem cell*; HSC), które ulegając kolejnym etapom różnicowania zmieniają się we wspólne komórki progenitorowe DC (ang. *common DC progenitor*; CDP). Rezultatem dalszego przekształcania komórek CDP jest utworzenie pDC lub prekursorów cDC [Merad i in. 2013].

Warto zaznaczyć, że niezależnie od typu subpopulacji, do której zostaną zaklasyfikowane DC, są one zdolne do działania w dwóch funkcjonalnie odrębnych stanach: niedojrzałym i dojrzałym (Ryc. 1 A). Niedojrzałe DC cechuje duża aktywność endocytarna umożliwiająca pochłanianie antygenów z otoczenia. W tym stanie DC syntetyzują duże ilości cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej (ang. *major histocompatibility complex*; MHC) klasy I i II, jednak przemieszczanie kompleksów peptyd-MHC na powierzchnię komórek jest niewielkie. Ponadto takie niedojrzałe komórki charakteryzują się niską ekspresją cząsteczek kostymulujących oraz

niewielką produkcją cytokin [Hubo i in. 2013; Mellman 2013]. DC posiadają szeroki wachlarz receptorów umożliwiający im rozpoznanie pochłanianych antygenów. W kontekście antygenów pochodzących z komórek nowotworowych, największe znaczenie mają tzw. wzorce molekularne związane z uszkodzeniem (ang. *damage-associated molecular patterns*; DAMP), które są przyłączane do receptorów rozpoznających wzorce (ang. *pattern-recognition receptors*; PRR). Wśród cząsteczek DAMP wyróżniamy m.in. białko HMGB1 (ang. *high mobility group box 1*), białka szoku cieplnego oraz kalretikulinę [Gardner, Ruffell 2016].



Ryc. 1. Różnice pomiędzy niedojrzałą i dojrzałą DC (A). Oddziaływanie dojrzałych DC z dziewiczymi limfocytami T w obszarze synapsy immunologicznej (B) (na podstawie Hubo i in. 2013).

Po internalizacji i rozpoznaniu antygeny, rozpoczyna się proces jego szybkiego przetwarzania, a jednocześnie zmniejsza się zdolność DC do endocytozy. Następnie utworzony kompleks peptyd-MHC jest transportowany na powierzchnię komórek [Mellman 2013]. Komórki dendrytyczne radykalnie zmieniają swoją budowę oraz fenotyp – wypustki ulegają wydłużeniu, co nadaje komórkom charakterystyczny wygląd, a dodatkowo zwiększa się ekspresja cząsteczek kostymulujących oraz produkcja cytokin [Merad i in. 2013; Palucka, Banchereau 2013]. Tak wyposażone komórki następnie przemieszczają się w kierunku węzłów chłonnych. Ten proces jest możliwy dzięki zwiększonej ekspresji receptorów chemokin CCR7, które warunkują migrację komórek zgodnie z wzrastającym gradientem chemokin (CCL19 i CCL21) [Platt, Randolph 2013]. Po dotarciu do węzłów chłonnych dojrzałe DC aktywują dziewicze limfocyty T, a cały proces odbywa się w synapsie immunologicznej (Ryc. 1 B).

Do pełnej aktywacji antygenowo-swoistych limfocytów T są niezbędne trzy sygnały. Najważniejszy z nich jest sygnał pierwszy, który pochodzi z oddziaływania kompleksu peptyd-

MHC z receptorem TCR (ang. *T cell receptor*) na powierzchni dziewiczych limfocytów T. Antygeny pochodzenia egzogenne są prezentowane limfocytom T CD4⁺ w kontekście cząsteczek MHC klasy II, natomiast antygeny pochodzenia endogenne eksponowane z cząsteczkami MHC klasy I są prezentowane limfocytom T CD8⁺. Ponadto DC są wyspecjalizowane w prezentacji krzyżowej, w której egzogenne antygeny są przedstawiane dziewiczemu limfocytom T CD8⁺ w kontekście cząsteczek MHC klasy I [Merad i in. 2013; Sánchez-Paulete i in. 2017].

Drugi sygnał aktywacyjny pochodzi z oddziaływania cząsteczek kostymulujących CD80/CD86 zlokalizowanych na powierzchni komórki dendrytycznej z cząsteczką CD28 na dziewiczym limfocycie T. Rezultatem ich wzajemnego połączenia jest produkcja IL-2, która wpływa na dalszą aktywację i proliferację limfocytów T [Hubo i in. 2013]. Dodatkowo pod wpływem silnego pobudzenia cząsteczki CD28 dochodzi do destabilizacji receptora IL-10 na powierzchni dziewiczego limfocyta T, co blokuje możliwość ich różnicowania w kierunku komórek Treg [Tuettenberg i in. 2009]. Do cząsteczek kostymulujących zaliczamy także CD40 występującą na powierzchni DC, której ligandem jest cząsteczka CD40L obecna na limfocytach T. Ich silne wzajemne oddziaływanie prowadzi do wzrostu ekspresji cząsteczek MHC oraz innych molekuł kostymulujących na powierzchni DC, a także pobudza te komórki do zwiększonego wydzielania IL-12. Brak sygnału pochodzącego z cząsteczek kostymulujących wprowadza limfocyty w stan anergii [Hubo i in. 2013]. Należy wspomnieć, że na powierzchni DC znajdują się cząsteczki PD-L1 oraz PD-L2 będące ligandami dla receptorów programowanej śmierci komórki PD-1 (ang. *programmed death receptor 1*), które występują na powierzchni limfocytów T. Oddziaływanie PD-L1/PD-1 wprowadza limfocyty na szlak apoptozy i w warunkach prawidłowych ten mechanizm jest wykorzystywany do eliminacji komórek autoreaktywnych [Schmidt i in. 2012].

Elementem zapewniającym kierunek polaryzacji odpowiedzi odpornościowej jest tzw. trzeci sygnał, pochodzący z cytokin zarówno tych wydzielanych przez DC, jak i obecnych w otoczeniu. Pod wpływem IL-12 następuje różnicowanie dziewiczych limfocytów T CD4⁺ do komórek typu Th1 [Macatonia i in. 1995]. Ponadto ta cytokina wspomaga aktywność cytotoksyczną limfocytów T CD8⁺ [Curtsinger i in. 2003]. Przekształcenie limfocytów T CD4⁺ w kierunku komórek Th2 jest uzależnione od obecności IL-4 [Zhu 2018]. Z kolei cytokiny o właściwościach supresorowych takie jak IL-10 lub TGF-β warunkują polaryzację komórek w kierunku limfocytów Treg [O'Garra, Vieira 2004]. Zatem, aby DC aktywowały wydajną odpowiedź przeciwnowotworową, zależną od swoistych antygenów limfocytów T, niezbędne jest pojawienie się wszystkich trzech sygnałów, przy czym decydujące znaczenie mają warunki mikrośrodowiskowe panujące w synapsie immunologicznej.

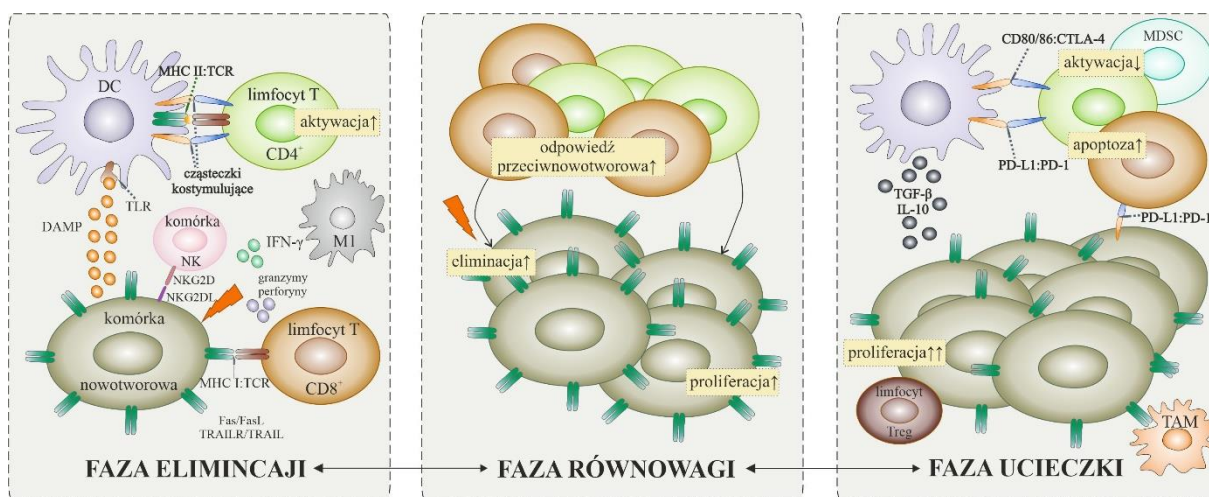
Należy podkreślić, że komórki dendrytyczne także modulują aktywność komórek NK i komórek NKT. Głównym czynnikiem stymulującym działanie komórek NK są cytokiny wydzielane przez DC, takie jak IL-12, IL-15 oraz IFN-α. Pod ich wpływem dochodzi

do zwiększenia proliferacji oraz aktywności cytotoksycznej komórek NK [Jacobs i in. 2021]. Z kolei w przypadku komórek NKT, ich pobudzenie następuje na drodze bezpośredniego kontaktu z DC, które prezentują egzogenne glikolipidowe antygeny w kontekście cząsteczek CD1d. Ponadto na powierzchni komórek NKT występują cząsteczki CD40L. W wyniku oddziaływania cząsteczek CD40/CD40L dochodzi do stymulacji komórek NKT do wydzielania IFN- γ . Dodatkowo obserwowana jest aktywacja DC, która prowadzi do zwiększonej produkcji IL-12, co pogłębia potencjał przeciwnowotworowy komórek NKT [Keller i in. 2017].

Jak zostało omówione powyżej, aby pobudzenie wydajnej odpowiedzi przeciwnowotworowej było możliwe, niezbędne jest prawidłowe funkcjonowanie i wzajemne oddziaływanie wielu różnych populacji komórek odpornościowych. Należy jednak podkreślić, że poza eliminacją komórek nowotworowych, układ odpornościowy odgrywa także istotną rolę w progresji choroby nowotworowej, co przedstawiono w kolejnej części wstępu.

1.2. Rola układu odpornościowego w progresji choroby nowotworowej

Rozwój nowotworu jest wieloetapowym procesem, w którym istotnym czynnikiem jest akumulacja mutacji genetycznych, prowadząca do powstania zaburzeń w regulowaniu proliferacji komórek. Nieograniczona zdolność do podziałów jest jedną z wielu charakterystycznych cech nowotworu (ang. *hallmarks of cancer*), do których zalicza się także: brak wrażliwości na sygnały warunkujące hamowanie wzrostu komórek, niezależnienie od sygnałów wzrostowych, tworzenie przerzutów, nieustanna angiogeneza, unikanie apoptozy, zmiana metabolizmu komórek oraz ucieczka komórek nowotworowych spod nadzoru immunologicznego [Hanahan, Weinberg 2000, 2011]. Pierwsze postulaty wskazujące na udział układu odpornościowego w eliminacji komórek nowotworowych sięgają początku dwudziestego wieku, gdy Paul Ehrlich wnioskuje, że pojawiające się komórki nowotworowe są wykrywane i na bieżąco usuwane przez komórki układu odpornościowego. W połowie dwudziestego wieku, Thomas i Burnet postawili podobną hipotezę, która została określona mianem nadzoru immunologicznego. Potwierdzenie tej teorii nastąpiło znacznie później, po przeprowadzeniu doświadczeń z wykorzystaniem modeli nowotworów powstających spontanicznie, jak i indukowanych chemicznie, które rozwijały się u myszy z upośledzonym układem odpornościowym [Kim i in. 2007; Ribatti 2017]. Dalsze badania w tym obszarze pozwoliły na określenie dokładnej roli jaką pełni układ odpornościowy w progresji choroby nowotworowej, a proces ten nazywany jest immunoredagowaniem, w ramach którego wyróżniamy fazy: eliminacji, równowagi oraz ucieczki [Dunn i in. 2004] (Ryc. 2).



Ryc. 2. Ucieczka komórek nowotworowych spod nadzoru immunologicznego i udział komórek układu odpornościowego w procesie immunoredagowania (na podstawie Kalbasi i in. 2013).

1.2.1. Immunoredagowanie odpowiedzi przeciwnowotworowej

W fazie eliminacji, gdy komórki nowotworowe są nadal rozpoznawane przez układ odpornościowy, wykorzystywane są mechanizmy odpowiedzi odpornościowej nabytej i wrodzonej. Na tym etapie na powierzchni komórek nowotworowych prezentowane są antygeny w kontekście cząsteczek MHC klasy I oraz ligandy dla NKG2D, które odpowiednio są rozpoznawane przez: efektorowe limfocyty T CD8⁺ oraz komórki NK. Ponadto na powierzchni zniszczonych komórek nowotworowych obecne są cząsteczki kalretikuliny, które rozpoznawane są przez komórki fagocytyczne [Mittal i in. 2014]. Dodatkowo komórki nowotworowe wydzielają DAMP, które pobudzają APC napływające do powstającej tkanki nowotworowej [Hernandez i in. 2016]. Komórki dendrytyczne wykorzystując prezentację krzyżową pochłoniętych antygenów aktywują limfocyty T oraz komórki NKT. Takie komórki efektorowe wydzielają IFN-γ, który wpływa na zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych. Nadrzędna rola IFN-γ w procesie usuwania komórek nowotworowych została potwierdzona w badaniach z wykorzystaniem myszy pozbawionych szlaku sygnałowego dla tej cytokiny [Kaplan i in. 1998] lub pozbawionych odporności nabytej [Shankaran i in. 2001]. U tych myszy proces indukowanej kancerogenezy postępował w szybszym tempie niż u myszy szczepu dzikiego. Innym mechanizmem prowadzącym do eliminacji powstałych komórek nowotworowych jest aktywność cytotoksyczna limfocytów T CD8⁺ wynikająca z wydzielania perforyny i granzymów, a także z wprowadzania komórek nowotworowych na szlak apoptozy poprzez oddziaływanie Fas/FasL lub TRAIL/TRAIL-R [Schreiber i in. 2011]. Na poziomie wrodzonej odpowiedzi odpornościowej, znaczący udział w eliminacji komórek nowotworowych odgrywają makrofagi typu M1 oraz granulocyty, które produkując czynniki prozapalne (IL-1, IL-12, TNF-α) przygotowują odpowiednie warunki umożliwiające rozwój komórkowej odpowiedzi odpornościowej [Mittal i in. 2014]. W sytuacji gdy komórki nowotworowe nie zostaną całkowicie usunięte, proces immunoredagowania przechodzi

w fazę równowagi uznawanej za najdłużej trwający okres w rozwoju choroby nowotworowej. Powstające nieprawidłowe komórki są rozpoznawane i nieustannie eliminowane z wykorzystaniem mechanizmów nabytej odpowiedzi odpornościowej. Na tym etapie dochodzi także do selekcji komórek nowotworowych. Ponadto pod wpływem presji wywołanej przez układ odpornościowy takie komórki zmieniają swoje właściwości i cechy, które umożliwiają im ucieczkę spod nadzoru immunologicznego [Dunn i in. 2004; Kim i in. 2007].

W fazie ucieczki, z jednej strony komórki nowotworowe nie są identyfikowane przez komórki układu odpornościowego, natomiast z drugiej strony, nowotwór przekształca otaczające go środowisko stwarzając odpowiednie warunki do dalszej progresji choroby. Jednym z mechanizmów wykorzystywanych przez komórki nowotworowe jest ograniczenie prezentacji własnych antygenów, poprzez zmniejszenie ekspresji cząsteczek MHC klasy I lub utracenie zdolności do przetwarzania antygeny i transportu powstałego epitopu na powierzchnię komórki. W rezultacie następuje dalsza nieograniczona proliferacja nieimmunogennych komórek nowotworowych, której towarzyszy wytworzenie swoistej niszy, zwanej mikrośrodowiskiem nowotworu (ang. *tumor microenvironment*; TME) [Schreiber i in. 2011].

1.2.2. Komórki układu odpornościowego obecne w mikrośrodowisku nowotworu i ich rola w tłumieniu odpowiedzi przeciwnowotworowej

W mikrośrodowisku nowotworu, poza proliferującymi komórkami nowotworowymi można wyodrębnić fibroblasty, komórki śródbłonna, elementy macierzy pozakomórkowej, a także leukocyty napływające do tkanki guza [Fu, Jiang 2018]. Na podstawie stopnia infiltracji tkanki guza przez komórki układu odpornościowego, które są zdolne do skutecznej odpowiedzi przeciwnowotworowej, można określić poziom immunogenności nowotworu. Wyróżnia się tzw. nowotwory „gorące” (ang. „*hot*” *tumors*) oraz nowotwory „zimne” (ang. „*cold*” *tumors*) [Duan i in. 2020; Liu, Sun 2021]. W przypadku nowotworów „gorących” ich cechą charakterystyczną jest obecność stanu zapalnego wywołanego przez pobudzone limfocyty T CD8⁺, które intensywnie napływają do tkanki guza. Efektem wzmożonej aktywności tych cytotoksycznych komórek, jest zwiększenie zawartości IFN- γ w środowisku, co także wspomaga uruchamianie mechanizmów odpowiedzi odpornościowej prowadzącej do eliminacji komórek nieprawidłowych. Ponadto w tkance nowotworowej tego typu, identyfikuje się zwiększone stężenie chemokin takich jak CCL5, CXCL9 oraz CXCL10, które wspomagają rekrutację limfocytów T. Inną cechą charakterystyczną dla tych guzów jest wysoka immunogenność komórek nowotworowych, która wynika z wysokiego poziomu ekspresji zmienionych antygenów nowotworowych (neoepitopów) rozpoznawanych przez komórki układu odpornościowego. Dodatkowo wzrasta ekspresja cząsteczek PD-L1 na powierzchni komórek nowotworowych, co wpływa na poprawę efektu terapeutycznego po zastosowaniu przeciwciał anti-PD-L1

[De Guillebon i in. 2020]. Natomiast w nowotworach „zimnych” limfocyty T CD8⁺ występują nielicznie i są głównie rozmieszczone w częściach marginalnych tkanki nowotworowej. Ponadto komórki nowotworowe są nierozpoznawalne przez komórki układu odpornościowego, bowiem poziom ekspresji neoepitopów oraz cząsteczek MHC klasy I na ich powierzchni jest niewielki [Liu, Sun 2021]. Zatem zastosowana terapia przeciwnowotworowa, poza eliminacją komórek nowotworowych, powinna przyczyniać się do zwiększenia napływu immunokompetentnych komórek układu odpornościowego do tkanki guza, tak aby przywrócić im cechy typowe dla nowotworów „gorących”.

Warto zaznaczyć, że infiltracja nowotworu przez komórki układu odpornościowego takie jak efektorowe limfocyty T, makrofagi typu M1, komórki NK oraz komórki dendrytyczne, szczególnie w początkowym etapie rozwoju choroby, jest kluczowa dla powstawania skutecznej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Niestety wraz z dalszym rozwojem choroby nowotworowej dochodzi do wytworzenia mikrośrodowiska nowotworu. Komórki nowotworowe wydzielając różne czynniki i substancje promują różnicowanie *in situ* oraz napływ do tkanki komórek o charakterze supresorowym. Zaliczamy do nich m.in. komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego, limfocyty T regulatorowe, makrofagi związane z nowotworem [Pitt i in. 2016]. Aktywność tych komórek wspomaga dalszą ekspansję tkanki nowotworu oraz osłabia wydajność tworzonej odpowiedzi przeciwnowotworowej, w konsekwencji prowadząc do dalszej progresji choroby.

1.2.2.1. Komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego

Komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego (ang. *myeloid-derived suppressor cells*; MDSC) są heterogenną populacją nieprawidłowo aktywowanych neutrofilii i monocytów, które charakteryzują silne właściwości immunosupresorowe. W obrębie MDSC wyróżnia się dwie subpopulacje: komórki monocytarne (ang. *monocytic MDSC*; M-MDSC) oraz granulocytarne (ang. *polymorphonuclear MDSC*; PMN-MDSC), które odróżniane są na podstawie charakterystyki fenotypowej i funkcjonalnej. Myszom komórki MDSC wyodrębnia się na podstawie ekspresji cząsteczek powierzchniowych Ly6C, Ly6G oraz CD11b, przy jednoczesnym braku markerów typowych dla limfocytów B, T oraz komórek NK [Bronte i in. 2016]. Porównując obie te subpopulacje, uważa się, że większą zdolność do osłabiania odpowiedzi odpornościowej wykazują komórki M-MDSC, mimo iż ich liczebność w tkance nowotworowej jest mniejsza niż PMN-MDSC [Groth i in. 2019]. Mechanizmy supresji wykorzystywane przez MDSC obejmują działanie pośrednie, przez cytokiny i enzymy wydzielane do środowiska, a także poprzez bezpośrednie oddziaływanie z komórkami odpornościowymi obecnymi w TME.

MDSC przez wzmożoną produkcję arginazy 1 doprowadzają do rozkładu argininy w TME. Deficyt tego aminokwasu powoduje utratę łańcucha ζ w receptorze limfocytów T, będącego jednym z kluczowych elementów podczas aktywacji tych komórek [Rodriguez i in. 2004]. Dodatkowo

MDSC wydzielają enzym IDO (2,3-dioksygenaza indoloaminy) odpowiedzialny za degradację tryptofanu do kinureniny. Efektem zmniejszenia dostępności tryptofanu jest zahamowanie aktywacji efektorowych limfocytów T, natomiast zwiększona zawartość kinureniny w środowisku, sprzyja powstawaniu limfocytów T regulatorowych [Munn, Mellor 2007]. Ponadto MDSC pobierając cysteinę ze środowiska, zmniejszają dostępność tego aminokwasu dla komórek prezentujących antygen. W rezultacie cysteina nie jest dostarczana przez APC podczas procesu prezentacji antygenów limfocytom T, co warunkuje zatrzymanie procesu aktywowania dziewiczych limfocytów T [Srivastava i in. 2010].

Pod wpływem wydzielanych przez MDSC reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*; ROS) i azotu (ang. *reactive nitrogen species*; RNS) dochodzi do powstania stresu oksydacyjnego w środowisku, który negatywnie oddziałuje na aktywność limfocytów T. Wykazano, iż pod wpływem RNS następują zmiany w kompleksie TCR-MHC, które uniemożliwiają limfocytom T prawidłowe rozpoznanie antygenów prezentowanych przez APC [Nagaraj i in. 2007]. MDSC ograniczają także zdolność pobudzonych limfocytów do migracji w kierunku węzłów chłonnych, ponieważ pod wpływem wydzielanego enzymu ADAM17 (ang. *A Disintegrin And Metalloproteinase 17*), dochodzi do pozbawienia limfocytów T cząsteczek L-selektyny (CD62L) [Ku i in. 2016].

Ze względu na produkowane cytokiny jak IL-10 i TGF- β komórki MDSC mają znaczący udział w ekspansji limfocytów Treg. Jednak kluczowym elementem, decydującym o aktywacji limfocytów Treg jest ich bezpośredni kontakt z komórkami MDSC. Pan i in. dowiedli, że oddziaływanie cząsteczki CD40 na powierzchni MDSC z cząsteczką CD40L limfocytów T w środowisku bogatym w supresorowe cytokiny prowadzi do proliferacji Treg [Pan i in. 2010]. Z kolei Poschke i in. wykazali, że jednym ze sposobów tłumienia odpowiedzi odpornościowej wykorzystywanym przez komórki MDSC jest oddziaływanie ich cząsteczek CD80, z cząsteczkami CTLA-4 występującymi na powierzchni limfocytów Treg, których aktywność wpływa hamująco na efektorowe limfocyty T [Poschke i in. 2010]. Wykazano także, iż pod wpływem TGF- β 1 produkowanego przez MDSC komórki NK przechodzą w stan anergii. Zjawisku temu towarzyszy słabsze wydzielanie IFN- γ przez komórki NK, a także obniżona ekspresja cząsteczek NKG2D, prowadząca do zmniejszenia właściwości cytotoksycznych tych komórek [Li i in. 2009]. Hart i in. wykazali, że komórki MDSC są jednym z głównych źródeł IL-10 w TME, a dodatkowo wykazują ekspresję receptora tej cytokiny (IL-10R) na swojej powierzchni, co pogłębia ich zdolność do wydzielania IL-10 do otoczenia [Hart i in. 2011]. Wytwarzana IL-10 przez komórki MDSC ma niekorzystny wpływ na wydajność komórek dendrytycznych w skutecznym pobudzaniu limfocytów T, głównie ze względu na zmniejszoną produkcję IL-12 oraz obniżoną zdolność tych komórek do prezentacji antygenów [Hu i in. 2011]. Co więcej, pod wpływem IL-10 pochodzącej

od MDSC, dochodzi do konwersji makrofagów typu M1 w kierunku komórek typu M2 [Ostrand-Rosenberg 2018].

1.2.2.2. Makrofagi związane z nowotworem

Najliczniejszą populacją komórek mieloidalnych obecnych w tkance nowotworowej są makrofagi związane z nowotworem (ang. *tumor-associated macrophages*; TAM). Źródłem tych komórek są krążące monocyty lub makrofagi rezydujące w tkankach, które są rekrutowane do tkanki nowotworu. W TME pod wpływem czynników takich jak VEGF, CCL2, M-CSF lub IL-4 następuje konwersja tych komórek w kierunku TAM [Davidov i in. 2020]. Należy dodać, że w warunkach obniżonej zawartości tlenu w tkance (hipoksji) komórki MDSC przekształcają się w TAM, co dodatkowo wpływa na wielkość tej populacji [Corzo i in. 2010].

Makrofagi występujące w nowotworze podlegają różnicowaniu w zależności od panujących warunków środowiskowych. Początkowo dominują komórki typu M1, które wykazują aktywność przeciwnowotworową. Makrofagi typu M1 poprzez produkcję cytokin prozapalnych m.in. IL-12, wspomagają tworzenie odpowiedzi typu Th1. Ponadto takie makrofagi są zdolne do eliminacji komórek nowotworowych. Jednak wraz z dalszym rozwojem choroby, w obecności cytokin takich jak IL-4, IL-10, IL-13 dochodzi do przekształcenia makrofagów w kierunku komórek typu M2, które wspomagają dalszy rozwój nowotworu, głównie poprzez produkowanie czynników wzrostu takich jak EGF oraz promowanie angiogenezy [Pan i in. 2020]. Uważa się, że TAM obecne w tkance nowotworowej, wykazują cechy typowe dla makrofagów typu M2. Zatem uwzględniając supresorowe właściwości TAM, a także ich dominację w TME należy uznać, że odgrywają znaczącą rolę w tłumieniu odpowiedzi przeciwnowotworowej.

Jednym z mechanizmów supresji wykorzystywanych przez TAM jest ograniczenie dostępności aminokwasów w środowisku. Wydzielając arginazę 1 orazIDO do środowiska TAM przyczyniają się do zahamowania aktywacji efektorowych limfocytów T [Rodriguez i in. 2003; Munn i in. 2005]. Dodatkowo TAM produkując IL-10, TGF- β oraz prostaglandyny E2, a także poprzez ekspresję na swojej powierzchni ligandów dla cząsteczek PD-1 i CTLA-4, niekorzystnie wpływają na funkcje cytotoksycznych limfocytów T CD8⁺ oraz limfocytów T CD4⁺ [Petty, Yang 2017]. Biorąc pod uwagę zdolność TAM do produkcji IL-10 na tle ich dominacji w TME, uważa się że te komórki, obok MDSC, stanowią główne źródło tej cytokiny w tkance guzów. Ponadto TAM odpowiadają za wzmożony napływ innych komórek supresorowych do tkanki guza. TAM wydzielając chemokiny CCL2, CCL20, CCL22 wspomagają rekrutowanie limfocytów Treg i MDSC do TME [Curiel i in. 2004; Liu i in. 2011; Lesokhin i in. 2012].

Makrofagi, zarówno o prawidłowych funkcjach, jak i związane z nowotworem, cechuje zdolność do prezentacji antygeny w kontekście cząsteczek MHC klasy II. Jednak pod wpływem czynników obecnych w TME m.in. hipoksji lub IL-10, poziom ekspresji tej cząsteczki na ich

powierzchni ulega obniżeniu. W początkowej fazie rozwoju nowotworu, wśród TAM dominują komórki o wysokiej ekspresji MHC II (TAM MHC II^{high}). Wraz z dalszym postępowaniem choroby, stopień pobudzenia tych komórek zmniejsza się, przez co znaczący udział w rozwoju nowotworu zaczynają odgrywać TAM o niskiej ekspresji MHC II (TAM MHC II^{low}) [Movahedi i in. 2010; Wang i in. 2011; Laoui i in. 2014].

1.2.2.3. *Limfocyty T regulatorowe*

Limfocyty T CD4 regulatorowe, które wyodrębnia się m.in. na podstawie ekspresji czynnika transkrypcyjnego FoxP3, w warunkach prawidłowych odpowiadają za utrzymanie tolerancji organizmu wobec antygenów własnych. Jednak uwzględniając ich właściwości immunosupresyjne, ekspansja tych komórek podczas rozwoju nowotworu jest związana ze złym rokowaniem dla pacjentów cierpiących z powodu chorób nowotworowych.

Limfocyty Treg napływające do tkanki guzów lub proliferujące bezpośrednio w TME, hamują odpowiedź odpornościową wykorzystując różne mechanizmy. Jednym z nich jest oddziaływanie ich cząsteczek CTLA-4 z cząsteczkami kostymulującymi na powierzchni DC. W przeciwieństwie do CD28, CTLA-4 ma wyższe powinowactwo względem cząsteczek CD80 i CD86, a efektem ich wzajemnego kontaktu jest wydzielanie enzymuIDO przez DC [Wojas, Pajtasz-Piasecka 2010]. Ponadto dziewicze limfocyty T aktywowane przez tak stymulowane DC przechodzą w stan anergii [Mellor, Munn 2004; Munn i in. 2004]. Limfocyty T regulatorowe charakteryzują się wysoką ekspresją cząsteczki CD25, która umożliwia im wydajne pobieranie IL-2 ze środowiska. Z tego powodu dostępność tej cytokiny dla limfocytów efektorowych jest ograniczona, co negatywnie wpływa na ich proliferację i aktywację. Dodatkowym elementem osłabiającym odpowiedź przeciwnowotworową jest zdolność limfocytów Treg do wydzielania cytokin przeciwzapalnych (IL-10, TGF- β , IL-35), a także perforyny i granzymów, których aktywność prowadzi do eliminacji komórek efektorowych [Ohue, Nishikawa 2019].

1.2.2.4. *Komórki dendrytyczne*

Obecność komórek dendrytycznych w tkance nowotworowej początkowo była uważana za korzystny marker prognostyczny. Jednak późniejsze badania wykazały, że wzmożona infiltracja DC może być związana z negatywnymi rokowaniami w rozwoju choroby nowotworowej [Karthaus i in. 2012; Tran Janco i in. 2015]. W TME zdolność komórek dendrytycznych do inicjowania skutecznej odpowiedzi odpornościowej jest osłabiona, zatem jako marker prognostyczny powinno się uznawać bardziej stopień pobudzenia DC, niż intensywność ich nacieku do tkanki nowotworu [Tran Janco i in. 2015; Fu, Jiang 2018]. Jednym z czynników obniżających aktywność DC są cytokiny produkowane przez komórki obecne w TME. Pod wpływem IL-6 i IL-10 proces dojrzewania komórek dendrytycznych zostaje zahamowany, co prowadzi do powstania DC

o cechach tolerogennych, niezdolnych do aktywowania skutecznej odpowiedzi przeciwnowotworowej [Fu, Jiang 2018]. Dowiedziono, że DC znajdujące się w mikrośrodowisku nowotworu charakteryzują się zwiększoną ekspresją receptorów zmiataczy typu A, które odpowiadają za pochłanianie lipidów z otoczenia. W związku z tym, we wnętrzu DC dochodzi do nadmiernej akumulacji kwasów tłuszczowych. Rezultatem zaburzonej gospodarki tłuszczowej komórek, jest osłabienie ich zdolności do prezentacji krzyżowej antygenów, co bezpośrednio wpływa na inicjowanie odpowiedzi przeciwnowotworowej [Herber i in. 2010; Ramakrishnan i in. 2014]. Ponadto komórki dendrytyczne obecne w TME wykazują zwiększoną ekspresję cząsteczek PD-L1, które oddziałując z cząsteczkami PD-1 na powierzchni limfocytów, indukują ich apoptozę. Jak wykazali w badaniach Krempski i in., DC napływające do tkanki nowotworowej jajnika, wykazywały jednocześnie zwiększoną ekspresję PD-L1 oraz PD-1 [Krempski i in. 2011]. W związku z tym, takie komórki z jednej strony zmniejszają żywotność limfocytów, a z drugiej strony same mogą zostać wyeliminowane z TME. Zatem zablokowanie szlaku programowanej śmierci komórki poprzez wykorzystanie przeciwciał skierowanych przeciwko PD-1 lub PD-L1 jest obiecującym rozwiązaniem. W istocie dowiedziono, że zablokowanie cząsteczki PD-1 na powierzchni DC przywróciło prawidłowe funkcje tych komórek, a to z kolei wpłynęło na zwiększoną proliferację limfocytów T w tkance raka mysiego jajnika [Krempski i in. 2011]. Ponadto z przeprowadzonych badań przez Karyampudi i in. wynika, że limfocyty T CD8⁺ pobudzone przez DC ze wstrzymaną funkcjonalnością cząsteczek PD-1, dłużej utrzymywały się w tkance mysiego raka sutka, ze względu na zwiększoną ekspresję receptora IL-7 na ich powierzchni [Karyampudi i in. 2014]. Warto podkreślić, że komórki nowotworowe wytwarzając substancje takie jak VEGF, IL-10, TGF- β i prostaglandyny uniemożliwiają różnicowanie komórek progenitorowych w kierunku DC. W tych warunkach dochodzi do powstawania komórek o cechach immunosupresorowych, takich jak MDSC i TAM [Hargadon 2013].

1.2.3. Rola IL-10 w tworzeniu odpowiedzi przeciwnowotworowej

Spośród cytokin, których aktywność stanowi dużą barierę w tworzeniu wydajnej odpowiedzi przeciwnowotworowej, znaczącą rolę odgrywa IL-10. Jest to cytokina, która w prawidłowych warunkach odpowiada za regulowanie odpowiedzi odpornościowej. Z jednej strony deficyt IL-10 uniemożliwia wyciszenie odpowiedzi zapalnej, natomiast z drugiej – jej nadmiar może promować tworzenie przeciwciał autoreaktywnych niszczących tkanki gospodarza [Mannino i in. 2015]. Początkowo uznawano, że za produkcję IL-10 są odpowiedzialne limfocyty Th2 i Treg, lecz obecnie wiadomo, że źródłem tej cytokiny mogą być inne komórki układu odpornościowego, np. limfocyty B, DC oraz komórki NK [Ng i in. 2013]. Ponadto jak przedstawiono w poprzedniej części wstępu, do produkcji tej cytokiny są zdolne komórki układu

odpornościowego ściśle związane z tkanką nowotworową – TAM i MDSC. Dodatkowo źródłem IL-10 w TME mogą być same komórki nowotworowe [Sato i in. 1996; Li i in. 2014].

Ważnym elementem warunkującym oddziaływanie IL-10, jest ekspresja swoistego receptora tej cytokiny na powierzchni komórek docelowych. Receptor IL-10 (IL-10R) jest heterodimerem złożonym z podjednostki IL-10R1 o wysokim powinowactwie do IL-10, oraz podjednostki IL-10R2, rozpoznającej również inne cytokiny należące do tej samej rodziny cytokin [Zdanov 2010]. Istnieją także różnice w rozpowszechnieniu obu podjednostek, ponieważ IL-10R1 została zidentyfikowana na powierzchni limfocytów B, makrofagów, DC, komórek NK oraz limfocytów Treg, podczas gdy IL-10R2 powszechnie występuje na wszystkich typach komórek [Mannino i in. 2015; Saraiva i in. 2020]. Przyłączenie IL-10 do podjednostki IL-10R1 powoduje jej oligomeryzację z IL-10R2, a następnie są fosforylowane kinazy tyrozynowe Janus, JAK1 oraz Tyk2. Do tak aktywowanego kompleksu przyłączane są białka STAT3, które w fosforylowanej formie przemieszczają się do jądra komórki, by w nim uruchomić ekspresję genów cytokin takich jak IL-6, IL-10, IL-21 lub IL-27 [Kicielińska, Pajtasz-Piasecka 2014]. Biorąc pod uwagę fakt, że komórki pod wpływem IL-10 stają się także producentami tej cytokiny, zasadnym jest blokowanie IL-10R na ich powierzchni.

Uwzględniając udział IL-10 w kształtowaniu odpowiedzi przeciwnowotworowej, należy podkreślić, że może ona wspierać lub hamować rozwój nowotworu. Wczesne badania nad rolą IL-10 wskazywały, że zarówno nadekspresja IL-10 przez komórki nowotworowe, jak i podawanie IL-10 pochodzenia egzogenne, prowadziło do zmniejszenia lub całkowitej eliminacji nowotworu [Giovarelli i in. 1995; Berman i in. 1996]. Wyjaśnienie podstaw tego mechanizmu nastąpiło później gdy wykazano, że obecność IL-10 korzystnie wpływa na proliferację limfocytów T CD8⁺, a także na ich aktywność cytotoksyczną. W istocie, zastosowanie pegylowanej formy IL-10 w terapii myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego lub rakiem płaskonabłonkowym skóry, doprowadziło do zwiększonej infiltracji tkanki nowotworu przez limfocyty T CD8⁺. Komórki te były zdolne do produkcji IFN- γ oraz granzymów, co zapewniło skuteczną eliminację komórek nowotworowych [Mumm i in. 2011; Emmerich i in. 2012]. Podobne efekty terapeutyczne osiągnięto w ramach przeprowadzonego badania klinicznego z udziałem pacjentów z nowotworami litymi (NCT02009449) [Naing i in. 2016, 2018].

Powyższe informacje wskazują, że IL-10 może działać immunostymulująco wobec efektorowych limfocytów T CD8⁺, szczególnie w początkowych etapach rozwoju nowotworu. Jednak uwzględniając mikrośrodowisko nowotworowe, w którym następuje dominacja komórek układu odpornościowego zdolnych do wydzielania tej cytokiny, poziom IL-10 będzie zwiększał się wraz z progresją choroby nowotworowej. Ostatnie badania dowodzą, że wysoki poziom IL-10 w surowicy lub w tkance guzów jest niekorzystnym markerem prognostycznym dla pacjentów cierpiących z powodu chorób nowotworowych [Feng i in. 2018; Chen i in. 2019; Zhang i in. 2020].

Meta-analiza danych pochodzących od 1788 pacjentów wykazała, że wysokie stężenie tej cytokiny w surowicy jest skorelowane z krótszym czasem przeżycia, zarówno w przypadku nowotworów litych, jak i hematologicznych [Zhao i in. 2015]. Ponadto IL-10 ma znaczący udział w ucieczce nowotworu spod nadzoru immunologicznego, ponieważ pod jej wpływem dochodzi do zmniejszenia ekspresji cząsteczek MHC klasy I oraz ligandów dla NKG2D na powierzchni komórek nowotworowych [Matsuda i in. 1994; Serrano i in. 2011].

Niekorzystny wpływ IL-10 na inne komórki układu odpornościowego został dobrze poznany. Związek IL-10 ze swoistym receptorem na powierzchni limfocytów T prowadzi do defosforylacji cząsteczki CD28, a to z kolei blokuje drugi sygnał aktywacyjny w synapsie immunologicznej. W rezultacie dziewicze limfocyty T nie zostają prawidłowo pobudzone i przechodzą w stan anergii [Taylor i in. 2007]. Dodatkowo limfocyty T CD4⁺ pod wpływem IL-10 wykazują zmniejszoną zdolność do wydzielania cytokin prozapalnych, takich jak IL-2, IFN- γ oraz TNF- α [Mannino i in. 2015]. W przypadku komórek NK początkowo sądzono, że IL-10 zmniejsza zdolność tych komórek do produkcji cytokin takich jak TNF- α oraz IFN- γ , co osłabia ich aktywność przeciwnowotworową [Conti i in. 2003]. Jednak późniejsze badania dowiodły, że IL-10 wpływając na zmniejszenie ekspresji cząsteczek MHC klasy I na powierzchni komórek nowotworowych, pośrednio działała immunostymulująco na komórki NK, które wydajniej eliminowały takie komórki nowotworowe [Mocellin i in. 2004]. W tym miejscu jednak należy podkreślić, że korzystny wpływ IL-10 na aktywność komórek NK ulega odwróceniu w sytuacji, gdy w środowisku zawartość tej cytokiny drastycznie wzrasta. Jak wykazał Szkaradkiewicz i in. u pacjentów z gruczolakorakiem żołądka istniała ścisła zależność pomiędzy stadium zaawansowania choroby nowotworowej a zwiększonym stężeniem IL-10 w surowicy, które miało nadrzędny wpływ na obniżenie aktywności cytotoksycznej komórek NK [Szkaradkiewicz i in. 2010].

Supresorowe działanie IL-10 względem odpowiedzi przeciwnowotworowej wynika między innymi z jej niekorzystnego oddziaływania na komórki prezentujące antygeny, w tym komórki dendrytyczne. Liczne badania wykazały, że IL-10 zaburza zdolność APC do zależnej od chemokin migracji w kierunku węzłów chłonnych [Demangel i in. 2002] i obniża ekspresję cząsteczek MHC II oraz cząsteczek kostymulujących umożliwiających wydajną i skuteczną aktywację dziewiczych limfocytów T [Ding i in. 1993]. Ponadto w obecności IL-10 DC produkują znacznie mniej IL-12, cytokiny niezbędnej do aktywacji odpowiedzi typu Th1 [De Smedt i in. 1997; Huang i in. 2001]. Uważa się, że komórki dendrytyczne pod wpływem IL-10, przekształcają się z komórek o charakterze immunogennym w komórki tolerogenne, które indukują anergię cytotoksycznych limfocytów T CD8⁺ [Steinbrink i in. 1999].

1.3. Wykorzystanie komórek dendrytycznych w immunoterapii przeciwnowotworowej

Jak już zostało wspomniane wcześniej, DC znajdujące się pod wpływem niekorzystnego mikrośrodowiska nowotworowego są niezdolne do pobudzenia komórek efektorowych. Z tego powodu, aby doprowadzić do reaktywacji odpowiedzi przeciwnowotworowej, do organizmu dostarcza się szczepionki komórkowe na bazie prawidłowo funkcjonujących DC różnicowanych w warunkach *ex vivo*. Wykorzystanie DC w terapii przeciwnowotworowej jest zaliczane do strategii adoptywnej immunoterapii, w której efekt terapeutyczny jest osiąganym poprzez aktywację odpowiedzi odpornościowej gospodarza, prowadzącej do eliminacji komórek nowotworowych [Galluzzi i in. 2014].

Do otrzymania ludzkich DC niezbędne są komórki prekursorowe, które izoluje się z krwi pacjenta lub dawcy (komórki CD14⁺ lub CD34⁺), a w przypadku układu mysiego wykorzystuje się komórki izolowane ze szpiku kości. Niezależnie od pochodzenia, komórki utrzymywane są w kilkudniowej hodowli w obecności IL-4 i GM-CSF, umożliwiającej ich proliferację i różnicowanie się w kierunku niedojrzałych DC [Sabado i in. 2017]. Jednym z kluczowych elementów wpływających na skuteczność szczepionek opartych na DC jest odpowiedni poziom dojrzałości podawanych komórek – mogą być to komórki częściowo dojrzałe lub całkowicie pobudzone, ale zawsze muszą być zdolne do prezentacji antygenów nowotworowych i do rozpoczęcia odpowiedzi odpornościowej. Do stymulacji niedojrzałych DC wykorzystuje się antygeny związane z nowotworem (ang. *tumor associated antigens*; TAA), z których izolowane są zdefiniowane peptydy lub specyficzne mRNA [Bol i in. 2016; Constantino i in. 2016]. Korzyścią płynącą ze stosowania peptydów pochodzących z TAA jest możliwość ich bezpośredniego wiązania z cząsteczkami MHC na powierzchni DC, bez konieczności ich wcześniejszego przekształcania i modyfikacji. Innym źródłem antygenów są lizaty całych komórek nowotworowych, które uzyskuje się poprzez kilkukrotny cykl ich szybkiego mrożenia i rozmrażania, w wyniku czego uwalnianych jest wiele stymulatorów pochodzenia nowotworowego, a także cząsteczki DAMP. Ta metoda jest z powodzeniem stosowana do otrzymywania antygenów nowotworowych wykorzystywanych w pobudzaniu ludzkich i mysich niedojrzałych DC [Sabado i in. 2017], w tym także w prowadzonych przez nas doświadczeniach terapeutycznych w mysich modelach nowotworowych [Rossowska i in. 2014, 2018; Wojas-Turek i in. 2016].

Do tej pory jedynym preparatem opartym na DC zaakceptowanym przez FDA jest Sipuleucel-T (Provenge[®]), w którym komórki dendrytyczne są izolowane z krwi pacjenta. W celu otrzymania swoistych i dojrzałych DC stosowane jest rekombinowane białko fuzyjne PA2024, składające się z GM-CSF oraz kwaśnej fosfatazy prostaty (ang. *prostatic acid phosphatase*; PAP). Wspomniany preparat był wykorzystywany w terapii hormonoopornego raka stercza, a w efekcie

jego stosowania nastąpiło wydłużenie średniego czasu przeżycia pacjentów o 4,1 miesiąca, w porównaniu do grupy otrzymującej placebo [Kantoff i in. 2010; Beer i in. 2013].

Spośród prowadzonych obecnie licznych prób klinicznych, wykorzystujących w terapii przeciwnowotworowej komórki dendrytyczne, zdecydowaną większość stanowią badania znajdujące się w I lub II fazie. Bezpieczeństwo immunoterapii opartej na DC zostało wielokrotnie potwierdzone. Ponadto wykazano, że specyficzne względem antygenów nowotworowych limfocyty T CD8⁺ pojawiają się już po 7 dniach od pierwszego podania szczepionkowych DC i świadczy to o immunogenności zastosowanej terapii [Butterfield i in. 2003]. Jednak mimo obiecujących rezultatów osiąganych w tych wczesnych fazach badań klinicznych, w większości przypadków wykorzystanie DC w postaci monoterapii nie przynosi oczekiwanych efektów w III fazie. Wśród czynników, które wpływają na te niezadowalające rezultaty, wymienia się wdrożenie terapii komórkami dendrytycznymi dopiero w zaawansowanym stadium choroby, w którym mechanizmy immunosupresji wykorzystywane przez nowotwór są bardzo rozwinięte. Dodatkowym elementem osłabiającym skuteczność terapii jest zmienność antygenowa pomiędzy komórkami w guzie pierwotnym i w przerzutach. Z tego powodu DC stymulowane TAA wyizolowanymi z guza pierwotnego, nie pobudzały limfocytów T swoistych względem komórek nowotworowych obecnych w przerzutach [Butterfield 2013]. Pomimo tych ograniczeń, jak podaje Santos, prawie u 10% osób poddanych terapii szczepionkami na bazie DC, może nastąpić trwała regresja guza nowotworowego [Santos, Butterfield 2018].

Uważa się, że dotychczasowe osiągnięcia i zdobyta wiedza w zakresie wykorzystania komórek dendrytycznych w terapiach przeciwnowotworowych pozwoli na stworzenie lepszych strategii terapeutycznych w przyszłości. Jednym z kierunków udoskonalania immunoterapii opartej na komórkach dendrytycznych jest odpowiednie przygotowanie szczepionkowych komórek, o obniżonej wrażliwości na negatywny wpływ czynników obecnych w nowotworze, szczególnie jeśli takie komórki są dostarczane bezpośrednio do guzów lub okołoguzowo.

1.4. Zniesienie negatywnego wpływu IL-10 na komórki dendrytyczne jako potencjalna strategia w terapii przeciwnowotworowej

Biorąc pod uwagę immunosupresyjne działanie IL-10 obecnej w tkance nowotworu na proces aktywacji odpowiedzi odpornościowej, obiecującym rozwiązaniem jest zablokowanie wpływu tej cytokiny na komórki immunokompetentne, w tym komórki dendrytyczne. W badaniach przedklinicznych najczęściej stosowane są przeciwciała neutralizujące IL-10 lub skierowane przeciwko receptorowi tej cytokiny.

Jednym z przykładów wykorzystania przeciwciał anti-IL-10 jako elementu kształtującego rozwój odpowiedzi odpornościowej, są badania przeprowadzone przez zespół Kalli i in. Przez immunizację myszy szczepionkami na bazie komórek dendrytycznych pulsowanych z peptydem

gp100, próbowano wywołać swoistą odpowiedź odpornościową, która stanowiłaby skuteczną barierę chroniącą przed rozwojem nowotworu. Chociaż po podaniu komórek czerniaka, u immunizowanych myszy pojawiły się guzy, to wykazano, że efektem zastosowania tej prewencyjnej immunoterapii, była zwiększona infiltracja nowotworu przez limfocyty T CD4⁺ oraz redukcja liczebności limfocytów Treg. Dopiero uzupełnienie terapii o ogólnoustrojowe podania przeciwciał neutralizujących IL-10 pogłębiło efekt terapeutyczny, w postaci całkowitego wstrzymania rozwoju guza. Schemat terapeutyczny zaproponowany przez Kalli i in. nie był typowy dla terapii przeciwnowotworowych, które wdrażane są dopiero po wykryciu nowotworu. Niemniej jednak rezultaty osiągnięte w ramach tych doświadczeń wskazały, że zablokowanie w guzach aktywności IL-10, doprowadziło do zredukowania populacji komórek Treg, a tym samym przyczyniło się do stworzenia wydajnej odpowiedzi przeciwnowotworowej inicjowanej przez szczepionkowe DC [Kalli i in. 2013].

We wcześniejszych badaniach prowadzonych w naszym laboratorium oceniano wpływ ogólnoustrojowej eliminacji IL-10 na skuteczność terapii z udziałem szczepionek na bazie DC, wspomaganym zastosowaniem cyklofosfamidu w modelu mysiego raka jelita grubego [Rossowska i in. 2015]. Rezultatem skojarzonej terapii składającej się z cyklofosfamidu i przeciwciał anti-IL-10 był zmniejszony napływ limfocytów T regulatorowych do tkanki guzów, któremu towarzyszyło obniżenie aktywności supresorowej MDSC. Niemniej jednak aktywacja swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej zależnej od komórek NK nastąpiła dopiero, gdy terapię uzupełniono o okołoguzowe podania dojrzałych DC. To z kolei doprowadziło do znaczącego zahamowania wzrostu guzów [Rossowska i in. 2015]. Biorąc pod uwagę, że długotrwałe i ogólnoustrojowe zablokowanie aktywności IL-10 może doprowadzić do zaburzeń o podłożu autoimmunologicznym, poszukiwane są rozwiązania działające miejscowo, które będą omijać ten problem. Z tego powodu w naszych kolejnych doświadczeniach, wykorzystane zostały wektory lentiwirusowe (ang. *lentivirus*; LV) niosące sekwencję shRNA skierowaną przeciwko IL-10. Podawane doguzowo wektory LV shIL-10 zmniejszały stężenie tej cytokiny w TME, co znacząco zwiększyło skuteczność szczepionek na bazie DC i pogłębiło efekt terapeutyczny [Rossowska i in. 2018].

Innym sposobem odwrócenia negatywnego wpływu IL-10 na odpowiedź odpornościową, jest zablokowanie swoistego receptora dla tej cytokiny, a jednym z najczęściej stosowanych rozwiązań jest podawanie przeciwciał anti-IL-10R. Chociaż zastosowanie tych przeciwciał w formie monoterapii nie spowalnia wzrostu guzów, to w połączeniu z innymi strategiami terapeutycznymi znacząco wzmacnia tworzoną odpowiedź przeciwnowotworową [Ni i in. 2020].

Z badań przeprowadzonych przez Llopiz i in. wynika, że użycie przeciwciał blokujących IL-10R jest szczególnie istotne, gdy zastosowana immunoterapia prowadzi do zwiększonej produkcji IL-10 przez komórki układu odpornościowego. Llopiz i in. wykazali, że następstwem

terapii opartej na szczepionkach zawierających TAA oraz ligand dla TLR7, był wzrost stężenia IL-10 w surowicy myszy. Z tego powodu obserwowano jedynie niewielki efekt terapeutyczny. Natomiast uzupełnienie terapii o przeciwciała anti-IL-10R doprowadziło do aktywacji odpowiedzi typu Th1 i znaczącego spowolnienia wzrostu nowotworu [Llopiz i in. 2016].

Korzyści płynące z zablokowania receptora IL-10 na powierzchni komórek układu odpornościowego wykazali także w swoich doświadczeniach Ruffell i in., którzy chemioterapię myszy z nowotworem gruczołu sutkowego wzbogacili o ogólnoustrojowe iniekcje przeciwciał anti-IL-10R. Dowiedli oni, że zniesienie negatywnego wpływu IL-10 na komórki dendrytyczne obecne w nowotworze, przywróciło ich zdolność do produkcji IL-12, co w konsekwencji aktywowało odpowiedź przeciwnowotworową zależną od limfocytów T CD8⁺ [Ruffell i in. 2014]. Podobne wnioski płyną z badań *in vitro* przeprowadzonych przez Thempalee i in, którzy wykazali, że naiwne limfocyty T pobudzone przez DC z zablokowanym receptorem IL-10, charakteryzowały się zwiększonym wydzielaniem IFN- γ i wzmożoną aktywnością cytotoksyczną wobec komórek nowotworowych [Thempalee i in. 2018].

Alternatywnym rozwiązaniem prowadzącym do otrzymania szczepionkowych DC o obniżonej wrażliwości na IL-10, jest modyfikacja komórek prowadząca do zmniejszenia ekspresji receptora tej cytokiny na ich powierzchni. W tym celu wykorzystuje się zjawisko interferencji RNA (ang. *RNA interference*; RNAi), które zostanie omówione w dalszej części wstępu. Skuteczność immunoterapii opartej na DC z wyciszoną ekspresją IL-10R potwierdzono w terapii myszy obciążonych nowotworem TC-1. Wykorzystując plazmidy niosące siRNA (ang. *small interfering RNA*) skierowane przeciwko IL-10R, otrzymano szczepionki komórkowe, które indukowały swoistą odpowiedź limfocytów T CD8⁺, a rezultatem zastosowanej strategii było znaczące spowolnienie wzrostu guzów [Kim i in. 2011; Ahn i in. 2015].

1.5. Wykorzystanie zjawiska interferencji RNA jako metody regulacji ekspresji genów

Poznanie mechanizmu post-transkrypcyjnej regulacji ekspresji genów poprzez interferencję RNA, otworzyło nowy etap w badaniach przedklinicznych. Wykazano, że pod wpływem degradacji dwuniciowego RNA (dsRNA) powstają krótkie interferujące RNA (siRNA), które wyciszają ekspresję docelowego genu. Źródłem dsRNA w komórkach mogą być endogenne cząsteczki mikroRNA (miRNA) lub egzogenne cząsteczki np. dsRNA pochodzenia wirusowego lub shRNA (ang. *short hairpin RNA*) wprowadzone do komórek na drodze modyfikacji genetycznej [Bofill-De Ros, Gu 2016].

Proces interferencji RNA rozpoczyna się od degradacji dsRNA pod wpływem aktywności endorybonukleazy zwanej Dicer. Powstające krótkie fragmenty siRNA o długości ok. 20 nukleotydów są następnie przyłączane do kompleksu składającego się z białka Ago2

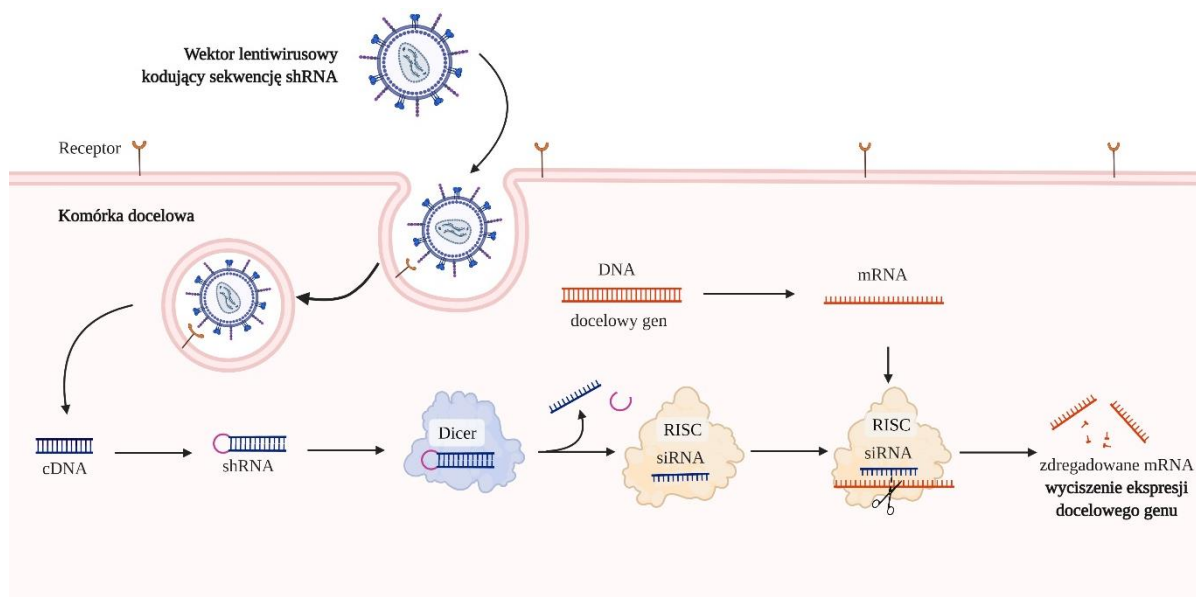
(ang. *argonaute 2*), białka wiążącego dsRNA (ang. *dsRNA-binding protein*) oraz wspomnianego enzymu Dicer. W obrębie nici siRNA wyróżniamy nić wiodącą, warunkującą swoistość mechanizmu interferencji RNA, oraz nić towarzyszącą, która jest usuwana przez białko Ago2. Powstały kompleks indukujący wyciszenie (ang. *RNA-induced silencing complex*; RISC) przyłącza się do docelowej sekwencji mRNA. Następnie dochodzi do degradacji tej sekwencji, a ekspresja tego genu zostaje wyciszona. Ważnym aspektem skuteczności interferencji RNA jest całkowita komplementarność nici wiodącej znajdującej się w kompleksie RISC względem fragmentu genu docelowego. W przeciwnym razie zahamowanie ekspresji pożądanego genu nie będzie możliwe [Singer, Verma 2008; Chen i in. 2018].

Biorąc pod uwagę fakt, że niezależnie od pochodzenia dsRNA, końcowym produktem degradacji są cząsteczki siRNA, podejmowano próby bezpośredniego dostarczania tych cząsteczek do komórek. Jednak głównymi ograniczeniami tego systemu są: niewielka trwałość siRNA w warunkach *in vivo* oraz słabe przenikanie siRNA przez błonę komórkową wynikające z ich ujemnego ładunku i silnych właściwości hydrofilowych [Singh i in. 2018].

W tym miejscu należy podkreślić, że zjawisko RNAi jest mechanizmem naturalnej regulacji ekspresji genów w komórkach eukariotycznych, w której uczestniczą miRNA. Prekursory tych cząsteczek powstają podczas transkrypcji zachodzącej w jądrze komórkowym. Następnie w wyniku dalszych modyfikacji jest formowane pre-miRNA, które mają budowę tzw. spinki do włosów, składającej się z fragmentu dsRNA oraz charakterystycznej pętli. Bazując na tym mechanizmie oraz strukturze pre-miRNA, opracowano metody modyfikacji genetycznej komórek, które prowadzą do utworzenia w ich jądrze komórkowym dsRNA zwanego shRNA [Bofill-De Ros, Gu 2016].

Projektując odpowiednią sekwencję, która ma zostać dostarczona przez cząsteczkę shRNA, można w warunkach doświadczalnych doprowadzić do wyciszenia ekspresji pożądanego genu w komórkach docelowych, ponieważ shRNA jest degradowane z wykorzystaniem maszyny dostępnej w komórce. Z tego powodu w obrębie struktury nukleotydowej cząsteczki shRNA powinna zostać umieszczona sekwencja nici towarzyszącej siRNA, następnie krótki fragment determinujący pojawienie się charakterystycznej pętli, po którym występuje sekwencja nici wiodącej siRNA komplementarna do mRNA docelowego genu. Na końcu znajduje się pięć tymidyn stanowiących sekwencję terminatorową dla polimerazy III, która jest odpowiedzialna za transkrypcję całego materiału genetycznego cząsteczki shRNA. Ważnym aspektem jest wybór odpowiedniej sekwencji promotora, który będzie rozpoznawany przez polimerazę III. Do ekspresji shRNA najczęściej wykorzystywanymi promotorami są U6 i H1. Spośród nich promotor U6 jest silniejszy, lecz istnieją przesłanki, że może być bardziej toksyczny wobec niektórych komórek, np. komórek szpiku kostnego [Singer, Verma 2008]. Zatem uwzględniając fakt, że w niniejszej pracy zaplanowano transdukcję komórek dendrytycznych pochodzenia szpikowego, wybór promotora H1 w konstrukcji plazmidu transferowego w systemie lentiwirusowym był uzasadniony.

Wprowadzenie sekwencji shRNA do komórek docelowych następuje na drodze ich transdukcji wektorami lentiwirusowymi (Ryc. 3), które zostały omówione poniżej.



Ryc. 3. Schemat przedstawiający proces wyciszenia genu w komórce docelowej w następstwie transdukcji wektorami lentiwirusowymi kodującymi shRNA.

1.6. Wektory lentiwirusowe jako narzędzie do modyfikacji genetycznej komórek

Jedną z cech typowych dla wirusów jest integracja ich materiału genetycznego z genomem zainfekowanej komórki. Umożliwia to dalszą replikację wirusowych genów, która jest przeprowadzana przez maszynę białkową komórki gospodarza. Dokładne poznanie tego mechanizmu pozwoliło opracować strategię modyfikacji genetycznej komórek, w których wektorem niosącym pożądany gen są cząstki wirusów. Aby uzyskać wektory wirusowe niezbędne są komórki pakujące, które kotransfekowane odpowiednimi plazmidami, wydzielają do otoczenia niezdolne do replikacji wiriony. Bowiem nadrzędnym celem zastosowania wektorów wirusowych jest wprowadzenie do docelowych komórek określonego transgenu, który zmieni ich właściwości. Zatem wyprodukowane wektory wirusowe muszą zostać pozbawione genów warunkujących ich wirulencję, a jednocześnie powinny być skuteczne w modyfikowaniu genomu komórki docelowej. Najczęściej wykorzystuje się wektory oparte na wirusach z rodziny *retroviridae*, do której zaliczamy m.in. γ -retrowirusy (zwane też onkoretrowirusami) oraz lentiwirusy (LV). W przypadku wektorów opartych na γ -retrowirusach najczęściej wykorzystywany jest myszy wirus białaczki, natomiast system wektorów lentiwirusowych został oparty o genom ludzkiego wirusa HIV-1 (ang. *human immunodeficiency virus 1*) [Liechtenstein i in. 2013].

Genom wirusów z rodziny *retroviridae* jest zbudowany z dwóch kopii jednoniciowego RNA. W jego obrębie wyróżniamy geny *gag*, *pol* i *env*. Za powstanie białek strukturalnych, takich jak białka macierzy i kapsydu oraz domen nukleokapsydu odpowiada gen *gag*. Natomiast gen *pol*

koduje białka niezbędne w procesie odwrotnej transkrypcji i integracji materiału genetycznego wirusa, a także białka uczestniczące w dojrzewaniu wirionów. Gen *env* jest odpowiedzialny za powstanie glikoprotein otoczki, które warunkują tropizm komórkowy cząstek wirusa. Po związaniu tej glikoproteiny ze swoistym receptorem powierzchniowym, następuje fuzja osłonki wirusowej z błoną komórkową gospodarza. Następnie zamknięty w kapsydzie materiał genetyczny wirusa zostaje przetransportowany do cytoplazmy, w której ulega odwrotnej transkrypcji. Powstałe cząsteczki cDNA trafiają do jądra komórkowego, w którym dochodzi do ich integracji z genomem gospodarza. Retrowirusy wykorzystują maszynę transkrypcyjną zainfekowanej komórki, aby zsyntetyzować własne mRNA, które później ulega translacji w cytoplazmie. W efekcie złożone na nowo cząstki wirusa opuszczają komórkę i cykl rozwojowy wirusów rozpoczyna się na nowo [Singer, Verma 2008; Liechtenstein i in. 2013].

W przypadku wirusa HIV-1, poza wspomnianymi podstawowymi genami *pol*, *gag* i *env*, wyróżnia się dodatkowo szereg genów pomocniczych powiązanych z wirulencją (*vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*) i regulacją ekspresji genów (*tat*, *rev*). Ponadto po etapie integracji cDNA wirusa HIV-1 z genomem gospodarza, powstają cząstki prowirusa, które na końcach 5' i 3' mają sekwencje LTR (ang. *long terminal repeats*) oraz elementy *cis* do których zaliczamy m.in.: sygnały pakowania (Ψ) i element odpowiedzi Rev (ang. *Rev response element*; RRE) [Pluta, Kacprzak 2009].

Pomimo znaczących podobieństw pomiędzy tymi dwoma rodzajami retrovirusów, zarówno w budowie, jak i w organizacji ich genomu, istnieją pewne ważne różnice, które warunkują znaczącą przewagę systemów na bazie wektorów LV. W przeciwieństwie do γ -retrowirusów, zastosowanie wektorów LV wiąże się z niższym ryzykiem mutageny insercyjnej, ponieważ integracja ich materiału genetycznego zachodzi w obrębie aktywnych transkrypcyjnie regionów chromatyny, a nie w pobliżu protoonkogenów. Ten mechanizm chroni przed niepożądaną transformacją nowotworową zainfekowanych komórek, który był obserwowany w przypadku wektorów na bazie γ -retrowirusów. Dodatkową zaletą użycia LV jest ich zdolność do translokacji przez nienaruszone jądro komórkowe, co warunkuje możliwość transdukcji komórek, które w danym momencie nie przechodzą podziałów mitotycznych [Liechtenstein i in. 2013; Milone, O'Doherty 2018].

Uwzględniając korzyści płynące z systemu opartego na lentiwirusach był on przez lata udoskonalany. Wektory LV pierwszej generacji zawierały znaczną część genomu HIV-1, a jedyną usuniętą sekwencją był gen *env*. Jako cząsteczkę otoczki wirusowej wykorzystano glikoproteinę G pochodzącą z wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (ang. *vesicular stomatitis virus G glycoprotein*; VSV-G), której gen umieszczono na osobnym plazmidzie. VSV-G wiąże się z receptorem LDL (ang. *low density lipoprotein*), powszechnie występującym na powierzchni wielu komórek, co umożliwiło rozszerzenie tropizmu lentiwirusów [Burns i in. 1993; Milone, O'Doherty 2018].

Kolejnym etapem ewolucji tego systemu było rozdzielenie poszczególnych genów na trzy osobne plazmidy. W obrębie plazmidu pakującego były nadal obecne sekwencje genów *gag*, *pol*, *rev* i *tat*, lecz usunięto geny pomocnicze związane z wirulencją *vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*. Gen kodujący glikoproteinę G był zlokalizowany na plazmidzie kodującym białko otoczki. Dodatkowo w celu zapewnienia stabilnej ekspresji genów w obu wspomnianych plazmidach, wykorzystano silny konstytutywny promotor pochodzący z cytomegalowirusa. Pożądany gen pod kontrolą swoistego promotora, który miał być wprowadzony do komórki docelowej, został umieszczony na plazmidzie transferowym, w którym znajdowały się także elementy LTR, sygnał pakowania Ψ oraz element odpowiedzi Rev (RRE) [Liechtenstein i in. 2013].

Obecnie stosuje się wektory LV trzeciej generacji, które określane są także mianem wektorów samoinaktywujących. Z plazmidu pakującego usunięto gen *tat*, a ponadto rozdzielono go na dwa osobne plazmidy, z których jeden koduje geny *gag* i *pol*, a drugi *rev*. W plazmidzie transferowym wprowadzono delecję w sekwencji 3'LTR, która zapewnia samoistną inaktywację cząstek prowirusa, przy czym ekspresja docelowego genu nie ulega zmianie i jest kontrolowana przez wewnętrzny promotor. Ostatnim plazmidem wykorzystywanym w tym systemie, jest plazmid kodujący białko otoczki wirusa i podobnie jak w poprzednich generacjach jest to glikoproteina VSV-G [Gándara i in. 2018].

Możliwości związane z zastosowaniem wektorów LV spowodowały, że od blisko dwudziestu lat są one wykorzystywane w opracowywaniu nowych strategii terapii przeciwnowotworowych, zarówno w badaniach przedklinicznych, jak i klinicznych [Gándara i in. 2018]. Zdolność wektorów LV do transdukcji dzielących się komórek wykorzystano w celu modyfikacji genetycznej komórek dendrytycznych. Yao i in. wykazali, że zastosowanie DC transdukowanych do nadprodukcji IL-12 w terapii myszy obarczonych czerniakiem, spowodowało znaczące spowolnienie wzrostu nowotworu [Yao i in. 2019]. Ponadto otrzymywano DC, które prezentowały antygeny nowotworowe dostarczone do komórek na drodze transdukcji lentiwirusowej. Dowiedziono, że DC pobudzone przez wprowadzone TAA takie jak MAGE-3 [Breckpot i in. 2004], MART-1 [Sumimoto i in. 2002] lub OVA [Dullaers i in. 2004] skutecznie aktywowały limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺ w warunkach *in vitro*. Z kolei Karwacz i in. wykazali, że obniżenie ekspresji PD-L1 na powierzchni DC na drodze transdukcji lentiwirusowej, przyczyniło się do zwiększonej ekspansji antygenowo-swoistych limfocytów T CD8⁺ [Karwacz i in. 2011].

Wykorzystując transdukcję lentiwirusową otrzymywane są swoiste wobec nowotworu cytotoksyczne limfocyty T, które następnie są podawane pacjentom cierpiącym z powodu choroby nowotworowej. W tym celu do plazmidu transferowego wprowadza się sekwencje nukleotydową kodującą specyficzny względem antygeny nowotworowego TCR, by następnie poddać transdukcji limfocyty T wyizolowane od pacjenta. Obecnie trwają badania kliniczne, w których wykorzystuje się autologiczne limfocyty T ekspozujące receptory TCR swoiste wobec antygenów

nowotworowych takich jak: NY-ESO-1, MART-1 lub WT-1 [Oldham i in. 2015]. Skuteczność i bezpieczeństwo immunoterapii opartej na zmodyfikowanych limfocytach T rozpoznających antygeny NY-ESO-1 została potwierdzona w II fazie badań klinicznych. Wspomniane limfocyty T zastosowano w połączeniu z autologicznym przeszczepem komórek macierzystych w terapii pacjentów ze szpiczakiem mnogim. Rezultatem takiej strategii terapeutycznej było wstrzymanie dalszego rozwoju choroby u 52% pacjentów, przy jednoczesnej aktywacji swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej [Stadtmauer i in. 2019]. Innym przykładem jest wykorzystanie wektorów LV do otrzymania limfocytów T z ekspresją receptora CAR, które swoiście rozpoznają cząsteczkę CD19 na komórkach ostrej białaczki limfoblastycznej. Ponadto terapia oparta na tych limfocytach CAR-T (Kymriah[®] Novartis AG) została zatwierdzona przez FDA i EMA oraz zarekomendowana do stosowania w terapii przeciwnowotworowej, co pośrednio świadczy o bezpieczeństwie systemu lentiwirusowego [Labbé i in. 2021].

1.7. Modulowanie odpowiedzi przeciwnowotworowej za pomocą chemioterapeutyków

Od wielu lat chemioterapia, obok radioterapii oraz chirurgicznego usunięcia guza, jest jedną z najczęściej wybieranych form terapii przeciwnowotworowej. Niezależnie od mechanizmu działania chemioterapeutyku, nadrzędnym celem jego zastosowania jest wywołanie efektu cytoredukcyjnego prowadzącego do zmniejszenia tkanki nowotworowej, lecz ze względu na niską specyficzność wobec komórek docelowych, wdrożenie chemioterapii wiąże się z pojawieniem skutków ubocznych. Przykładem jednego z najczęstszych działań niepożądanych jest toksyczność preparatów w stosunku do komórek hematopoetycznych, a także komórek układu odpornościowego. To z kolei prowadzi do zaburzenia prawidłowego funkcjonowania odpowiedzi wrodzonej i nabytej [Nars, Kaneno 2013]. W wyniku terapii cytostatykami dochodzi do zmniejszenia populacji limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺. Ponadto niektóre ze stosowanych chemioterapeutyków mogą powodować dysfunkcje w aktywności komórek NK i gamma delta limfocytów T, tym samym zaburzając nadzór immunologiczny nad rozwijającym się nowotworem, co dodatkowo osłabia tworzenie odpowiedzi przeciwnowotworowej [Shurin i in. 2012; Nars, Kaneno 2013]. Z powodu ogólnoustrojowej toksyczności wynikającej ze stosowania wysokich dawek leków przeciwnowotworowych, opracowano schematy terapeutyczne, które nadal prowadzą do eliminacji komórek nowotworowych, jednak zakładają stosowanie niższych dawek preparatów. Dodatkowo pod wpływem chemioterapeutyków użytych w odpowiednich dawkach dochodzi do modulacji odpowiedzi odpornościowej, która może wynikać z pobudzenia efektorowych limfocytów T, zwiększenia immunogenności komórek nowotworowych na skutek wzrostu ekspresji cząsteczek MHC I na ich powierzchni, a także eliminowania populacji komórek układu odpornościowego o cechach supresorowych [Weir i in. 2011; Emens, Middleton 2015].

Lutsiak i in. wykazali, że po zastosowaniu niskiej dawki cyklofosfamidu – cytostatyku o działaniu alkilującym – dochodzi do eliminacji limfocytów Treg, podczas gdy populacja efektorowych limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ pozostaje nienaruszona [Lutsiak i in. 2005]. Ponadto pod wpływem cyklofosfamidu zwiększa się zdolność komórek dendrytycznych do wydzielania IFN typu I, a to z kolei sprzyja aktywowaniu cytotoksycznych limfocytów T [Sistigu i in. 2011]. Innymi przykładami cytostatyków o działaniu immunomodulującym są gemcytamina i 5-fluorouracyl, które należą do grupy antymetabolitów pirymidynowych. Stwierdzono, że efektem ich zastosowania jest redukcja wielkości populacji komórek MDSC w tkance nowotworowej [Le i in. 2009; Vincent i in. 2010], a także zwiększona ekspresja TAA na powierzchni komórek nowotworowych [Correale i in. 2003]. Ponadto rezultatem użycia niższych dawek niektórych cytostatyków są korzystne zmiany w stopniu pobudzenia komórek dendrytycznych. Wykazano bowiem, że DC hodowane w obecności metotreksatu lub paklitakselu charakteryzowały się wyższą ekspresją cząsteczek kostymulujących oraz białek odpowiedzialnych za przetwarzanie pochłoniętych antygenów [Shurin i in. 2009; Kaneno i in. 2009].

Uwzględniając powyższe immunomodulujące właściwości chemioterapeutyków, zastosowanie cytostatyków przed rozpoczęciem immunoterapii będzie wspomagać rozwój skutecznej odpowiedzi przeciwnowotworowej inicjowanej przez szczepionkowe komórki dendrytyczne. Badania przedkliniczne, które wykorzystują taką strategię skojarzonej terapii przeciwnowotworowej, bazują głównie na dobrze poznanych chemioterapeutykach, np. na cyklofosfamidzie [Son i in. 2012; Rossowska i in. 2014] lub paklitakselu [Zhong i in. 2007]. Niemniej jednak interesującym obszarem badań, jest zastosowanie innych cytostatyków, powszechnie wykorzystywanych w terapii przeciwnowotworowej, szczególnie gdy zostały one przyłączone do nośników zapewniających bardziej selektywną dystrybucję leku w organizmie. To z kolei obniża toksyczność chemioterapeutyku względem komórek prawidłowych oraz powoduje wydajniejszą akumulację preparatu w tkance docelowej. Przykładem takiej nowatorskiej formy dostarczania chemioterapeutyku jest nanokoniugat metotreksatu i hydroksyetyloskrobi, który omówiono poniżej.

1.7.1. Nanokoniugat metotreksatu i hydroksyetyloskrobi

Metotreksat (MTX) należący do grupy antymetabolitów, jest jednym z najdłużej stosowanych cytostatyków zarówno w chorobach nowotworowych, jak i w chorobach o podłożu autoimmunologicznym [Visentin i in. 2012]. MTX jako antagonistę kwasu foliowego, blokuje aktywność reduktazy dihydrofolianowej – enzymu odpowiedzialnego za konwersję dihydrofolianów do tetrahydrofolianów. Rezultatem zmniejszonej dostępności tetrahydrofolianów jest zaburzenie syntezy nukleotydów, co bezpośrednio wpływa na zahamowanie procesu proliferacji komórek. MTX jest powszechnie używany w terapii przeciwnowotworowej, zarówno

w przypadku nowotworów hematologicznych, jak i w nowotworach litych, m.in. mózgu, piersi, wątroby oraz przewodu pokarmowego [Koźmiński i in. 2020]. Ten chemioterapeutyk przedostaje się do komórek głównie przez powszechnie występujący przekaźnik zredukowanych folianów (ang. *reduced folate carrier*; RFC), co także wpływa na ogólnoustrojową toksyczność MTX [Visentin i in. 2012]. Dodatkowo transport MTX do komórek może być realizowany przez podjednostkę α receptora folianów (ang. *folate receptor α* ; FR α). Jednak ze względu na niskie powinowactwo cząsteczki MTX do tego receptora, ta droga wnikania nie ma nadrzędnego udziału w aktywności antyproliferacyjnej chemioterapeutyku [Nogueira i in. 2018].

Głównymi problemami związanymi z wykorzystaniem w terapii przeciwnowotworowej niskocząsteczkowych związków, takich jak MTX, jest ich szybkie wydalanie oraz niekorzystna dystrybucja leku w organizmie, która wpływa na toksyczność cytostatyku wobec prawidłowych komórek. Aby ominąć powyższe problemy prowadzone są badania nad opracowaniem systemu selektywnego dostarczania preparatów, który pozwoli na ukierunkowaną akumulację leku w tkance guzów. W tym celu wykorzystuje się różne nośniki MTX takie jak: micelle [Chen i in. 2015; Hao i in. 2019], dendrymery [Li i in. 2012; Thomas i in. 2012], nanokapsuły [Figueiró i in. 2016] lub wielkocząsteczkowe koniugaty [Goszczyński, Nevozhay i in. 2013, Goszczyński i in. 2014]. Przykładem tego ostatniego rozwiązania jest nanokoniugat hydroksyetyloskrobi i metotreksatu (HES-MTX), który otrzymano na drodze kowalencyjnego przyłączenia cząsteczek MTX do wysokocząsteczkowego nośnika, jakim jest hydroksyetyloskrobia (HES). Oba elementy, które stanowią istotę tego nanokoniugatu są dobrze poznanymi, wykorzystywanymi w medycynie preparatami. HES jest amylopektynowym polimerem, który jako koloid stosowany jest w przypadkach hipowolemii. Dodatkowo wykazano, że HES jest nieimmunogeny, głównie ze względu na strukturalne podobieństwo amylopektyny do glikogenu [Brecher i in. 1997].

Wspomniany nanokoniugat HES-MTX został opracowany przez Goszczyńskiego i in., a jego wykorzystanie w terapii przeciwnowotworowej jest przedmiotem zgłoszenia patentowego [Goszczyński, Boratyński in. 2013]. Należy podkreślić, że proces koniugacji następuje bezpośrednio pomiędzy estryfikowanymi grupami hydroksylowymi w HES, a kwasem glutaminowym będącym integralną częścią MTX. W związku z tym, uwalnianie MTX z nanokoniugatu zachodzi na drodze enzymatycznej hydrolizy przez esterazy i amylazy, a powstające produkty degradacji – glukoza i metotreksat, są stopniowo uwalniane i wydalane z organizmu. Wpływa to na przedłużone działanie cytostatyku, co zostało także potwierdzone dłuższym okresem półtrwania HES-MTX w ludzkim osoczu, w porównaniu do MTX [Goszczyński i in. 2014]. Ponadto rezultatem skoniugowania MTX z HES może być ulepszona biodystrybucja chemioterapeutyku, wynikająca z jego zwiększonej specyficzności wobec komórek nowotworowych. Ze względu na wielkość średnicy hydrodynamicznej (d_H) nanokoniugatu, która wynosi $15,2 \pm 6,2$ nm [Goszczyński i in. 2014], cząsteczka ta może podlegać efektowi zwiększonej

przepuszczalności i retencji naczyń krwionośnych (ang. *enhanced vascular permeability and retention*; EPR). Wspomniany efekt EPR zakłada, że nanocząsteczki o $d_H > 10$ nm, z uwagi na swój rozmiar, nie przenikają przez ścianę naczyń krwionośnych do zdrowych tkanek [Wilhelm i in. 2016]. Natomiast w tkance nowotworowej, szczególnie w guzach litych, dochodzi do szybkiej angiogenezy prowadzącej do uformowania nieszczelnych naczyń krwionośnych, z których nanocząsteczki wypływają na drodze transportu biernego i gromadzą się w tkance guza [Maeda 2010; Fang i in. 2011; Golombek i in. 2018]. Warto zaznaczyć, że wydłużenie okresu półtrwania cytostatyku przyłączonego do nośnika zwiększa szansę dotarcia leku do tkanki nowotworu [Zein i in. 2020].

Innym aspektem poprawiającym specyficzną oddziaływanie HES-MTX względem komórek nowotworowych jest poliwalentność nanokoniugatu [Thomas i in. 2011, 2012], która wynika z przyłączenia ok. 50 cząsteczek MTX do jednej cząsteczki HES [Goszczyński i in. 2014]. To z kolei umożliwia interakcję koniugatów metotreksatu z podjednostką α receptora folianów (FR α) o wyższej stałej wiązania w porównaniu do wolnej formy MTX [Nogueira i in. 2018]. Należy podkreślić, że występowanie tego receptora jest charakterystyczne dla komórek nowotworowych, natomiast ta podjednostka receptora jest nieobecna na komórkach prawidłowych [Kelemen 2006; Walters i in. 2013]. Zatem biorąc pod uwagę przedłużoną akumulację nanokoniugatu w tkance nowotworowej, a także jego zwiększone powinowactwo względem FR α , należy sądzić, że HES-MTX będzie charakteryzował się wyższą aktywnością przeciwnowotworową w porównaniu do MTX. W istocie, pierwsze doświadczenia terapeutyczne z wykorzystaniem tego nanokoniugatu potwierdziły jego lepszy efekt terapeutyczny w porównaniu do MTX wobec nowotworu białaczki zarówno mysiej (P388), jak i ludzkiej (MV4-11) [Goszczyński i in. 2014].

Chociaż MTX jest lekiem powszechnie wykorzystywanym w terapii przeciwnowotworowej, to niewiele jest doniesień naukowych, oceniających zmiany w wielkości populacji komórek odpornościowych zachodzących po jego zastosowaniu. Pomimo iż MTX jest często poddawany modyfikacjom, które mają na celu poprawę efektu terapeutycznego, to dotychczas nie zostało jeszcze sprawdzone czy przyłączenie tego cytostatyku do nośnika, wpłynie na zwiększoną modulację odpowiedzi przeciwnowotworowej.

Z tego względu niniejsza praca doktorska jest próbą odpowiedzi na pytanie, czy przyłączenie MTX do nośnika zapewniającego lepszą dystrybucję leku, spowoduje korzystne zmiany w lokalnej i ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej, a także przy jakiej dawce obserwowany jest najlepszy efekt. Co więcej najistotniejszym aspektem niniejszych badań jest określenie czy powstałe zmiany wywołane po zastosowaniu immunomodulującej dawki chemioterapeutyku, umożliwią rozwój skutecznej odpowiedzi przeciwnowotworowej zainicjowanej przez szczepionkowe DC o obniżonej wrażliwości na negatywny wpływ IL-10 obecnej w nowotworze.

2. Założenia i cel pracy

Przełomowe odkrycie populacji DC, którego w roku 1973 dokonał Ralph Steinman i in., stanowiło kamień milowy w dalszych badaniach z zakresu immunologii nowotworów. Wyjaśnienie roli DC w aktywacji układu odpornościowego i w tworzeniu odpowiedzi przeciwnowotworowej spowodowało, że obecnie są one traktowane jako potencjalne narzędzie terapeutyczne, a immunoterapia z wykorzystaniem tych komórek stała się nową strategią w leczeniu chorób nowotworowych. Opracowane protokoły różnicowania i stymulacji DC w warunkach *ex vivo* umożliwiają otrzymanie dojrzałych komórek, które są zdolne do pobudzania swoistej odpowiedzi odpornościowej. Jednak pomimo obiecujących rezultatów osiąganych we wczesnych fazach badań klinicznych, szczepionki komórkowe na bazie DC nie wywołują długotrwałego efektu terapeutycznego w postaci spowolnienia rozwoju choroby nowotworowej. Do powodów wpływających na końcowy rezultat immunoterapii zalicza się m.in. tłumienie odpowiedzi odpornościowej w mikrośrodku nowotworowym. Z tego względu podejmowane są próby odpowiedniego przygotowania szczepionkowych DC poprzez zmniejszenie ich wrażliwości na negatywne działanie czynników immunosupresorowych obecnych w nowotworze. W celu zwiększenia skuteczności immunoterapii, schematy leczenia uzupełnia się o podanie cytostatyków zapewniających eliminację komórek nowotworowych. Co więcej, chemioterapeutyki zastosowane w odpowiedniej dawce modulują odpowiedź odpornościową, a to z kolei stwarza korzystne warunki do rozwoju skutecznej odpowiedzi przeciwnowotworowej inicjowanej przez szczepionkowe komórki dendrytyczne. Ponadto w celu poprawy efektu terapeutycznego chemioterapii, cytostatyki przyłącza się do nośników zapewniających korzystniejszą dystrybucję i wydajniejszą akumulację leku w tkance nowotworowej.

Celem niniejszej pracy było określenie efektu terapeutycznego oraz zmian w odpowiedzi odpornościowej zachodzących pod wpływem zastosowania skojarzonej terapii opartej na immunomodulującej dawce nanokoniugatu metotreksatu i hydroksyetyloskrobi (HES-MTX) oraz komórek dendrytycznych z wyciszoną ekspresją receptora IL-10 w mysim modelu raka jelita grubego MC38. Aby osiągnąć założony cel, zrealizowano następujące etapy badań:

1. Określenie modulacji odpowiedzi przeciwnowotworowej po zastosowaniu różnych dawek MTX lub HES-MTX, a w tym:
 - ocenę zahamowania wzrostu guzów MC38;
 - ocenę kinetyki zmian w lokalnej i ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej na podstawie wielkości populacji leukocytów w tkance guzów MC38 i śledzenie oraz stopnia pobudzenia *ex vivo* swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej splenocytów w następstwie ponownego kontaktu z komórkami MC38.

2. Określenie efektu terapeutycznego chemioimmunoterapii z udziałem MTX lub HES-MTX oraz szczepionek komórkowych na bazie dojrzałych komórek dendrytycznych, a w tym:
 - ocenę zahamowania wzrostu guzów MC38;
 - ocenę zmian w lokalnej i ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej w oparciu o analizę wielkości populacji leukocytów w tkance guzów MC38, węzłach chłonnych drenujących nowotwór i w śledzionie oraz stopnia pobudzenia *ex vivo* swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej splenocytów w następstwie ponownego kontaktu z komórkami MC38.
3. Określenie aktywności komórek dendrytycznych z wyciszoną ekspresją IL-10R, a w tym:
 - ocenę skuteczności wybranych sekwencji shRNA w wyciszeniu IL-10R;
 - ocenę wpływu transdukcji lentiwirusowej prowadzącej do wyciszenia ekspresji IL-10R na zmiany fenotypowe i funkcjonalne komórek dendrytycznych.
4. Określenie efektu terapeutycznego chemioimmunoterapii z udziałem MTX lub HES-MTX oraz komórek dendrytycznych z wyciszoną ekspresją receptora IL-10R, a w tym:
 - ocenę zahamowania wzrostu guzów MC38;
 - ocenę zmian w lokalnej i ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej w oparciu o analizę wielkości populacji leukocytów w tkance guzów MC38, węzłach chłonnych drenujących nowotwór i w śledzionie oraz pobudzenia *ex vivo* swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej splenocytów w następstwie ponownego kontaktu z komórkami MC38.

3. Materiały i metody

3.1. Materiały

3.1.1. Myszy

W doświadczeniach wykorzystywano 8-12 tygodniowe samice myszy szczepu C57BL/6 pochodzące z Centrum Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Doświadczenia terapeutyczne przeprowadzono za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej we Wrocławiu (nr zgód 31/2016 oraz 068/2020). W zwierzętarni IITD PAN myszy utrzymywano w warunkach SPF (*specific pathogen free*), natomiast 7-10 dni przed rozpoczęciem doświadczeń terapeutycznych umieszczano je w warunkach konwencjonalnych. Myszy, od których pobierany był szpik kostny przeznaczony do hodowli komórek dendrytycznych oraz śledziony, przez cały czas przebywały w warunkach SPF.

3.1.2. Odczynniki

- 2-merkaptoetanol (Sigma-Aldrich);
- agaroz (EUR_x);
- amplicylina (Sigma-Aldrich);
- błękit trypanu (Sigma-Aldrich);
- bufor do transfekcji (Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN) – 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,4;
- bufor lizujący – N,N-dimetyloetanolamin (50% v/v) (Sigma-Aldrich), dodecylosiarczan sodu (Sigma-Aldrich) (20% w/v), H₂O; pH 4,7;
- bufor TAE 50x (EUR_x);
- DiO₁₈C(3) (Molecular Probes) – barwnik fluorescencyjny;
- DMSO (Sigma-Aldrich) – dimetylosulfotlenek;
- DNA Gel Loading Dye 6x (Thermo Scientific);
- GreenDNA Gel Stain (Syngen);
- 1 M H₃PO₄ (Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN);
- jonomycyna (Sigma-Aldrich);
- L-glutamina (Sigma-Aldrich);
- LPS (Sigma-Aldrich) – lipopolisacharyd pochodzący z *E. coli* (O111:B4);
- mitomycyna C – (Sigma-Aldrich);
- MTT (Sigma-Aldrich) – bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylo-tetrazoliowy;
- MTX (Ebewe) – metotreksat;

- 4 M NaCl (Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN);
- HES-MTX (Laboratorium Chemii Biomedycznej IITD PAN) – nanokoniugat hydroksyetyloskrobi (HES 130/0.4; Voluven[®], Fresenius Kabi) i metotreksatu (MTX, Ebewe);
- PBS (Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN) – 0,9% buforowany fosforanami roztwór soli fizjologicznej o pH 7,4;
- PEG6000 BioUltra (Sigma-Aldrich) – glikol polietylenowy;
- PEI (Sigma-Aldrich) – polietylenoimina;
- penicylina (Sigma-Aldrich);
- PI (Invitrogen) – jodek propidyny;
- pirogronian sodu (Sigma-Aldrich);
- PMA (Sigma-Aldrich) – ester forbolu (12-mirystynian, 13-octan forbolu);
- polibren (Sigma-Aldrich);
- streptomycyna (Sigma-Aldrich);
- trypsyna z EDTA (Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN) – 0,25% roztwór trypsyny z 2 mM EDTA w PBS;
- Tween 20 (Sigma-Aldrich).

3.1.3. Nanokoniugat metotreksatu i hydroksyetyloskrobi

Nanokoniugat HES-MTX wykorzystywany w doświadczeniach *in vitro* i *in vivo* został przygotowany i scharakteryzowany fizykochemicznie przez dra hab. Tomasza Goszczyńskiego w Laboratorium Chemii Biomedycznej IITD PAN zgodnie z procedurami opisanymi we wcześniejszych publikacjach [Ciekot i in. 2012; Goszczyński i in. 2014].

W niniejszej pracy podawane stężenie HES-MTX odnosi się do całkowitej zawartości kowalencyjnie związanego MTX w koniugacie. W związku z tym zawartość metotreksatu w preparatach oznaczanych jako MTX oraz HES-MTX była jednakowa.

3.1.4. Płyny wykorzystywane w hodowlach komórkowych

3.1.4.1. Pożywki wykorzystywane w hodowlach komórek prokariotycznych

- Pożywka LB (ang. *lysogeny broth*; Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN) – 1% baktotrypton, 1% NaCl, 0,5% ekstrakt drożdżowy; pożywkę uzupełniano ampicyliną (100 µg/ml);
- Zestawiona pożywka LB-agar (Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN) – podłoże LB z dodatkiem 1,5% agaru; pożywkę uzupełniano ampicyliną (100 µg/ml);

- Pożywka SOC (ang. *super optimal catabolite repression*; Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN) – 2% bakto-trypton, 0,5% ekstrakt drożdżowy, 0,05% NaCl, 20 mM glukoza, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, pH 7,0.

3.1.4.2. Podłoża hodowlane wykorzystywane w hodowlach komórek eukariotycznych

- RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 GlutaMAX (Gibco) – podłoże hodowlane uzupełniane o pirogronian sodu (1 mM), penicylinę (100 U/ml), streptomycynę (100 µg/ml), 2-merkaptoetanol (0,05 mM);
- DMEM + 4,5 g/l glukozy (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*; Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN) – podłoże hodowlane uzupełniane o pirogronian sodu (1 mM), penicylinę (100 U/ml), streptomycynę (100 µg/ml), L-glutaminę (2 mM);
- Opti-MEM GlutaMax (Gibco) – podłoże hodowlane uzupełniane o penicylinę (100 U/ml), streptomycynę (100 µg/ml);
- FBS (*fetal bovine serum*; Sigma-Aldrich) – inaktywowana ciepłem płodowa surowica bydlęca.

3.1.5. Rekombinowane cytokiny

- rm GM-CSF (Immunotools) – rekombinowany myszy czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów;
- rm IL-4 (Immunotools) – rekombinowana mysia interleukina 4;
- rm IL-10 (Immunotools) – rekombinowana mysia interleukina 10;
- rh IL-2 (Immunotools) – rekombinowana ludzka interleukina 2.

3.1.6. Bufory i przeciwciała monoklonalne wykorzystywane w analizach cytometrycznych

- PBS + 2 mM EDTA z dodatkiem 2,5% FBS (Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN) – stosowany do przygotowania próbek oraz rozcieńczania przeciwciał;
- LIVE/DEAD Fixable Violet Dead Cell Stain Kit (Invitrogen) – stosowany do oznaczenia populacji martwych komórek w utrwalanych próbkach;
- DAPI (Molecular Probes) – 4',6-diamidyno-2-fenylindol; stosowany do oznaczenia populacji martwych komórek;
- Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (Invitrogen) – wykorzystywany do utrwalania komórek i permeabilizacji błony komórkowej;
- Phosflow Lyse/Fix Buffer 5x (BD Biosciences) – wykorzystywany do utrwalania komórek stosowany w oznaczaniu ekspresji pSTAT3 w komórkach;

- Perm Buffer III (BD Biosciences) – wykorzystywany do permeabilizacji błony komórkowej stosowany w oznaczaniu ekspresji pSTAT3 w komórkach;
- płyn Hanks'a (Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN);
- Stain Buffer (BD Biosciences).

Tabela 1. Przeciwciała monoklonalne stosowane w oznaczeniach cytometrycznych

Antygen	Charakterystyka przeciwciała	Klasa przeciwciał (klon)	Fluorochrom	Stosowane rozcieńczenie	Producent
CD3	Szczurze anty-mysz	IgG2b, κ (17A2)	Brilliant Violet 605	1:200	BioLegend
CD3e	Chomicze anty-mysz	IgG1, κ (145-2C11)	PE-CF594	1:200	BD Biosciences
CD4	Szczurze anty-mysz	Rat IgG2a, κ (RM4-5)	FITC	1:200	BioLegend
CD8a	Szczurze anty-mysz	IgG2a, κ (53-6.7)	APC/Fire 750 PE-Cy7	1:200	BioLegend
CD11b	Szczurze anty-mysz/człowiek	IgG2b, κ (M1/70)	PerCP-Cy5.5	1:200	BioLegend
CD11c	Chomicze anty-mysz	IgG (N418)	Brilliant Violet 650	1:200	BioLegend
CD16/ CD32	Szczurze anty-mysz	IgG2a, λ (93)	-	1:50	eBioscience
CD19	Szczurze anty-mysz	Rat IgG2a, κ (6D5) (1D3)	Alexa Fluor 700 PE-CF594	1:200	BioLegend
CD25	Szczurze anty-mysz	IgG1, λ (PC61)	PE	1:200	BioLegend
CD40	Szczurze anty-mysz	IgG2b, κ (3/23) (i.c. R35-95)	Brilliant Violet 605	1:200	BD Pharmingen
CD44	Szczurze anty-mysz	IgG2b, κ (IM7)	PE-Cy7	1:200	BioLegend
CD45	Szczurze anty-mysz	IgG2b, κ (30-F11)	V500 Brilliant Violet 605	1:200	BioLegend
CD49b	Szczurze anty-mysz	IgM, κ (DX5)	PE-CF594 PE	1:200	BD Biosciences

Tabela 1 c.d. Przeciwciała monoklonalne stosowane w oznaczeniach cytometrycznych.

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 PE-Cy7	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
CD197 (CCR7)	Szczurze anty-mysz	IgG2a, κ (4B12) (i.c. R35-95)	Brilliant Violet 786	1:200	BioLegend
CD206	Szczurze anty-mysz	IgG2a, κ (C068C2) (i.c. RTK2758)	APC	1:50	BioLegend
F4/80	Szczurze anty-mysz	Rat IgG2a, κ, (BM8)	Alexa Fluor 700	1:200	BioLegend
FoxP3	Szczurze anty-mysz/człowiek	IgG2a, κ (FJK-16s) (i.c. eBR2a)	APC	1:100	eBioscience
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. RTK4530)	FITC APC-Cy7	1:400	BioLegend
Stat3 (pY705)	anty-mysz	IgG2a, κ (4/P-STAT3) (i.c. MOPC-173)	Alexa Fluor 647	1:50	BD Phosflow

3.1.7. Bufory i roztwory wykorzystywane w testach ELISA

Oznaczenia stężeń cytokin w nadsączach z nad hodowli komórkowych przeprowadzano z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych zestawów ELISA. Każdy z zestawów zawierał przeciwciało I warstwy, które rozcieńczano w odpowiednim buforze opłaszczającym wykrywające przeciwciało II warstwy oraz enzym (koniugat awidyny i peroksydazy chrzanowej). Ponadto zestawy zawierały rekombinowane białko o znanym stężeniu, które wykorzystywano podczas przygotowania krzywej standardowej.

Tabela 2. Zestawy ELISA wykorzystane do oznaczenia stężeń cytokin w nadsączach z hodowli komórkowych

Cytokina	Producent	Bufor opłaszczający
IL-4	BD Biosciences	0,1 M bufor węglanowy (pH 9,5)
IL-10	BD Biosciences	0,1 M bufor fosforanowy (pH 6,5)
IFN-γ	Invitrogen	10x Coating Buffer rozcieńczony w wodzie MiliQ

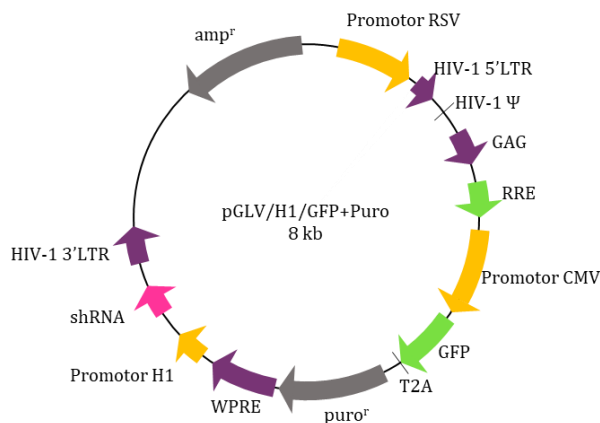
Odczynniki stosowane w teście ELISA (opis metody znajduje się w podrozdziale 3.2.9):

- bufor do przemywania – PBS z dodatkiem 0,05% Tween 20;
- bufor blokujący tło – PBS wzbogacony o 10% FBS lub 5x ELISA/ELISPOT Diluent rozcieńczony w wodzie MiliQ;
- mieszanina wykrywająca białko – w zestawach do testów ELISA pochodzących z firmy BD Biosciences składała się ze specyficznego biotynylowanego przeciwciała II warstwy oraz z enzymu, natomiast w zestawach pochodzących z firmy Invitrogen przygotowywano osobne roztwory przeciwciała II warstwy i enzymu;
- roztwór substratu – mieszanina tetrametylobenzydyny (TMB) oraz nadtlenu wodoru (H_2O_2) w stosunku objętościowym 1:1 stosowana w testach ELISA z firmy BD Biosciences lub roztwór TMB stosowany w testach ELISA z firmy Invitrogen;
- roztwór zatrzymujący reakcję enzymatyczną – 1 M H_3PO_4 .

3.1.8. Plazmidy stosowane w systemie lentiwirusowym III generacji

Tabela 3. System lentiwirusowy III generacji – charakterystyka stosowanych plazmidów

Plazmid	Funkcja	Pochodzenie
pGLV-H1-GFP+puro	Plazmid transferowy zawierający sekwencję shRNA, białko zielonej fluorescencji (EGFP) i gen oporności na puromycynę i ampicylinę	Ezbiolab
pMD2.G	Plazmid kodujący gen białka otoczki wirusa VSV i gen oporności na ampicylinę	Didier Trono, Addgene
pMDL-g/p-RRE	Plazmid pakujący kodujący geny <i>gag</i> i <i>pol</i> i gen oporności na ampicylinę	Didier Trono, Addgene
pRSV-REV	Plazmid pakujący kodujący gen <i>rev</i> i gen oporności na ampicylinę	Didier Trono, Addgene



Ryc. 4. Mapa plazmidu transferowego pGLV-H1-GFP+puro

Tabela 4. Charakterystyka sekwencji shRNA znajdujących się w plazmidzie transferowym pGLV-H1-GFP+puro

Nazwa	Gen docelowy	Sekwencja
shN	ludzkie GAPDH	TATGACAACAGCCTCAAG
shIL-10R_1	mysia IL-10R α	GCGTGACTCTGAAAGCAATGG
shIL-10R_2	mysia IL-10R α	GCAGCTTGGATATACCCATCA
shIL-10R_3	mysia IL-10R α	GGGTGTGGTTAGCTGTGAAGA

3.1.9. Zestawy odczynników wykorzystywane w oznaczeniu ekspresji mRNA

- NucleoSpin[®] RNA (Macherey-Nagel) – stosowany w izolacji RNA z komórek;
- First Strand cDNA Syntesis Kit (Thermo Scientific) – stosowany w reakcji odwrotnej transkrypcji;
- TaqMan[™] Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems[™]) – odczynnik do przeprowadzania reakcji PCR w czasie rzeczywistym;
- TaqMan[™] Gene Expression Assay (Applied Biosystems[™]) – sondy stosowane w oznaczaniu ekspresji genów.

Tabela 5. Sondy stosowane w określaniu ekspresji genów metodą reakcji PCR w czasie rzeczywistym

Gen	Numer identyfikacyjny sondy
<i>Hprt</i>	Mm00446968_m1
<i>Folr1</i>	Mm00433355_m1
<i>I10ra</i>	Mm00434151_m1

3.2. Metody

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

Hodowle komórkowe prowadzono w standardowych warunkach (5% CO₂, 37°C, 95% wilgotności powietrza) w plastikowych butelkach o powierzchni 75 cm² firmy Corning, a w przypadku hodowli komórek Lenti-X™ 293T na większą skalę stosowano szalki o powierzchni 150 cm² firmy Sarstedt. Hodowle utrzymywano w niskiej gęstości i pasażowano 2-3 razy w tygodniu, z wykorzystaniem roztworu trypsyny z EDTA. Zawiesinę komórek odwirowano (192×g, 7 minut), a następnie mikroskopowo oceniano ich żywotność z wykorzystaniem błękitu trypanu oraz komory Bürkera.

W poniższej tabeli przedstawiono charakterystykę linii komórkowych wykorzystanych w doświadczeniach:

Tabela 6. Charakterystyka stosowanych linii komórkowych

Linia komórkowa	Pochodzenie	Stosowane medium hodowlane
MC38	Linia komórek mysiego raka jelita grubego wyprowadzona w IITD PAN [Pajtasz-Piasecka i in. 2004] z nowotworu wyindukowanego chemicznie przez Corbetta i in. [Corbett i in. 1975]	RPMI 1640 z dodatkiem 5% FBS
LL2	Linia komórek mysiego raka płuca (CRL-1642; ATCC)	DMEM z dodatkiem 10% FBS
CT26	Linia komórek mysiego raka jelita grubego (CRL-2638; ATCC)	RPMI 1640 z dodatkiem 10% FBS
Lenti-X™ 293T	Linia komórek pakujących stosowana do produkcji wektorów lentiwirusowych wywodząca się z ludzkich zarodkowych komórek zdrowej nerki HEK293 (Clontech)	DMEM z dodatkiem 10% FBS

Poza liniami komórkowymi, w doświadczeniach wykorzystywano także hodowle komórkowe *ex vivo* takie jak hodowla komórek dendrytycznych pochodzenia szpikowego oraz hodowla komórek izolowanych z mysiej śledziny. W obu przypadkach stosowano medium hodowlane RPMI uzupełnione o 10% FBS i wzbogacone o odpowiednie rekombinowane cytokiny (czynniki wzrostowe).

3.2.2. *Przygotowanie lizatu z komórek nowotworowych*

Komórki nowotworowe MC38 zbierano z butelek hodowlanych przy użyciu trypsyny z EDTA, odwirowano ($192 \times g$, 7 minut) i zawieszano w medium RPMI z dodatkiem 5% FBS doprowadzając do gęstości 5×10^6 kom./ml. W celu uzyskania lizatu komórkowego, przygotowane w ten sposób komórki zamrażano w ciekłym azocie, a następnie rozmrażano w temperaturze 37°C . Po powtórzeniu czynności pięciokrotnie, przeprowadzano 2-godzinny proces sonikacji w temperaturze 37°C z wykorzystaniem urządzenia Sonorex Digital (Bandelin). Otrzymany w ten sposób lizat traktowano jako źródło antygenów nowotworowych (TAg) stosowanych do stymulacji niedojrzałych komórek dendrytycznych.

3.2.3. *Izolacja splenocytów ze śledzion pobranych od zdrowych myszy szczepu C57BL/6*

Od zdrowych myszy szczepu C57BL/6 pośmiertnie pobrano śledziony, które następnie przecierano przez jałowy nylonowy filtr uzyskując zawiesinę pojedynczych komórek śledzionowych (splenocytów). Otrzymane komórki dwukrotnie odwirowano w medium RPMI z dodatkiem 2,5% FBS ($192 \times g$, 7 minut), po czym dodawano mieszaninę składającą się z medium hodowlanego (40%), DMSO (10%) oraz FBS (50%) i zamrażano w ciekłym azocie.

3.2.4. *Hodowla komórek dendrytycznych pochodzenia szpikowego w warunkach ex vivo*

Komórki dendrytyczne pochodzenia szpikowego (oznaczane dalej jako DC) otrzymywano w wyniku hodowli różnicującej komórek wyizolowanych ze szpiku kości udowych i piszczelowych zdrowych myszy szczepu C57BL/6. Komórki (w gęstości 10×10^6 kom./10 ml) hodowano w RPMI z dodatkiem 10% FBS, rm GM-CSF (40 ng/ml) i rm IL-4 (10 ng/ml). Co dwa dni do hodowli dostarczano lub wymieniano 10 ml medium hodowlanego uzupełnionego o niezbędne cytokiny. W wyniku hodowli prowadzonej przez sześć dni uzyskano niedojrzałe DC, które zbierano z butelek przy pomocy roztworu trypsyny i EDTA, a otrzymaną zawiesinę komórek wykorzystywano do dalszych doświadczeń.

Po upływie 24 godzin od nałożenia komórek na butelki hodowlane (w gęstości 15×10^6 kom./20 ml RPMI z dodatkiem 10% FBS) lub płytki 12-dołkowe ($0,5 \times 10^6$ kom./1 ml RPMI z dodatkiem 10% FBS/dołek), do 7-dniowych komórek dendrytycznych dodawano różne czynniki stymulujące dojrzewanie DC. W zależności od rodzaju zaplanowanego doświadczenia do stymulacji DC wykorzystano:

- LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) i/lub rm IL-10 (1 $\mu\text{g/ml}$), a po 24-godzinnej stymulacji oceniono fenotyp powierzchniowy DC zgodnie z opisem znajdującym się w podrozdziale 3.2.5;

- TAg (10% v/v), PMA (1 µg/ml), rm IL-10 (1 µg/ml) lub LPS (1 µg/ml), a po 24 godzinnej stymulacji określono względny poziom ekspresji IL-10R zgodnie z metodą opisaną w podrozdziale 3.2.8 lub oceniono fosforylację czynnika STAT3 (podrozdział 3.2.6).
- TAg (10% v/v), a po 24-godzinnej stymulacji DC wykorzystano jako składnik szczepionek komórkowych stosowanych w skojarzonej terapii przeciwnowotworowej (podrozdział 3.2.15.2).

Ponadto w celu otrzymania komórek dendrytycznych z wyciszoną ekspresją IL-10R przeprowadzono transdukcję wektorami lentiwirusowymi niosącymi sekwencję shRNA skierowaną przeciwko mysiemu receptorowi IL-10. Opis metody transdukcji lentiwirusowej zamieszono w podrozdziale 3.2.13.

3.2.5. Określenie fenotypu powierzchniowego komórek dendrytycznych z wykorzystaniem cytometrii przepływowej

W celu oceny fenotypu powierzchniowego komórek dendrytycznych przenoszono po $0,2 \times 10^6$ kom. do probówek i odwirowano (192×g, 7 minut) w PBS z dodatkiem 2,5% FBS. Następnie, aby zablokować niespecyficzne wiązanie przeciwciał skoniugowanych z fluorochromami, dodawano po 50 µl roztworu przeciwciał monoklonalnych anty-CD16/CD32 i inkubowano przez 15 minut w 4°C. Po odwirowaniu, do komórek dodawano po 50 µl roztworu mieszaniny przeciwciał monoklonalnych: anty-CD11c Brilliant Violet 650, anty-CD40 Brilliant Violet 605, anty-CD80 PerCP-Cy5.5, anty-CD86 PE-Cy7, anty-CD197 (CCR7) Brilliant Violet 786, anty-MHC II APC-Cy7. Do każdej próbki przygotowano kontrolę izotypową (i.c.). Charakterystykę przeciwciał i stosowane rozcieńczenia zamieszczono w podrozdziale 3.1.6 (Tabela 1). Inkubację komórek z przeciwciałami prowadzono przez 45 minut w 4°C, a po odwirowaniu komórki zawieszono w 200 µl roztworu PBS z 2,5% FBS. W celu wyodrębnienia populacji martwych komórek stosowano roztwór barwnika DAPI (1 µg/ml). Analizę przeprowadzono z wykorzystaniem cytometru przepływowego LSR Fortessa z oprogramowaniem Diva (Becton Dickinson).

3.2.6. Ocena fosforylacji czynnika STAT3 w komórkach dendrytycznych z wykorzystaniem cytometrii przepływowej

Komórki dendrytyczne transdukowane wektorami lentiwirusowymi i stymulowane antygenami nowotworowymi przenoszono do probówek (po 2×10^6 kom./ml/probówkę) i dodawano rm IL-10 (1 µg/ml). Po 15 minutach inkubacji w 37°C komórki utrwalano z wykorzystaniem 20 ml buforu Phosflow Lyse/Fix Buffer (inkubacja 10 minut w łaźni wodnej w temp. 37°C). Następnie komórki odwirowano (500×g, 8 minut), a otrzymany osad komórek zawieszono w 5 ml płynu

Hanks'a i ponownie odwirowano ($500\times g$, 8 minut). W kolejnym etapie komórki permeabilizowano poprzez wolne wkraplanie 1 ml zimnego buforu Perm Buffer III i inkubowano na lodzie przez 30 minut. Po dwukrotnym odwirowaniu komórek w Stain Buffer ($250\times g$, 10 minut), dodawano roztwór przeciwciał monoklonalnych: anti-STAT3 (pY705) Alexa Fluor 647 oraz anti-CD11c Brilliant Violet 650 i inkubowano przez 45 minut w 4°C . Po tym czasie komórki odwirowano i dodano 200 μl roztworu PBS z 2,5% FBS. Analizę przeprowadzano z wykorzystaniem cytometru przepływowego LSR Fortessa z oprogramowaniem Diva (Becton Dickinson).

3.2.7. Ocena zahamowania proliferacji komórek nowotworowych z wykorzystaniem kolorymetrycznego testu MTT

Komórki nowotworowe MC38, LL2, CT26 zbierano z butelek hodowlanych za pomocą trypsyny z EDTA, odwirowano ($192\times g$, 7 minut) i zawieszano w odpowiednim medium hodowlanym. Następnie nakładano po 5×10^3 kom./100 μl /dołek płytki 96-dołkowej (Corning) i tak przygotowane komórki inkubowano przez 24 godziny w standardowych warunkach. Po tym czasie do komórek dodawano po 100 μl roztworu MTX lub HES-MTX przygotowanego w medium hodowlanym, a końcowe stężenie preparatów na dołku mieściło się w zakresie 0,001-2000 ng/ml. Inkubację komórek ze związkami prowadzono przez 72 godziny w standardowych warunkach. Na ostatnie 4 godziny inkubacji dodawano po 25 μl roztworu MTT o stężeniu 5 mg/ml, po tym czasie dołki uzupełniano o 75 μl buforu lizującego. Po całonocnej inkubacji absorbancję mierzono przy długości fali 570 nm, wykorzystując spektrofotometr Thermo Labsystem Multiskan RC oraz oprogramowanie Genlite. Na podstawie otrzymanych danych, dla każdej linii nowotworowej wyliczono wartość IC_{50} odpowiadającą stężeniu MTX i HES-MTX, które w 50% hamowało proliferację komórek.

3.2.8. Oznaczenie poziomu ekspresji genów z wykorzystaniem metody PCR w czasie rzeczywistym

Z zawiesiny komórek linii nowotworowych (MC38, LL2, CT26) odbierano 2×10^6 komórek, które przeznaczano na określenie poziomu ekspresji $\text{FR}\alpha$ metodą reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

Z zawiesiny komórek dendrytycznych oraz transdukowanych DC (opisywanych w podrozdziale 3.2.13) odbierano 2×10^6 komórek, które przeznaczano na określenie poziomu ekspresji IL-10R metodą reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

3.2.8.1. Izolacja całkowitego RNA z komórek

Izolację całkowitego RNA przeprowadzano z wykorzystaniem zestawu NucleoSpin[®] RNA (Macherey-Nagel) zgodnie z protokołem producenta.

W pierwszym etapie, komórki przeznaczone do izolacji RNA wirowano w PBS, a następnie osad komórek lizowano z wykorzystaniem 350 μ l buforu RA1 oraz 3,5 μ l 2-merkaptoetanolu. Po zmniejszeniu lepkości lizatu poprzez kilkukrotne zasysanie strzykawką z 0,9 mm igłą, nakładano lizat na filtr NucleoSpin Filter i wirowano (11 000 \times g, 1 minuta). Następnie do przefiltrowanego lizatu dodawano 350 μ l etanolu (70%), po czym roztwór przenoszono na kolumnę NucleoSpin RNA i odwirowano (11 000 \times g, 30 s) w celu związania RNA na złożu kolumny. Kolejnym etapem izolacji było odsalanie membrany krzemionkowej poprzez dodanie 350 μ l buforu MDB do kolumny i jej odwirowanie (11 000 \times g, 1 minuta). W celu eliminacji obecnego DNA stosowano 95 μ l roztworu rDNazy i inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Następnie, przemywano złożę kolumny z wykorzystaniem 200 μ l buforu RAW2 i odwirowano (11 000 \times g, 30 s). Kolejne oczyszczanie kolumny wykonywano dwukrotnie: dodając 600 μ l buforu RA3 i osuszając kolumnę przez odwirowanie (11 000 \times g, 30 s), a następnie 250 μ l buforu, po którym wirowano kolumnę przez 2 minuty z prędkością 11 000 \times g w celu całkowitego jej osuszenia.

Wyizolowane RNA eluowano ze złoża za pomocą 40 μ l wody wolnej od RNaz podczas wirowania przez 1 minutę z prędkością 11 000 \times g. Następnie dokonywano pomiaru stężenia RNA.

3.2.8.2. *Oznaczanie stężenia i czystości RNA*

Stężenie oraz czystość wyizolowanego komórkowego RNA oznaczano przy użyciu spektrofotometru NanoDrop firmy Thermo Scientific. Wyliczenia stężenia kwasu nukleinowego zostały oparte na równaniu Lamberta-Beera z użyciem skorygowanej wartości absorbancji kwasu nukleinowego. Określając czystość wyizolowanego RNA opierano się na iloczynie wartości skorygowanych absorbancji mierzonych przy długościach fal 260 nm oraz 280 nm. Dla dobrze oczyszczonego RNA wartość A_{260}/A_{280} powinna wynosić $\sim 2,0$.

3.2.8.3. *Reakcja odwrotnej transkrypcji*

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzano używając zestawu First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) zgodnie z zaleceniami producenta.

Do reakcji wykorzystywano objętość roztworu odpowiadającą 2 μ g wyizolowanego RNA, do którego dodawano 1 μ l oligo(dT)₁₈ primer i uzupełniano wodą wolną od nukleaz do objętości 11 μ l. Następnie dodawano mieszaninę składającą się z:

- 5x Reaction Buffer – 4 μ l;
- RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ μ l) – 1 μ l;
- 10 mM dNTP Mix – 2 μ l;
- M-MuLV Reverse Transcriptase (20 U/ μ l) – 2 μ l.

Łączna objętość mieszaniny reakcyjnej do odwrotnej transkrypcji wynosiła 20 μ l. Reakcję przeprowadzano w termocyklerze firmy Bio-Rad w temperaturze 42°C przez 60 minut, a zakończono poprzez inkubację w temperaturze 70°C przez 5 minut. Otrzymane cDNA (o stężeniu 2 μ g/20 μ l) wykorzystywano w reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

3.2.8.4. *Reakcja PCR w czasie rzeczywistym*

Poziom ekspresji badanego genu określano z wykorzystaniem odczynnika TaqMan™ Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems™). Do mieszaniny reakcyjnej dodawano cDNA (50 ng/reakcję) oraz odpowiednie sondy (Tabela 5), a następnie naniesiono po 20 μ l mieszaniny do dołków płytki MicroAmp™ (Applied Biosystems™). Reakcję PCR w czasie rzeczywistym prowadzono z wykorzystaniem urządzenia ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™). Poziom ekspresji genu *FolR1* (FR α) w komórkach LL2 i CT26 oszacowano względem komórek MC38, a w przypadku stymulowanych lub transdukowanych DC poziom ekspresji *Il10ra* oszacowano względem niestymulowanych lub nietransdukowanych DC. Do wyliczenia relatywnego poziomu ekspresji badanego genu wykorzystywano metodę komparatywną ($\Delta\Delta$ Ct).

3.2.9. *Ocena stężenia cytokin w nadsączach znad hodowli komórkowych z wykorzystaniem testu ELISA*

W celu oznaczenia stężenia cytokin w nadsączach znad hodowli mieszanych, które zebrano po pierwotnej stymulacji lub restymulacji komórek śledzionowych, wykorzystywano komercyjnie dostępne testy ELISA. Opis stosowanych buforów i roztworów zamieszczono w podrozdziale 3.1.7.

W dniu poprzedzającym wykonanie testu ELISA (ok. 16 godzin przed rozpoczęciem testu), na 96-dołkową płytkę MaxiSorp™ firmy Nunc nanoszono po 100 μ l/dołek roztworu przeciwciał I warstwy. Tak przygotowaną płytkę pozostawiano w temp. 4°C na całonocną inkubację. Po tym czasie dołki 3-krotnie płukano buforem przemywającym (300 μ l/dołek), a następnie nanoszono po 200 μ l/dołek buforu blokującego tło i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po kolejnym, 3-krotnym płukaniu dołków, nakładano po 100 μ l/dołek badanych nadsączy oraz próbek o standardowym stężeniu badanej cytokiny, które służyły do wyznaczenia krzywej kalibracyjnej (inkubację prowadzono przez 2 godziny w temperaturze pokojowej). W celu usunięcia niezwiązanych cząsteczek białka, płytkę płukano 5-krotnie. Następnie do dołków nanoszono mieszaninę wykrywającą badane białko. Ten etap różnił się w zależności od producenta stosowanego zestawu. W przypadku użycia testów ELISA firmy BD Biosciences mieszanina wykrywająca białko składała się z przeciwciał II warstwy oraz enzymu, a inkubację prowadzono przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po inkubacji następowało 7-krotne przemywanie dołków, pozostawiając bufor w dołkach na ok. 45 sekund w celu dokładnego odpłukania

niezwiązanego kompleksu przeciwciała II warstwy-enzym. Natomiast podczas wykonywania testów ELISA z firmy Invitrogen, najpierw prowadzono 1-godziną inkubację (w temperaturze pokojowej) z przeciwciałami II warstwy (100 μ l/dołek), po której następowało 5-krotne przepłukanie dołek. Następnie наносzono po 100 μ l/dołek roztworu enzymu, a inkubację prowadzono przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Po inkubacji następowało 7-krotne przemywanie dołek, pozostawiając bufor w dołkach na ok. 45 sekund.

Kolejnym etapem wykonywania testu ELISA było naniesienie roztworu substratu (100 μ l/dołek) i inkubacja w temperaturze pokojowej bez dostępu światła (30 minut dla testów ELISA z firmy BD Biosciences lub 15 minut dla testów ELISA z firmy Invitrogen). Po tym czasie dodawano 50 μ l/dołek roztworu blokującego reakcję enzymatyczną (1M H₃PO₄). Absorbancję roztworów mierzono w ciągu 30 minut przy długości fali 450 nm oraz 570 nm jako długości korekcyjnej, wykorzystując spektrofotometr Thermo Labsystem Multiskan RC oraz oprogramowanie Genlite. Stężenie białka w roztworach określano wykorzystując krzywą standardową wyznaczaną osobno dla każdego testu.

3.2.10. Produkcja plazmidowego DNA

W celu otrzymania roztworów plazmidowego DNA niezbędnych do kotransfekcji komórek pakujących Lenti-X™ 293T, przeprowadzono izolację plazmidowego DNA z transformowanych bakterii. Przedstawione poniżej metody dotyczyły wykorzystania mikroorganizmów genetycznie zmodyfikowanych zaliczanych do II kategorii zagrożenia i przeprowadzono je za zgodą Ministerstwa Środowiska (nr decyzji 46/2021).

3.2.10.1. Transformacja bakterii chemikompetentnych metodą szoku cieplnego

W doświadczeniach wykorzystywano szczep bakterii chemikompetentnych: DH5 α ™ Chemically Competent *Escherichia coli* o genotypie: F- ϕ 80lacZM15 (lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ -.

Do zamrożonej zawiesiny chemikompetentnych bakterii *E. coli* dodawano plazmidowe DNA i inkubowano 10 minut na lodzie. Następnie prowadzono inkubację w łaźni wodnej (42°C) przez 40-50 s i przenoszono z powrotem na lód na 5 minut. Po tym czasie dodawano 1 ml pożywki SOC i wytrząsano przez 1 godzinę w 37°C. Otrzymaną zawiesinę komórek bakteryjnych wysiewano metodą posiewu gładzonego na płytkę Petriego z pożywką selekcyjną (LB-agar z dodatkiem ampicyliny 100 μ g/ml). Po całonocnej inkubacji w temperaturze 37°C, z pojedynczej kolonii bakterii wykonywano posiew redukcyjny, a następnie namnażano bakterie w celu izolacji plazmidowego DNA.

3.2.10.2. Izolacja plazmidowego DNA „na małą skalę”

Pojedynczą kolonię bakteryjną uzyskaną dzięki posiewowi redukcyjnemu zawieszano w 5 ml pożywki LB z dodatkiem antybiotyku selekcyjnego (ampicyliny 100 µg/ml) i wytrząsano (180 rpm) przez 16 godzin w 37°C. Plazmidowe DNA izolowano za pomocą zestawu GeneMATRIX Plasmid Miniprep DNA Purification Kit (EURx) postępując zgodnie z zaleceniami producenta. W pierwszym etapie izolacji aktywowano minikolumny przez dodanie 30 µl buforu aktywacyjnego Buffer PL. Następnie hodowlę bakteryjną wirowano w celu otrzymania osadu bakterii (12 000×g, 2 minuty), który zawieszono w 250 µl buforu Cell R. W kolejnym etapie dodawano 250 µl buforu lizującego Lysis Blue i powoli mieszano zawartość, aż do uzyskania jednolitej, niebieskiej zawiesiny. Po dodaniu 350 µl buforu Neutral B, ponownie powoli mieszano zawiesinę, aż do całkowitego zaniku niebieskiej barwy, po czym wirowano ją przez 7 minut z prędkością 12 000×g. Otrzymany klarowny nadsącz przenoszono do aktywowanej minikolumny umieszczonej w probówce odbierającej i wirowano (11 000×g, 1 minuta). Następnie otrzymany przesącz wylewano, a na minikolumnę dodawano 500 µl buforu płuczącego Wash PLX1 i ponownie wirowano (11 000×g, 1 minuta). Przesącz usuwano, dodawano 650 µl buforu płuczącego Wash PLX2 i wirowano (11 000×g, 1 minuta). W celu usunięcia resztek buforu płuczącego, minikolumny wirowano przez 2 minuty z prędkością 11 000×g, a następnie wymywano związane DNA za pomocą 50 µl buforu Elution. Po 2-minutowej inkubacji minikolumny w temperaturze pokojowej wirowano ją ostatni raz (11 000×g, 1 minuta), a otrzymane DNA wykorzystywano do wykonania analizy restrykcyjnej (opisanej w podrozdziale 3.2.10.4) oraz rozdziału elektroforetycznego potwierdzającego poprawność transformacji bakterii.

3.2.10.3. Izolacja plazmidowego DNA „na dużą skalę”

Pojedynczą kolonię bakteryjną uzyskaną dzięki posiewowi redukcyjnemu zawieszano w 5 ml pożywki LB z dodatkiem ampicyliny (100 µg/ml) i wytrząsano przez 8 godzin w 37°C. Następnie hodowlę przenoszono do 400 ml świeżej pożywki z dodatkiem ampicyliny (100 µg/ml) i wytrząsano (180 rpm) przez 16 godzin w 37°C. Plazmidowe DNA izolowano za pomocą zestawu QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) postępując zgodnie z zaleceniami producenta.

Zawiesinę komórek po całonocnej inkubacji przenoszono do probówek wirówkowych i wirowano (5000×g, 30 minut). Po dokładnym usunięciu nadsączy, osad bakteryjny zawieszano w 10 ml buforu P1 z dodatkiem RNazy A (100 µg/ml) i dokładnie mieszano. Następnie dodawano 10 ml buforu P2, energicznie odwracano probówki wirówkowe i inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej. W kolejnym etapie, do mieszaniny dodawano 10 ml schłodzonego buforu P3, energicznie odwracano probówki wirówkowe i inkubowano przez 20 minut na lodzie. Po tym czasie, mieszaninę wirowano (12 000×g, 30 minut, 4°C), a otrzymany nadsącz bogaty

w plazmidowe DNA nakładano na kolumnę i wykorzystując wypływ grawitacyjny przesączono go przez złożę kolumny. Następnie kolumnę przemywano dwukrotnie z wykorzystaniem 30 ml buforu QC. Elucję DNA ze złoża kolumny przeprowadzano z wykorzystaniem 15 ml buforu QF, a eluat zbierano do próbki wirówkowej. Precypitację eluowanego DNA przeprowadzano z wykorzystaniem 10,5 ml izopropanolu, po której następowało wirowanie (14 000×g, 15 minut, 4°C). Po delikatnym odlaniu nadsączy, DNA przemywano 5 ml 70% etanolu i ponownie wirowano (14 000×g, 10 minut, 4°C). Następnie osad DNA suszono na powietrzu, po czym rozpuszczano w 1 ml wody do biologii molekularnej i wykorzystywano do dalszych analiz.

3.2.10.4. Oznaczanie stężenia i czystości plazmidowego DNA oraz analiza restrykcyjna DNA

Stężenie oraz czystość wyizolowanego plazmidowego DNA oznaczano przy użyciu spektrofotometru NanoDrop firmy Thermo Scientific. Wyliczając stężenie plazmidowego DNA korzystano z zależności absorbancji próbki przy długości fali 260 nm od jej stężenia, zakładając, że 50 µg/ml plazmidowego DNA daje absorbancję równą 1. Określając czystość wyizolowanego DNA opierano się na iloczynie wartości skorygowanych absorbancji mierzonych przy długościach fal 260 nm oraz 280 nm. Dla dobrze oczyszczonego DNA wartość A_{260}/A_{280} powinna wynosić ~1,8.

Analizę restrykcyjną DNA wykonywano po każdej izolacji plazmidowego DNA. Enzymy restrykcyjne oraz bufor używane w analizach przedstawiono w tabeli poniżej. Zgodnie z zaleceniami producenta, w analizie restrykcyjnej stosowano 10 U enzymu restrykcyjnego na 1 µg DNA. Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi prowadzono przez 16 godzin w temperaturze 37°C, a końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 20 µl.

Tabela 7. Enzymy restrykcyjne i bufor używane podczas analizy restrykcyjnej plazmidowego DNA

Plazmid	Enzymy restrykcyjne	Bufory	Producent
pGLV-H1-GFP+puro	EcoRI Bsu15I (ClaI)	Bufor BamHI	Thermo Scientific
pMD2.G	PstI	Bufor O	
pMDL-g/p-RRE	XhoI MluI	Bufor R	
pRSV-REV	EcoRI	Bufor EcoRI	

Rozdział elektroforetyczny plazmidowego DNA poddanej analizie restrykcyjnej prowadzono w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika GreenDNA Gel Stain (Syngen) w buforze TAE przy napięciu 100 V przez około 60 minut. Próbkę DNA nakładano na żel uprzednio

mieszając je z barwnikiem obciążającym DNA Gel Loading Dye 6x (Thermo Scientific). Elektroforezę analizowano w świetle UV z wykorzystaniem transiluminatora Gel Doc firmy Bio-Rad, a otrzymane obrazy zapisywano w postaci cyfrowych plików graficznych.

3.2.11. Produkcja i zagęszczanie wektorów lentiwirusowych

Hodowlę komórek linii Lenti-X™ 293T założono na szalkach hodowlanych o powierzchni 150 cm² w gęstości 5×10⁶ komórek zawieszonych w medium hodowlanym DMEM + 4,5 g glukozy uzupełnionym o 10% FBS. Po 72 godzinach od nałożenia komórek, gdy zajmowały one ok. 80% powierzchni szalki, przeprowadzano kotransfekcję plazmidami wchodzącymi w skład systemu lentiwirusowego III generacji (Tabela 3). Mieszanie plazmidowych DNA oraz roztwór polietylenoiminy (PEI) przygotowywano w buforze do transfekcji. Następnie do mieszaniny DNA powoli dodawano, cały czas mieszając, roztwór PEI, a po 15-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej, taką mieszaniną transfekowano komórki linii Lenti-X™ 293T. Po 24 godzinach dokonywano wymiany medium hodowlanego na Opti-MEM + GlutaMAX uzupełnionego o 5% FBS. Transfekowane komórki Lenti-X™293T wydzielają cząsteczki wirusów do medium hodowlanego, które zbierano po upływie 48 godzin. Po wstępnym oczyszczeniu nadsącza hodowlanego ze zlepow komórkowych oraz martwych komórek (2 000×g, 20 minut), przeprowadzano proces zagęszczania cząsteczek wirusowych. W tym celu do nadsącza dodawano mieszaninę PEG 6000, 4 M NaCl oraz PBS. Po 90 minutowej inkubacji w temperaturze 4°C, mieszaninę odwirowano (3 800×g, 80 minut), a otrzymany osad zawierający wektory lentiwirusowe zawieszono w PBS i przechowywano w temperaturze -80°C.

3.2.12. Oznaczanie miana wektorów lentiwirusowych

Miano wektorów lentiwirusowych określano metodą seryjnych rozcieńczeń z wykorzystaniem transdukowanych komórek linii MC38. W tym celu komórki MC38 nakładano na płytki 24-dółkowe firmy Costar (0,1×10⁶ kom./ml/dółek), a po upływie 24 godzin, poddawano je transdukcji wektorami lentiwirusowymi w obecności polibrenu (10 µg/ml). Zastosowano 100-, 500-, 2 500- oraz 12 500-krotnie rozcieńczone wektory lentiwirusowe. Po 24 godzinach od transdukcji wymieniano medium hodowlane, a następnie po upływie 48 godzin, komórki zbierano przy pomocy roztworu trypsyny z EDTA i zawieszano w PBS z dodatkiem 2,5% FBS. Odsetek komórek wykazujących ekspresję EGFP, świadczący o wydajności przeprowadzonej transdukcji określano w cytometrze przepływowym LSR Fortessa z oprogramowaniem Diva. Do obliczenia miana wektorów lentiwirusowych stosowano następujący wzór:

$$M\left(\frac{TU}{ml}\right) = \frac{C \cdot G \cdot F}{V}$$

M – miano nadszycza lentiwirusowego (TU/ml; ang. *transducing units*; TU),

C – średnia liczba komórek przypadająca na dołek,

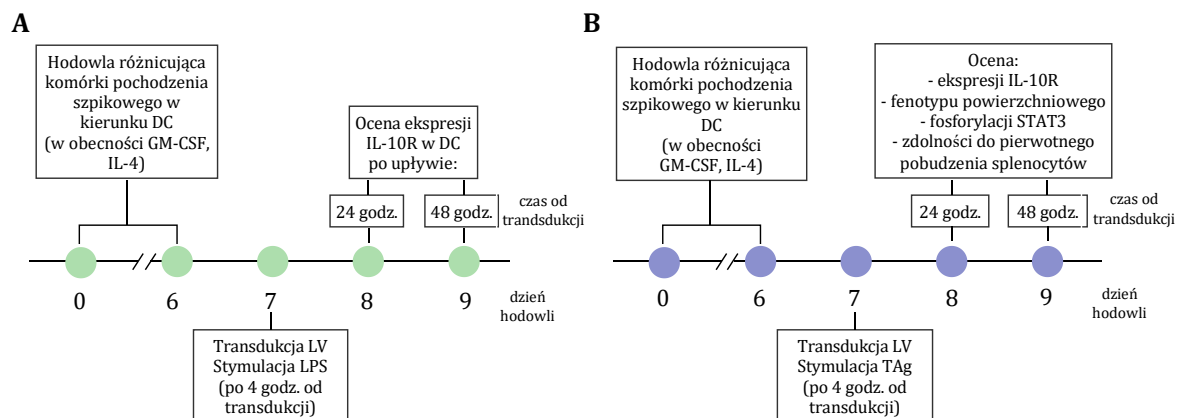
G – iloczyn liczby komórek wykazujących zieloną fluorescencję i wszystkich komórek w próbce,

F – rozcieńczenie nadszycza lentiwirusowego,

V – objętość w dołku.

3.2.13. Transdukcja komórek dendrytycznych z wykorzystaniem wektorów lentiwirusowych

Niedojrzałe komórki dendrytyczne otrzymane z 6-dniowej hodowli różnicującej (według metody opisanej w podrozdziale 3.2.4) nałożono do butelek hodowlanych w gęstości 15×10^6 kom./20 ml medium hodowlanego wzbogaconego o cytokiny w odpowiednich stężeniach. Po upływie 24 godzin, 7-dniowe komórki dendrytyczne transdukowano wektorami lentiwirusowymi (w liczbie 4 TU/1 kom. docelową) kodującymi sekwencję shRNA skierowaną przeciwko IL-10R (shIL-10R) lub sekwencję kontrolną (shN). Proces transdukcji przeprowadzono w obecności polibrenu (8 μ g/ml). Następnie po 4 godzinach od dodania wektorów lentiwirusowych, komórki dendrytyczne stymulowano LPS (1 μ g/ml) (Ryc. 5 A) lub TAg (10% v/v) (Ryc. 5 B).

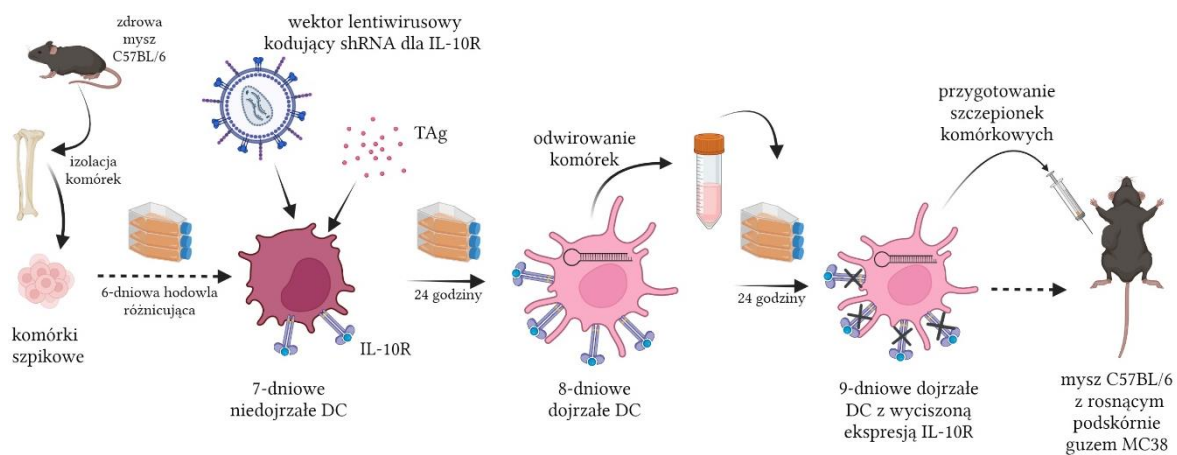


Ryc. 5. Schematy doświadczeń *in vitro* prowadzących do wyciszenia receptora IL-10 w komórkach dendrytycznych stymulowanych LPS (A) lub TAg (B) oraz zakres przeprowadzonych analiz fenotypowych i funkcjonalnych otrzymanych komórek.

Po upływie kolejnych 20 godzin, 8-dniowe transdukowane komórki zbierano i odwirowywano (192 \times g, 7 minut), po czym wykorzystywano w dalszych analizach i testach funkcjonalnych lub przenoszono je z powrotem do butelek hodowlanych na kolejne 24 godziny. Po tym czasie 9-dniowe transdukowane DC zbierano z butelek, wirowano i wykorzystywano

w dalszych analizach i testach funkcjonalnych. Na Ryc. 5 przedstawiono schemat doświadczeń oraz zakres przeprowadzonej charakterystyki komórek.

Skuteczność wyciszenia ekspresji IL-10R w DC oceniano na podstawie relatywnego poziomu ekspresji genu *Il10ra* za pomocą reakcji PCR w czasie rzeczywistym, zgodnie z metodą opisaną w podrozdziale 3.2.8. Ponadto w przypadku transdukowanych DC i stymulowanych TAG przeprowadzono ocenę fenotypu powierzchniowego (podrozdział 3.2.5), fosforylacji czynnika STAT3 (podrozdział 3.2.6) oraz określono zdolność transdukowanych DC do pierwotnego pobudzenia limfocytów T (podrozdział 3.2.14). W doświadczeniach terapeutycznych prowadzonych w warunkach *in vivo* (opisywanych w podrozdziale 3.2.15), do przygotowywania szczepionek komórkowych wykorzystywano stymulowane antygenami nowotworowymi transdukowane DC, które zbierano po upływie 48 godzin od dodania wektorów lentiwirusowych. Sposób przygotowania szczepionek komórkowych na bazie transdukowanych DC stymulowanych TAG przedstawiono na poniższej rycinie.



Ryc. 6. Schemat przygotowania szczepionek komórkowych na bazie DC z wyciszonym receptorem IL-10.

3.2.14. Ocena zdolności transdukowanych DC do pierwotnego pobudzenia komórek śledzionowych

Do dołek płytki 12-dołkowej (Nunc) nakładano po $0,18 \times 10^6$ kom./0,5 ml/dołek transdukowanych DC stymulowanych TAG oraz po $1,8 \times 10^6$ kom./0,5 ml/dołek zawiesiny splenocytów pobranych ze zdrowej myszy szczepu C57BL/6 (końcowy stosunek liczby DC względem komórek śledzionowych wynosił 1:10). Hodowlę mieszaną prowadzono w medium RPMI z dodatkiem 10% FBS uzupełnionym o rh IL-2 (200 U/ml) w warunkach standardowych.

Po 5 dniach hodowli, nadsącza znad komórek zbierano w celu określenia stężenia cytokin (za pomocą testu ELISA, podrozdział 3.2.9), a komórki śledzionowe odwirowano i analizowano ich fenotyp powierzchniowy, zdolność do degranulacji na podstawie poziomu ekspresji cząsteczki CD107a, a także oceniano aktywność cytotoksyczną wobec komórek nowotworowych.

3.2.14.1. Ocena fenotypu powierzchniowego pobudzonych komórek śledzionowych oraz ich zdolności do degranulacji określana na podstawie poziomu ekspresji cząsteczki CD107a

Komórki śledzionowe pobudzone przez transdukowane DC zebrano, odwirowano i nałożono po 2×10^5 kom./dołek na jednowarstwową hodowlę komórek nowotworowych MC38, przygotowaną dzień wcześniej ($0,4 \times 10^5$ kom./dołek, 96-dołkowa płytki firmy Costar). Do każdego z dołków dodano mieszaninę przeciwciał anti-CD107a skoniugowanych z fluorochromem APC, rh IL-2 (200 U/ml), PMA (stężenie końcowe 50 ng/ml) i jonomycynę (stężenie końcowe 1 μ g/ml). Inkubację prowadzono przez 2 godziny w 37°C. Po tym czasie, zebrano komórki i odwirowano, a następnie dodano po 50 μ l mieszaniny przeciwciał monoklonalnych: anti-CD45 Brilliant Violet 605, anti-CD4 FITC, anti-CD19 Alexa Fluor 700, anti-CD8 APC/Fire 750 oraz anti-CD49b PE-CD594 (Tabela 1). Inkubację komórek z przeciwciałami prowadzono przez 45 minut w 4°C, a po odwirowaniu zawiesiny dodano 200 μ l roztworu PBS z 2,5% FBS. W celu wyodrębnienia populacji martwych komórek stosowano roztwór barwnika DAPI (1 μ g/ml). Analizę przeprowadzano z wykorzystaniem cytometru przepływowego LSR Fortessa z oprogramowaniem Diva (Becton Dickinson).

Tabela 8. Charakterystyka fenotypowa komórek śledzionowych pobudzonych w pięciodniowej hodowli mieszanej

Komórki	Fenotyp
limfocyty T CD8 ⁺	CD45 ⁺ CD49b ⁻ CD8 ⁺
limfocyty T CD4 ⁺	CD45 ⁺ CD49b ⁻ CD4 ⁺
limfocyty B	CD45 ⁺ CD49b ⁻ CD19 ⁺
komórki NK	CD45 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻ CD49b ⁺

3.2.14.2. Ocena aktywności cytotoksycznej pobudzonych komórek śledzionowych

Aktywność cytotoksyczną pobudzonych splenocytów (komórek efektorowych) określano na podstawie ich zdolności do zabijania komórek nowotworowych MC38 (komórek docelowych). W tym celu przygotowano zawiesinę komórek MC38 wyznakowanych barwnikiem DiO₁₈C(3) (10 μ l barwnika/ 1×10^6 kom./ml zawiesiny). Komórki inkubowano z DiO₁₈C(3) przez 20 minut w 37°C, a następnie po trzykrotnym odwirowaniu niezwiązanego barwnika (192 \times g, 7 minut), wyznakowane komórki MC38 nakładano po 1×10^4 kom./100 μ l/dołek na okrągłodenne płytki 96-dołkowe (Greiner). Następnie dodano po 1×10^5 kom./100 μ l/dołek lub 3×10^5 kom./100 μ l/dołek zawiesiny komórek śledzionowych. Stosunek komórek docelowych do komórek efektorowych

wynosił odpowiednio 1:10 lub 1:30. Mieszana hodowlę prowadzono w RPMI z dodatkiem 10% FBS uzupełnionym o rhIL-2 (200 U/ml) przez 4 godziny w 37°C. Po zakończonej inkubacji, komórki zbierano z dołków i odwirowano, po czym dodawano po 200 µl 7,5 nM roztworu jodku propidyny (PI) (inkubację prowadzono przez 10 minut w temp. 37°C). Komórki analizowano z wykorzystaniem cytometru przepływowego LSR Fortessa z oprogramowaniem Diva (Becton Dickinson). Aktywność cytotoksyczną określano jako odsetek martwych komórek MC38 (DiO₁₈C(3)⁺ PI⁺) inkubowanych z komórkami efektorowymi pomniejszony o odsetek martwych komórek MC38 inkubowanych bez komórek efektorowych.

3.2.15. Doświadczenia terapeutyczne

3.2.15.1. Wszczepienie komórek nowotworowych

Komórki nowotworowe MC38 zbierano z butelek hodowlanych za pomocą trypsyny z EDTA i odwirowano (192×g, 7 minut), a następnie zawieszano je w soli fizjologicznej. Tak przygotowane komórki podawano podskórnie (*s.c.*) w prawy bok myszy w liczbie $1,1 \times 10^6$ kom./0,2 ml/mysz. W dniu, w którym rozpoczynano terapię przeciwnowotworową w oparciu o wielkość rosnącego guza myszy zostały losowo podzielone na grupy doświadczalne.

3.2.15.2. Przygotowanie szczepionek komórkowych na bazie dojrzałych komórek dendrytycznych

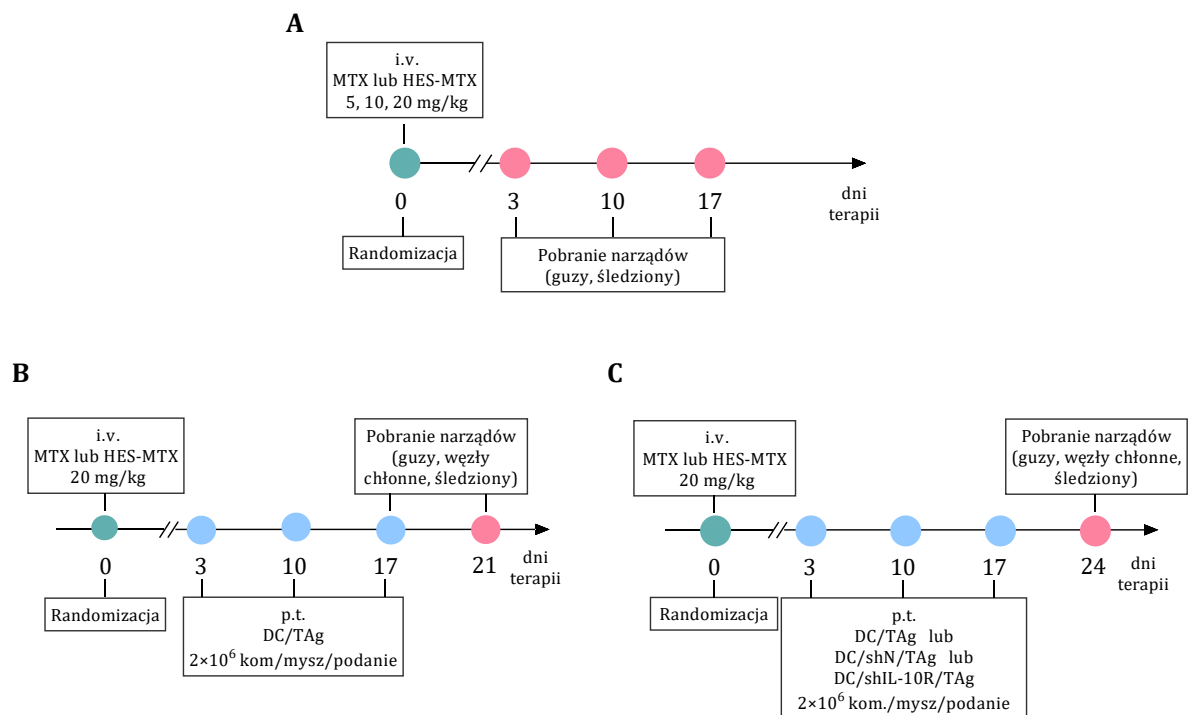
Szczepionki komórkowe stosowane w skojarzonej terapii przeciwnowotworowej przygotowywano z komórek dendrytycznych stymulowanych antygenami nowotworowymi (DC/TAg). Szczegółowy opis prowadzenia hodowli DC w warunkach *ex vivo* opisano w podrozdziale 3.2.4. Komórki dendrytyczne z wyciszoną ekspresją IL-10R i poddane stymulacji antygenami nowotworowymi otrzymywano na drodze transdukcji lentiwirusowej zgodnie z metodą opisaną w podrozdziale 3.2.13.

Komórki dendrytyczne zbierano z butelek hodowlanych za pomocą trypsyny z EDTA i odwirowano (192×g, 7 minut), a następnie zawieszano je w soli fizjologicznej. Szczepionkowe komórki dendrytyczne podawano okołoguzowo (*p.t*) w liczbie 2×10^6 kom./0,2 ml/mysz trzykrotnie w tygodniowych odstępach rozpoczynając od trzeciego dnia terapii. Schematy doświadczeń terapeutycznych przedstawiono na Ryc. 7.

3.2.15.3. Schematy doświadczeń terapeutycznych

W doświadczeniu chemioterapeutycznym (Ryc. 7 A), w dniu rozpoczęcia terapii myszy z podskórnie rosnącymi guzami MC38 otrzymywały MTX lub HES-MTX dożylnie (*i.v.*; do żyły ogonowej) w dawkach: 5, 10 lub 20 mg/kg masy ciała.

Preparaty rozcieńczano w soli fizjologicznej w taki sposób, aby na każde 10 g wagi myszy została podana dożylnie objętość 0,1 ml preparatu. Podczas trwania doświadczenia co 3-4 dni mierzono guzy, a następnie obliczano ich objętość na podstawie wzoru: $\frac{1}{2} a \times b^2$, gdzie „a” jest dłuższym, a „b” krótszym wymiarem. Skuteczność zastosowanej terapii określano na podstawie procentowego zahamowania wzrostu nowotworu (TGI, *tumor growth inhibition*) w odniesieniu do guzów myszy nietraktowanych (nieleczonych), który obliczano ze wzoru: $TGI [\%] = 100 - (T/C \times 100)$, gdzie **T** oznacza medianę objętości guzów myszy poddanych terapii, a **C** – medianę guzów myszy nietraktowanych. Ponadto w celu określenia zmian w lokalnej i ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej w 3., 10., i 17. dniu terapii od 5 myszy z każdej grupy pobierano pośmiertnie guzy nowotworowe i śledziony.



Ryc. 7. Schemat doświadczenia chemioterapeutycznego (A) oraz chemoimmunoterapeutycznego (B, C).

W doświadczeniach chemoimmunoterapeutycznych (Ryc. 7 B i C) w dniu rozpoczęcia terapii, myszy z podskórnie rosnącymi guzami MC38 otrzymały MTX lub HES-MTX dożylnie (*i.v.*; do żyły ogonowej) w dawce 20 mg/kg masy ciała, a trzy dni później rozpoczęto okołoguzowe (*p.t.*) podania szczepionek komórkowych na bazie dojrzałych DC (2×10^6 kom./0,2 ml/mysz/podanie). Objętość guzów MC38 monitorowano podczas trwania doświadczenia, a efekt terapeutyczny określono w oparciu o obliczoną wartość TGI. Po zakończeniu terapii, od myszy pobierano guzy nowotworowe, węzły chłonne drenujące nowotwór oraz śledziony do dalszych analiz *ex vivo* opisanych w podrozdziałach 3.2.16 oraz 3.2.17.

Każdy z narządów pobranych od myszy przecierano przez jałowy nylonowy filtr, w celu otrzymania zawiesiny pojedynczych komórek. Otrzymane komórki dwukrotnie odwirowano

w medium RPMI z dodatkiem 2,5% FBS (192×g, 7 minut), po czym dodawano mieszaninę składającą się z medium hodowlanego (40%), DMSO (10%) oraz FBS (50%) i zamrażano w ciekłym azocie.

3.2.16. Oznaczenie wielkości populacji komórek limfoidalnych i mieloidalnych w śledzionach oraz guzach metodą cytometrii przepływowej

Przechowywaną w ciekłym azocie zawiesinę komórek wyizolowanych ze śledzion lub guzów MC38 rozmrożono w RPMI uzupełnionym o 2,5% FBS, odwirowano i zawieszono w PBS + 2 mM EDTA z dodatkiem 2,5% FBS. W celu identyfikacji martwych komórek w trakcie analizy cytometrycznej, wyizolowane komórki wyznakowano za pomocą barwnika LIVE/DEAD[®] Fixable Violet Dead Cell Stain. Odwirowane w PBS komórki zawieszano w roztworze PBS z dodatkiem barwnika i inkubowano bez dostępu światła w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Po tym czasie zawiesinę odwirowano dwukrotnie w PBS + 2 mM EDTA z dodatkiem 2,5% FBS i przefiltrowano przez filtry nylonowe o średnicy porów 35 μm. Następnie, aby zablokować niespecyficzne wiązanie przeciwciał skoniugowanych z fluorochromami, dodano po 50 μl roztworu przeciwciał monoklonalnych anti-CD16/CD32 i inkubowano przez 15 minut w 4°C. Tak przygotowaną zawiesinę rozdzielano na dwa osobne rodzaje oznaczeń: ocenę wielkości populacji komórek limfoidalnych oraz populacji komórek mieloidalnych. Dla komórek limfoidalnych wykorzystano następujące przeciwciała: anti-CD45 Brilliant Violet 605, anti-CD3 Brilliant Violet 650, anti-CD4 FITC, anti-CD8 APC/Fire 750, anti-CD19 Alexa Fluor 700, anti-CD49b PE-CF594, anti-CD25 PE, anti-CD44 PE-Cy7, anti-CD62L PerCP-Cy5.5. Natomiast dla komórek mieloidalnych wykorzystano: anti-CD45 Brilliant Violet 605, anti-CD3e PE-CF594, anti-CD19 PE-CF594, anti-CD49b PE-CF594, anti-CD11b PerCP-Cy5.5, anti-CD11c Brilliant Violet 650, anti-F4/80 Alexa Fluor 700, anti-Ly6C PE, anti-Ly6G APC-Cy7, anti-MHC II FITC, anti-CD80 PE-Cy7. Charakterystyka przeciwciał oraz wykorzystane rozcieńczenia znajdują się w podrozdziale 3.1.6 (Tabela 1).

Do zawiesiny komórek dodano po 50 μl odpowiedniej mieszaniny przeciwciał monoklonalnych skoniugowanych z fluorochromami (wymienionych wcześniej) i inkubowano przez 45 minut w 4°C, po czym odwirowano niezwiązane przeciwciała (192×g, 7 minut). Następnie z wykorzystaniem zestawu Foxp3 Transcription Factor Staining Buffer Set komórki utrwalano przez dodanie odczynnika Foxp3 Fixation/Permeabilization (30 minut, 4°C), a po skończonej inkubacji zawiesinę komórek odwirowywano w Permeabilization Buffer (300×g, 5 minut). W kolejnym kroku do zawiesiny komórek dodawano przeciwciała anti-CD16/CD32 rozcieńczone w buforze do permeabilizacji i inkubowano przez 15 minut w 4°C. Po odwirowaniu (300×g, 5 minut), barwiono antygeny wewnątrzkomórkowe (w przypadku tkanki nowotworowej – FoxP3 lub CD206 w zależności od rodzaju oznaczenia, natomiast w przypadku śledzion oznaczano jedynie

FoxP3) za pomocą przeciwciał rozcieńczonych w buforze do permeabilizacji (45 minut, 4°C). Po dwukrotnym odwirowywaniu zawiesiny komórek (300 ×g, 5 minut) dodawano PBS + 2 mM EDTA z dodatkiem 2,5% FBS i analizowano w cytometrze przepływowym LSR Fortessa z oprogramowaniem Diva.

Tabela 9. Charakterystyka fenotypowa populacji komórek układu odpornościowego identyfikowanych w śledzionach, guzach nowotworowych oraz węzłach chłonnych drenujących nowotwór

Komórki	Fenotyp
Oznaczenia komórek limfoidalnych	
limfocyty T CD8 ⁺	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD49b ⁻ CD8 ⁺
limfocyty T CD4 ⁺	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD49b ⁻ CD4 ⁺
limfocyty Treg	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD49b ⁻ CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺
komórki efektorowe	CD62L ⁻ CD44 ⁺
komórki pamięci	CD62L ⁺ CD44 ⁺
limfocyty B	CD45 ⁺ CD19 ⁺
komórki NK	CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD49b ⁺
komórki NKT	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD49b ⁺
Oznaczenia komórek mieloidalnych	
komórki mieloidalne	CD45 ⁺ CD11b ⁺ CD3e ⁻ CD19 ⁻ CD49b ⁻
DC	CD11c ⁺ F4/80 ^{int} MHC II ⁺
Mf	CD11b ⁺ CD11c ⁻ Ly6C ⁻ F4/80 ⁺
TAM	CD11c ⁺ F4/80 ⁺ MHC II ⁺
M-MDSC	CD11b ⁺ CD11c ⁻ Ly6C ⁺ Ly6G ⁻
PMN-MDSC	CD11b ⁺ CD11c ⁻ Ly6C ^{int} Ly6G ⁺
M1	F4/80 ⁺ CD206 ⁻
M2	F4/80 ⁺ CD206 ⁺

3.2.17. Oznaczenie wielkości populacji komórek limfoidalnych i komórek dendrytycznych w węzłach chłonnych drenujących nowotwór metodą cytometrii przepływowej

Przechowywaną w ciekłym azocie zawiesinę komórek wyizolowanych z węzłów chłonnych drenujących nowotwór MC38 rozmrożono w RPMI uzupełnionym o 2,5% FBS i odwirowano (192 ×g, 7 minut). Następnie, aby zablokować niespecyficzne wiązanie przeciwciał skoniugowanych z fluorochromami, dodano po 50 µl roztworu przeciwciał monoklonalnych anty-CD16/CD32 i inkubowano przez 15 minut w 4°C. Tak przygotowaną zawiesinę komórek rozdzielano na dwa osobne rodzaje oznaczeń: ocenę wielkości populacji komórek limfoidalnych oraz populacji komórek dendrytycznych. Dla komórek limfoidalnych wykorzystano następujące przeciwciała: anty-CD45 Brilliant Violet 605, anty-CD3 Brilliant Violet 650, anty-CD4 FITC,

anty-CD8 APC/Fire 750, anty-CD19 Alexa Fluor 700, anty-CD49b PE-CF594, anty-CD44 PE-Cy7, anty-CD62L PerCP-Cy5.5. Natomiast dla komórek dendrytycznych wykorzystano: anty-CD45 Brilliant Violet 605, anty-CD3e PE-CF594, anty-CD19 PE-CF594, anty-CD49b PE-CF594, anty-CD11b PerCP-Cy5.5, anty-CD11c Brilliant Violet 650, anty-F4/80 Alexa Fluor 700, anty-MHC II FITC, anty-CD80 PE-Cy7. Charakterystyka przeciwciał oraz wykorzystane rozcieńczenia znajdują się w podrozdziale 3.1.6 (Tabela 1). Do zawiesiny komórek dodano po 50 μ l odpowiedniej mieszaniny przeciwciał monoklonalnych skoniugowanych z fluorochromami i inkubowano przez 45 minut w 4°C. Po odwirowaniu komórek dodano 200 μ l roztworu PBS z 2,5% FBS. W celu wyodrębnienia populacji martwych komórek stosowano roztwór barwnika DAPI (1 μ g/ml). Analizę przeprowadzano z wykorzystaniem cytometru przepływowego LSR Fortessa z oprogramowaniem Diva (Becton Dickinson).

3.2.18. Restymulacja komórek śledzionowych

W celu oceny aktywności przeciwnowotworowej splenocytów pobranych od myszy obarczonych nowotworem i poddanych terapii, prowadzono pięciodniową mieszaną hodowlę *ex vivo* komórek śledzionowych z komórkami nowotworowymi w obecności rh IL-2 (restymulacja).

3.2.18.1. Przygotowanie jednowarstwowej hodowli komórek MC38

Komórki nowotworowe MC38 zbierano z butelek hodowlanych przy pomocy roztworu trypsyny i EDTA, odwirowano (192×g, 7 minut) i zawieszono w RPMI z dodatkiem 5% FBS doprowadzając do gęstości 3×10⁶ kom./ml. Następnie do zawiesiny komórek dodano mitomycynę C (50 μ g mitomycyny C/ml zawiesiny komórek) i inkubowano przez 30 minut w 37°C. Po tym czasie komórki trzykrotnie odwirowano (192×g, 7 minut) i nakładano na płytkę 24-dołkową (Costar) w gęstości 1×10⁵ kom./dołek i inkubowano przez 24 godziny.

3.2.18.2. Przygotowanie komórek efektorowych

Przechowywaną w ciekłym azocie zawiesinę komórek wyizolowanych ze śledzion rozmrożono w RPMI uzupełnionym o 2,5% FBS, odwirowano (192×g, 7 minut) i doprowadzono do gęstości 2×10⁶ kom./ml RPMI z dodatkiem 10% FBS. Następnie komórki śledzionowe nakładano na przygotowaną dzień wcześniej jednowarstwową hodowlę komórek nowotworowych (1×10⁵ kom./dołek), a hodowlę uzupełniono o rh IL-2 (200 U/ml). Końcowy stosunek komórek nowotworowych do splenocytów wynosił 1:20. Hodowlę mieszaną prowadzono przez 5 dni w standardowych warunkach.

3.2.18.3. Ocena aktywności restymulowanych komórek śledzionowych

Po 5 dniach hodowli mieszanej, nadsączka z nad komórek zbierano w celu określenia stężenia cytokin (za pomocą testu ELISA) (podrozdział 3.2.9), a komórki śledzionowe odwirowano i analizowano ich fenotyp powierzchniowy oraz zdolność do degranulacji na podstawie poziomu ekspresji cząsteczki CD107a (podrozdział 3.2.14.1), a także oceniano aktywność cytotoksyczną wobec komórek nowotworowych (podrozdział 3.2.14.2). W przypadku oceny fenotypu powierzchniowego restymulowanych splenocytów wykorzystywano następujące przeciwciała monoklonalnych: anti-CD45 V500, anti-CD4 FITC; anti-CD8 PE-Cy7; anti-CD19 Alexa Fluor 700; anti-CD49b PE, anti-CD107a APC. Charakterystyka przeciwciał oraz wykorzystane rozcieńczenia znajdują się w podrozdziale 3.1.6 (Tabela 1).

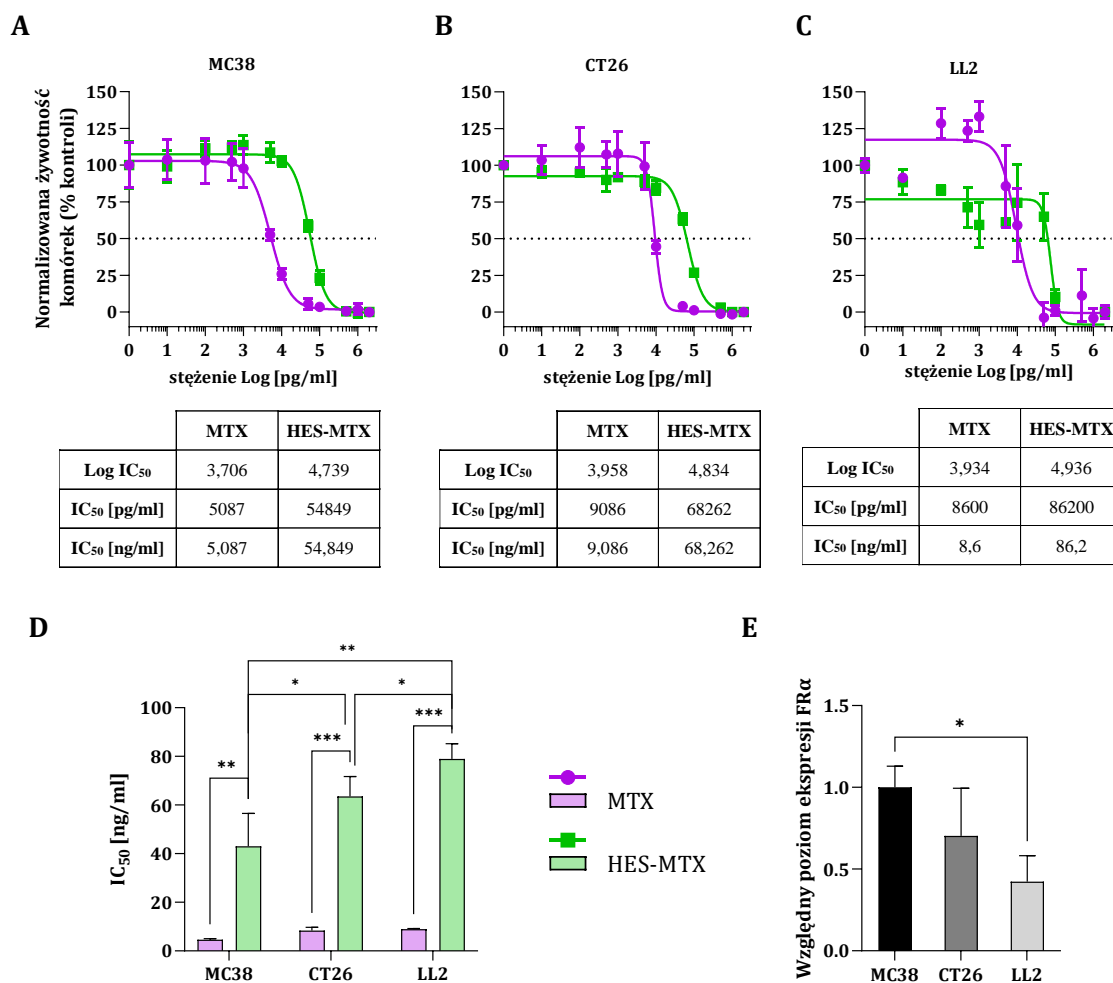
3.2.19. Analiza statystyczna wyników

Analizę statystyczną otrzymanych wyników przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania GraphPad Prism 9. Normalność rozkładu danych oceniono na podstawie testu D'Agostino-Pearsona. Dla danych zgodnych z rozkładem Gaussa o równych wartościach SD, istotność statystyczną obliczono za pomocą jednoczynnikowego testu ANOVA i testu *post hoc* wielokrotnych porównań Tukey'a. Kiedy dane były zgodne z rozkładem Gaussa, lecz posiadały nierówne wartości SD, istotność statystyczną obliczono za pomocą jednoczynnikowego testu ANOVA w modyfikacji Browna-Forsythe'a i Welcha, a następnie testu *post hoc* wielokrotnych porównań T3 Dunnetta. Dla danych niezgodnych z rozkładem Gaussa, istotność statystyczną obliczono za pomocą nieparametrycznego testu Kruskalla-Wallisa i testu *post hoc* Dunna. Analizę statystyczną pomiarów objętości guzów prowadzonych przez cały czas doświadczeń terapeutycznych wykonano za pomocą dwuczynnikowego testu ANOVA i *post hoc* testu wielokrotnych porównań Bonferroniego. Korelację pomiędzy dwiema zmiennymi obliczono wykorzystując nieparametryczny współczynnik korelacji Spearmana.

Wszystkie statystycznie istotne różnice przedstawiono na wykresach gdy $p < 0,05$, a w opisach pod rycinami zamieszczono rodzaj użytego testu statystycznego.

4. Wyniki

4.1. Wpływ metotreksatu oraz nanokoniugatu metotreksatu i hydroksyetyloskrobi na zahamowanie proliferacji komórek linii nowotworowych



Ryc. 8. Zahamowanie proliferacji komórek linii nowotworowych MC38, CT26, LL2 traktowanych metotreksatem lub nanokoniugatem HES-MTX. Ekspresja receptora α dla folianów (FR α) w tych komórkach. Do jednowarstwowej hodowli komórek linii nowotworowych dodano związki w zakresie stężeń 0,001-2000 ng/ml i prowadzono inkubację przez 72 godziny. Po tym czasie z wykorzystaniem kolorymetrycznego testu MTT określono stężenie MTX i HES-MTX, które w 50% hamowało proliferację komórek MC38, CT26, LL2 (IC₅₀). Na wykresach liniowych przedstawiono przykładową znormalizowaną żywotność komórek, przeliczoną w odniesieniu do odpowiedniej kontroli nietraktowanej; a w tabelach pod wykresami zamieszczono przykładowe wyliczone wartości IC₅₀ (A, B, C). Porównanie wartości IC₅₀ dla MTX i HES-MTX (D). Względny poziom ekspresji mRNA dla FR α w komórkach nowotworowych linii MC38, CT26, LL2 określono metodą reakcji PCR w czasie rzeczywistym (E). Na wykresach D i E przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane z trzech testów przeprowadzonych w trzech powtórzeniach. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Niniejsza praca wpisuje się w tematykę badań prowadzonych w Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej IITD PAN, której celem jest opracowanie nowej strategii skojarzonej terapii przeciwnowotworowej oraz poznanie mechanizmów zaangażowanych w indukowaną odpowiedź odpornościową. Na podstawie doświadczeń przeprowadzonych przez zespół dra hab. Tomasza Goszczyńskiego, w których oceniano aktywność przeciwnowotworową nanokoniugatu metotreksatu i hydroksyetyloskrobi (HES-MTX) w modelu mysiej (P388) i ludzkiej (MV4-11) białaczki, podjęto decyzję o wykorzystaniu HES-MTX jako chemioterapeutyku wspomagającego działanie szczepionek na bazie dojrzałych komórek dendrytycznych (DC/TA_g).

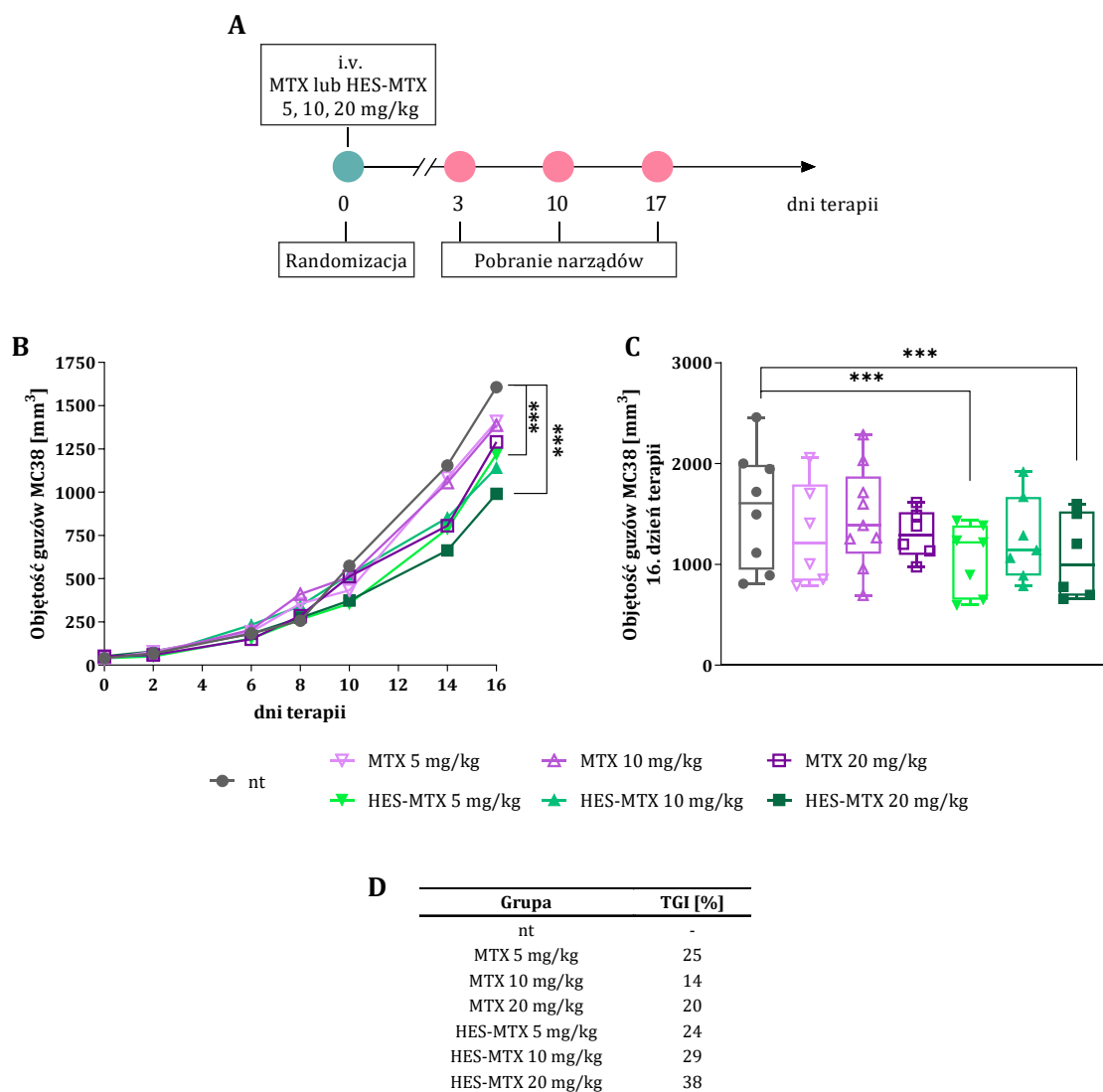
Badania rozpoczęto od wybrania odpowiedniej mysiej linii nowotworowej, którą cechowałaby największa wrażliwość na nanokoniugat. Określono efekt antyproliferacyjny metotreksatu (MTX) oraz jego nanokoniugatu wobec trzech mysich linii nowotworowych: raka jelita grubego MC38 i CT26 oraz mysiego raka płuca LL2 (Ryc. 8 A-C). Nie odnotowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy wyliczonymi dla metotreksatu wartościami IC₅₀ (Ryc. 8 D). Natomiast porównując aktywność przeciwnowotworową MTX oraz HES-MTX zaobserwowano, że nanokoniugat cechowała ok. 8-krotnie (CT26) lub 10-krotnie (MC38 i LL2) wyższa wartość IC₅₀. To wskazuje na słabsze działanie antyproliferacyjne HES-MTX wobec testowanych linii nowotworowych w warunkach *in vitro*. Najniższą wartość IC₅₀ dla nanokoniugatu odnotowano w przypadku komórek MC38, zatem ta linia komórkowa była najbardziej wrażliwa na działanie HES-MTX.

Ze względu na fakt, że aktywność przeciwnowotworowa nanokoniugatu może być związana z występowaniem podjednostki α receptora folianów (FR α), zdecydowano o określeniu poziomu ekspresji mRNA dla tej cząsteczki w badanych komórkach. Biorąc pod uwagę, że najniższą wartość IC₅₀ dla HES-MTX odnotowano w przypadku linii MC38, tę linię potraktowano jako punkt odniesienia podczas oceny względnego poziomu ekspresji FR α w pozostałych liniach nowotworowych. W komórkach linii CT26 oraz LL2 stwierdzono niższą ekspresję FR α , a w przypadku komórek raka płuca obniżenie to wyniosło ok. 60% i było istotne statystycznie. Zatem większa wrażliwość komórek linii MC38 na nanokoniugat, może być związana z wyższym poziomem ekspresji FR α na powierzchni tych komórek.

Na podstawie powyższych wyników do zaplanowanych w warunkach *in vivo* doświadczeń terapeutycznych wybrano linię mysiego raka jelita grubego MC38.

4.2. Określenie efektu przeciwnowotworowego chemioterapii z udziałem metotreksatu lub nanokoniugatu metotreksatu i hydroksyetyloskrobi

4.2.1. Wzrost guzów MC38 u myszy poddanych chemioterapii



Ryc. 9. Wzrost guzów MC38 u myszy poddanych chemioterapii z udziałem metotreksatu lub nanokoniugatu metotreksatu i hydroksyetyloskrobi. Mysiom z rosnącym podskórnie guzem MC38 dożylnie (i.v.) podano MTX lub HES-MTX w dawkach: 5, 10 lub 20 mg/kg m.c. Schemat doświadczenia (A). Mediana objętości guzów wyznaczonych na podstawie pomiarów prowadzonych co 3-4 dni (B). Mediana objętości guzów zmierzonych w 16. dniu terapii (C). Wartości zahamowania wzrostu nowotworu (TGI) obliczone dla 16. dnia terapii w odniesieniu do kontroli nietraktowanej (D). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego dwuczynnikowego testu ANOVA i testu *post hoc* testu Bonferroniego (B, C) (***) $p < 0,001$.

W kolejnym etapie badań określono efekt terapeutyczny po dożylnym podaniu nanokoniugatu myszom obciążonym nowotworem MC38. Głównym zamiarem był wybór takiej dawki preparatu, która po jednokrotnym podaniu skutecznie modulowałaby odpowiedź przeciwnowotworową. W związku z tym do doświadczenia terapeutycznego, wybrano trzy różne dawki MTX lub HES-MTX (5, 10, 20 mg/kg m.c.). Ponadto, aby ocenić kinetykę zmian zachodzących w lokalnej i ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej, materiał biologiczny do analiz *ex vivo* pobierano w trzech punktach czasowych: 3., 10. i 17. dnia terapii (licząc od momentu podania badanych związków) (Ryc. 9 A).

Z uwagi na fakt, że w dalszych badaniach *in vivo* zaplanowano wykorzystanie tylko jednej dawki chemioterapeutyków, jej wybór został dokonany na podstawie następujących parametrów: zahamowania wzrostu nowotworu, różnic w odsetku populacji efektorowych i supresorowych komórek układu odpornościowego obecnych w guzach oraz śledzionach, a także aktywności przeciwnowotworowej restymulowanych komórek śledzionowych (splenocytów).

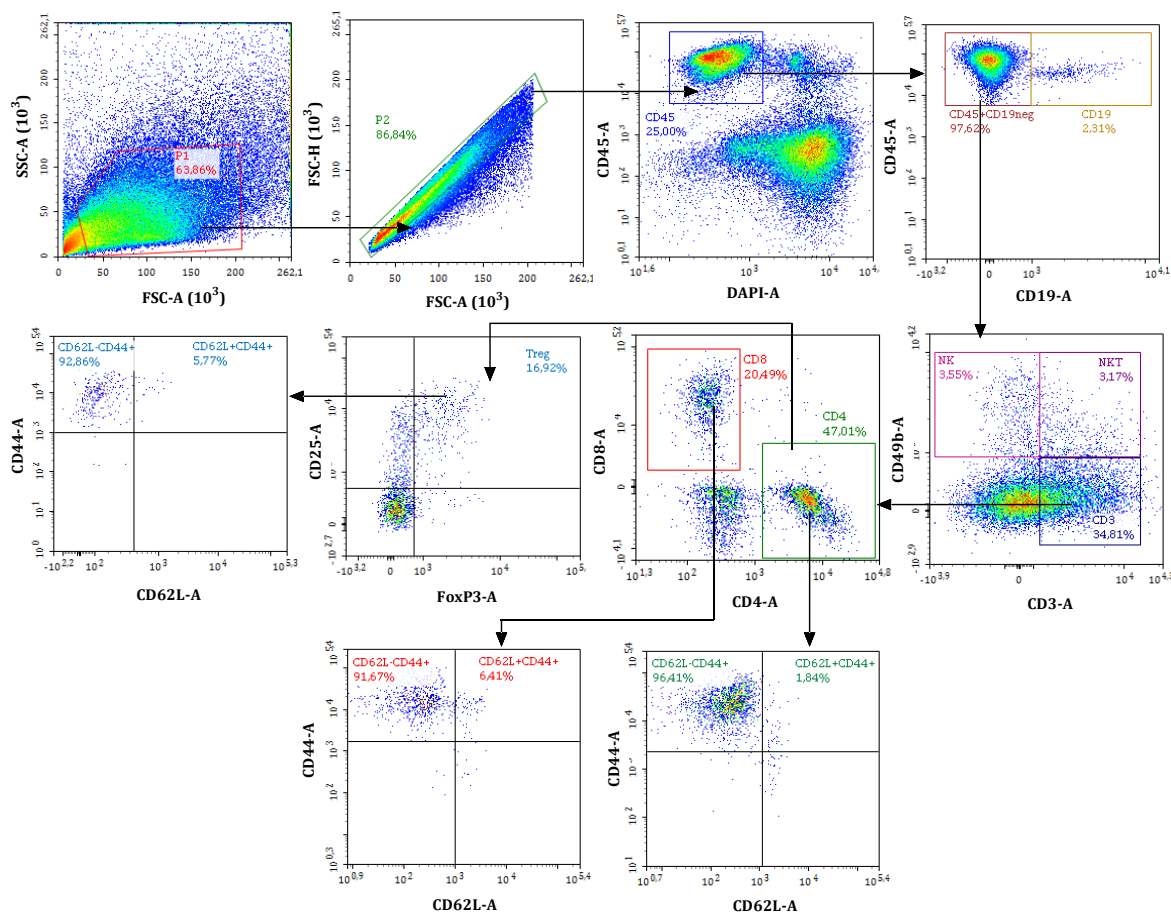
Ocenę efektów wywołanych po podaniu samego chemioterapeutyku przeprowadzono z myślą o dalszych etapach badań *in vivo* opartych na skojarzonej terapii, w której poza podaniem chemioterapeutyków, myszy z rosnącym podskórnym guzem MC38 będą otrzymywać immunoterapię w postaci szczepionek komórkowych na bazie komórek dendrytycznych (DC/TAg). W opracowanym w naszym laboratorium schemacie skojarzonej terapii przeciwnowotworowej, immunoterapia rozpoczyna się trzy dni po podaniu cytostatyku. Z tego względu istotnym aspektem było określenie zmian zachodzących w 3. dniu terapii, zarówno w lokalnej, jak i ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Było to niezbędne do identyfikacji mikrośrodowiska nowotworowego, do którego zostaną podane szczepionkowe DC/TAg.

Pomiary objętości guzów prowadzone co 3-4 dni podczas trwania eksperymentu posłużyły do sporządzenia krzywych wzrostu guzów przedstawionych na Ryc. 9 B. Porównując oba zastosowane chemioterapeutyki – MTX i HES-MTX, można zaobserwować tendencję wskazującą na skuteczniejsze hamowanie wzrostu nowotworu po podaniu nanokoniugatu, szczególnie w dawkach 10 lub 20 mg/kg. W odniesieniu do grupy kontrolnej (nietraktowanej; nt) odnotowano, że po zastosowaniu HES-MTX zahamowanie wzrostu nowotworu było największe, a w przypadku grup myszy otrzymujących HES-MTX w dawce 5 lub 20 mg/kg, zmiany te były istotne statystycznie (Ryc. 9 B)

W oparciu o pomiary guzów przeprowadzonych w przedostatnim dniu doświadczenia (przedstawionych także na wykresach pudełkowych na Ryc. 9 C), możliwe było obliczenie procentowego zahamowania wzrostu nowotworu w odniesieniu do grupy kontrolnej (TGI; Ryc. 9 D). Najwyższe wartości TGI, wskazujące na najlepszy efekt terapeutyczny zastosowanej chemioterapii, odnotowano w grupie myszy traktowanych HES-MTX w dawce 20 mg/kg (TGI 38%).

4.2.2. Ocena lokalnej odpowiedzi przeciwnowotworowej u myszy poddanych chemioterapii

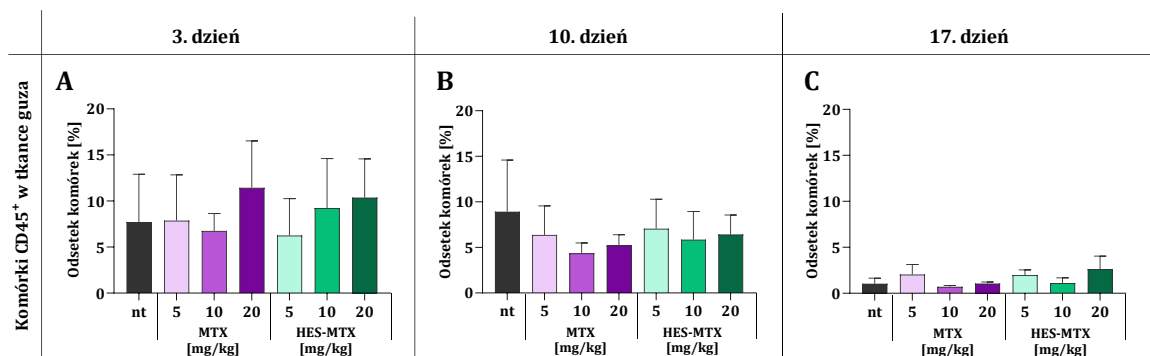
4.2.2.1. Populacje komórek limfoidalnych w guzach MC38



Ryc. 10. Schemat analizy populacji komórek limfoidalnych naciekających guzy MC38. Po wyeliminowaniu zlepow komórkowych, wyodrębniono żywe leukocyty ($CD45^+DAPI^{neg}$) wśród których zidentyfikowano limfocyty $CD19^+$, limfocyty T ($CD3^+CD49b^-$), komórki NK ($CD3^-CD49b^+$) oraz komórki NKT ($CD3^+CD49b^+$). Na podstawie ekspresji markerów CD4 i CD8 wydzielono populację limfocytów T $CD4^+$ i $CD8^+$. W obrębie populacji limfocytów T $CD4^+$ zidentyfikowano limfocyty Treg ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$). W oparciu o ekspresję cząsteczek CD44 i CD62L wśród limfocytów T naciekających guzy, określono subpopulację komórek efektorowych ($CD62L^-CD44^+$).

W celu określenia wpływu zastosowanej terapii na zmiany w lokalnej odpowiedzi odpornościowej, wykorzystując wieloparametryczną analizę metodą cytometrii przepływowej, oceniono odsetek żywych leukocytów $CD45^+$ napływających do tkanki nowotworowej. Następnie wśród nich zidentyfikowano subpopulacje komórek pochodzenia limfoidalnego – limfocyty T $CD8^+$ ($CD3^+CD8^+$), limfocyty T $CD4^+$ ($CD3^+CD4^+$), limfocyty B ($CD19^+$), komórki NK ($CD3^-CD49b^+$) i komórki NKT ($CD3^+CD49b^+$) (Ryc. 10). Na podstawie ekspresji czynnika

transkrypcyjnego FoxP3 w limfocytach T CD4⁺ wyodrębniono populację limfocytów T regulatorowych (Treg, CD25⁺FoxP3⁺). Wśród wszystkich populacji limfocytów T określono odsetek komórek efektorowych (CD62L⁻CD44⁺).

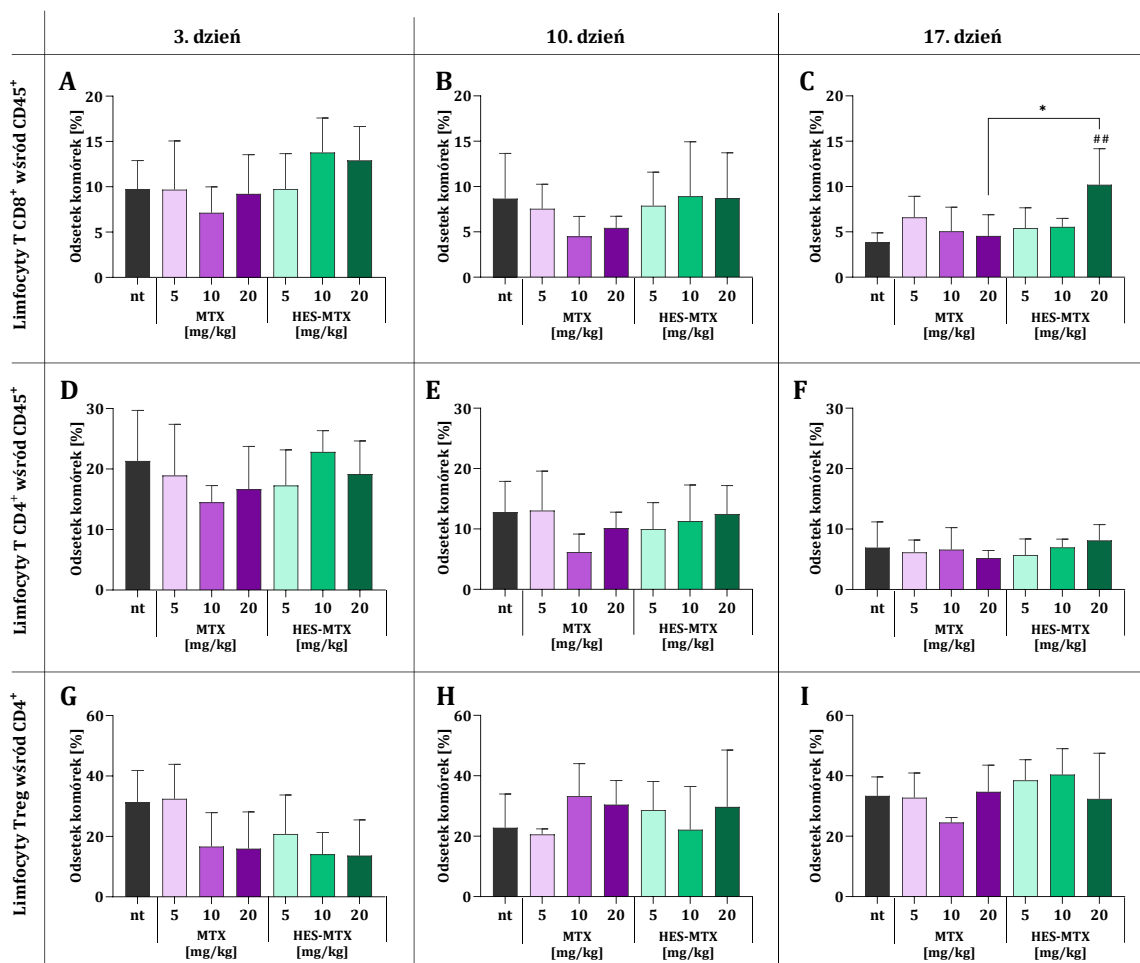


Ryc. 11. Ocena nacieku leukocytów w guzach nowotworowych MC38 pobranych od myszy poddanych chemioterapii. W trakcie wieloparametrycznej analizy cytometrycznej wśród komórek DAPI^{neg} określono odsetek komórek CD45⁺ w tkankach guzów pobranych 3. (A), 10. (B), oraz 17. dnia (C) po dożylnym podaniu MTX lub HES-MTX. Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A); nieparametrycznego testu Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna (B) lub testu ANOVA w modyfikacji Browna-Forsythe'a i Welcha i testu *post hoc* T3 Dunnetta (C) ($p > 0,05$).

Ocena odsetka leukocytów obecnych w tkance nowotworowej pobranej 3., 10. i 17. dnia terapii wykazała, że napływ tych komórek do tkanki guzów zmniejszał się wraz z rozwojem nowotworu, niezależnie od zastosowanej dawki chemioterapeutyków (Ryc. 11 A-C.). Trzeciego dnia po zastosowaniu 20 mg/kg MTX lub HES-MTX stwierdzono tendencję wskazującą na zwiększenie udziału procentowego komórek CD45⁺ w tkance guza. W 10. dniu terapii, niezależnie od dawki, odnotowano wpływ zastosowania chemioterapii na nieistotnie statystycznie zmniejszenie wielkości populacji leukocytów. Natomiast 17. dnia od podania chemioterapeutyków stwierdzono nieznacznie zwiększony odsetek tych komórek w grupach MTX 5 mg/kg, HES-MTX 5 mg/kg lub 20 mg/kg, w odniesieniu do kontroli nietraktowanej. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że wyniki są trudne do interpretacji ze względu na brak istotności statystycznych oraz w niektórych przypadkach, wysokie wartości odchyłeń standardowych.

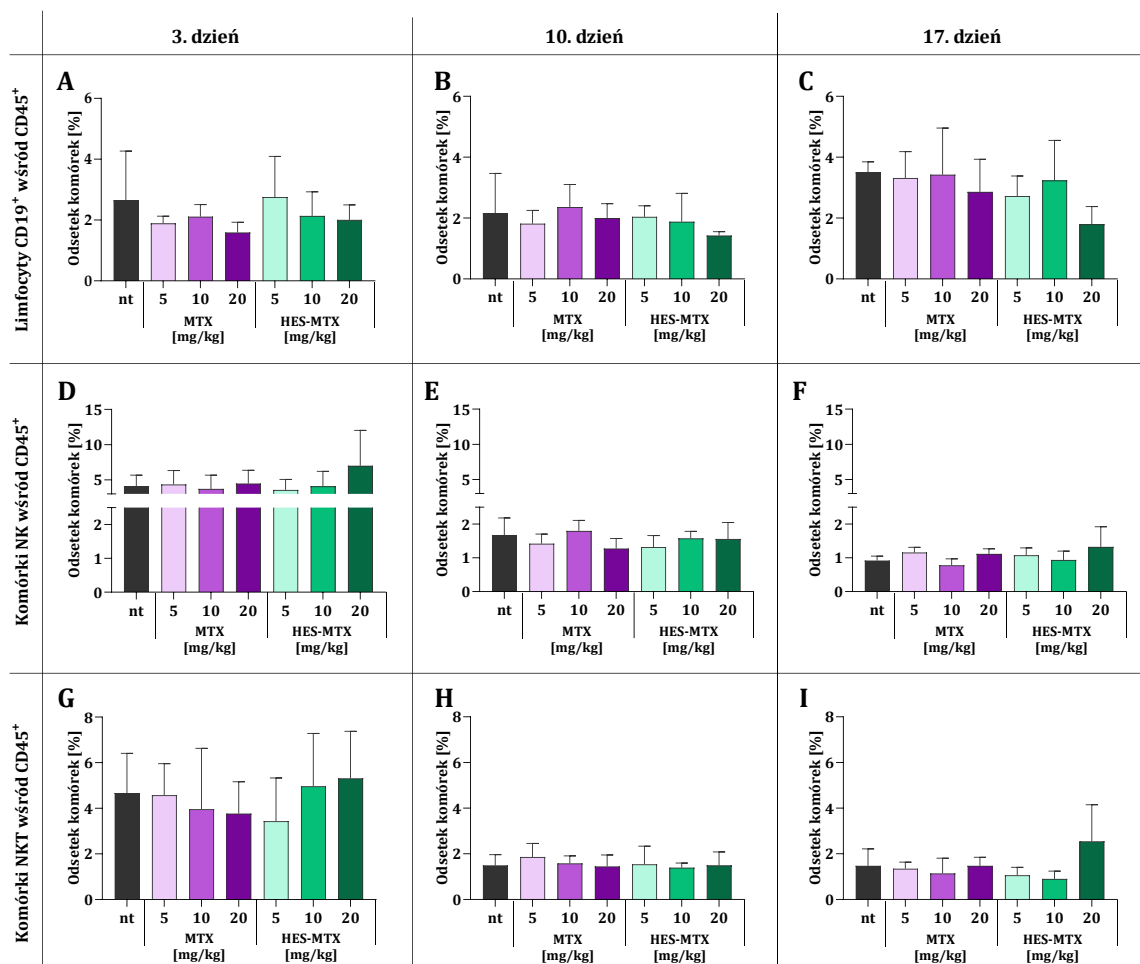
Porównując wielkości różnych populacji komórek limfoidalnych naciekających guzy MC38 zaobserwowano, że wraz z rozwojem nowotworu zmniejszyła się wielkość populacji limfocytów T CD8⁺ oraz CD4⁺, natomiast zwiększyła się populacja limfocytów Treg (Ryc. 12). Nie odnotowano wpływu badanych chemioterapeutyków na zmiany w odsetku komórek efektorowych (CD62L⁻CD44⁺) wśród wszystkich populacji limfocytów T napływających do tkanki nowotworowej (dane nieprezentowane).

Trzeciego dnia po podaniu HES-MTX w dawce 10 lub 20 mg/kg, zaobserwowano nieistotne statystycznie zwiększenie odsetka limfocytów T CD8⁺, w porównaniu do pozostałych grup myszy (Ryc. 12 A). Pomimo braku znaczących zmian w odsetku tych komórek w 10. dniu terapii, w materiale zebrany 17. dnia od podania chemioterapeutyków, w grupie HES-MTX 20 mg/kg zaobserwowano zwiększenie limfocytów T CD8⁺ (Ryc. 12 B, C). Ponadto zmiany te były istotne statystycznie, zarówno w odniesieniu do grupy nietraktowanej, jak również do grupy myszy otrzymujących MTX w tej samej dawce.



Ryc. 12. Ocena nacieku limfocytów T w guzach nowotworowych MC38 pobranych od myszy poddanych chemioterapii. W tkankach guzów pobranych 3. (A, D, G), 10. (B, E, H) lub 17. dnia (C, F, I) terapii wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} zidentyfikowano populacje limfocytów T CD8⁺ (A-C) i CD4⁺ (D-F), a także limfocytów Treg określonych wśród limfocytów T CD4⁺ (G-I). Na wykresach przedstawiono średnie wartości (+SD) uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A-E; H-I) lub nieparametrycznego testu Kruskalla-Wallisa i testu *post hoc* Dunna (F-G). Znaki „#” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a grupą kontrolną – nt; pozostałe istotności pomiędzy grupami są prezentowane w formie klamer i znaków „*,” (p<0,05; ##p<0,01).

Po podaniu chemioterapeutyków nie stwierdzono znaczących zmian w odsetku limfocytów T CD4⁺ (Ryc. 12 D-F). Po zastosowaniu MTX lub HES-MTX w dawce 10 mg/kg lub 20 mg/kg, stwierdzono znaczne, jednak nieistotne statystycznie, obniżenie odsetka limfocytów Treg, w odniesieniu do kontroli nietraktowanej. Efekt ten był krótkotrwały – wystąpił tylko 3. dnia po podaniu chemioterapeutyków, a w kolejnych punktach czasowych udział procentowy tych komórek osiągnął poziom równy lub większy niż w grupie nietraktowanej (Ryc. 12 G-I).



Ryc. 13. Ocena nacieku komórek limfoidalnych w guzach nowotworowych MC38 pobranych od myszy poddanych chemioterapii. W tkance guzów pobranych 3. (A, D, G), 10. (B, E, H) lub 17. dnia (C, F, I) terapii wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} zidentyfikowano populacje limfocytów CD19⁺ (A-C) i komórek NK (D-F), a także komórek NKT (G-I). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (C,E,G,H); nieparametrycznego testu Kruskalla-Wallisa i testu *post hoc* Dunna (D,F,I) lub testu ANOVA w modyfikacji Browna-Forsythe'a i Welcha i testu *post hoc* T3 Dunnetta (A,B) ($p > 0,05$).

Następnymi populacjami komórek pochodzenia limfoidalnego, których wielkość nacieku oceniano w tkance nowotworowej były limfocyty B, komórki NK i NKT (Ryc. 13). Określając wielkość populacji limfocytów B obecnych w guzach MC38 odnotowano, że wraz z progresją choroby nowotworowej zwiększał się odsetek tych komórek (Ryc. 13 A-C). Porównując grupy

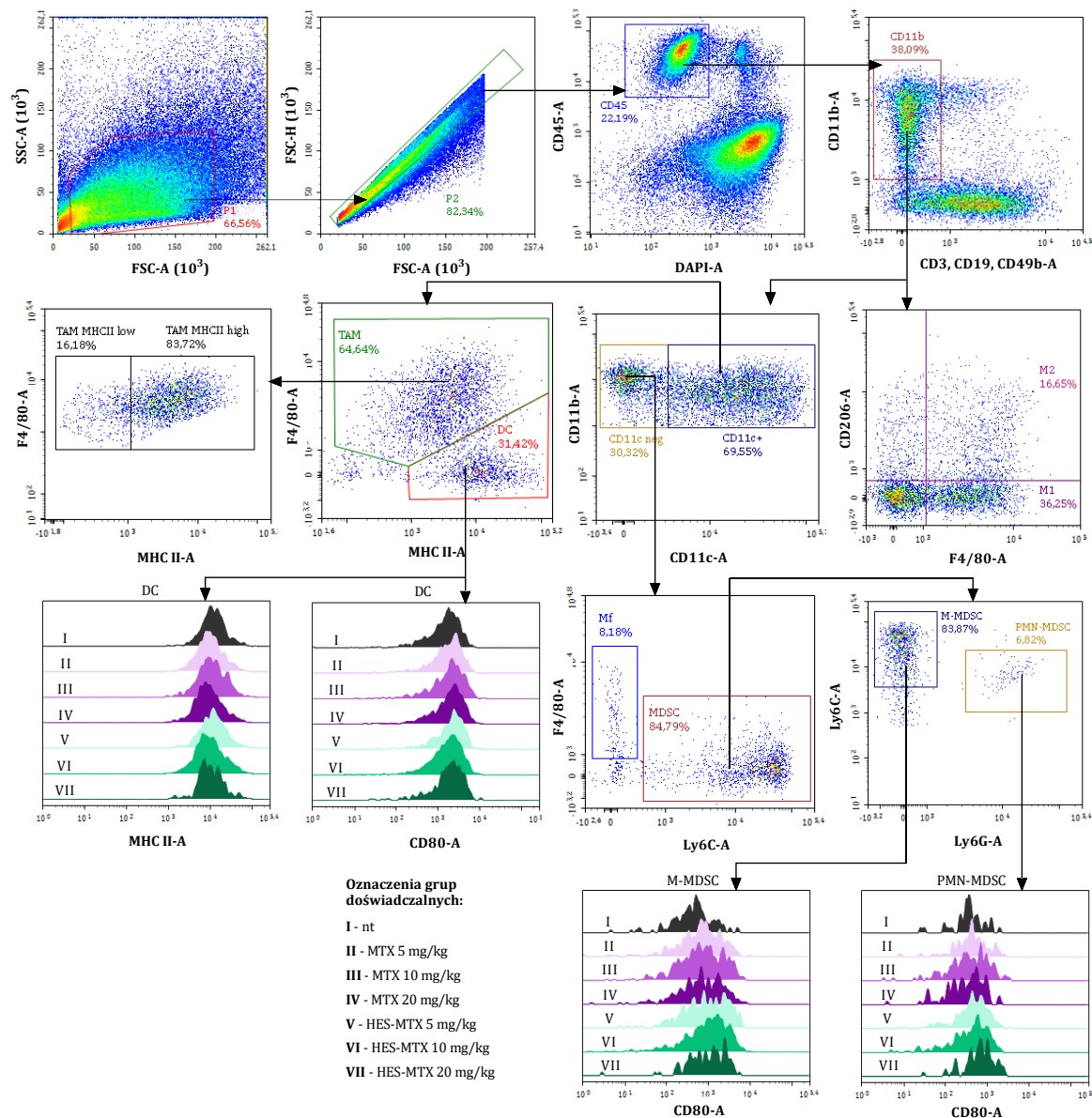
myszy, które otrzymały MTX lub HES-MTX nie odnotowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy działaniem obu chemioterapeutyków. Zaobserwowano natomiast, że w grupie HES-MTX 20 mg/kg odsetek komórek CD19⁺ utrzymywał się na stałym poziomie i nie przekraczał 2% wszystkich leukocytów, co sugeruje wpływ najwyższej dawki nanokoniugatu na zmniejszoną infiltrację nowotworu przez limfocyty B podczas rozwoju guza nowotworowego.

Podobnie jak w przypadku limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺, stwierdzono wpływ rozwoju nowotworu na zmniejszoną infiltrację tkanki guzów przez komórki NK i NKT (Ryc. 13 D-I). Pomędzy różnymi dawkami chemioterapeutyków nie odnotowano istotnych statystycznie zmian w odsetku tych komórek. Jednak warto zauważyć, że w 3. dniu po podaniu dawki 20 mg/kg HES-MTX ich odsetek był najwyższy (Ryc. 13 D, G). Mimo że w 10. dniu terapii nie obserwowano wpływu zastosowania chemioterapeutyków na wielkość populacji komórek NK i NKT (Ryc. 13 E, H), to 17. dnia terapii, najwyższy odsetek tych komórek, choć nieistotny statystycznie, wykazano ponownie w grupie HES-MTX 20 mg/kg (Ryc. 13 F, I).

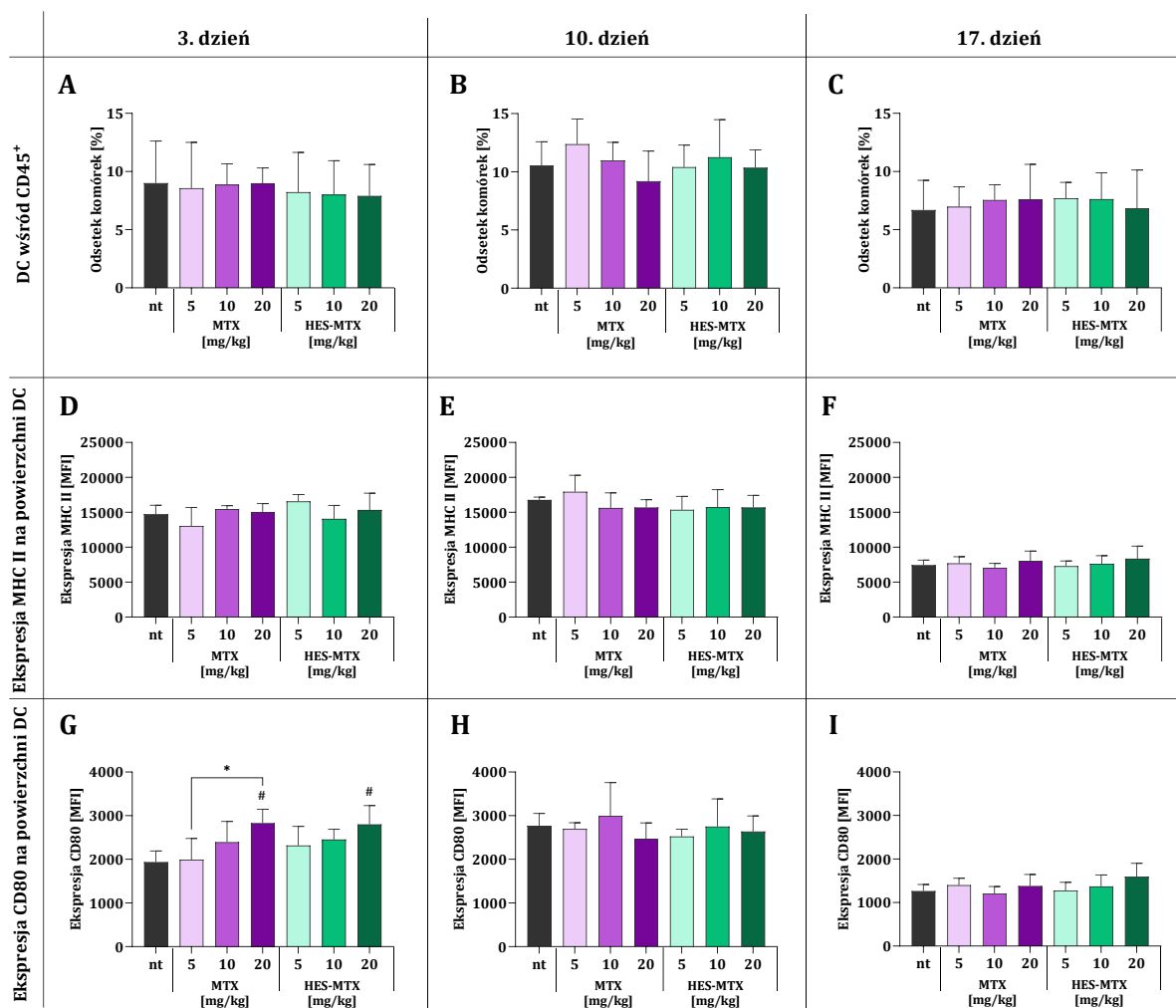
Powyższe dane sugerują, że zmiany w odsetku komórek limfoidalnych napływających do tkanki guzów zachodziły w krótkim czasie od podania chemioterapeutyków i były indukowane przez najwyższe dawki preparatów. Wprawdzie dalszy rozwój nowotworu, a tym samym wydłużony czas od rozpoczęcia terapii, znosił modulujące działanie badanych preparatów, to efekt wywołany po zastosowaniu HES-MTX w dawce 20 mg/kg był przedłużony.

4.2.2.2. *Populacje komórek mieloidalnych w guzach MC38*

Poza określeniem odsetka populacji komórek limfoidalnych, w tkankach nowotworowych oceniono również udział procentowy komórek pochodzenia mieloidalnego (Ryc. 14). Wśród komórek CD11b⁺CD45⁺ obecnych w guzach, wyodrębniono populacje DC, M-MDSC, PMN-MDSC, TAM, Mf oraz analizowano polaryzację wszystkich makrofagów występujących w nowotworze w kierunku komórek typu M1 i M2. Dodatkowo, aby określić stopień pobudzenia komórek mieloidalnych, dla wybranych populacji zbadano ekspresję cząsteczek MHC klasy II i/lub CD80.



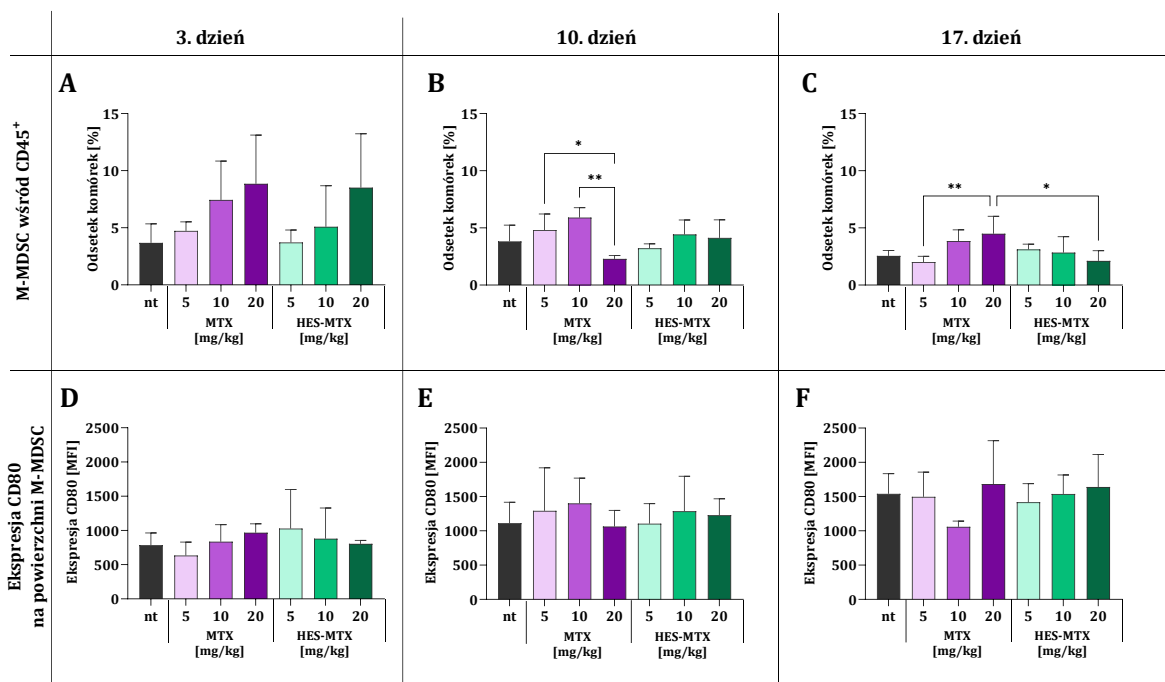
Ryc. 14. Schemat analizy populacji komórek mieloidalnych naciekających guzy MC38. Po wyeliminowaniu zlepow komórkowych, wyodrębniono żywe leukocyty ($CD45^+DAPI^{neg}$), wśród których zidentyfikowano komórki $CD11b^+$. Wśród komórek $CD11b^+$ na podstawie ekspresji cząsteczek $CD206$, określono liczebność makrofagów M1 ($F4/80^+CD206^-$) i M2 ($F4/80^+CD206^+$). Ponadto populację komórek $CD11b^+$ rozdzielono w oparciu o ekspresję cząsteczek $CD11c$. Wśród komórek $CD11b^+CD11c^-$ wyodrębniono populację Mf ($CD11b^+CD11c^-Ly6C^+F4/80^+$) i MDSC: M-MDSC ($CD11b^+CD11c^-Ly6C^+Ly6G^-$); PMN-MDSC ($CD11b^+CD11c^-Ly6C^{int}Ly6G^+$). Wśród komórek $CD11b^+CD11c^+$ zidentyfikowano populacje DC ($CD11c^+F4/80^{int}MHC II^+$) oraz TAM ($CD11c^+F4/80^+MHC II^+$), a w obrębie tych ostatnich, wydzielono subpopulację TAM o wysokiej (TAM $MHC II^{high}$) i niskiej (TAM $MHC II^{low}$) ekspresji cząsteczek $MHC II$. Dodatkowo określono ekspresję cząsteczek $MHC II$ na powierzchni DC oraz $CD80$ na powierzchni DC, M-MDSC i PMN-MDSC. Na histogramach przedstawiono ekspresje cząsteczek $MHC II$ lub $CD80$ reprezentatywne dla każdej grupy z doświadczenia chemioterapeutycznego.



Ryc. 15. Ocena nacieku komórek dendrytycznych oraz stopnia ich pobudzenia w guzach nowotworowych MC38 pobranych od myszy poddanych chemioterapii. W tkance guzów pobranych 3. (A, D, G), 10. (B, E, H) lub 17. dnia (C, F, I) terapii wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} zidentyfikowano populację DC (A-C) oraz określono ekspresję cząsteczek MHC II (D-F) oraz CD80 (G-I) na powierzchni tych komórek. Ekspresję cząsteczek MHC II i CD80 zaprezentowano jako średnią intensywność fluorescencji (MFI). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A,B,D-G,I); nieparametrycznego testu Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna (C) lub testu ANOVA w modyfikacji Browna-Forsythe'a i Welch'a i testu *post hoc* T3 Dunnetta (H). Znaki „#” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a grupą kontrolną – nt; pozostałe istotności pomiędzy grupami są prezentowane w formie klamer i znaków „*” (*/# p<0,05).

Analiza wielkości populacji DC wykazała, że wraz ze wzrostem guzów zmienił się udział procentowy tych komórek w tkance nowotworowej oraz poziom ekspresji cząsteczek MHC II i CD80 na ich powierzchni (Ryc. 15). Pomiędzy grupą nietraktowaną a pozostałymi grupami badanymi, nie obserwowano statystycznie istotnych zmian w odsetku DC, jak i w ekspresji MHC II na ich powierzchni (Ryc. 15 A-F). Wykazano natomiast zależne od zastosowanej dawki chemioterapeutyków, zmiany w powierzchniowej ekspresji cząsteczek CD80. W 3. dniu terapii w odniesieniu do grupy nietraktowanej, w grupach myszy otrzymujących dawkę 20 mg/kg MTX

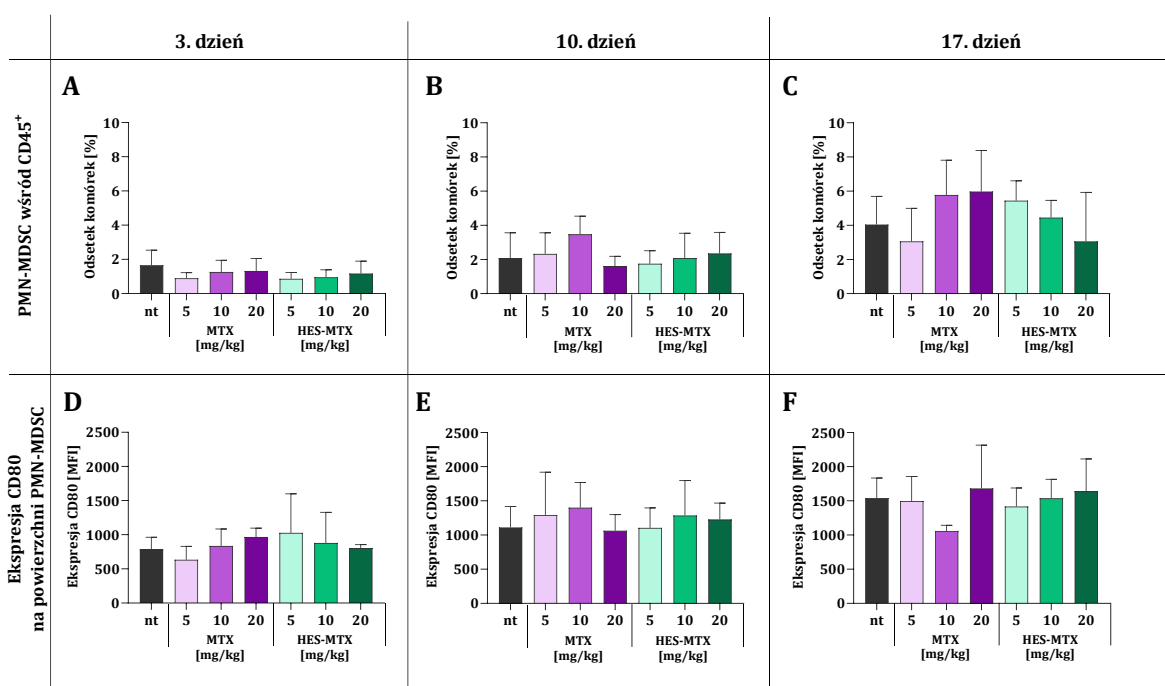
lub HES-MTX obserwowano zwiększoną wartość MFI dla cząsteczki CD80, a zmiana ta była istotna statystycznie. Efekt wywołany przez oba preparaty był podobny i pomiędzy działaniem chemioterapeutyków nie odnotowano znaczących różnic. W kolejnych punktach czasowych nie obserwowano zależnego od dawki preparatów zwiększenia ekspresji CD80 na powierzchni DC (Ryc. 15 G-I). Można zatem sądzić, że immunomodulacyjny wpływ MTX lub HES-MTX na pobudzenie DC był krótkotrwały, a jego szczyt przypadał na 3. dzień po dożylnym podaniu chemioterapeutyków i to w najwyższej dawce.



Ryc. 16. Ocena nacieku i stopnia pobudzenia monocytarnych komórek supresorowych pochodzenia mieloidalnego w guzach nowotworowych MC38 pobranych od myszy poddanych chemioterapii. W tkankach guzów pobranych 3. (A, D), 10. (B, E) lub 17. dnia (C, F) terapii wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} zidentyfikowano populację M-MDSC (A-C) oraz określono ekspresję cząsteczki CD80 (D-F) na powierzchni tych komórek. Ekspresję cząsteczki CD80 zaprezentowano jako średnią intensywność fluorescencji (MFI). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (C-F); nieparametrycznego testu Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna (B) lub testu ANOVA w modyfikacji Browna-Forsythe'a i Welcha i testu *post hoc* T3 Dunnetta (A) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Wśród komórek supresorowych pochodzenia mieloidalnego (MDSC) wyodrębniono dwie subpopulacje – monocytarne MDSC (M-MDSC) oraz granulocytarne MDSC (PMN-MDSC). Ze względu na supresorową aktywność tych komórek, zdecydowano o określeniu ekspresji cząsteczki CD80 na ich powierzchni. Porównując odsetek komórek M-MDSC w tkance guzów pobranych w różnych punktach czasowych, nie odnotowano wpływu rozwoju choroby nowotworowej na zwiększony udział procentowy tych komórek (Ryc. 16 A-C). Wprawdzie w guzach pobranych 3. dnia terapii, najwyższy odsetek M-MDSC stwierdzono w grupach myszy

otrzymujących 20 mg/kg MTX lub HES-MTX, jednak ze względu na wysokie wartości odchyłeń standardowych otrzymane wyniki okazały się trudne do interpretacji (Ryc. 16 A). W 10. dniu terapii w grupie otrzymującej MTX 20 mg/kg zaobserwowano najmniejszy udział procentowy komórek M-MDSC w tkance guza (Ryc. 16 B). Efekt ten nie był długotrwały – w 17. dniu terapii odsetek analizowanych komórek znacznie zwiększył się w tej grupie, szczególnie w odniesieniu do HES-MTX 20 mg/kg (Ryc. 16 C). Należy dodać, że rozwojowi nowotworu MC38 towarzyszył wzrost ekspresji cząsteczki CD80 na powierzchni M-MDSC, co sugeruje pogłębienie ich właściwości supresorowych. Pomimo obserwowanych zmian w udziale procentowym komórek M-MDSC, w przypadku ekspresji cząsteczki CD80 nie odnotowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami (Ryc. 16 D-F).



Ryc. 17. Ocena nacieku i stopnia pobudzenia granulocytarnych komórek supresorowych pochodzenia mieloidalnego w guzach nowotworowych MC38 pobranych od myszy poddanych chemioterapii. W tkankach guzów pobranych 3. (A, D), 10. (B, E) lub 17. dnia (C, F) terapii wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} zidentyfikowano populację PMN-MDSC (A-C) oraz określono ekspresję cząsteczki CD80 (D-F) na powierzchni tych komórek. Ekspresję cząsteczki CD80 zaprezentowano jako średnią intensywność fluorescencji (MFI). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A,C,D,F); nieparametrycznego testu Kruskala-Wallis'a i testu *post hoc* Dunna (E) lub testu ANOVA w modyfikacji Browna-Forsythe'a i Welcha i testu *post hoc* T3 Dunnetta (B) ($p > 0,05$).

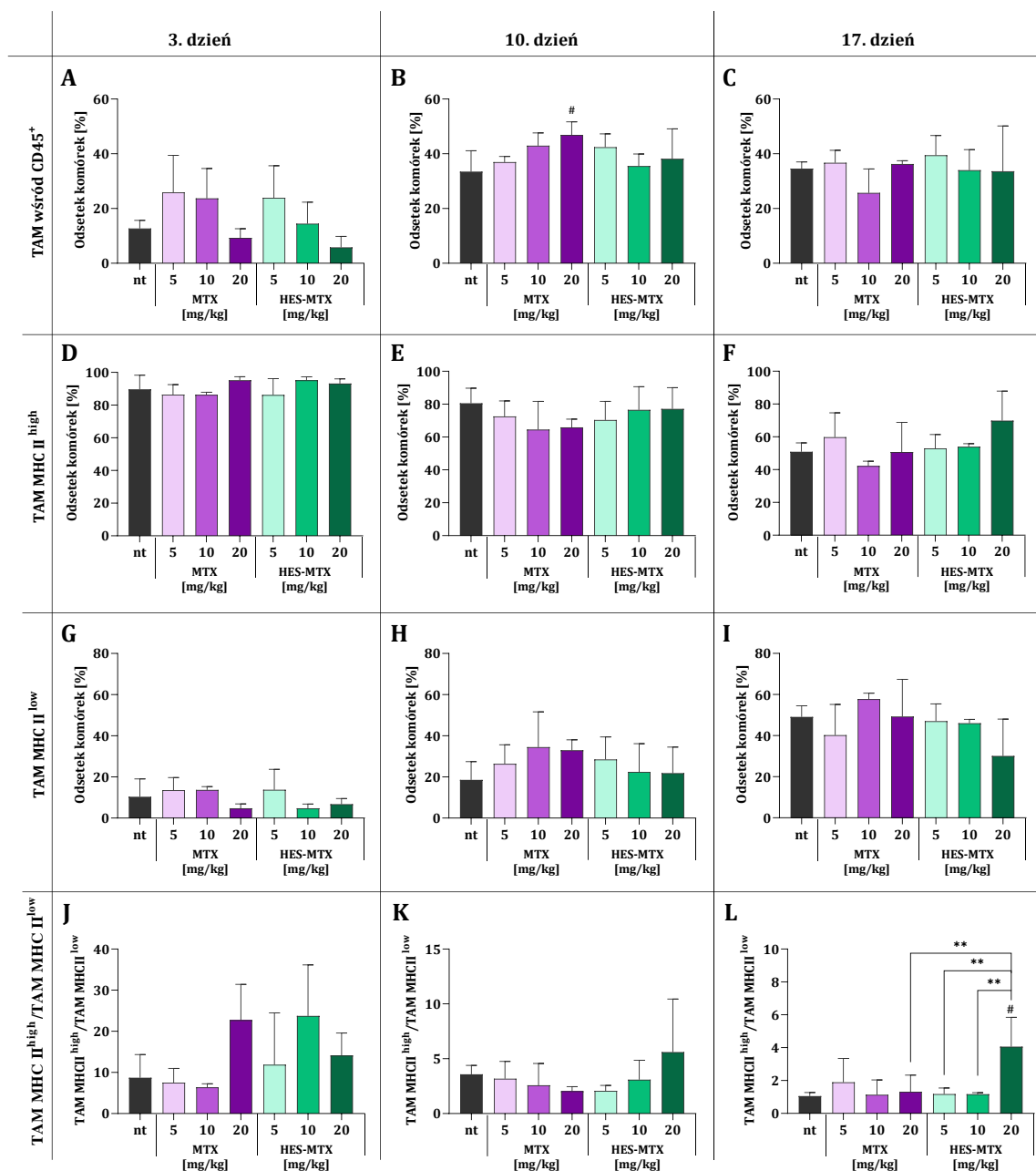
Podczas analizy udziału procentowego PMN-MDSC odnotowano zależny od stopnia rozwoju nowotworu wzrost odsetka tych komórek, któremu towarzyszyło zwiększenie ekspresji cząsteczki CD80 na ich powierzchni (Ryc. 17). Początkowo nie stwierdzono znaczących różnic w wielkości tej populacji. W guzach pobranych w 10. dniu terapii najwyższy odsetek komórek

PMN-MDSC odnotowano w grupie MTX 10 mg/kg, jednak zmiana ta nie była istotna statystycznie. Natomiast 7 dni później zaobserwowano tendencję wskazującą na wprost proporcjonalny do zastosowanej dawki MTX, wzrost udziału procentowego tych komórek, podczas gdy po podaniu HES-MTX zależność była odwrotna (Ryc. 17 A-C). W odniesieniu do kontroli nietraktowanej, żaden z chemioterapeutyków ani żadna z użytych dawek preparatów nie przyczyniła się do znaczących zmian w ekspresji cząsteczki CD80 na powierzchni PMN-MDSC (Ryc. 17 D-F).

Kolejną populacją komórek układu odpornościowego ocenianą w tkance nowotworowej były makrofagi związane z nowotworem (TAM), które wyodrębniono jako komórki o fenotypie $CD11c^+F4/80^+MHCII^+$. W guzach pobranych 3. dnia terapii stwierdzono, że w odniesieniu do grupy nietraktowanej, niskie dawki zastosowanych preparatów indukowały duży, lecz nieistotny statystycznie, wzrost odsetka tych komórek w guzach. Natomiast najmniejsze udziały procentowe populacji TAM obserwowano w grupach myszy traktowanych 20 mg/kg MTX lub HES-MTX (Ryc. 18 A). W 10. dniu terapii, w odniesieniu do 3. dnia, nastąpił gwałtowny wzrost odsetka TAM w tkance guzów. Ponadto zastosowanie MTX wpłynęło na zwiększenie odsetka TAM wśród komórek $CD45^+$, a efekt ten był wprost proporcjonalny do zastosowanej dawki preparatu. (Ryc. 18 B). W guzach pobranych w 17. dniu terapii odnotowano, że wielkość populacji TAM utrzymała się na poziomie podobnym do obserwowanego w 10. dniu, jednak pomiędzy grupami nie stwierdzono znaczących różnic (Ryc. 18 C).

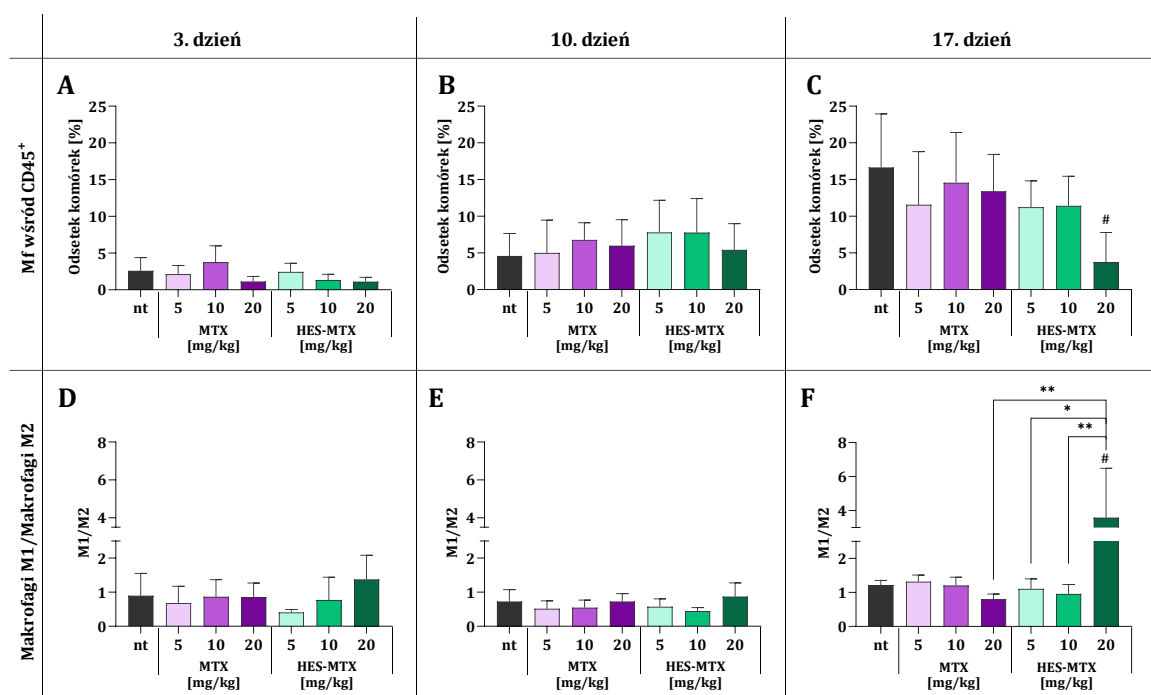
Ze względu na fakt, iż istnieją doniesienia naukowe mówiące o korelacji między progresją choroby nowotworowej, a stopniem pobudzenia komórek TAM, analizę cytometryczną uzupełniono o ocenę odsetka komórek TAM o wysokiej (TAM MHC II^{high}) i niskiej (TAM MHC II^{low}) ekspresji cząsteczki MHC II. Następnie z uzyskanych danych wyliczono współczynnik $TAM\ MHC\ II^{high}/TAM\ MHC\ II^{low}$, który umożliwił odpowiedź na pytanie: czy badane chemioterapeutyki są w stanie odwrócić tendencję dominacji komórek TAM o niskiej ekspresji MHC II, a także przy jakiej dawce obserwowany jest najkorzystniejszy efekt.

Z przeprowadzonych analiz wynika, że w początkowej fazie rozwoju nowotworu, gdy guzy MC38 były niewielkiego rozmiaru, ok. 90% komórek TAM stanowiły komórki z wysoką ekspresją MHC II. Wraz ze wzrostem nowotworu odsetek komórek TAM MHC II^{high} zmniejszył się i 17. dnia terapii w grupie nietraktowanej wynosił ok. 50% wszystkich makrofagów związanych z nowotworem (Ryc. 18 D-F). Odwrotną tendencję obserwowano w przypadku komórek TAM o niskiej ekspresji MHC II (Ryc. 18 G-I). Wspomniane zmiany w proporcjach obu populacji komórek były także zauważalne w wyliczonym współczynniku $TAM\ MHC\ II^{high}/TAM\ MHC\ II^{low}$, którego wartość zmniejszyła się 10-krotnie między pierwszym a ostatnim badanym punktem czasowym (Ryc. 18 J-L).



Ryc. 18. Ocena nacieku makrofagów związanych z nowotworem i określenie zmian w proporcji populacji tych komórek o różnej ekspresji cząsteczki MHC II w tkance guzów MC38 pobranych od myszy poddanych chemioterapii. W tkankach guzów pobranych 3. (A, D, G, J), 10. (B, E, H, K) lub 17. dnia (C, F, I, L) terapii wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} zidentyfikowano populacje TAM (A-C), wśród których na podstawie ekspresji cząsteczki MHC II, wyodrębniono komórki TAM MHC II^{high} (D-F) i TAM MHC II^{low} (G-I). Wykresy J-L przedstawiają uśrednione wartości ilorazu odsetka TAM MHC II^{high} oraz odsetka komórek typu TAM MHC II^{low} uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A-C,E,F,H,L) lub nieparametrycznego testu Kruskala-Wallis i testu *post hoc* Dunna (D,G,I,J,K). Znaki „#” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a grupą kontrolną – nt; pozostałe istotności pomiędzy grupami są prezentowane w formie klamer i znaków „” (#p<0,05; **p<0,01).**

W 3. dniu terapii odnotowano najwyższy współczynnik TAM MHC II^{high}/TAM MHC II^{low} w grupach myszy traktowanych MTX 20 mg/kg, a także HES-MTX 10 mg/kg, jednak obserwowane zmiany nie były istotne statystycznie (Ryc. 18 J). Analiza guzów pobranych w 10. dniu terapii wykazała, że najwyższy współczynnik był obserwowany w grupie myszy, które otrzymały 20 mg/kg HES-MTX. Jednoznaczny wpływ terapii najwyższą dawką nanokoniugatu na zmiany w proporcjach wielkości TAM MHC II^{high} i TAM MHC II^{low} obserwowano dopiero 17. dnia terapii – w tej grupie wykazano istotne statystycznie zwiększenie współczynnika TAM MHC II^{high}/TAM MHC II^{low} (Ryc. 18 K-L).



Ryc. 19. Ocena nacieku i polaryzacji makrofagów w guzach nowotworowych MC38 pobranych od myszy poddanych chemioterapii. W tkankach guzów pobranych 3. (A, D), 10. (B, E) lub 17. dnia (C, F) terapii wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} zidentyfikowano Mf (A-C). Spośród komórek mieloidalnych (CD11b⁺), na podstawie wewnątrzkomórkowej ekspresji cząsteczki CD206, wyodrębniono populacje makrofagów typu M1 (F4/80⁺CD206⁻) i M2 (F4/80⁺CD206⁺) i wyliczono wartości ilorazu odsetka komórek typu M1 oraz komórek typu M2 (D-F). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A-E) lub nieparametrycznego testu Kruskala-Wallis i testu *post hoc* Dunna (F). Znaki „#” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a grupą kontrolną – nt; pozostałe istotności pomiędzy grupami są prezentowane w formie klamer i znaków „*”, „**” (*#p<0,05; **p<0,01).

Makrofagi (Mf), które fenotypowo zidentyfikowano jako CD11b⁺CD11c⁻Ly6C⁻F4/80⁺ były ostatnią populacją komórek mieloidalnych określaną w tkance nowotworowej. Analiza populacji tych komórek w różnych punktach czasowych wykazała, że rozwojowi nowotworu towarzyszyło zwiększenie odsetka Mf obecnych w tkance guzów, a gwałtowny wzrost wielkości tej populacji nastąpił między 10. a 17. dniem terapii (Ryc. 19 A-C). W 3. dniu terapii stwierdzono

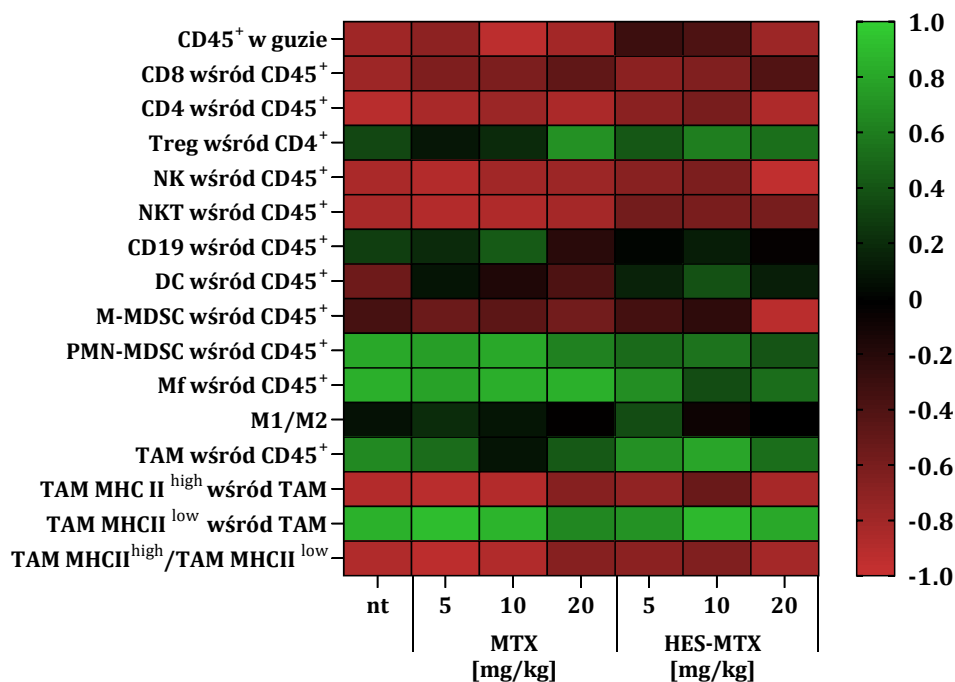
tendencję wskazującą na obniżenie udziału procentowego Mf w guzach po zastosowaniu dawki 20 mg/kg MTX lub HES-MTX (Ryc. 19 A). Analiza materiału pobranego w ostatnim punkcie czasowym wykazała, że oba zastosowane chemioterapeutyki wpłynęły na zmniejszenie wielkości populacji Mf, jednak istotne statystycznie obniżenie odsetka tych komórek, w stosunku do grupy kontrolnej, było wynikiem podania HES-MTX w dawce 20 mg/kg (Ryc. 19 C).

W celu określenia kierunku polaryzacji wszystkich makrofagów obecnych w nowotworze, zarówno tych identyfikowanych jako Mf, jak i TAM, dokonano oceny występowania cząsteczek receptora mannozowego CD206. Makrofagi CD206⁺ są uznawane za wykazujące cechy pronowotworowe komórki typu M2 i ich obecność jest korelowana z progresją choroby nowotworowej. Z kolei komórki typu M1, niewykazujące ekspresji cząsteczki CD206 – za makrofagi o cechach przeciwnowotworowych, a ich zwiększony udział procentowy jest dobrym markerem prognostycznym. Zatem wyliczając współczynnik z wielkości populacji komórek typu M1 i M2 można określić, który typ komórek dominuje w mikrośrodowisku nowotworowym.

Oceniając wzajemne proporcje obu tych populacji w badanych punktach czasowych można zauważyć, że populacje komórek typu M1 i M2 występują w tkance guza MC38 w porównywalnej wielkości, a odchylenia od tego stanu dotyczą tylko jednej grupy (Ryc. 19 D-F). W guzach pobranych 3. dnia terapii w grupie HES-MTX 20 mg/kg odnotowano zwiększoną, choć nieistotną statystycznie, zmianę współczynnika M1/M2 w odniesieniu do grupy nietraktowanej (Ryc. 19 D). W tkankach pobranych w 10. dniu terapii nie obserwowano wpływu podanych chemioterapeutyków na kierunek polaryzacji makrofagów (Ryc. 19 E). Z kolei, w 17. dniu terapii stwierdzono, że najwyższa dawka nanokoniugatu indukowała konwersję makrofagów obecnych w nowotworze w kierunku komórek M1. Świadczy o tym statystycznie istotny wzrost wartości współczynnika M1/M2, w odniesieniu do grupy kontrolnej i traktowanej MTX 20 mg/kg, jak również pozostałych grup myszy otrzymujących HES-MTX (Ryc. 19 F).

Aby ocenić zmiany wielkości poszczególnych populacji komórek układu odpornościowego obecnych w guzach w kontekście wzrostu nowotworu MC38, oszacowano występowanie korelacji pomiędzy tymi dwiema zmiennymi. Korzystając z korelacji wyliczonych indywidualnie dla każdej grupy, sporządzono heat-mapę prezentowaną na Ryc. 20 (przygotowane dla każdej grupy wykresy punktowe niezbędne do obliczenia korelacji zamieszczono na Ryc. 74-Ryc. 78 w rozdziale „Suplement”). Przedstawiając wyniki w tej formie, możliwe było określenie jak zmieniały się wielkości populacji komórek układu odpornościowego podczas zwiększania objętości guzów MC38 w trakcie trwania doświadczenia, a także jak chemioterapeutyki wpłynęły na zmiany w tym zakresie. O korelacji pozytywnej (gdy $0 < r_s < 1$; kolor zielony) mówimy wtedy, gdy zwiększającej się objętości guzów towarzyszył wzrost odsetka populacji komórek układu odpornościowego i taką tendencję obserwowano w przypadku komórek o cechach supresorowych – limfocytach Treg, PMN-MDSC, Mf, TAM, a w obrębie tej ostatniej populacji, korelację pozytywną odnotowano

przede wszystkim w TAM MHC II^{low}. Natomiast w przypadku korelacji negatywnej (gdzie $-1 < r_s < 0$; kolor czerwony) progresji choroby nowotworowej towarzyszyło stopniowe zmniejszanie się wielkości populacji komórek, np. związanych z aktywacją odpowiedzi przeciwnowotworowej i taką tendencję wykazano w obrębie limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺, komórek NK, NKT, DC oraz w subpopulacji TAM MHC II^{high}.



Ryc. 20. Heat-mapa przedstawiająca korelację pomiędzy wielkością guzów a udziałem procentowym poszczególnych populacji komórek układu odpornościowego napływających do guzów MC38 myszy poddanych chemioterapii. Korelacje dla każdej z grup badanych obliczono z wykorzystaniem nieparametrycznego testu Spearmana, korzystając z objętości guzów MC38 zmierzonych w 3., 10. i 17. dniu terapii oraz z udziału procentowego poszczególnych populacji komórek określonych w tkance nowotworowej. Wykresy punktowe oraz wyliczone wartości r_s i p dla poszczególnych grup i populacji przedstawiono na Ryc. 74-Ryc. 78 w rozdziale 7.

Analizując wyliczone wartości r_s można zauważyć, że jedynie w niektórych populacjach komórek układu odpornościowego wykazano zmiany zależne od rodzaju zastosowanego chemioterapeutyku. W przypadku populacji limfocytów T CD8⁺ obserwowano, że wraz ze zwiększeniem dawki preparatów zmniejszała się negatywna korelacja pomiędzy wielkością tej populacji a objętością guzów MC38. Świadczy o tym wzrastająca wartość r_s , która zmieniała się wprost proporcjonalnie do zastosowanej dawki preparatów. W grupie HES-MTX 20 mg/kg wyliczona wartość r_s była największa, a analiza statystyczna nie potwierdziła występowania zbieżności zmniejszania się wielkości populacji tych komórek wraz ze wzrostem objętości guzów (Ryc. 20 i Ryc. 74).

Podkreślenia wymaga fakt, że pomimo iż rozwojowi guzów towarzyszyło znaczne obniżenie odsetka komórek NKT w guzach, to w wyniku zastosowania nanokoniugatu, niezależnie od dawki, odnotowano częściowe zniesienie tego efektu. W porównaniu do grup myszy nieleczonych lub otrzymujących MTX, w grupach traktowanych HES-MTX otrzymane wartości r_s były większe, a korelacja negatywna była słabsza.

Pomimo że wyliczone wartości r_s dla populacji komórek CD19⁺ i DC mogą wskazywać na przeciwstawny wpływ MTX i HES-MTX na wielkości tych populacji w kontekście rozwoju guza nowotworowego, to analiza statystyczna nie potwierdziła tych obserwacji.

Należy zwrócić uwagę, że choć M-MDSC są uznawane za komórki o cechach supresorowych, to w przypadku tej populacji obserwowano umiarkowaną korelację negatywną. Jednak wynika to z faktu, że wielkość tej populacji utrzymywała się na jednakowym poziomie we wszystkich badanych punktach czasowych, szczególnie w grupie nietraktowanej i w grupach myszy otrzymujących preparaty w dawce 5 lub 10 mg/kg. Warto dodać, że po zastosowaniu wyższych dawek MTX lub HES-MTX obserwowano korelacje negatywne o umiarkowanym lub silnym charakterze (odpowiednio, $r_s = -0,56$ dla grupy MTX 20 mg/kg lub $r_s = -0,91$ dla grupy HES-MTX 20 mg/ml). Jednakże powyższe korelacje powinny być wiązane z odnotowanym na początku terapii zwiększonym napływem komórek M-MDSC do tkanki guza, aniżeli ze zmniejszeniem wielkości tej populacji pod wpływem zastosowanych chemioterapeutyków.

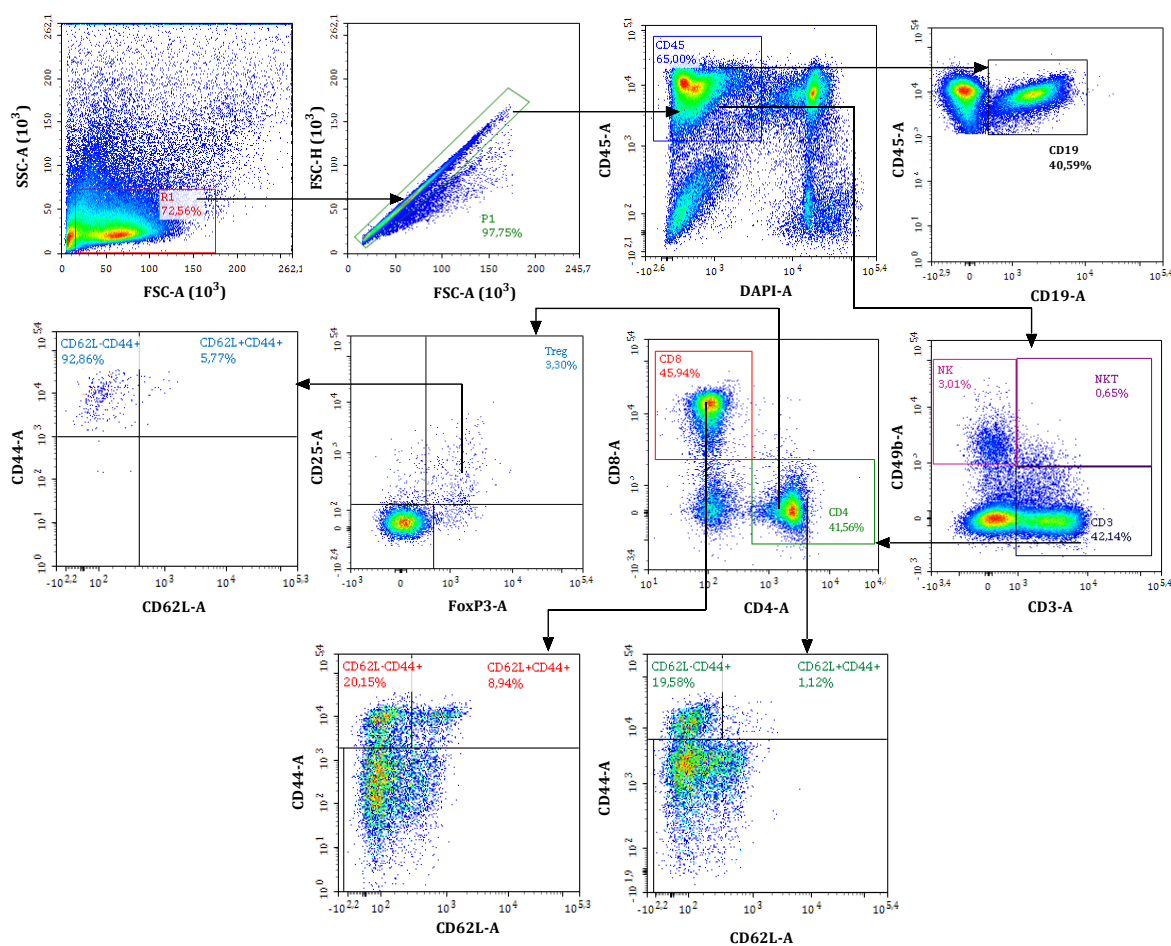
Porównując wpływ obu chemioterapeutyków na zmiany w wielkości populacji PMN-MDSC podczas rozwoju guzów MC38 odnotowano, że w grupach myszy traktowanych nanokoniugatem wartości r_s były mniejsze niż w pozostałych grupach. Ponadto po podaniu HES-MTX 20 mg/kg odnotowano najniższą wartość r_s . Sugeruje to, że zastosowanie nanokoniugatu w tej dawce wpłynęło na ograniczony napływ komórek PMN-MDSC do tkanki guzów.

W przypadku populacji Mf odnotowano, że zwiększającej się objętości guzów MC38 towarzyszył gwałtowny wzrost napływu tych komórek do tkanki nowotworu. Porównanie wyliczonych wartości r_s wykazało, że efektem zastosowania nanokoniugatu w terapii było częściowe zredukowanie tej tendencji, szczególnie w grupach myszy otrzymujących HES-MTX w dawce 10 mg/kg lub 20 mg/kg.

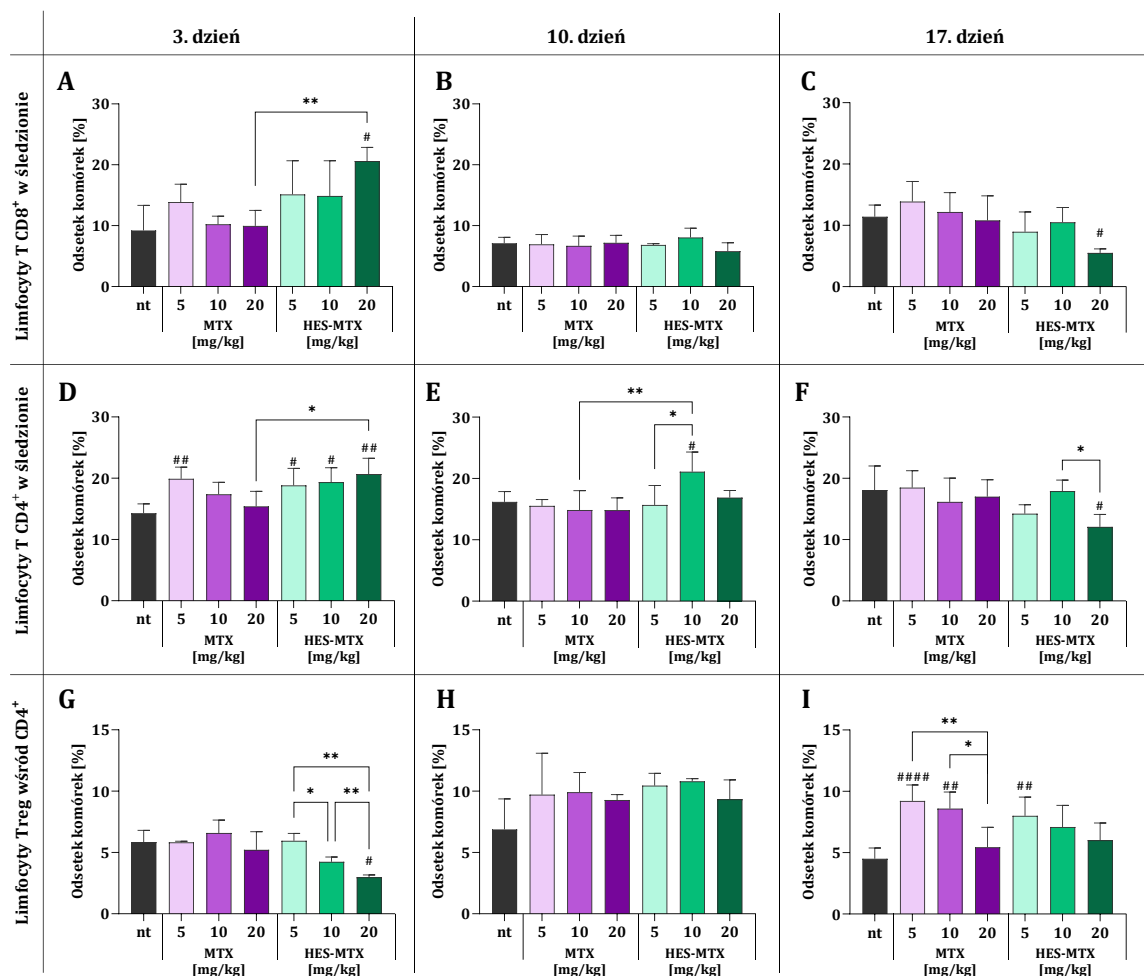
4.2.3. Ocena ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej u myszy poddanych chemioterapii

W celu określenia wpływu zastosowanych chemioterapeutyków na zmiany w udziale procentowym komórek układu odpornościowego w śledzionach, przeprowadzono wieloparametryczną analizę cytometryczną zgodnie ze schematami prezentowanymi na Ryc. 21. oraz Ryc. 24. Nie stwierdzono wpływu rozwijającego się nowotworu na zmiany w wielkości populacji komórek układu odpornościowego w śledzionie, a obserwowane różnice były indukowane pod wpływem zastosowanych chemioterapeutyków.

4.2.3.1. Populacje komórek limfoidalnych w śledzionach pobranych od myszy obciążonych nowotworem MC38



Ryc. 21. Schemat analizy populacji komórek limfoidalnych w śledzionach myszy obciążonych nowotworem MC38. Po wyeliminowaniu zlepek komórkowych, wyodrębniono żywe leukocyty (CD45⁺DAPI^{neg}), wśród których zidentyfikowano limfocyty CD19⁺, limfocyty T (CD3⁺CD49b⁻), komórki NK (CD49b⁺CD3⁻) oraz komórki NKT (CD49b⁺CD3⁺). Na podstawie ekspresji markerów CD4 i CD8 wydzielono populację limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺. W obrębie populacji limfocytów T CD4⁺ zidentyfikowano limfocyty Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺). W oparciu o ekspresję cząsteczek CD44 i CD62L wśród limfocytów T określono subpopulację komórek efektorowych (CD62L⁻CD44⁺) oraz komórek pamięci (CD62L⁺CD44⁺).



Ryc. 22. Ocena odsetka limfocytów T w śledzionach myszy obciążonych nowotworem MC38 i poddanych chemioterapii. W śledzionach pobranych 3. (A, D, G), 10. (B, E, H) lub 17. dnia (C, F, I) terapii wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} zidentyfikowano populacje limfocytów T CD8⁺ (A-C) i CD4⁺ (D-F), a także limfocytów Treg określonych wśród limfocytów T CD4⁺ (G-I). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy śledzion pobranych od 5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A-F,I) lub testu ANOVA w modyfikacji Browna-Forsythe'a i Welch'a i testu *post hoc* T3 Dunnetta (G-H). Znaki „##” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a grupą kontrolną – nt; pozostałe istotności pomiędzy grupami są prezentowane w formie klamer i znaków „*” (*#p<0,05; **###p<0,01; #####p<0,0001).

Ocena wielkości populacji limfocytów T CD8⁺ w śledzionach pobranych od myszy w 3. dniu terapii wykazała, że zmiany w odsetku tych komórek zostały wywołane po podaniu nanokoniuugatu w dawce 20 mg/kg. Udział procentowy limfocytów T CD8⁺ w tej grupie był znacząco wyższy w odniesieniu zarówno do kontroli nietraktowanej, jak również grupy myszy otrzymujących MTX w dawce 20 mg/kg (Ryc. 22 A). Jednak ten efekt był krótkotrwały – analiza komórek śledzionowych pobranych w kolejnym punkcie czasowym, nie wykazała zmian zależnych od zastosowanego preparatu (Ryc. 22 B), a w 17. dniu terapii odnotowano istotne obniżenie odsetka limfocytów T CD8⁺ po podaniu 20 mg/kg HES-MTX (Ryc. 22 C).

Podanie chemioterapeutyków indukowało zmiany w odsetku limfocytów T CD4⁺ w śledzionie i podobnie jak w przypadku poprzedniej populacji komórek, szczyt tych zmian był obserwowany 3. dnia terapii. W odniesieniu do kontroli nieleczonej, statystycznie wyższy odsetek komórek CD4⁺ odnotowano w grupie MTX 5 mg/kg oraz we wszystkich grupach myszy traktowanych nanokoniugatem. Porównując najwyższe dawki obu chemioterapeutyków zauważono, że w przeciwieństwie do MTX, nanokoniugat przyczynił się do istotnego statystycznie wzrostu odsetka limfocytów T CD4⁺ (Ryc. 22 D). Z kolei, zwiększony odsetek tych komórek utrzymał się do 10. dnia jedynie po podaniu HES-MTX w dawce 10 mg/kg (Ryc. 22 E), a w 17. dniu terapii stwierdzono znaczące obniżenie odsetka limfocytów T CD4⁺ w grupie HES-MTX 20 mg/kg (Ryc. 22 F).

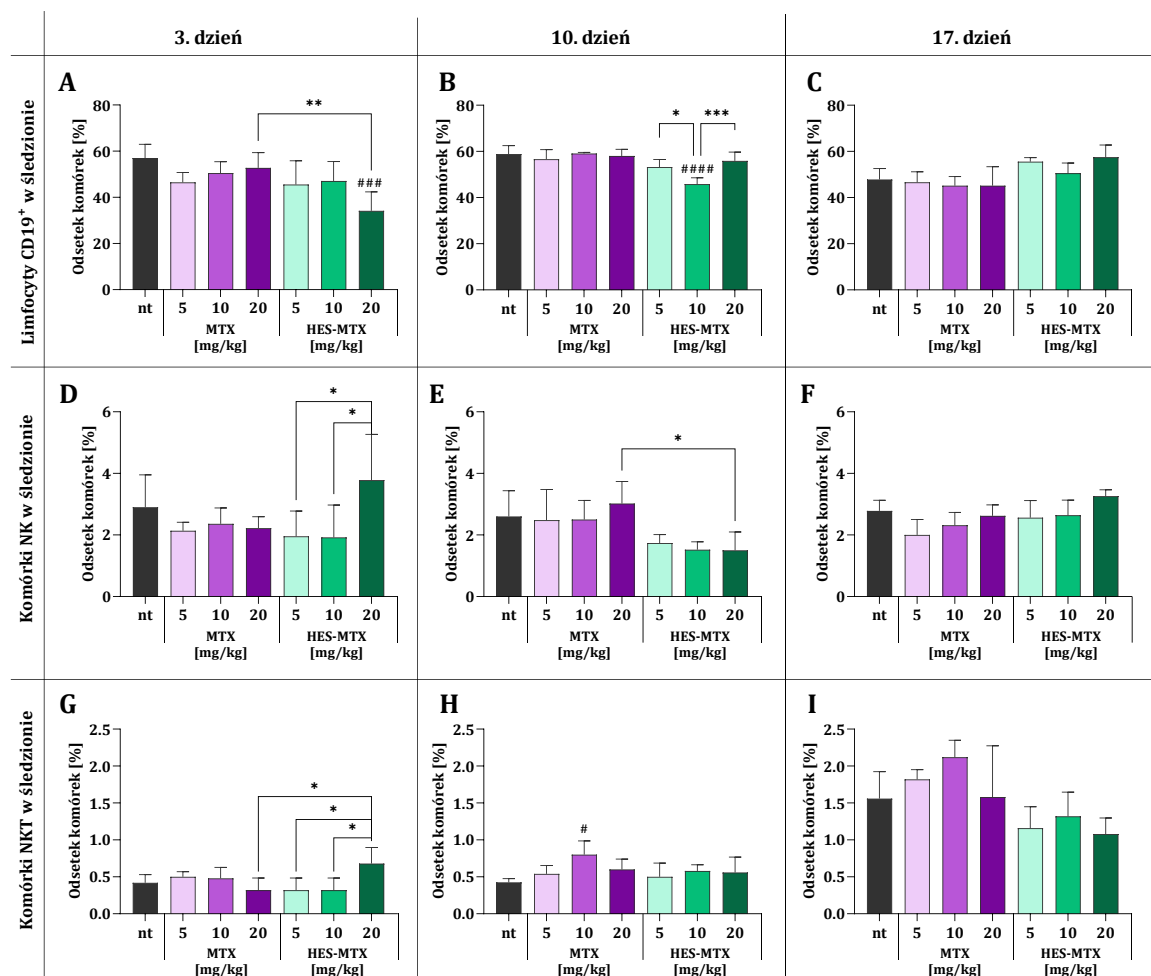
W śledzionach pobranych 3. dnia terapii, po zastosowaniu HES-MTX w dawkach 10 i 20 mg/kg, wykazano obniżenie odsetka limfocytów Treg (Ryc. 22 G). Tymczasem w 10. dniu terapii odnotowano nieistotny statystycznie wzrost udziału procentowego tych komórek we wszystkich grupach terapeutycznych (Ryc. 22 H). W kolejnym punkcie czasowym stwierdzono, że zwiększony odsetek limfocytów Treg utrzymał się po zastosowaniu preparatów w dawce 5 lub 10 mg/kg, natomiast zmniejszenie wielkości tej populacji do poziomu kontroli nietraktowanej obserwowano jedynie po podaniu preparatów w dawce 20 mg/kg (Ryc. 22 I).

Analiza wielkości populacji limfocytów B w śledzionach pobranych 3. dnia terapii wykazała, że we wszystkich traktowanych grupach niezależnie od rodzaju preparatu nastąpiło obniżenie udziału procentowego tych komórek. Przy czym, zmiana ta była istotna statystycznie jedynie w przypadku HES-MTX w dawce 20 mg/kg (Ryc. 23 A). Dziesiątego dnia terapii zmniejszony odsetek limfocytów B utrzymał się jedynie po podaniu HES-MTX w dawce 10 mg/kg (Ryc. 23 B), a 7 dni później tylko po podaniu nanokoniugatu wielkość populacji tych limfocytów pozostała na poprzednim poziomie (Ryc. 23 C).

Oceniając wpływ zastosowania terapii na zmiany w wielkości populacji komórek NK w śledzionach pobranych 3. dnia terapii odnotowano, że zastosowanie nanokoniugatu w dawce 20 mg/kg wpłynęło na zwiększenie odsetka tych komórek (Ryc. 23 D). Analiza śledzion pobranych w kolejnym punkcie czasowym wykazała, że we wszystkich grupach myszy traktowanych nanokoniugatem doszło do obniżenia udziału procentowego komórek NK, jednak statystycznie istotnie zmiany wykazano tylko w grupie HES-MTX 20 mg/kg. W 17. dniu terapii odsetek tych komórek w poszczególnych grupach wyrównał się i powrócił do poziomu obserwowanego w grupie nietraktowanej (Ryc. 23 E-F).

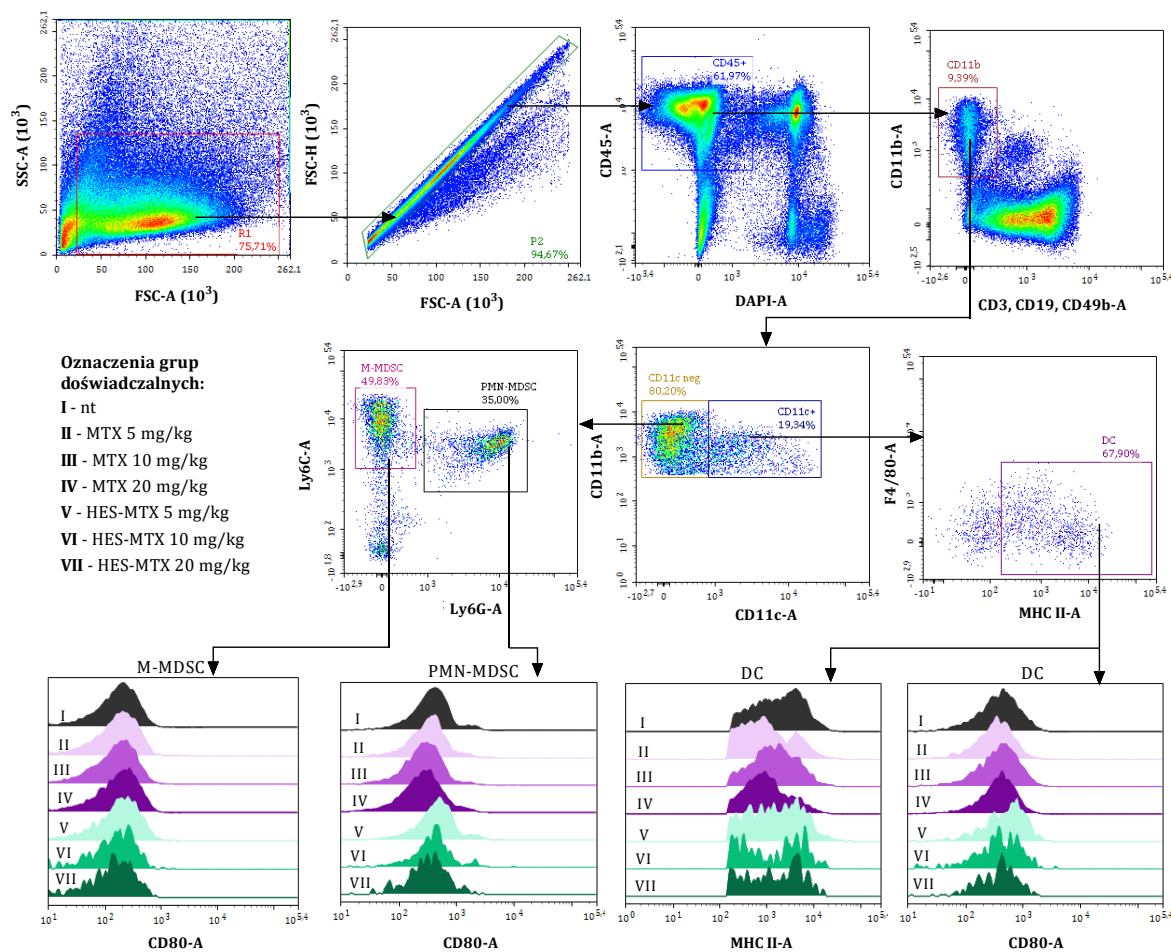
Ocena wielkości populacji komórek NKT w śledzionach pobranych 3. dnia terapii wykazała, że najwyższa dawka nanokoniugatu przyczyniła się do znaczącego zwiększenia udziału procentowego tych komórek (Ryc. 23 G), jednak obserwowany efekt zastosowania wysokiej dawki HES-MTX był krótkotrwały. Analiza komórek śledzionowych pobranych 7 dni później ujawniła

wpływ podania MTX w dawce 10 mg/kg na znaczący wzrost odsetka komórek NKT (Ryc. 23 H). Tendencja ta utrzymała się także w 17 dniu terapii. Dodatkowo wykazano, że w przeciwieństwie do MTX, zastosowanie nanokoniugatu przyczyniło się do nieistotnego statystycznie obniżenia komórek NKT w śledzionie w odniesieniu do kontroli nietraktowanej (Ryc. 23 I).



Ryc. 23. Ocena odsetka komórek limfoidalnych w śledzionach myszy obciążonych nowotworem MC38 i poddanych chemioterapii. W śledzionach pobranych 3. (A, D, G), 10. (B, E, H) lub 17. dnia (C, F, I) terapii wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} zidentyfikowano populacje limfocytów CD19⁺ (A-C), komórek NK (D-F), a także komórek NKT (G-I). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy śledzion pobranych od 5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A,B,D,E,H); nieparametrycznego testu Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna (C,F,I) lub testu ANOVA w modyfikacji Browna-Forsythe'a i Welcha i testu *post hoc* T3 Dunnetta (G). Znaki „#” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a grupą kontrolną – nt; pozostałe istotności pomiędzy grupami są prezentowane w formie klamer i znaków „*” (*# p<0,05; **/# p<0,01; ### p<0,0001).

4.2.3.2. Populacje komórek mieloidalnych w śledzionach pobranych od myszy obciążonych nowotworem MC38

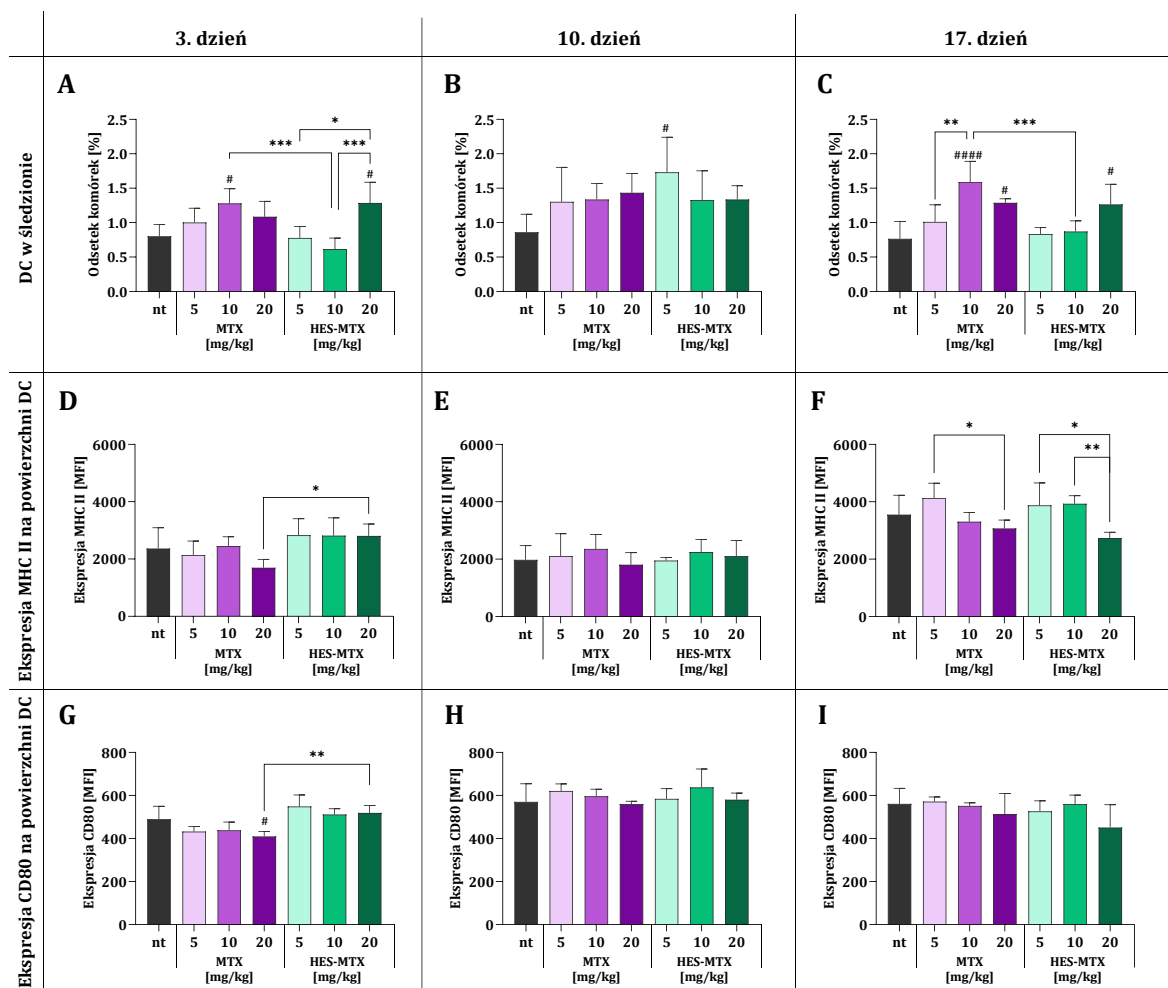


Ryc. 24. Schemat analizy populacji komórek mieloidalnych w śledzionach myszy obciążonych nowotworem MC38. Po wyeliminowaniu zlepek komórkowych, wyodrębniono żywe leukocyty ($CD45^+DAPI^{neg}$), wśród których zidentyfikowano populację komórek $CD11b^+$, które rozdzielono w oparciu o ekspresję cząsteczek $CD11c$. Wśród komórek $CD11b^+CD11c^-$ wyodrębniono populację MDSC: M-MDSC ($CD11b^+CD11c^-Ly6C^+Ly6G^-$); PMN-MDSC ($CD11b^+CD11c^-Ly6C^{int}Ly6G^+$). Wśród komórek $CD11b^+CD11c^+$ zidentyfikowano populację DC ($CD11c^+F4/80^{int}MHC II^+$). Dodatkowo określono ekspresję cząsteczek MHC II na powierzchni DC oraz $CD80$ na powierzchni DC, M-MDSC oraz PMN-MDSC. Na histogramach przedstawiono ekspresję cząsteczek MHC II lub $CD80$ reprezentatywne dla każdej grupy z doświadczenia chemioterapeutycznego.

Aby ocenić wpływ podania różnych dawek chemioterapeutyków na zmiany w wielkości populacji śledzionowych komórek mieloidalnych przeprowadzono wieloparametryczną analizę cytometryczną (Ryc. 24). Wśród komórek $CD11b^+CD45^+$ w śledzionach, wyodrębniono populacje DC, M-MDSC, PMN-MDSC. Dodatkowo w celu określenia stopnia pobudzenia tych komórek, badano ekspresję cząsteczek MHC II i/lub $CD80$ na ich powierzchni.

Analiza wielkości populacji komórek dendrytycznych w śledzionach wykazała, że zmiany indukowane chemioterapeutykami były obserwowane już 3. dnia terapii. W odniesieniu do grupy nietraktowanej znaczący wzrost odsetka DC odnotowano w grupach MTX 10 mg/kg oraz

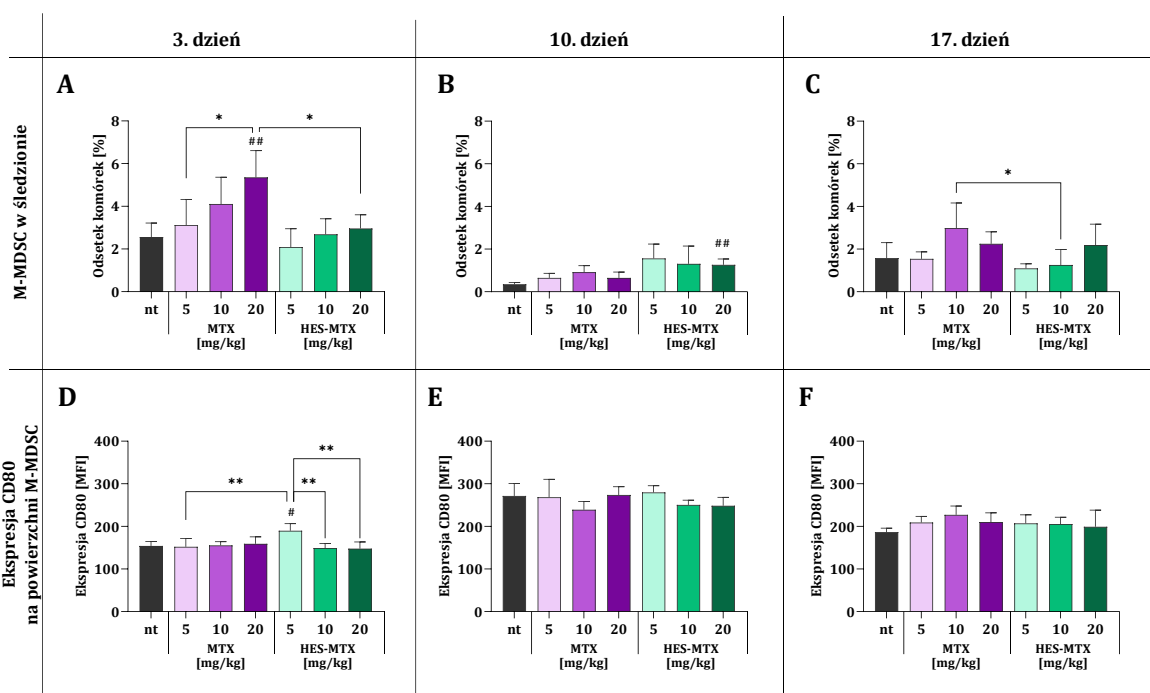
HES-MTX 20 mg/kg (Ryc. 25 A). Choć w 10. dniu terapii we wszystkich grupach myszy poddanych leczeniu obserwowano zwiększony udział procentowy tych komórek, to w odniesieniu do grupy kontrolnej istotnie statystycznie zmiany odnotowano tylko w grupie HES-MTX 5 mg/kg (Ryc. 25 B). Po dłuższym czasie od podania chemioterapeutyków, znaczący wzrost odsetka DC utrzymał się w grupach MTX 10 mg/kg i 20 mg/kg lub HES-MTX 20 mg/kg (Ryc. 25 C). Sugeruje to, że jedynie wyższe dawki chemioterapeutyków mogą spowodować trwałe zwiększony udział tych komórek w śledzionie.



Ryc. 25. Ocena odsetka i stopnia pobudzenia komórek dendrytycznych w śledzionach myszy obciążonych nowotworem MC38 i poddanych chemioterapii. W śledzionach pobranych 3. (A, D, G), 10. (B, E, H) lub 17. dnia (C, F, I) terapii wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} zidentyfikowano populację DC (A-C) oraz określono ekspresję cząsteczek MHC II (D-F) oraz CD80 (G-I) na powierzchni tych komórek. Ekspresję cząsteczek MHC II i CD80 zaprezentowano jako średnią intensywność fluorescencji (MFI). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A-E;G,H) lub testu ANOVA w modyfikacji Browna-Forsythe'a i Welcha i testu *post hoc* T3 Dunnetta (F,I). Znaki „#” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a grupą kontrolną – nt; pozostałe istotności pomiędzy grupami są prezentowane w formie klamer i znaków „*” (*#p<0,05; **/###p<0,01; ***p<0,001; ####p<0,0001).

W śledzionach pobranych w 3. dniu terapii zaobserwowano, że w odniesieniu do MTX, podanie nanokoniugatu w najwyższej dawce, indukowało wyższą ekspresję cząsteczek MHC II i CD80 na powierzchni śledzionowych DC (Ryc. 25 D, G). Dalsze zmiany w ekspresji MHC II odnotowano dopiero 17. dnia terapii i były one zależne od zastosowanych dawek preparatów. Najwyższą wartość MFI dla cząsteczek MHC II zaobserwowano w grupach: MTX 5 mg/kg; HES-MTX 5 mg/kg lub 10 mg/kg (Ryc. 25 E, F). Wpływ chemioterapeutyków na zmiany w ekspresji cząsteczki CD80 na powierzchni śledzionowych DC był krótkotrwały – dalsza analiza cytometryczna materiału pobranego w 10. i 17. dniu terapii nie wykazała zmian w poziomie ekspresji tej cząsteczki na powierzchni DC (Ryc. 25 H, I).

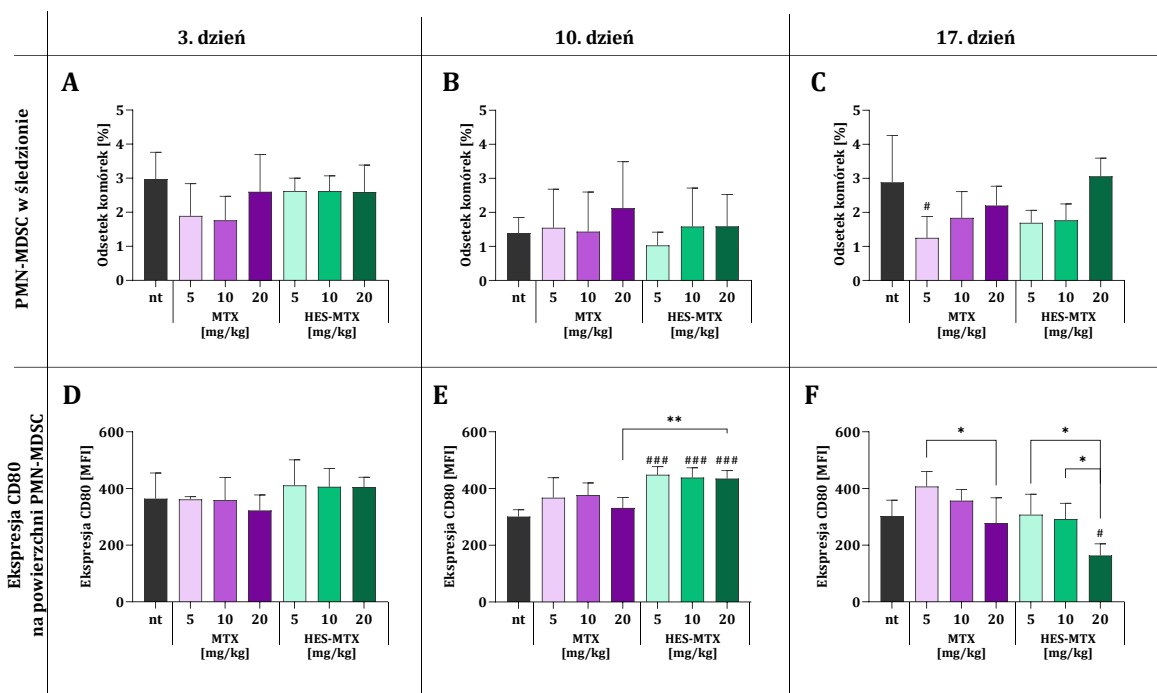
Podsumowując, analiza populacji DC w śledzionie wykazała, że w krótkim czasie od rozpoczęcia terapii nanokoniugat zastosowany w dawce 20 mg/kg wpłynął na zwiększenie odsetka pobudzonych DC, jednak w dłuższym czasie od jego podania, zwiększonemu odsetkowi DC nie towarzyszyła wyższa ekspresja cząsteczek MHC II i CD80 na ich powierzchni.



Ryc. 26. Ocena odsetka i stopnia pobudzenia monocytarnych komórek supresorowych pochodzenia mieloidalnego w śledzionach myszy obciążonych nowotworem MC38 i poddanych chemioterapii.

W śledzionach pobranych 3. (A, D), 10. (B, E) lub 17. dnia (C, F) terapii wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} zidentyfikowano populację M-MDSC (A-C) oraz określono ekspresję cząsteczki CD80 (D-F) na powierzchni tych komórek. Ekspresję cząsteczki CD80 zaprezentowano jako średnią intensywność fluorescencji (MFI). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy śledzion pobranych od 5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A-C;E,F) lub testu ANOVA w modyfikacji Browna-Forsythe'a i Welch'a i testu *post hoc* T3 Dunnetta (D). Znaki „#” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a grupą kontrolną – nt; pozostałe istotności pomiędzy grupami są prezentowane w formie klamer i znaków „*” (*# p<0,05; **## p<0,01).

W przypadku populacji M-MDSC stwierdzono, że zwiększenie odsetka tych komórek w śledzionie nastąpiło 3. dnia po podaniu MTX, a po zastosowaniu HES-MTX – dopiero 10. dnia terapii (Ryc. 26 A, B). Natomiast w dłuższym czasie od podania chemioterapeutyków nie obserwowano znaczących różnic w udziale procentowym M-MDSC (Ryc. 26. C). Istotny statystycznie wzrost ekspresji cząsteczek CD80 na powierzchni tych komórek odnotowano jedynie 3. dnia terapii, w grupie myszy otrzymujących HES-MTX w dawce 5 mg/kg (Ryc. 26 D-F).

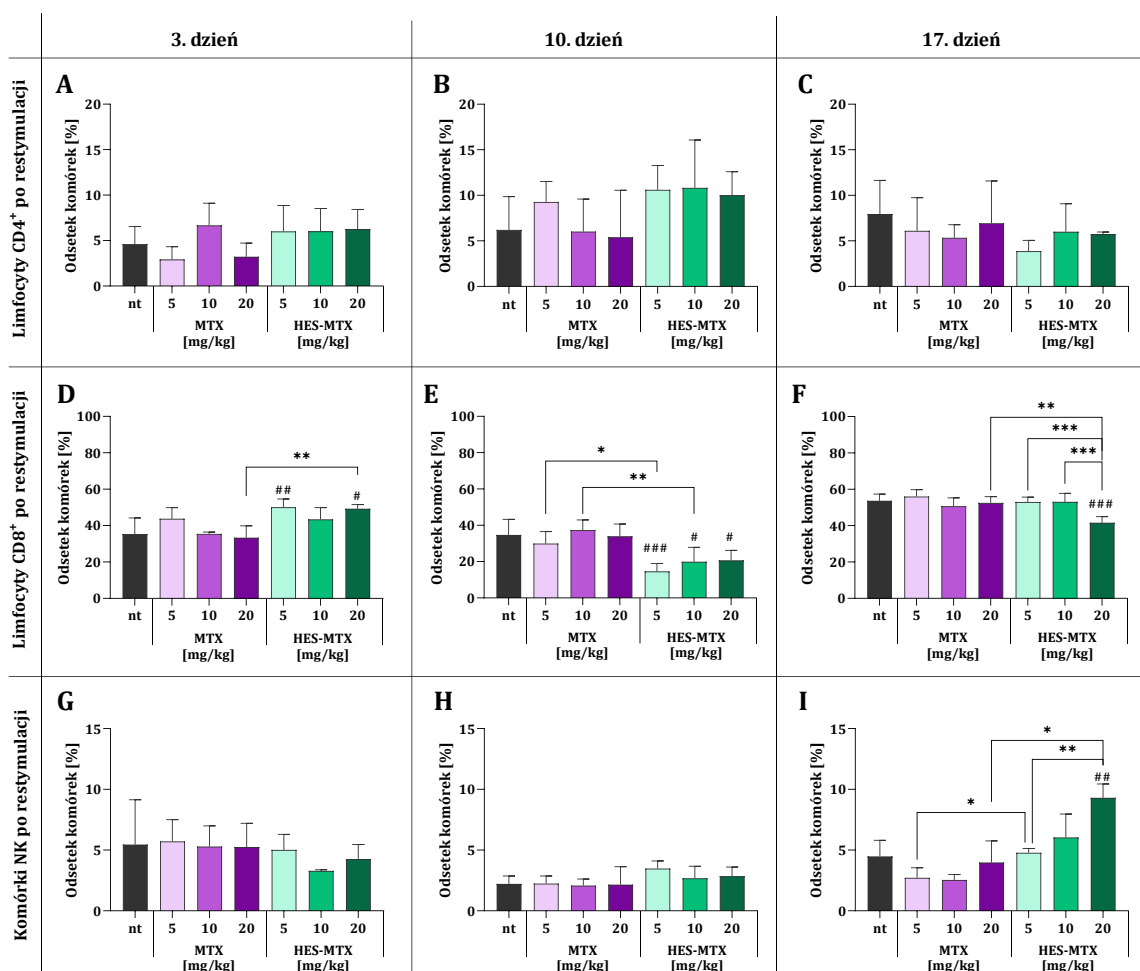


Ryc. 27. Ocena odsetka i stopnia pobudzenia komórek supresorowych pochodzenia mieloidalnego w śledzionach myszy obciążonych nowotworem MC38 i poddanych chemioterapii. W śledzionach pobranych 3. (A, D), 10. (B, E) lub 17. dnia (C, F) terapii wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} zidentyfikowano populację PMN-MDSC (A-C) oraz określono ekspresję cząsteczki CD80 (D-F) na powierzchni tych komórek. Ekspresję cząsteczki CD80 zaprezentowano jako średnią intensywność fluorescencji (MFI). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy śledzion pobranych od 5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A,D-G); nieparametrycznego testu Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna (C) lub testu ANOVA w modyfikacji Browna-Forsythe'a i Welch'a i testu *post hoc* T3 Dunnetta (B). Znaki „#” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a grupą kontrolną – nt; pozostałe istotności pomiędzy grupami są prezentowane w formie klamer i znaków „*,” (*/# p<0,05; **p<0,01; ###p<0,001).

Wykazano ponadto, że zmiany w wielkości populacji komórek PMN-MDSC nastąpiły w 10. dniu od podania chemioterapeutyków (Ryc. 27 A-C). Znaczące zróżnicowanie odsetka tych komórek obserwowano dopiero 17. dnia terapii, kiedy w grupie MTX 5 mg/kg uległ on statystycznie istotnemu obniżeniu, a w grupie otrzymującej HES-MTX w dawce 20 mg/kg powrócił do wartości wyjściowej. W przypadku ekspresji cząsteczki CD80 na powierzchni tych komórek, wykazano zmiany indukowane pod wpływem podania nanokoniugatu. Co więcej, w 10. dniu terapii były one statystycznie istotne niezależnie od zastosowanej dawki HES-MTX (Ryc. 27 D, E).

Natomiast w śledzionach pobranych w 17. dniu terapii od myszy traktowanych HES-MTX w dawce 20 mg/kg obserwowano zmniejszony poziom ekspresji tej cząsteczki, w porównaniu do grupy nietraktowanej (Ryc. 27 F).

4.2.3.3. Zdolność komórek śledzionowych do aktywowania swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej w następstwie ponownego kontaktu z komórkami MC38



Ryc. 28. Ocena odsetka komórek limfoidalnych wśród restymulowanych splenocytów pochodzących ze śledzion od myszy obciążonych nowotworem MC38 i poddanych chemioterapii. W śledzionach pobranych 3. (A, D, G), 10. (B, E, H) lub 17. dnia (C, F, I) terapii określono odsetek limfocytów T CD4⁺ (A-C) CD8⁺ (D-F) oraz komórek NK (G-I) po 5-dniowej hodowli mieszanej z komórkami MC38. Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy śledzion pobranych od 5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A,B,D-F); nieparametrycznego testu Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna (G,H) lub testu ANOVA w modyfikacji Browna-Forsythe'a i Welcha i testu *post hoc* T3 Dunnetta (C,I). Znaki „#” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a grupą kontrolną – nt; pozostałe istotności pomiędzy grupami są prezentowane w formie klamer i znaków „*” (*#p<0,05; **p<0,01; ###p<0,001).

Aby sprawdzić wpływ podania chemioterapeutyków na powstanie ogólnoustrojowej swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej, określono zdolność komórek śledzionowych do reakcji na powtórny kontakt z antygenami komórek nowotworowych. W tym celu splenocyty

pobrane od myszy obarczonych nowotworem MC38 i poddanych chemioterapii wykorzystano w funkcjonalnym teście *ex vivo* (restymulacje).

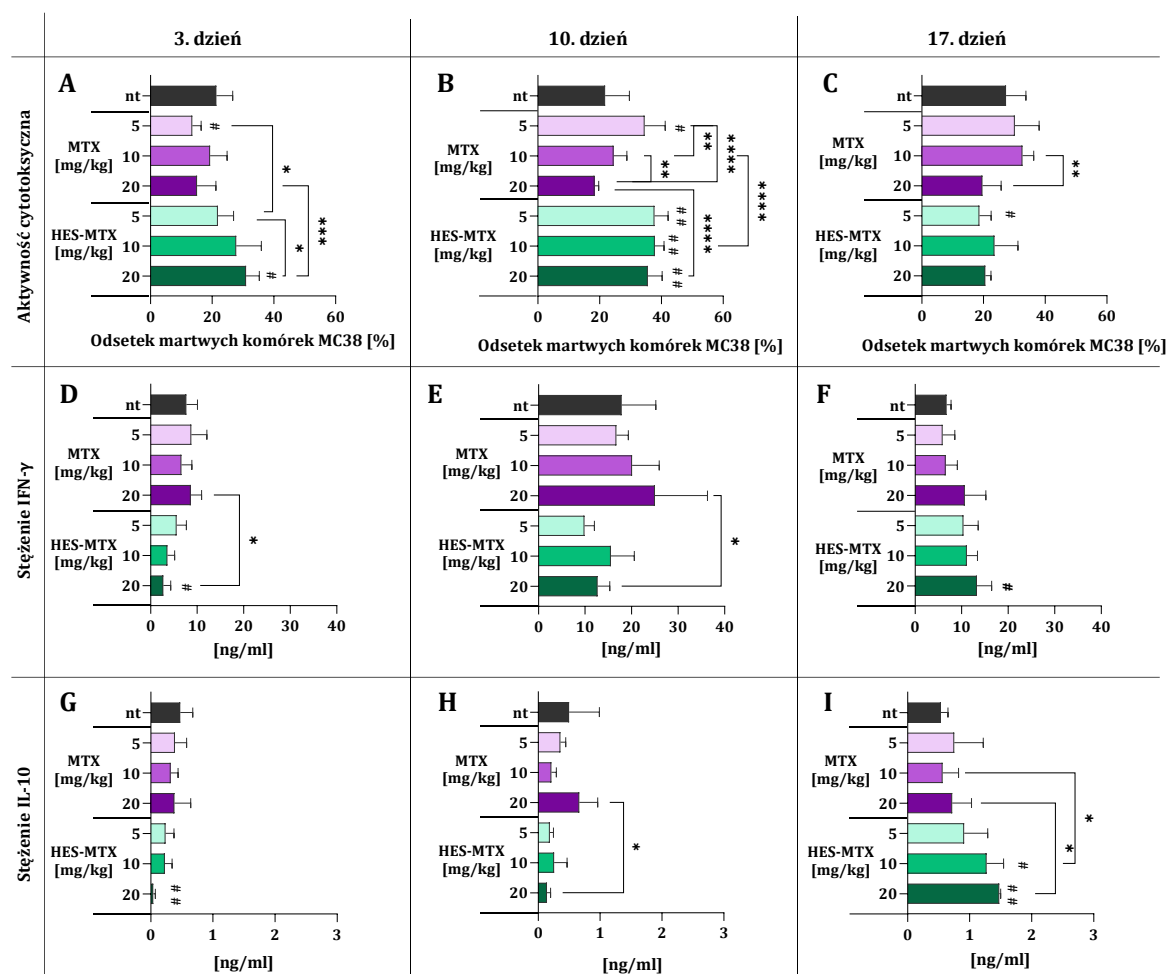
Po pięciodniowej mieszanej hodowli komórek śledzionowych z komórkami nowotworowymi MC38, określono odsetek limfocytów T ($CD4^+$ oraz $CD8^+$) oraz komórek NK (Ryc. 28). Zastosowane chemioterapeutyki nie wpłynęły na zmiany w udziale procentowym limfocytów T $CD4^+$ wśród restymulowanych splenocytów, w żadnym z analizowanych punktów czasowych (Ryc. 28 A-C). Natomiast istotne różnice pomiędzy efektem wywołanym przez preparaty, odnotowano podczas analizy wielkości populacji limfocytów T $CD8^+$ (Ryc. 28 D-F). W 3. dniu terapii zwiększony odsetek tych komórek odnotowano po zastosowaniu HES-MTX, szczególnie w dawkach 5 i 20 mg/kg (Ryc. 28 D). Jednak wpływ nanokoniugatu okazał się krótkotrwały – w śledzionach myszy pobranych 10. dnia terapii odsetek komórek $CD8^+$ po restymulacji był znacząco niższy (Ryc. 28 E). Po 17 dniach od podania chemioterapeutyków wykazano, że jedynie w przypadku najwyższej dawki nanokoniugatu doszło do obniżenia udziału procentowego limfocytów T $CD8^+$, w odniesieniu do kontroli nietraktowanej (Ryc. 28 F).

Analiza cytometryczna restymulowanych splenocytów wykazała pojawienie się zmian w odsetku komórek NK dopiero po dłuższym czasie od podania chemioterapeutyków (Ryc. 28 G-I). Wśród śledzion pobranych w 17. dniu terapii stwierdzono, że efektem wtórnego kontaktu splenocytów pochodzących od myszy traktowanych nanokoniugatem z komórkami nowotworowymi MC38, było znaczące zwiększenie odsetka komórek NK, szczególnie w grupie myszy otrzymujących HES-MTX w dawce 20 mg/kg (Ryc. 28 I).

Oceniono ponadto aktywność cytotoksyczną restymulowanych splenocytów, a także określono profil cytokinowy w nadsączach zebranych z nad pięciodniowej hodowli mieszanej (Ryc. 29). Restymulacja komórek śledzionowych pobranych w 3. dniu terapii wykazała, że zastosowanie najwyższej dawki nanokoniugatu wpłynęło na zwiększoną zdolność splenocytów do eliminacji komórek nowotworowych (Ryc. 29 A). Efekt ten utrzymał się także 10. dnia terapii, a dodatkowo w grupach myszy MTX 5 mg/kg, HES-MTX 5 mg/kg lub 10 mg/kg odsetek martwych komórek MC38 był znacząco wyższy w odniesieniu do grupy nietraktowanej, lecz porównywalny do grupy HES-MTX 20 mg/kg (Ryc. 29 B). Po upływie 17 dni od podania chemioterapeutyków wykazano zmniejszenie aktywności cytotoksycznej splenocytów. W grupach MTX 20 mg/kg oraz we wszystkich grupach myszy traktowanych HES-MTX udział procentowy martwych komórek MC38 był zbliżony lub nawet niższy niż obserwowany w grupie nietraktowanej i w grupach MTX 5 mg/kg lub 10 mg/kg (Ryc. 29 C).

Ocena stężenia $IFN-\gamma$ oraz IL-10 w nadsączach z nad hodowli mieszanej wykazała, że zwiększonej aktywności cytotoksycznej odnotowanej w 3. dniu terapii w grupie HES-MTX 20 mg/kg, towarzyszyło znaczne zmniejszenie produkcji tych cytokin przez komórki śledzionowe (Ryc. 29 D, G). W porównaniu do 3. dnia terapii, w nadsączach zebranych z nad

restymulowanych komórek śledzionowych pobranych w 10. dniu, zaobserwowano wyższe stężenie IFN- γ , przy czym stężenie IL-10 pozostało na tym samym poziomie. Mimo to nadal obserwowano wpływ HES-MTX w dawce 20 mg/kg na zmniejszoną produkcję obu badanych cytokin, szczególnie w porównaniu do grupy MTX 20 mg/kg (Ryc. 29 E, H). Dopiero w 17. dniu terapii w nadsączach znad splenocytów pobranych od myszy traktowanych HES-MTX 20 mg/kg odnotowano zwiększone stężenie IFN- γ , a wyższe stężenie IL-10 – zarówno w tej grupie, jak i otrzymującej HES-MTX 10 mg/kg (Ryc. 29 F, I)



Ryc. 29. Aktywność restymulowanych splenocytów pobranych od myszy obciążonych nowotworem MC38 i poddanych chemioterapii. Aktywność cytotoksyczną restymulowanych komórek śledzionowych pobranych 3. (A, D, G), 10. (B, E, H) lub 17. dnia (C, F, I) wobec komórek nowotworowych przedstawiono jako odsetek martwych komórek MC38 po 4-godzinnej inkubacji z komórkami efektorowymi w stosunku wynoszącym 1:10 (A-C). Stężenie IFN- γ (D-F) i IL-10 (G-I) oceniono w nadsączach znad 5-dniowej hodowli mieszanej splenocytów i komórek MC38. Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy śledziony pobranej od 5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (D,F,I); nieparametrycznego testu Kruskala-Wallis'a i testu *post hoc* Dunna (G,H) lub testu ANOVA w modyfikacji Browna-Forsythe'a i Welcha i testu *post hoc* T3 Dunnetta (A-C,E). Znaki „#” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a grupą kontrolną – nt; pozostałe istotności pomiędzy grupami są prezentowane w formie klamer i znaków „*” (*#p<0,05; **/#p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001).

4.2.4. Podsumowanie

Po zastosowaniu terapii z udziałem nanokoniugatu odnotowano znaczne zahamowanie wzrostu guzów MC38, a najlepszy efekt terapeutyczny wywołało podanie najwyższej dawki HES-MTX. Ocena lokalnej odpowiedzi przeciwnowotworowej wykazała, że zastosowanie nanokoniugatu w dawce 20 mg/kg wpłynęło na zwiększony napływ limfocytów T CD8⁺ do tkanki guzów. Wzrost infiltracji tkanki nowotworowej przez wspomnianą populację komórek był obserwowany w krótkim czasie od dożylnego podania badanego chemioterapeutyku, a efekt ten utrzymywał się pomimo dalszego rozwoju nowotworu. Choć w grupie HES-MTX 20 mg/kg nie obserwowano długotrwałej redukcji odsetka TAM, to efektem tej terapii były zmiany w stopniu pobudzenia populacji tych komórek. Tylko w tej grupie obserwowano utrzymującą się wielkość populacji komórek TAM MHC II^{high} pomimo rozwoju nowotworu. Ponadto jedynie po podaniu 20 mg/kg HES-MTX doszło do znaczącego zmniejszenia wielkości populacji makrofagów w tkance nowotworowej. Temu zjawisku towarzyszyła zwiększona polaryzacja wszystkich makrofagów obecnych w nowotworze w kierunku komórek typu M1, które uważane są za komórki o potencjale przeciwnowotworowym.

Analiza ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej w śledzionach potwierdziła wpływ najwyższej dawki nanokoniugatu na zwiększone udziały procentowe limfocytów T CD8⁺ i CD4⁺, komórek NK oraz NKT wśród splenocytów. Jednak efekt ten nie był tak długotrwały jak w przypadku lokalnej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Wskazuje to, że pod wpływem zastosowania najwyższej dawki HES-MTX dochodziło początkowo do mobilizacji i pobudzenia niektórych populacji śledzionowych komórek limfoidalnych. Obserwowane obniżenie odsetka limfocytów T CD8⁺ w śledzionach w 17. dniu terapii w grupie HES-MTX 20 mg/kg, może wskazywać na migrację tych komórek w kierunku guzów celem inicjacji odpowiedzi odpornościowej skierowanej przeciwko komórkom nowotworowym. Wzrost odsetka limfocytów T CD8⁺ w tkance nowotworowej odnotowany 17. dnia terapii potwierdza powyższy wniosek.

Terapia z udziałem najwyższej dawki HES-MTX indukowała większą zdolność komórek śledzionowych do aktywowania swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej w następstwie ponownego kontaktu z komórkami MC38. Jednak obserwowano zmieniający się w trakcie terapii charakter tworzonej odpowiedzi przeciwnowotworowej – początkowo pobudzane były limfocyty T CD8⁺, a po dłuższym czasie od podania nanokoniugatu aktywowane były komórki NK.

Na podstawie efektu terapeutycznego oraz przeprowadzonych analiz *ex vivo* można wnioskować, że znaczącej redukcji wielkości guzów po zastosowaniu 20 mg/kg HES-MTX, towarzyszyło modulowanie odpowiedzi przeciwnowotworowej. Z tego względu, do dalszych doświadczeń *in vivo* w modelu mysiego nowotworu MC38 wybrano dawkę chemioterapeutyków wynoszącą 20 mg/kg.

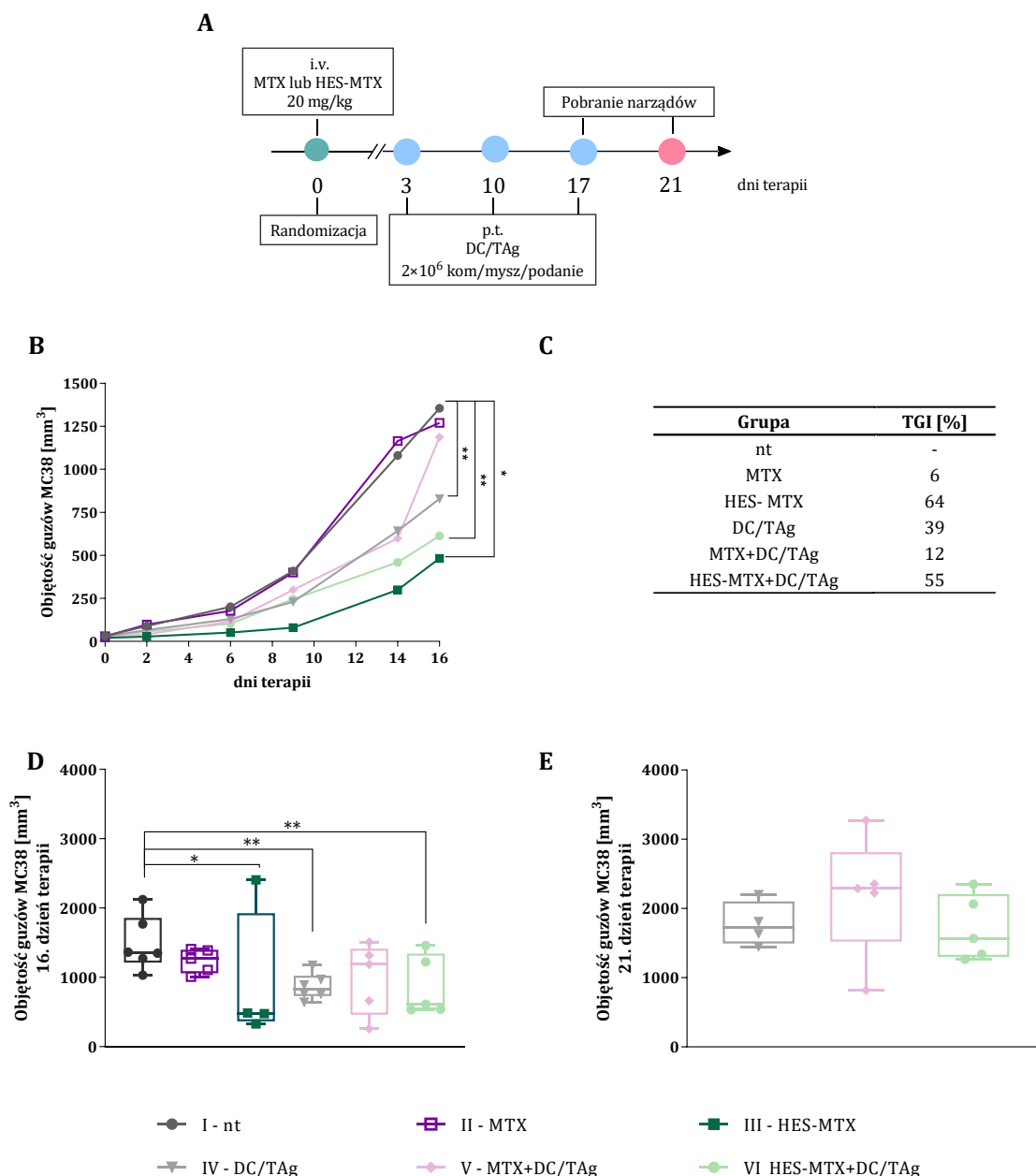
4.3. Określenie efektu przeciwnowotworowego chemioimmunoterapii z udziałem MTX lub HES-MTX oraz szczepionek komórkowych na bazie dojrzałych komórek dendrytycznych

Uwzględniając immunomodulacyjny wpływ nanokoniugatu obserwowany w warunkach *in vivo*, w kolejnym etapie badań schemat terapii uzupełniono o wielokrotne okołoguzowe iniekcje szczepionek na bazie dojrzałych komórek dendrytycznych (DC/TAg), których podawanie rozpoczęto 3. dnia po dożylnym podaniu chemioterapeutyków (w dawce 20 mg/kg) (Ryc. 30 A). Materiał biologiczny do analiz *ex vivo* (guzy nowotworowe, węzły chłonne oraz śledziony) pobrano w dwóch punktach czasowych: w 17. dniu terapii od myszy z grup: nietraktowanej (nt); MTX; HES-MTX oraz w 21. dniu terapii od myszy z grup otrzymujących immunoterapię – DC/TAg; MTX + DC/TAg; HES-MTX + DC/TAg. Powyższe różnice wynikały z szybszego tempa wzrostu guzów, w szczególności w grupie myszy nietraktowanych oraz otrzymujących MTX w formie monoterapii. Ze względu na fakt, że 17. dnia terapii zaplanowane było ostatnie okołoguzowe podanie szczepionek komórkowych DC/TAg, podjęto decyzję o przedłużonej o kilka dni obserwacji wzrostu guzów MC38 w tych grupach i pobranie materiału biologicznego cztery dni później. Wydłużenie tego czasu pozwoliło na pełniejsze rozwinięcie odpowiedzi przeciwnowotworowej zainicjowanej przez komórki dendrytyczne pochodzenia egzogenego oraz obserwację wzrostu guza po trzecim podaniu szczepionek komórkowych. Z tego powodu analizę statystyczną otrzymanych wyników przeprowadzono w obrębie grup I-III lub IV-VI i nie porównywano między sobą grup myszy, od których pobrano materiał biologiczny w różnych dniach terapii.

Efekt terapeutyczny określono w oparciu o procentowe zahamowanie wzrostu nowotworu (TGI) wyliczone z ostatniego pomiaru objętości guza we wszystkich grupach myszy. Ponadto, aby określić wpływ zastosowania terapii na zmiany w lokalnej i ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej przeprowadzono ocenę wielkości populacji komórek układu odpornościowego obecnych w guzach oraz w narządach limfatycznych.

4.3.1. Wzrost guzów MC38 u myszy poddanych chemioimmunoterapii

Na podstawie wyliczonego TGI stwierdzono najkorzystniejszy efekt terapeutyczny w grupach myszy, którym podano jedynie HES-MTX (TGI 64%). Po zastosowaniu MTX w formie monoterapii, guzy rozwijały się podobnie jak w grupie nietraktowanej (TGI 6%). Rezultatem terapii składającej się tylko z wielokrotnych okołoguzowych podań DC/TAg, było umiarkowane zahamowanie wzrostu guzów (TGI 39%). Po zastosowaniu skojarzonej terapii doszło do spowolnienia wzrostu nowotworu, lecz jedynie w przypadku, gdy myszy otrzymały HES-MTX oraz DC/TAg (TGI 55%). Natomiast w grupie MTX + DC/TAg spowolnienie rozwoju guzów było niewielkie – ich objętości były tylko o 12% mniejsze niż w grupie nietraktowanej (Ryc. 30).



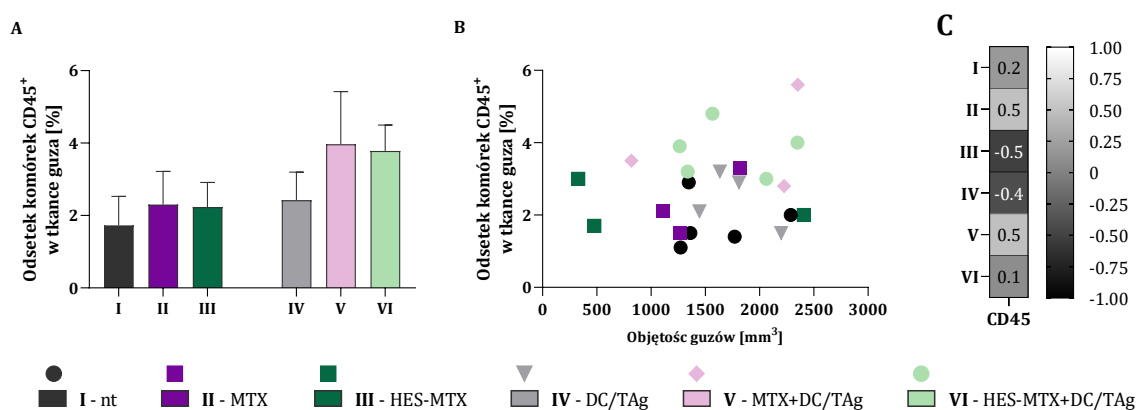
Ryc. 30. Wzrost guzów MC38 u myszy poddanych chemioimmunoterapii z udziałem metotreksatu lub nanokoniugatu metotreksatu i hydroksytyloskrobi oraz komórek dendrytycznych stymulowanych antygenami nowotworowymi. Mysiom z rosnącymi podskórnymi guzami MC38 dożylnie (i.v.) podano metotreksat MTX lub HES-MTX w dawce 20 mg/kg, a następnie trzeciego dnia rozpoczęto trzykrotne okołoguzowe (p.t.) podania komórek dendrytycznych stymulowanych antygenami nowotworowymi (DC/TAg). W 17. dniu terapii pobrano narządy od myszy z grup I-III, a 21. dnia – z grup IV-VI. Schemat doświadczenia (A). Mediana objętości guzów wyznaczonych na podstawie pomiarów prowadzonych co 3-4 dni (B). Wartości zahamowania wzrostu nowotworu (TGI) obliczone dla 16. dnia terapii w odniesieniu do kontroli nietraktowanej (nt) (C) Mediana objętości guzów zmierzonych w 16. dniu (D) oraz w 21. dniu terapii (E). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego dwuczynnikowego testu ANOVA i *post hoc* testu Bonferroniego (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

4.3.2. Ocena lokalnej odpowiedzi przeciwnowotworowej u myszy poddanych chemioimmunoterapii

Aby określić wpływ skojarzonej terapii na lokalną odpowiedź przeciwnowotworową przeprowadzono analizę cytometryczną pobranych guzów MC38 oraz drenujących je węzłów chłonnych. Określono wielkość populacji komórek limfoidalnych i mieloidalnych napływających do tkanki guzów lub węzłów chłonnych, a także oceniono stopień pobudzenia tych komórek.

4.3.2.1. Populacje komórek limfoidalnych w guzach MC38

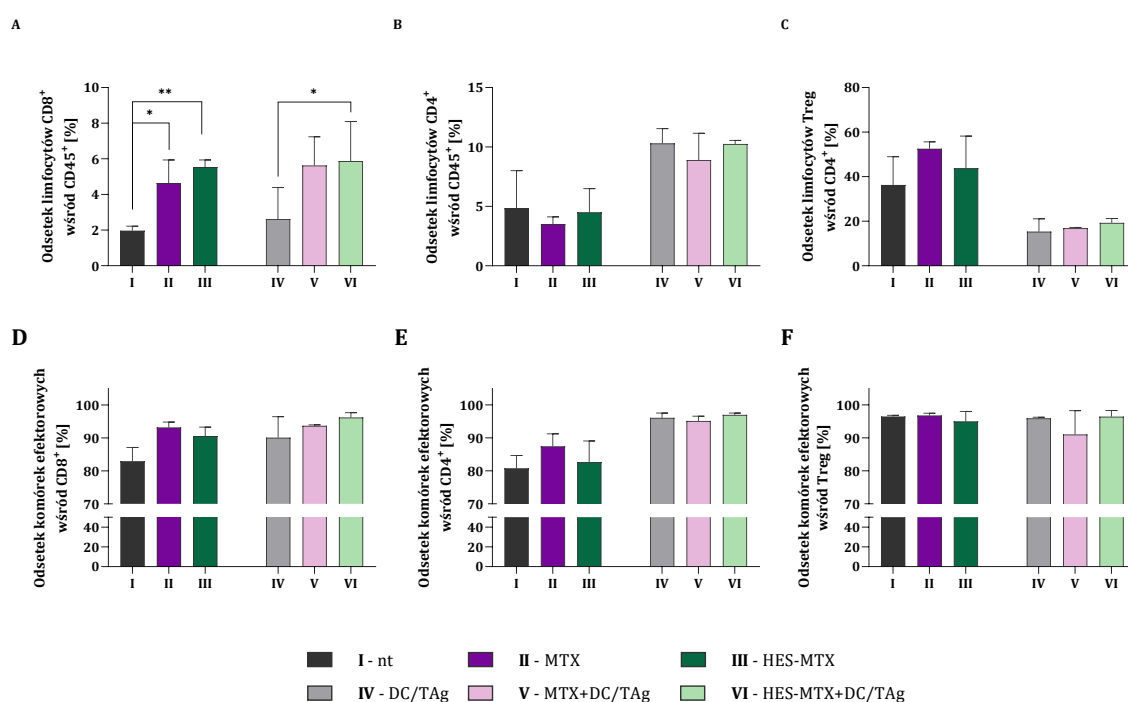
Wieloparametryczna analiza wielkości populacji komórek limfoidalnych napływających do tkanki guzów MC38 została przeprowadzona zgodnie ze schematem prezentowanym na Ryc. 10 zamieszczonej w podrozdziale 4.2.2.1.



Ryc. 31. Ocena nacieku leukocytów w guzach nowotworowych MC38 pobranych od myszy poddanych chemioimmunoterapii. Na wykresie słupkowym przedstawiono uśrednione wartości (+SD) odsetka komórek CD45⁺ uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 3-5 myszy/grupę (zgodnie ze schematem przedstawionym na Ryc. 10). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a ($p > 0,05$) (A). Na wykresie punktowym przedstawiono rozmiar guzów MC38 zmierzonych w 16. dniu (dla grup I-III) lub w 21. dniu terapii (dla grup IV-VI) oraz wielkość nacieku komórek CD45⁺ do tkanki guza przygotowany dla każdej myszy w doświadczeniu terapeutycznym (B). Heat-mapa korelacji pomiędzy wielkością guzów a udziałem procentowym populacji CD45⁺ w każdej z grup badanych wyliczonej z wykorzystaniem nieparametrycznego testu korelacji Spearmana. W poszczególnych polach mapy zamieszczono otrzymane wartości r_s ($p > 0,05$) (C).

Ocena odsetka leukocytów obecnych w tkance nowotworowej wykazała, że po zastosowaniu skojarzonej terapii nastąpiło zwiększenie nacieku tych komórek. W grupach MTX + DC/TAg oraz HES-MTX + DC/TAg odsetek komórek CD45⁺ był najwyższy, jednak w odniesieniu do grupy DC/TAg zmiany te nie były istotne statystycznie. Ponadto nie wykazano różnic pomiędzy obiema grupami myszy otrzymującymi chemioimmunoterapię (Ryc. 31 A). Wykorzystując indywidualny pomiar objętości guza oraz odpowiadającą mu wielkość populacji leukocytów obecnych w tkance guza, możliwe było wyliczenie korelacji (Ryc. 31 B) oraz

sporządzenie heat-mapy z otrzymanych wartości r_s (Ryc. 31 C). Wyliczone wartości r_s sugerowały tendencję wskazującą, że w wyniku zastosowania MTX ($r_s = 0,5$) napływ leukocytów występował jednocześnie ze zwiększeniem objętości guzów. Natomiast w przypadku HES-MTX ($r_s = -0,5$) większej infiltracji tych komórek towarzyszyła mniejsza objętość guzów. Tendencję podobną do obserwowanej w grupie HES-MTX, odnotowano także w przypadku grupy DC/TAg, dla której wyliczona wartość r_s wynosiła $-0,4$. Natomiast porównując obie grupy chemioimmunoterapeutyczne stwierdzono, że w grupie MTX + DC/TAg odsetek komórek CD45⁺ wzrastał wraz z rozmiarem guzów ($r_s = 0,5$), tymczasem w grupie HES-MTX + DC/TAg takiej korelacji nie odnotowano ($r_s = 0,1$). Ze względu na brak istotności statystycznej w wyliczonych korelacjach, powyższe wyniki należy interpretować z ostrożnością.

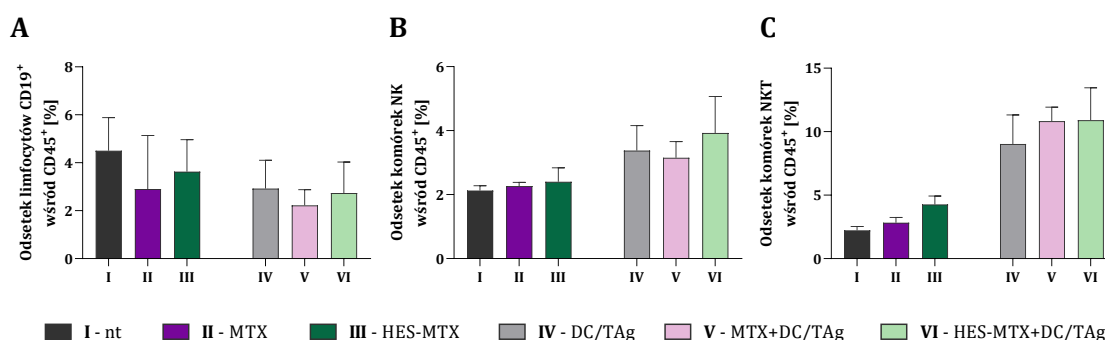


Ryc. 32. Ocena nacieku i stopnia pobudzenia limfocytów T w guzach nowotworowych MC38 pobranych od myszy poddanych chemioimmunoterapii. Wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} w tkance guza, zidentyfikowano populacje limfocytów T CD8⁺ (A) i CD4⁺ (B) i limfocytów Treg określonych wśród limfocytów T CD4⁺ (C) (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na ryc. 4). Na podstawie ekspresji cząsteczek CD44 i CD62L zidentyfikowano subpopulacje komórek efektorowych (CD44⁺CD62L⁻) wśród populacji limfocytów T CD8⁺ (D), CD4⁺ (E), Treg (F). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 3-5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A-E) lub nieparametrycznego testu Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna (F). (*p < 0,05; **p < 0,01).

Analiza wielkości populacji limfocytów T CD8⁺ wykazała wzrost odsetka tych komórek po zastosowaniu chemioterapeutyków zarówno w formie monoterapii, jaki również w połączeniu z DC/TAg (Ryc. 32 A). Natomiast w przypadku limfocytów T CD4⁺ stwierdzono tendencję wskazującą na zwiększenie udziału procentowego tych komórek we wszystkich grupach

otrzymujących DC/TAg, a zmianom tym towarzyszyło zmniejszenie odsetka limfocytów Treg w tkance guzów (Ryc. 32 B).

Wielkość subpopulacji komórek efektorowych wśród badanych populacji limfocytów T napływających do tkanki nowotworu określono w oparciu o ekspresję cząsteczek CD62L oraz CD44. Rezultatem terapii było nieistotne statystycznie zwiększenie odsetka efektorowych limfocytów T CD8⁺, a najwyższy udział procentowy tych komórek wykazano w grupie HES-MTX + DC/TAg (Ryc. 32 D). Zastosowanie w schemacie terapeutycznym szczepionek DC/TAg zwiększyło stopień pobudzenia limfocytów T CD4⁺, jednak pomiędzy tymi grupami nie wykazano istotnych statystycznie różnic (Ryc. 32 E). W przypadku limfocytów Treg nie odnotowano zmian w stopniu ich pobudzenia, a odsetek komórek efektorowych w guzach był na zbliżonym poziomie we wszystkich grupach badanych (Ryc. 32 F).

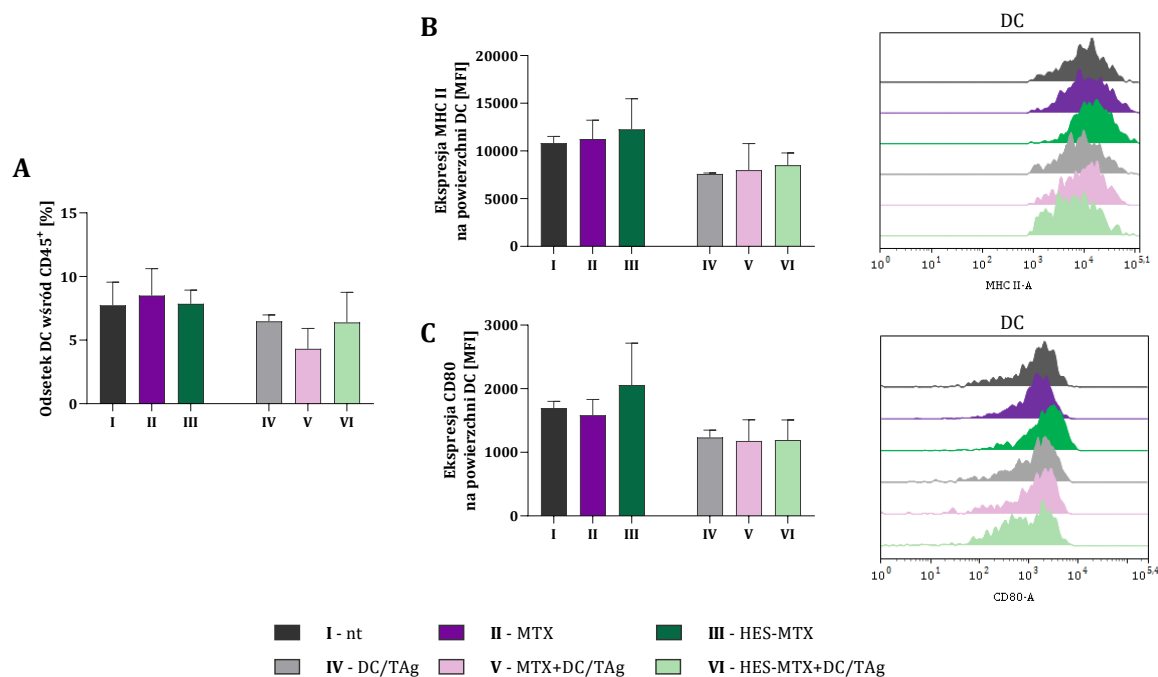


Ryc. 33. Ocena nacieku komórek limfoidalnych w guzach nowotworowych MC38 pobranych od myszy poddanych chemioimmunoterapii. Wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} w tkance guza, zidentyfikowano populacje limfocytów CD19⁺ (A) komórek NK (B) i komórek NKT (C) (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 10). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 3-5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A-C) ($p > 0,05$).

Kolejnymi populacjami komórek limfoidalnych określanymi w tkance guzów były limfocyty CD19⁺ oraz komórki NK i NKT. Analiza wielkości populacji limfocytów B obecnych w tkance guzów nie wykazała istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi grupami. Obserwowano jedynie niewielkie obniżenie odsetka tych komórek w następstwie wielokrotnych podań DC/TAg (Ryc. 33 A). Warto podkreślić, że odnotowano tendencję wskazującą na zwiększenie napływu komórek NK i NKT do tkanki guzów, jako efekt zastosowania immunoterapii, zarówno w formie monoterapii, jak również w połączeniu z chemioterapeutykami. Najwyższy odsetek komórek NK odnotowano w grupie myszy HES-MTX + DC/TAg, natomiast w przypadku komórek NKT, najwyższe udziały procentowe obserwowano w grupach MTX + DC/TAg oraz HES-MTX + DC/TAg (Ryc. 33 B, C).

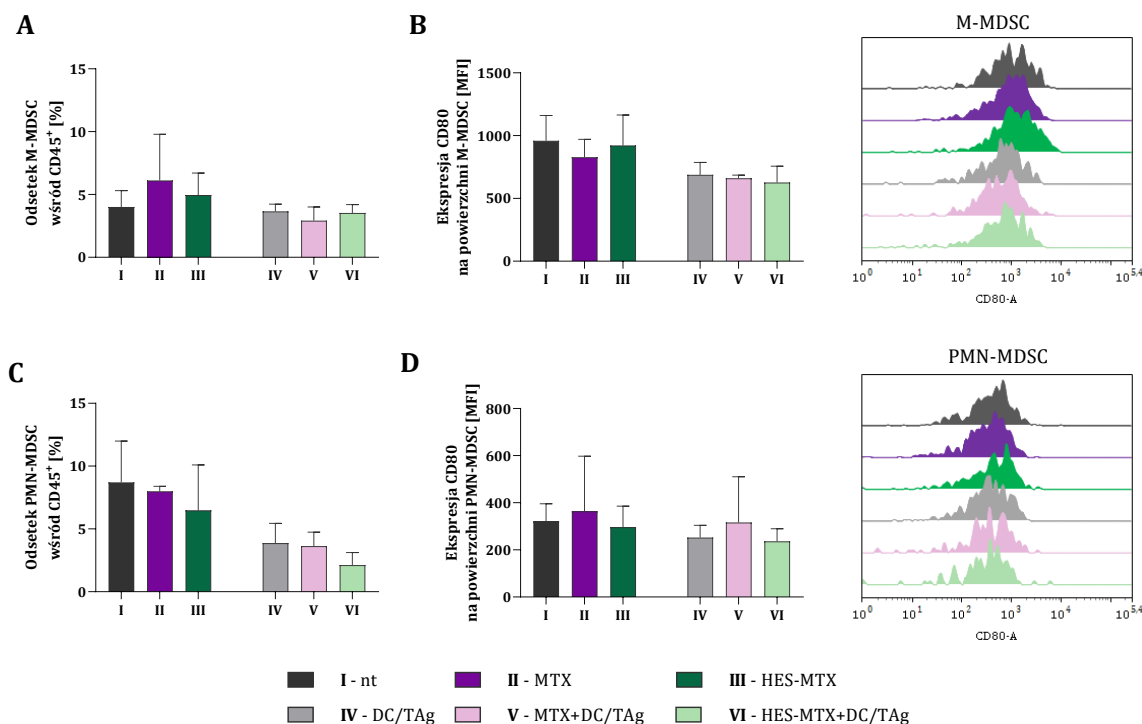
4.3.2.2. Populacje komórek mieloidalnych w guzach MC38

W celu określenia wpływu zastosowania skojarzonej terapii na zmiany w wielkości populacji komórek mieloidalnych napływających do tkanki guzów, przeprowadzono analizę cytometryczną zgodnie ze schematem prezentowanym na Ryc. 14 w podrozdziale 4.2.2.2.



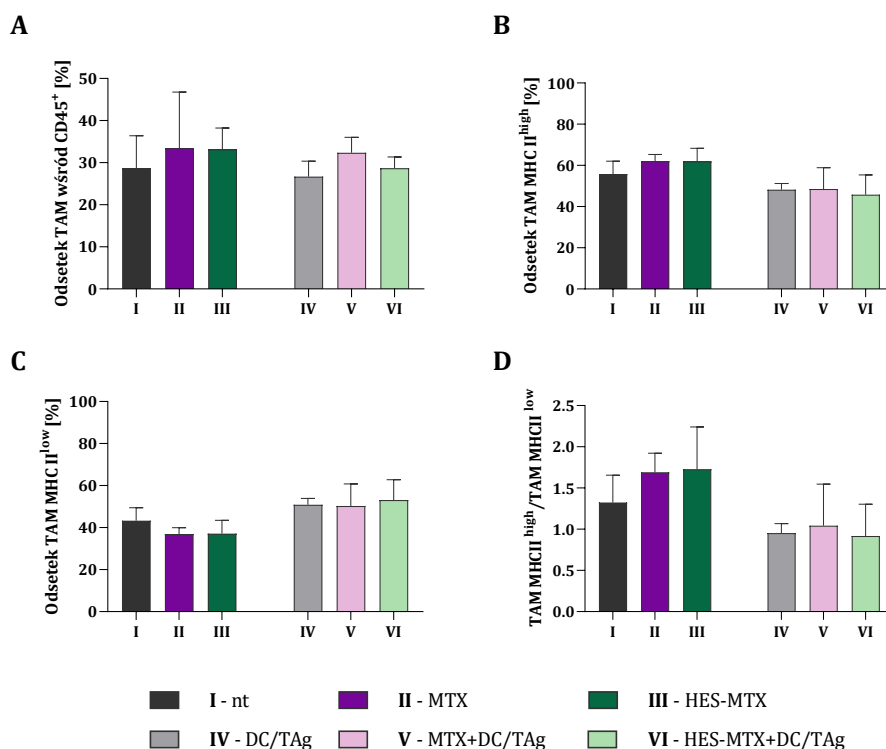
Ryc. 34. Ocena nacieku i stopnia pobudzenia komórek dendrytycznych w guzach nowotworowych myszy poddanych chemioimmunoterapii. Wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} w tkance guza zidentyfikowano populację DC (A) oraz określono ekspresję cząsteczek MHC II (B) oraz CD80 (C) na powierzchni tych komórek (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 14). Ekspresję cząsteczek MHC II i CD80 zaprezentowano jako średnią intensywność fluorescencji (MFI). Na histogramach zamieszczono ekspresje cząsteczek MHC II lub CD80 reprezentatywne dla każdej grupy z doświadczenia chemioimmunoterapeutycznego. Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 3-5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A-C) ($p > 0,05$).

Oceniając infiltrację tkanki guzów przez komórki dendrytyczne odnotowano nieistotne statystycznie zmniejszenie wielkości populacji tych komórek w grupach myszy, które otrzymały immunoterapię (Ryc. 34 A). Ponadto w tych grupach, zidentyfikowane DC charakteryzowały się mniejszym stopniem pobudzenia, co sugerują niższe wartości MFI dla cząsteczek MHC II oraz CD80. Chociaż nie odnotowano zmian w odsetku DC w guzach pobranych od myszy otrzymujących jedynie HES-MTX, to ocena stopnia pobudzenia tych komórek wykazała najwyższy poziom ekspresji powierzchniowych cząsteczek MHC II i CD80 (Ryc. 34 B, C).



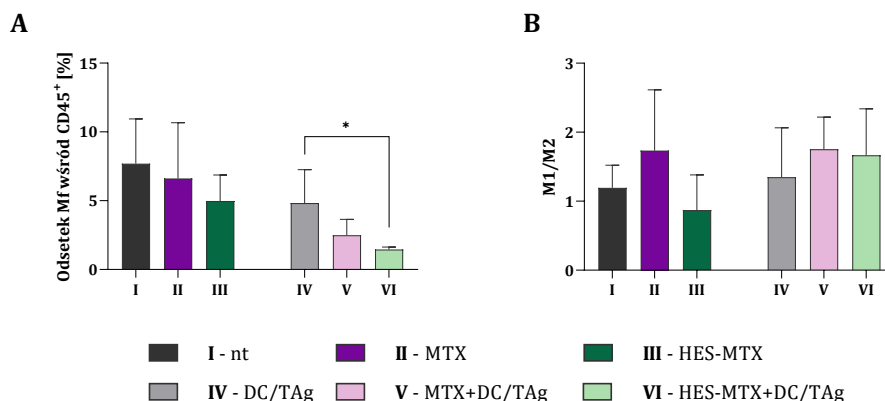
Ryc. 35. Ocena nacieku i stopnia pobudzenia komórek supresorowych pochodzenia mieloidalnego w guzach nowotworowych MC38 pobranych od myszy poddanych chemioimmunoterapii. Wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} w tkance guza zidentyfikowano populacje M-MDSC (A) i PMN-MDSC (C) na powierzchni których określono ekspresję cząsteczek CD80 (B, D) (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 14). Ekspresję badanych cząsteczek przedstawiono jako średnią intensywność fluorescencji (MFI). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 3-5 myszy/grupę. Na histogramach zamieszczono ekspresje cząsteczek CD80 reprezentatywne dla każdej grupy z doświadczenia chemioimmunoterapeutycznego. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A-D) ($p > 0,05$).

Nie wykazano, aby pod wpływem zastosowanej terapii doszło do zmian w udziale procentowym populacji M-MDSC w tkance guza. Natomiast obserwowano tendencję wskazującą na zmiany w stopniu ich pobudzenia. Ekspresja cząsteczki CD80 na powierzchni M-MDSC była niższa we wszystkich grupach otrzymujących szczepionki komórkowe (Ryc. 35 A, B). W przypadku komórek PMN-MDSC zastosowanie samej immunoterapii, jak i terapii skojarzonej, spowodowało redukcję wielkości populacji tych komórek, jednak nie towarzyszyły jej zmiany w poziomie ekspresji cząsteczki CD80. Najniższy odsetek komórek PMN-MDSC odnotowano w grupie myszy traktowanych HES-MTX + DC/TAg, jednak zmiana ta nie była istotna statystycznie w odniesieniu do grupy DC/TAg (Ryc. 35 C, D).



Ryc. 36. Ocena nacieku makrofagów związanych z nowotworem i określenie zmian w proporcji populacji tych komórek o różnej ekspresji cząsteczki MHC II w tkance guzów MC38 pobranych od myszy poddanych chemioimmunoterapii. Wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} w tkance guza zidentyfikowano populacje TAM (A), wśród których na podstawie ekspresji cząsteczki MHC II, wyodrębniono komórki TAM MHC II^{high} (B) i TAM MHC II^{low} (C). Uśrednione wartości ilorazu odsetka komórek TAM MHC II^{high} oraz TAM MHC II^{low} (D) uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 3-5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A-D) ($p > 0,05$).

Makrofagi związane z nowotworem (TAM) stanowiły największą populację komórek pochodzenia mieloidalnego w guzach MC38. Niezależnie od rodzaju zastosowanej terapii nie obserwowano zmian w wielkości populacji tych komórek (Ryc. 36 A). Ocena stopnia pobudzenia TAM wykazała, że w wyniku zastosowania wielokrotnych okołoguzowych podań DC/TAg doszło do nieznacznego obniżenia odsetka komórek TAM MHC II^{high} (Ryc. 36 B). Jednocześnie w tych grupach myszy odnotowano nieistotny statystycznie zwiększony udział procentowy komórek identyfikowanych jako TAM MHC II^{low} (Ryc. 36 C). Z wyliczonego współczynnika TAM MHC II^{high}/TAM MHC II^{low} wynika, że zmiany we wzajemnej proporcji populacji komórek TAM MHC II^{high} i TAM MHC II^{low}, choć nieistotne statystycznie, dotyczyły zastosowania chemioterapeutyków, przy czym w grupach MTX oraz HES-MTX wartości współczynnika były najwyższe. Natomiast rezultatem wykorzystania w terapii DC/TAg było utrzymanie wielkości obu subpopulacji komórek TAM na jednakowym poziomie (Ryc. 36 D).



Ryc. 37. Ocena nacieku i polaryzacji makrofagów w guzach nowotworowych MC38 pobranych od myszy poddanych chemioimmunoterapii. Wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} w tkance guza zidentyfikowano populację Mf (A). Spośród komórek mieloidalnych (CD11b⁺), na podstawie wewnątrzkomórkowej ekspresji cząsteczki CD206, wyodrębniono populacje makrofagów typu M1 (F4/80⁺CD206⁻) i M2 (F4/80⁺CD206⁺) (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 14) i wyznaczono wartości ilorazu odsetka komórek typu M1 oraz odsetka komórek typu M2 (B). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 3-5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A-B) (**p*<0,05)

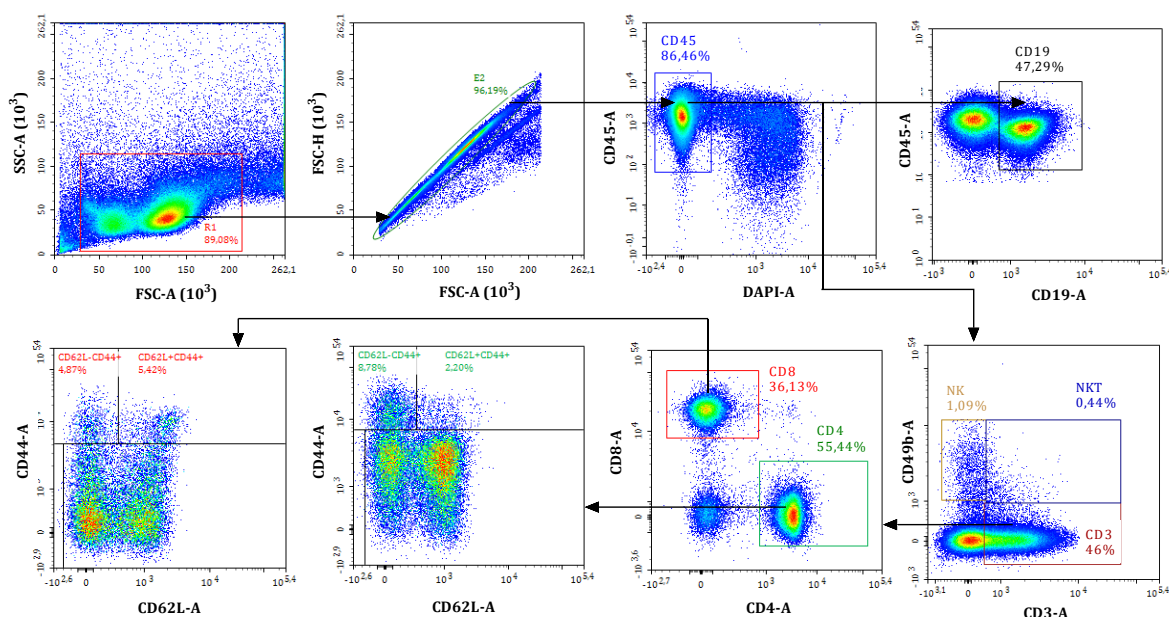
Niewielkie obniżenie odsetka Mf obserwowano w grupach HES-MTX oraz DC/TAg, a pogłębienie tego efektu było widoczne po zastosowaniu skojarzonej terapii. Pomimo że zmniejszenie wielkości populacji makrofagów obserwowano w obu grupach chemioimmunoterapeutycznych, to w odniesieniu do grupy DC/TAg zmniejszony napływ tych komórek do tkanki guzów stwierdzono w grupie HES-MTX + DC/TAg (Ryc. 37 A).

Polaryzację makrofagów naciekających guzy nowotworowe, zarówno rezydujących, jak i związanych z nowotworem określono na podstawie ekspresji markera CD206. Wyznaczony współczynnik M1/M2 był najwyższy w grupach myszy traktowanych MTX, zarówno w formie monoterapii, jak również w terapii skojarzonej oraz w grupie myszy HES-MTX + DC/TAg (Ryc. 37 B). Jednak przedstawiane wyniki są trudne do interpretacji ze względu na brak istotności statystycznych oraz wysokie, w niektórych przypadkach, wartości odchyłeń standardowych.

4.3.2.3. Populacje komórek limfoidalnych w węzłach chłonnych drenujących nowotwór MC38

Dodatkowo, aby określić wpływ zastosowania chemioimmunoterapii na zmiany w lokalnej odpowiedzi przeciwnowotworowej, przeprowadzono analizę cytometryczną węzłów chłonnych drenujących nowotwór (dtLN). Zgodnie ze schematem prezentowanym na Ryc. 38 wśród leukocytów obecnych w dtLN oceniano populację komórek pochodzenia limfoidalnego, takich jak:

limfocyty T CD4⁺ oraz CD8⁺, limfocyty B oraz komórki NK i NKT. Ponadto na podstawie ekspresji cząsteczek CD44 i CD62L określano stopień pobudzenia limfocytów T.



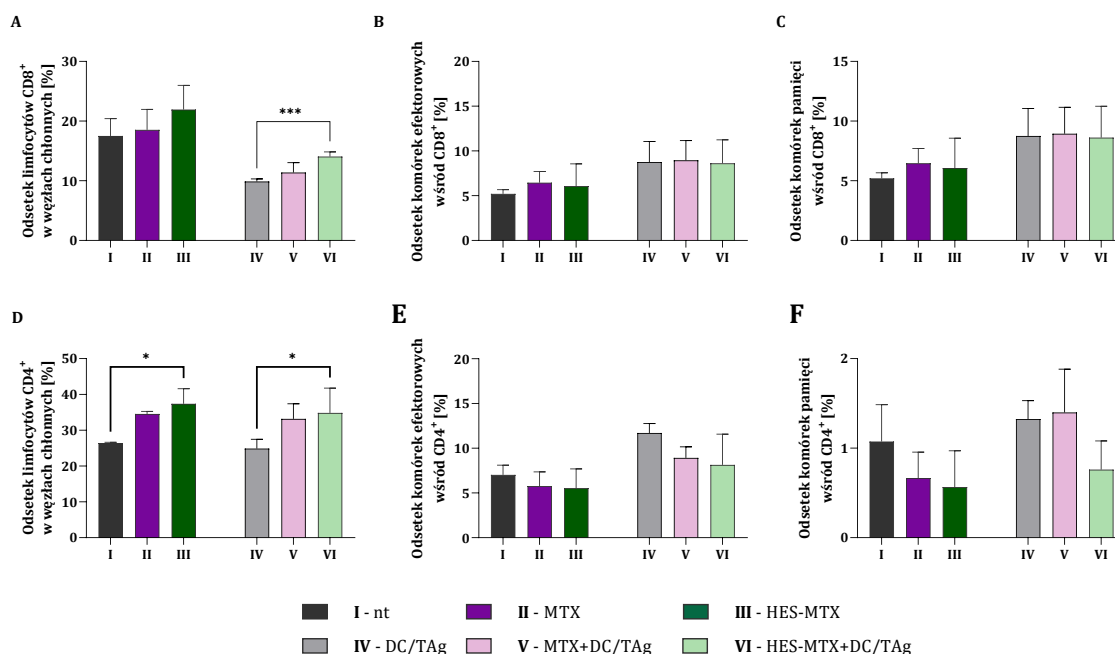
Ryc. 38. Schemat analizy populacji komórek limfoidalnych w węzłach chłonnych drenujących nowotwór MC38. Po wyeliminowaniu zlepek komórkowych, wyodrębniono żywe leukocyty (CD45⁺DAPI^{neg}), wśród których zidentyfikowano limfocyty CD19⁺, limfocyty T (CD3⁺CD49b⁻), komórki NK (CD49b⁺CD3⁻) oraz komórki NKT (CD49b⁺CD3⁺). Na podstawie ekspresji markerów CD4 i CD8 wydzielono populację limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺. W oparciu o ekspresję cząsteczek CD44 i CD62L wśród limfocytów T określono subpopulację komórek efektorowych (CD62L⁻CD44⁺) i komórek pamięci (CD62L⁺CD44⁺).

Analiza cytometryczna komórek wyizolowanych z dtLN wykazała nieistotny statystycznie wzrost odsetka komórek CD8⁺ w grupie traktowanej nanokoniugatem w odniesieniu do grupy MTX oraz kontroli nietraktowanej. Po zastosowaniu szczepionek komórkowych na bazie DC/TAg, zarówno samych, jak i w połączeniu z chemioterapeutykami, odnotowano tendencję wskazującą na zmniejszenie wielkości tej populacji limfocytów T względem pozostałych grup badanych. Jednak należy podkreślić, że w porównaniu do grupy DC/TAg pod wpływem skojarzonej terapii składającej się z HES-MTX+DC/TAg doszło do znaczącego zwiększenia napływu limfocytów T CD8⁺ do węzłów chłonnych.

Powyższym zmianom towarzyszyło nieistotne statystycznie zwiększenie stopnia pobudzenia tych komórek – we wszystkich grupach myszy otrzymujących DC/TAg stwierdzono większy udział procentowy limfocytów T CD8⁺ zidentyfikowanych jako komórki efektorowe (CD62L⁻CD44⁺) oraz komórki pamięci (CD62L⁺CD44⁺) (Ryc. 39 A-C).

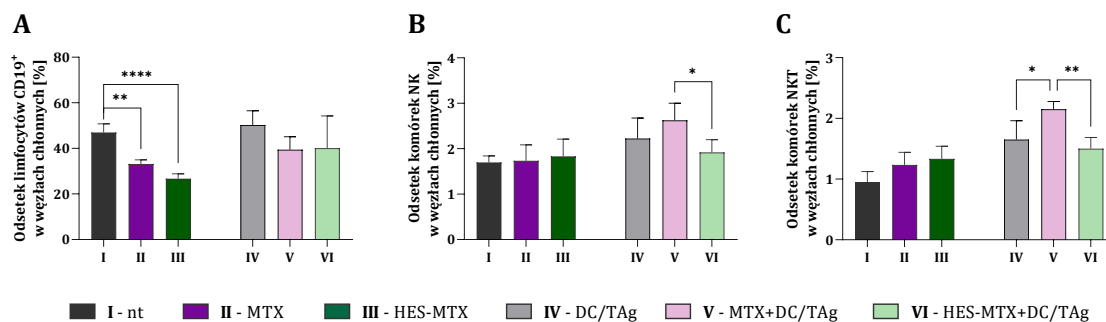
W przypadku limfocytów T CD4⁺ odnotowano znaczący wzrost odsetka tych komórek zależny bardziej od rodzaju zastosowanego chemioterapeutyku niż działania szczepionek DC/TAg. Najwyższy udział procentowy komórek CD4⁺ obserwowano w grupach myszy traktowanych HES-

MTX zarówno w formie monoterapii, jak i w połączeniu z DC/TAg. W tych grupach wykazano nieistotne statystycznie, zmniejszenie wielkości populacji komórek efektorowych oraz komórek pamięci wśród limfocytów T CD4⁺ (Ryc. 39 D-F).



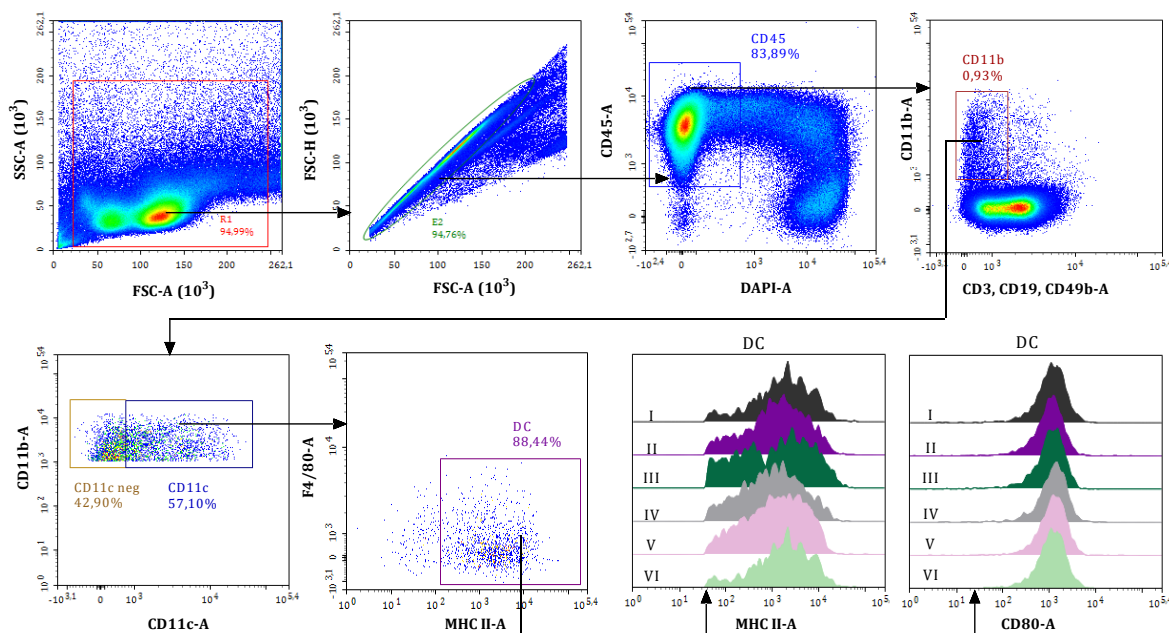
Ryc. 39. Ocena odsetka i poziomu aktywacji limfocytów T w węzłach chłonnych drenujących nowotwór MC38 myszy poddanych chemioimmunoterapii. Wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} w węzłach chłonnych, zidentyfikowano populacje limfocytów T CD8⁺ (A) i CD4⁺ (D). Na podstawie ekspresji cząsteczek CD44 i CD62L zidentyfikowano subpopulacje komórek efektorowych (CD62L⁻CD44⁺) oraz komórek pamięci (CD62L⁺CD44⁺) wśród populacji limfocytów T CD8⁺ (B, C) i CD4⁺ (E, F). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 3-5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (C-F); nieparametrycznego testu Kruskala-Wallis i testu *post hoc* Dunna (B) lub testu ANOVA w modyfikacji Browna-Forsythe'a i Welcha i testu *post hoc* T3 Dunnetta (A) (**p*<0,05; ****p*<0,001).

Dalsza analiza wykazała, że zastosowanie chemioterapeutyków w formie monoterapii przyczyniło się do obniżenia odsetka limfocytów B, a najniższy udział procentowy tych komórek odnotowano w grupie HES-MTX. Podobną tendencję obserwowano w przypadku uzupełnienia chemioterapii o szczepionki na bazie DC/TAg (Ryc. 40 A). Najwyższy odsetek komórek NK oraz NKT odnotowano w węzłach chłonnych pobranych od myszy otrzymujących MTX + DC/TAg, a zmiana była istotna statystycznie w odniesieniu do innych grup myszy traktowanych DC/TAg (Ryc. 40 B, C).

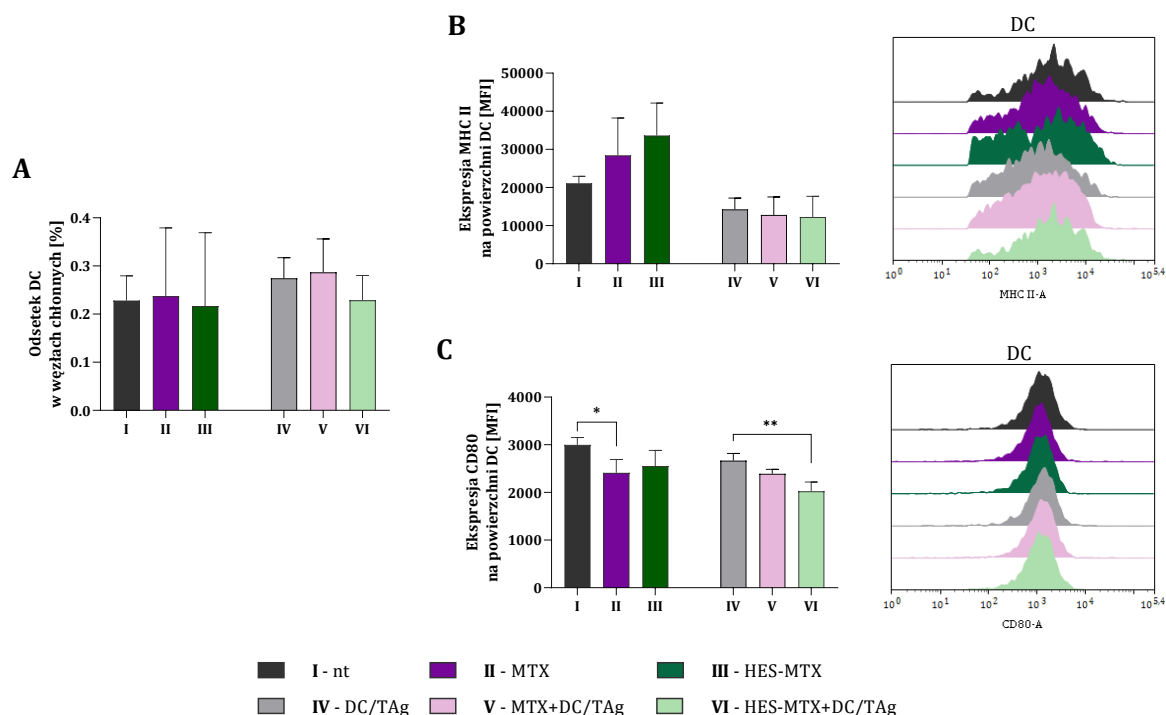


Ryc. 40. Ocena odsetka komórek limfoidalnych w węzłach chłonnych drenujących nowotwór MC38 myszy poddanych chemioimmunoterapii. W trakcie wieloparametrycznej analizy cytometrycznej wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} w węzłach chłonnych, zidentyfikowano populacje limfocytów CD19⁺ (A), komórek NK (B) oraz komórek NKT (C). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy węzłów chłonnych pobranych od 3-5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A-C) (**p*<0,05; ***p*<0,01; *****p*<0,0001).

4.3.2.4. Aktywność komórek dendrytycznych obecnych w węzłach chłonnych drenujących nowotwór MC38



Ryc. 41. Schemat analizy populacji komórek mieloidalnych w węzłach chłonnych drenujących nowotwór MC38. Po wylimitowaniu zlepek komórkowych, wyodrębniono żywe leukocyty (CD45⁺DAPI^{neg}), wśród których zidentyfikowano komórki CD11b⁺, które rozdzielono w oparciu o ekspresję cząsteczek CD11c. Wśród komórek CD11b⁺CD11c⁺ zidentyfikowano populacje DC (CD11c⁺F4/80^{int}), na powierzchni których określono ekspresję cząsteczek MHC II oraz CD80. Na histogramach zamieszczono ekspresje tych cząsteczek reprezentatywne dla każdej grupy z doświadczenia chemioterapeutycznego (oznaczenia grup doświadczalnych: I – nt; II – MTX; III – HES-MTX; IV – DC/TAg; V – MTX + DC/TAg; VI – HES-MTX + DC/TAg).



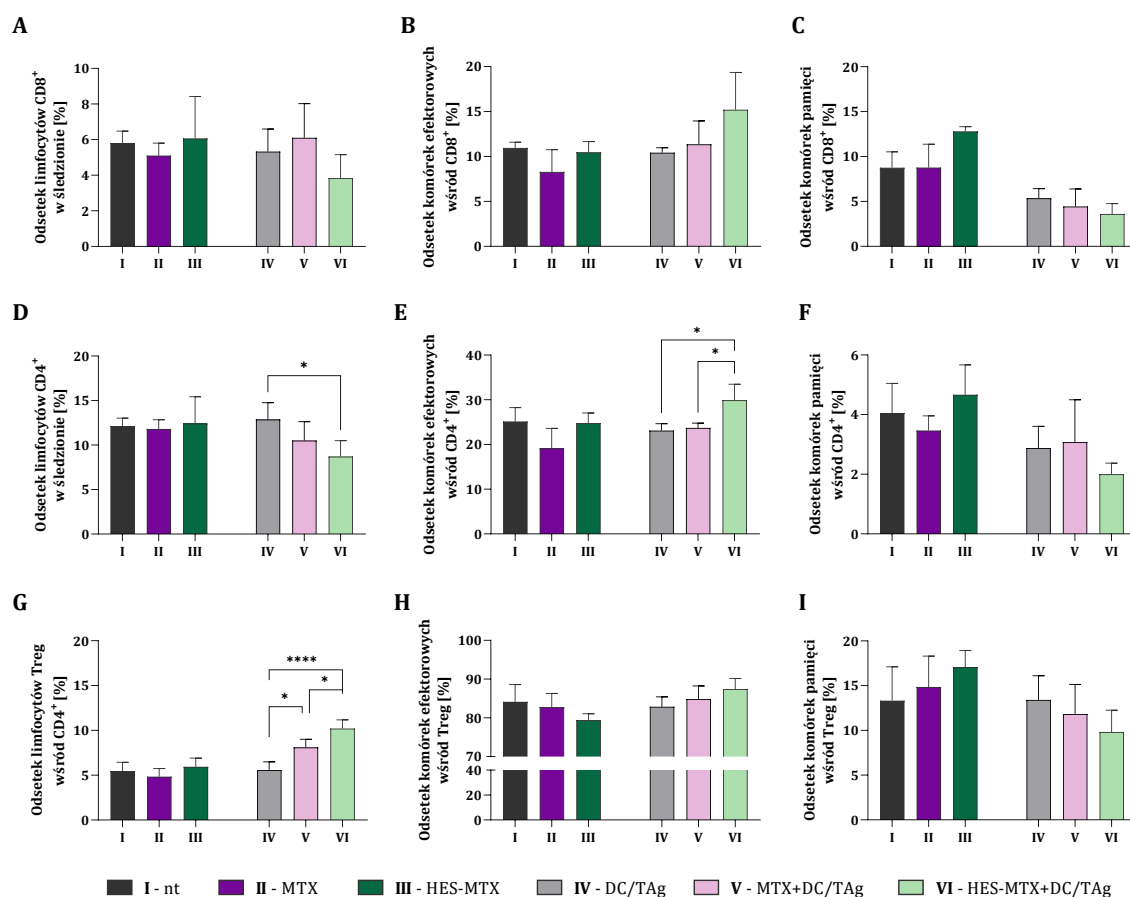
Ryc. 42. Ocena odsetka komórek dendrytycznych oraz stopnia ich pobudzenia w węzłach chłonnych drenujących nowotwór MC38 myszy poddanych chemioimmunoterapii. Wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} w węzłach chłonnych, zidentyfikowano populacje DC (A) oraz powierzchniową ekspresję cząsteczek MHC II (B) i CD80 (C). Ekspresję badanych cząsteczek przedstawiono jako średnią intensywność fluorescencji (MFI) uzyskaną podczas analizy populacji DC. Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy węzłów chłonnych pobranych od 3-5 myszy/grupę. Na histogramach zamieszczono ekspresje cząsteczek MHC II lub CD80 reprezentatywne dla każdej grupy z doświadczenia chemioimmunoterapeutycznego. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A-C) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

W węzłach chłonnych drenujących nowotwór MC38 określono wielkość populacji komórek dendrytycznych, zgodnie ze schematem analizy cytometrycznej prezentowanym na Ryc. 41. Pomiędzy grupami badanymi nie wykazano zmian w odsetku DC, lecz stwierdzono różnice w stopniu ich pobudzenia. W grupach myszy otrzymujących jedynie MTX lub HES-MTX odnotowano najwyższą ekspresję antygenów MHC II na powierzchni DC, natomiast po podaniu DC/TAg stwierdzono zmniejszenie ekspresji tych cząsteczek. Chociaż każda z zastosowanych terapii skojarzonych wpłynęła na obniżenie ekspresji cząsteczki CD80 względem DC/TAg, to najniższą wartość MFI odnotowano w grupie HES-MTX + DC/TAg (Ryc. 42).

4.3.3. Ocena ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej u myszy poddanych chemioimmunoterapii

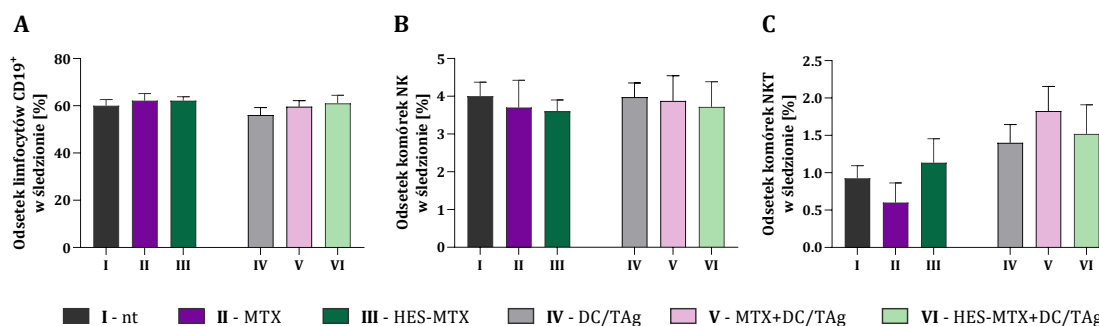
W kolejnym etapie oceniono wpływ zastosowania chemioimmunoterapii na zmiany w udziale procentowym komórek układu odpornościowego w śledzionie. W tym celu przeprowadzono wieloparametryczną analizę cytometryczną splenocytów zgodnie ze schematami prezentowanymi na Ryc. 21 w podrozdziale 4.2.3.1 oraz Ryc. 24 w podrozdziale 4.2.3.2.

4.3.3.1. Populacje komórek limfoidalnych w śledzionach pobranych od myszy obarczonych nowotworem MC38



Ryc. 43. Ocena odsetka i poziomu aktywacji limfocytów T w śledzionach myszy obarczonych nowotworem MC38 i poddanych chemioimmunoterapii. Wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} w śledzionie zidentyfikowano populacje limfocytów T CD8⁺ (A), limfocytów T CD4⁺ (D) oraz limfocytów Treg określonych wśród limfocytów T CD4⁺ (G) (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 21). Zidentyfikowano subpopulacje komórek efektorowych (CD62L⁻CD44⁺) oraz komórek pamięci (CD62L⁺CD44⁺) wśród populacji limfocytów T CD8⁺ (B, C), CD4⁺ (E, F) i Treg (H, I). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy śledzion pobranych od 3-5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A,D-I) lub nieparametrycznego testu Kruskala-Wallis i testu *post hoc* Dunna (B,C) (**p*<0,05;*****p*<0,001).

Ocena udziału procentowego limfocytów T wykazała, że najniższe odsetki komórek CD8⁺ oraz CD4⁺ odnotowano w śledzionach pobranych od myszy traktowanych HES-MTX + DC/TAg, podczas gdy w pozostałych grupach, odsetek tych komórek znajdował się na poziomie kontroli nieleczonej. Ponadto w obu populacjach limfocytów T CD8⁺ i CD4⁺, w grupie HES-MTX + DC/TAg odnotowano z jednej strony największy udział procentowy komórek efektorowych, a z drugiej – najmniejszy udział procentowy komórek pamięci. Powyższe obserwacje mogą wskazywać na aktywację komórek śledzionowych i mobilizację pobudzonych limfocytów T CD8⁺ i CD4⁺ do opuszczenia śledziony i migracji w kierunku guzów nowotworowych (Ryc. 43 A-F). Należy także zwrócić uwagę na fakt, że w wyniku uzupełnienia chemioterapii o wielokrotne okołoguzowe podania DC/TAg doszło do zwiększenia odsetka limfocytów Treg. W śledzionach myszy z grup chemoimmunoterapeutycznych odnotowano statystycznie istotne zwiększenie wielkości populacji tych komórek. Najwyższy odsetek limfocytów Treg obserwowano w grupie HES-MTX + DC/TAg, a komórki te charakteryzowały się silnym pobudzeniem w kierunku komórek efektorowych. Ponadto w tej grupie wykazano najmniejszy odsetek komórek pamięci (Ryc. 43 G-I).

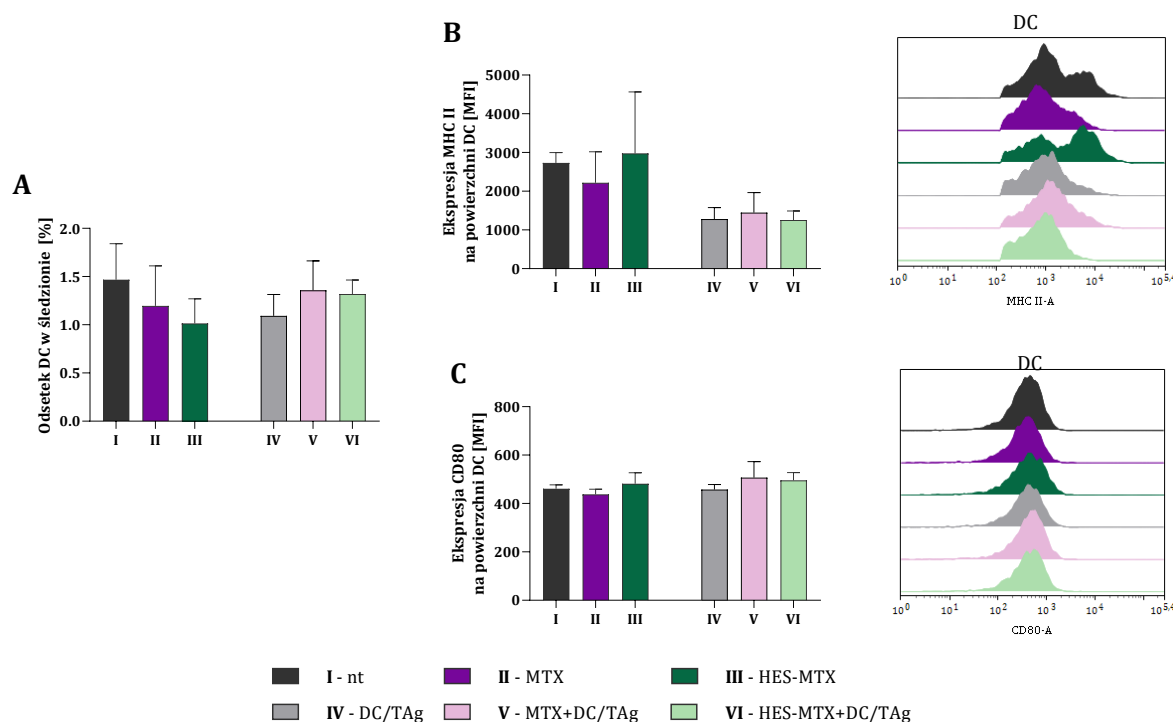


Ryc. 44. Ocena odsetka komórek limfoidalnych w śledzionach myszy obciążonych nowotworem MC38 i poddanych chemoimmunoterapii. Wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} w śledzionie, zidentyfikowano populacje limfocytów CD19⁺ (A), komórek NK (B) oraz komórek NKT (C) (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 21). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy śledzion pobranych od 3-5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A-C) ($p > 0,05$).

Analiza udziałów procentowych limfocytów B i komórek NK w śledzionie nie ujawniła zmian w wielkości populacji tych komórek zachodzących pod wpływem zastosowanej terapii. Natomiast odnotowano tendencję wskazującą na wzrost odsetka komórek NKT pod wpływem zastosowania DC/TAg, szczególnie w grupie MTX + DC/TAg (Ryc. 44).

4.3.3.2. Populacje komórek mieloidalnych w śledzionach pobranych od myszy obciążonych nowotworem MC38

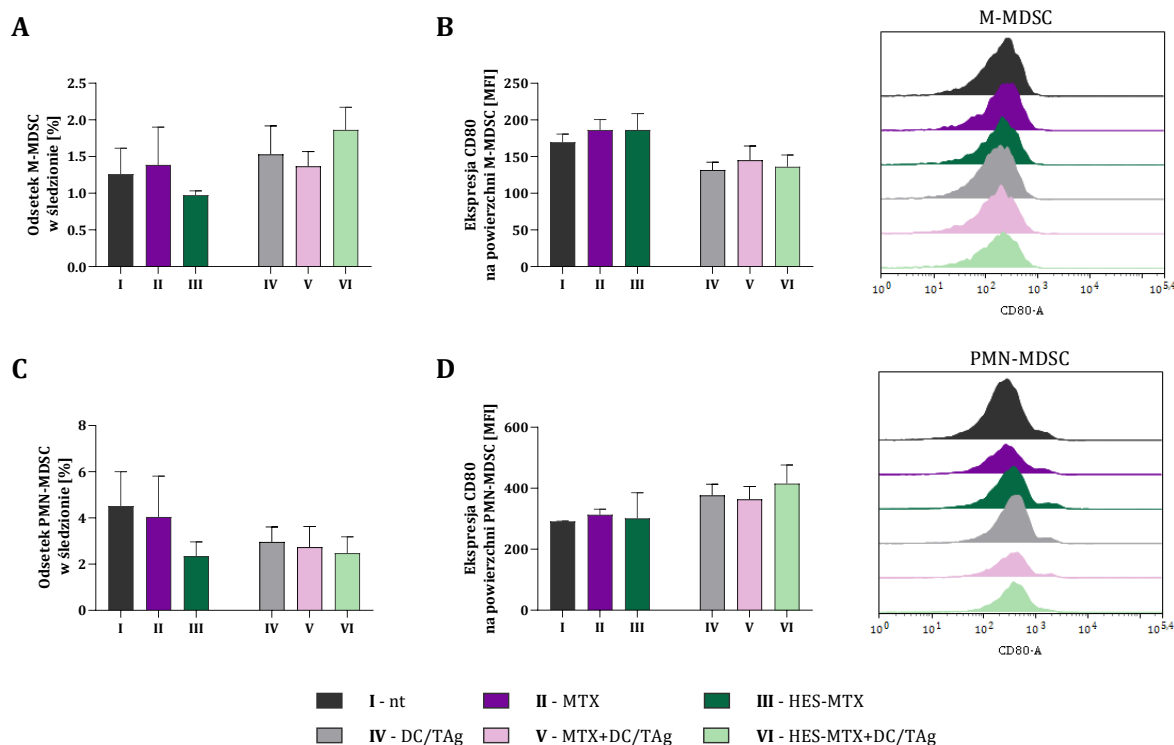
Podczas oceny wielkości populacji komórek dendrytycznych w śledzionach nie wykazano istotnych statystycznie różnic. Niemniej jednak najniższy odsetek DC odnotowano w grupach myszy otrzymujących monoterapię – zarówno w przypadku chemioterapii, jak i immunoterapii (Ryc. 45 A). Pomimo braku istotnych statystycznie różnic w wielkości populacji DC pomiędzy grupami, ocena stopnia pobudzenia tych komórek wykazała, że zastosowanie szczepionek spowodowało obniżenie ekspresji cząsteczek MHC II. Natomiast żadna z terapii nie miała wpływu na poziom ekspresji cząsteczki CD80 (Ryc. 45 B, C).



Ryc. 45. Ocena odsetka i stopnia pobudzenia komórek dendrytycznych w śledzionach myszy obciążonych nowotworem MC38 i poddanych chemoimmunoterapii. Wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} w śledzionie zidentyfikowano populację DC (A) oraz określono ekspresję cząsteczek MHC II (B) oraz CD80 (C) na powierzchni tych komórek (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 24). Ekspresję cząsteczek MHC II i CD80 zaprezentowano jako średnią intensywność fluorescencji (MFI). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy śledzion pobranych od 3-5 myszy/grupę. Na histogramach zamieszczono ekspresje cząsteczek MHC II lub CD80 reprezentatywne dla każdej grupy z doświadczenia chemoimmunoterapeutycznego. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A,C) lub nieparametrycznego testu Kruskala-Wallis i testu *post hoc* Dunna (B) ($p > 0,05$).

Analiza wielkości populacji M-MDSC w śledzionie nie wykazała jednoznacznego wpływu skojarzonej terapii na zmiany w odsetku tych komórek. Podczas oceny stopnia pobudzenia komórek M-MDSC, stwierdzono tendencję wskazującą na obniżenie ekspresji cząsteczek CD80 wywołaną

po terapii z udziałem DC/TAg (Ryc. 46 A, B). W przypadku populacji PMN-MDSC obserwowano nieistotne statystycznie obniżenie odsetka tych komórek w grupach myszy traktowanych HES-MTX lub otrzymujących DC/TAg. Należy zwrócić uwagę, że podanie DC/TAg spowodowało zwiększenie ekspresji cząsteczki CD80 na powierzchni PMN-MDSC, a najwyższą wartość MFI odnotowano w grupie myszy HES-MTX + DC/TAg (Ryc. 46 C, D).

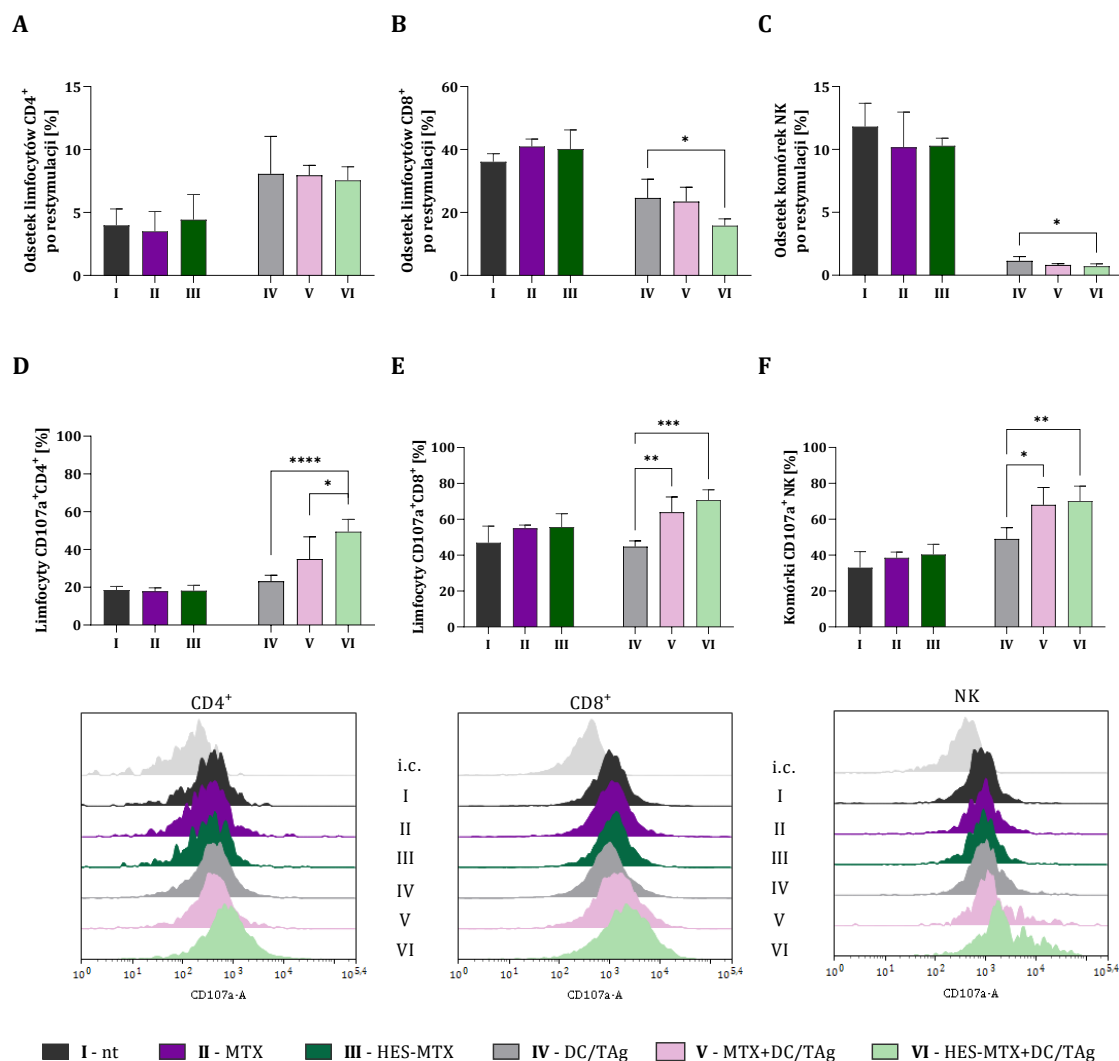


Ryc. 46. Ocena odsetka i stopnia pobudzenia komórek supresorowych pochodzenia mieloidalnego w śledzionach myszy obciążonych nowotworem MC38 i poddanych chemioimmunoterapii. Wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} w śledzionie zidentyfikowano populacje M-MDSC (A) i PMN-MDSC (C) na powierzchni których określono ekspresję cząsteczek CD80 (B, D) (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 24). Ekspresję badanych cząsteczek przedstawiono jako średnią intensywność fluorescencji (MFI). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy śledzion pobranych od 3-5 myszy/grupę. Na histogramach zamieszczono ekspresje cząsteczek CD80 reprezentatywne dla każdej grupy z doświadczenia chemioimmunoterapeutycznego. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A-D) ($p > 0,05$).

4.3.3.3. Zdolność komórek śledzionowych do aktywowania swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej w następstwie ponownego kontaktu z komórkami MC38

W celu sprawdzenia wpływu zastosowanej chemioimmunoterapii na zmiany w ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej określono, w warunkach *ex vivo*, zdolność komórek śledzionowych do tworzenia swoistej odpowiedzi odpornościowej. Dodatkowo na tym etapie badań, analizę cytometryczną restymulowanych splenocytów rozszerzono o ocenę wydzielania ziaren cytolitycznych w następstwie ponownego kontaktu tych komórek z komórkami

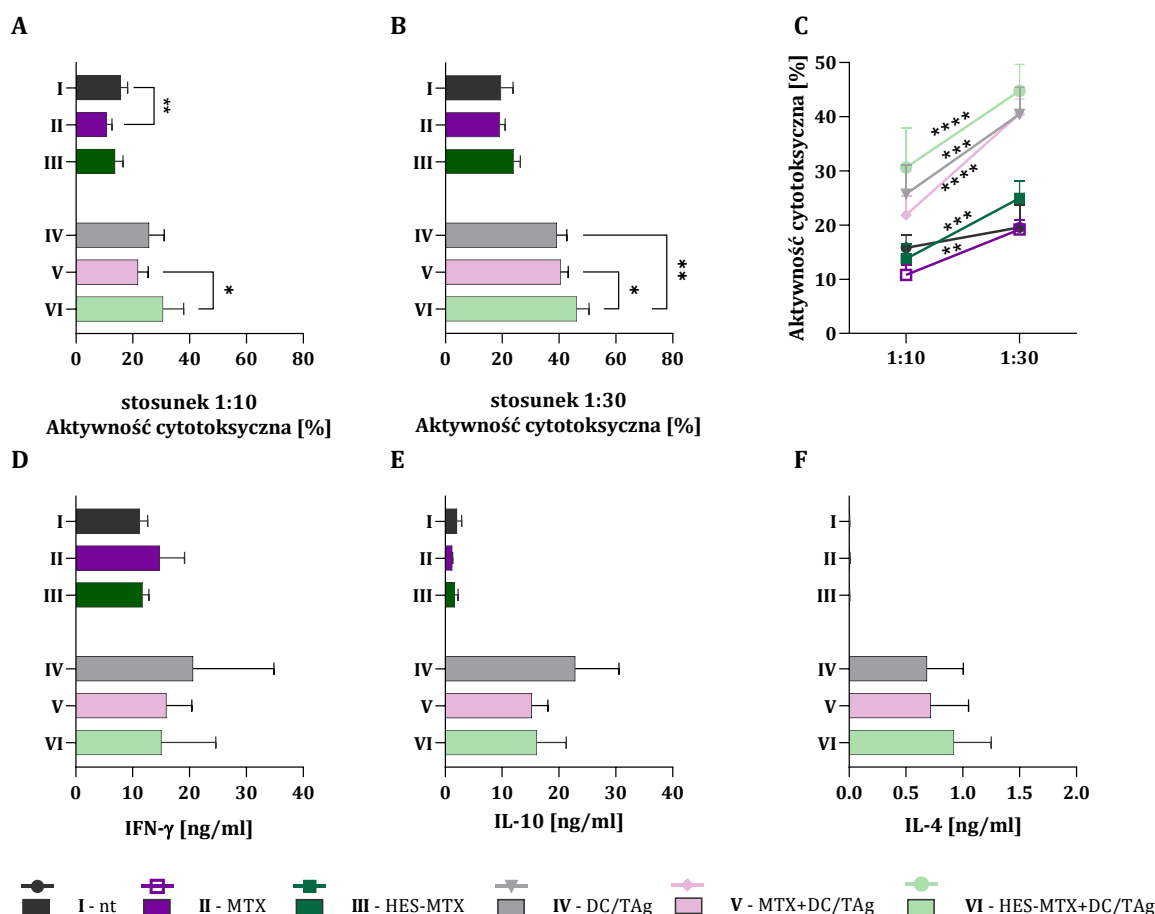
nowotworowymi MC38. Zdolność do degranulacji określano na podstawie ekspresji cząsteczek CD107a na powierzchni badanych populacji komórek limfoidalnych (Ryc. 47).



Ryc. 47. Ocena odsetka komórek limfoidalnych wśród restymulowanych splenocytów pobranych od myszy obciążonych nowotworem MC38 i poddanych chemioimmunoterapii. Odsetek limfocytów T CD4⁺ (A), CD8⁺ (B) oraz komórek NK (C) określono wśród restymulowanych splenocytów z komórkami MC38 w 5-dniowej hodowli mieszanej. Odsetek komórek CD107a⁺ określono wśród limfocytów T CD4⁺ (D), T CD8⁺ (E) i komórek NK (F) po 2-godzinnej inkubacji restymulowanych splenocytów z komórkami MC38. Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy śledzion pobranych od 3-5 myszy/grupę. Na histogramach zamieszczono ekspresję cząsteczek CD107a reprezentatywne dla każdej grupy z doświadczenia chemioimmunoterapeutycznego. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A-F) (**p*<0,05; ***p*<0,01; ****p*<0,001; *****p*<0,0001).

Podczas analizy fenotypu splenocytów restymulowanych komórkami MC38 obserwowano tendencję wskazującą, że zmiany w odsetku limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ oraz komórek NK zostały indukowane pod wpływem podania myszom szczepionek komórkowych na bazie DC/TAg. We wszystkich grupach, które otrzymały DC/TAg, z jednej strony odnotowano najwyższy udział procentowy komórek CD4⁺, a z drugiej – odsetek komórek CD8⁺ oraz komórek NK był

najmniejszy, szczególnie w grupie HES-MTX + DC/TAg (Ryc. 47 A-C). Dalsza ocena wykazała, że zwiększona zdolność restymulowanych komórek śledzionowych do wydzielania ziaren cytotolitycznych (a w rezultacie ekspozycji cząsteczek CD107a), była obserwowana jedynie w grupach myszy otrzymujących skojarzoną chemioimmunoterapię. Najwyższy odsetek komórek CD4⁺, CD8⁺ oraz komórek NK identyfikowanych jako komórki CD107a⁺ odnotowano w grupie myszy otrzymujących nanokoniugat oraz DC/TAg (Ryc. 47 D-F).



Ryc. 48. Aktywność restymulowanych splenocytów pobranych od myszy obarczonych nowotworem MC38 i poddanych chemioimmunoterapii. Aktywność cytotoksyczną restymulowanych komórek śledzionowych wobec komórek nowotworowych przedstawiono jako odsetek martwych komórek MC38 po 4-godzinnej inkubacji z komórkami efektorowymi w stosunku 1:10 i 1:30 (A, B, C). Stężenie IFN-γ (D), IL-10 (E) i IL-4 (F) określono w nadsączach znad 5-dniowej hodowli mieszanej splenocytów i komórek MC38. Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy śledzion pobranych od 3-5 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A-D,F) lub nieparametrycznego testu Kruskalla-Wallisa i testu *post hoc* Dunna (E). Znaki „*” znajdujące się nad liniami na Ryc. 48 C prezentują istotność statystyczną pomiędzy aktywnością cytotoksyczną w stosunkach 1:10 i 1:30 w obrębie danej grupy (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001).

Analizę ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej uzupełniono o określenie aktywności cytotoksycznej restymulowanych splenocytów, a także oceniono profil cytokinowy w nadsączach zebranych znad pięciodniowej hodowli mieszanej. W odniesieniu do grup myszy traktowanych jedynie chemioterapeutykami, wyższy odsetek martwych komórek MC38 obserwowano we wszystkich grupach myszy otrzymujących szczepionki na bazie DC/TAg, wśród których największą aktywność cytotoksyczną wobec komórek nowotworowych wykazywały splenocyty pobrane od myszy z grupy HES-MTX + DC/TAg (Ryc. 48 A-C).

Oceniając stężenia cytokin w nadsączach znad hodowli mieszanej stwierdzono tendencję wskazującą na wpływ szczepionek komórkowych na bazie DC/TAg na zwiększoną produkcję IFN- γ , IL-10 oraz IL-4 przez restymulowane splenocyty. Chociaż we wszystkich grupach traktowanych DC/TAg odnotowano zwiększone stężenie IFN- γ i IL-10 w nadsączach, to największą ilość tych cytokin stwierdzono w grupie DC/TAg. Z kolei najwięcej IL-4 produkowały splenocyty pochodzące od myszy z grup otrzymujących skojarzoną terapię (Ryc. 48 D-F).

4.3.4. Podsumowanie

Zastosowanie w skojarzonej terapii przeciwnowotworowej HES-MTX i szczepionek na bazie DC/TAg wpłynęło na znaczące zahamowanie wzrostu guzów, a także przyczyniło się do stworzenia wydajnej odpowiedzi odpornościowej. Chociaż największe zahamowanie wzrostu nowotworu zostało wywołane po zastosowaniu monoterapii HES-MTX, to tendencję wskazującą na najkorzystniejsze zmiany w wielkości i aktywności poszczególnych populacji komórek układu odpornościowego stwierdzono po jej skojarzeniu z wielokrotnym okołoguzowym podaniem DC/TAg. Na podstawie oceny lokalnej odpowiedzi odpornościowej w tkance nowotworowej można przypuszczać, że terapia HES-MTX + DC/TAg spowodowała z jednej strony zwiększony napływ limfocytów T CD8⁺ do tkanki guza, a z drugiej – obniżenie odsetka Mf i komórek PMN-MDSC w tkance nowotworowej.

Porównując stopień pobudzenia komórek układu odpornościowego obecnych w węzłach chłonnych odnotowano, że zmiany powstały przede wszystkim pod wpływem podania DC/TAg. Różnice pomiędzy grupami myszy otrzymujących skojarzoną terapię, obserwowano w przypadku populacji komórek NK i NKT. W grupie otrzymującej MTX + DC/TAg stwierdzono większy napływ tych komórek do węzłów chłonnych niż w przypadku grupy HES-MTX + DC/TAg.

Podczas oceny wielkości populacji komórek układu odpornościowego wśród splenocytów odnotowano, że pomimo iż terapia składająca się z HES-MTX i DC/TAg nie spowodowała zwiększenia udziału procentowego limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ to wpłynęła na stopień ich pobudzenia. Wskazuje na to najwyższy odsetek komórek efektorowych w tej grupie. Ponadto

zastosowanie HES-MTX + DC/TAg spowodowało zwiększenie odsetka a także stopnia pobudzenia limfocytów Treg.

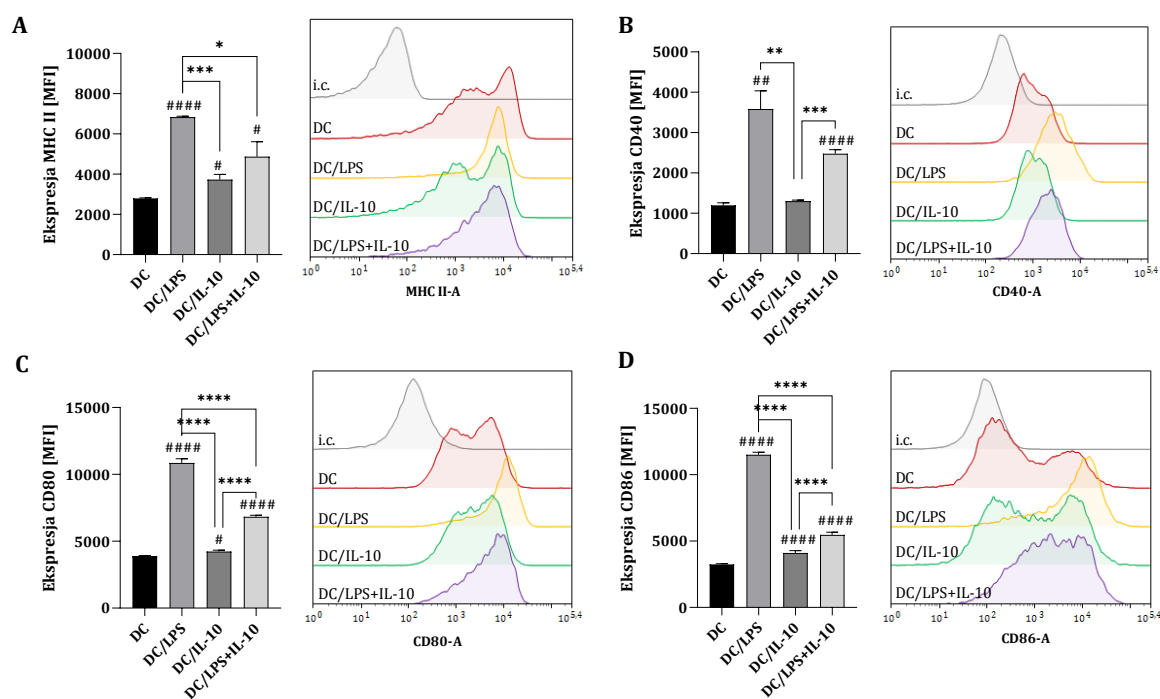
Terapia z udziałem szczepionek na bazie DC/TAg stosowanych samodzielnie, jak i w połączeniu z chemioterapeutykami, zwiększyła zdolność komórek śledzionowych do aktywowania swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Odnotowano, że po podaniach DC/TAg doszło do zwiększenia udziału procentowego limfocytów T CD4⁺, a także znaczącego obniżenia odsetka limfocytów T CD8⁺ i komórek NK wśród splenocytów, które miały ponowny kontakt z komórkami MC38. Ocena zdolności restymulowanych komórek śledzionowych do wydzielania ziaren cytolitycznych wykazała, że jedynie zastosowanie kompleksowego rozwiązania, składającego się z chemioimmunoterapii wpłynęło na zwiększenie odsetka komórek CD107a⁺, w szczególności w grupie myszy HES-MTX + DC/TAg. Ponadto komórki śledzionowe pobrane od myszy z tej grupy najskuteczniej eliminowały komórki nowotworowe, o czym świadczył największy udział procentowy martwych komórek MC38.

4.4. Określenie aktywności komórek dendrytycznych z wyciszoną ekspresją IL-10R

Jednym z czynników, które hamują rozwój skutecznej odpowiedzi przeciwnowotworowej są cytokiny przeciwzapalne. Ze względu na wzmożoną infiltrację guzów przez komórki układu odpornościowego o cechach supresorowych zdolnych do wydzielania m.in. IL-10, dochodzi do jej nagromadzenia w mikrośrodku nowotworowym. W związku z tym podawane okołoguzowo szczepionkowe DC/TAg trafiają do warunków niesprzyjających tworzeniu wydajnej odpowiedzi odpornościowej. Z tego powodu, w doświadczalnych terapiach przeciwnowotworowych, przed rozpoczęciem immunoterapii stosowane są cytostatyki. Ich wykorzystanie poza eliminacją komórek nowotworowych, zapewnia zmniejszenie wielkości niektórych populacji komórek układu odpornościowego, co pośrednio wpływa na obniżenie ilości czynników o cechach supresorowych. Biorąc pod uwagę, że działanie chemioterapeutyków może być krótkotrwałe, a stężenie IL-10 w tkance guza zwiększa się wraz z progresją choroby nowotworowej, w dalszej części badań zaplanowano wykorzystanie DC/TAg o obniżonej wrażliwości na działanie tej cytokiny. Badania w tym zakresie rozpoczęto od określenia supresorowego wpływu IL-10 na dojrzewanie DC. W dalszych etapach przeprowadzono optymalizację transdukcji lentiwirusowej prowadzącej do wyciszenia ekspresji receptora IL-10 w komórkach dendrytycznych, a otrzymane transduktanty poddano pełnej charakterystyce fenotypowej i funkcjonalnej.

4.4.1. Określenie supresorowego wpływu IL-10 na dojrzewanie komórek dendrytycznych

W celu otrzymania silnie pobudzonych komórek, niedojrzałe DC stymulowano lipopolisacharydem (LPS) przez 24 godziny. Ponadto, aby określić czy obecność IL-10 zaburzy proces dojrzewania tych komórek, zaplanowano grupę badaną, w której DC były jednocześnie traktowane LPS i IL-10 (Ryc. 49). Analiza fenotypu powierzchniowego wykazała, że rezultatem zastosowania LPS (**DC/LPS**) było silne pobudzenie komórek, które przejawiało się gwałtownym wzrostem ekspresji cząsteczek MHC II oraz cząsteczek kostymulujących (CD40, CD80, CD86), w odniesieniu do kontroli niestymulowanej (**DC**). Efektem zastosowania IL-10 (**DC/IL-10**) było niewielkie zwiększenie ekspresji badanych antygenów powierzchniowych, lecz zmiany te były znacznie słabsze niż obserwowane w grupie DC/LPS. W przypadku gdy oprócz LPS, w środowisku była także obecna IL-10 (**DC/LPS+IL-10**), wykazano słabsze pobudzenie komórek dendrytycznych. Choć w odniesieniu do kontroli niestymulowanej odnotowano zwiększenie wartości MFI dla wszystkich ocenianych markerów powierzchniowych, to w porównaniu do komórek stymulowanych LPS, poziom ekspresji badanych cząsteczek w grupie DC/LPS+IL-10 był znacznie niższy (Ryc. 49 A-D). Powyższe obserwacje potwierdzają, że obecność IL-10 w środowisku uniemożliwia pełne pobudzenie komórek dendrytycznych, co pośrednio może negatywnie wpływać na wytworzenie wydajnej odpowiedzi odpornościowej.

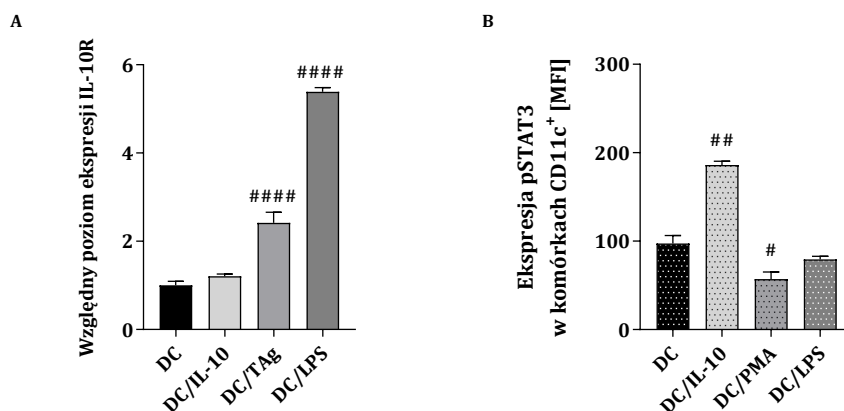


Ryc. 49. Charakterystyka fenotypowa DC różnicowanych w kierunku dojrzałych komórek w obecności IL-10. Siódmego dnia hodowli niedojrzałe DC stymulowano przez 24 godziny z użyciem LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) i/lub *in vitro* IL-10 (1 $\mu\text{g/ml}$). Po tym czasie poziom zróżnicowania komórek $\text{CD11c}^+\text{DAPI}^{\text{neg}}$ oceniono na podstawie ekspresji cząsteczki MHC II (A) oraz cząsteczek kostymulujących: CD40 (B); CD80 (C); CD86 (D), przedstawianej jako średnia intensywność fluorescencji (MFI). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane z testu przeprowadzonego w sześciu powtórzeniach. Na histogramach zamieszczono ekspresje badanych cząsteczek reprezentatywne dla każdej grupy. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A-D). Znaki „#” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a grupą kontrolną – DC; pozostałe istotności pomiędzy grupami są prezentowane w formie klamer i znaków „*” (*# p <0,05; **/# p <0,01; *** p <0,001; ****/# p <0,0001).

4.4.2. Określenie czynników indukujących zwiększenie ekspresji IL-10R oraz fosforylacji czynnika STAT3 w komórkach dendrytycznych

Następnie określono, które czynniki wpływają na zwiększoną ekspresję receptora IL-10 w komórkach dendrytycznych. Podczas oceny poziomu ekspresji genu *Il10ra* odnotowano, że obecność w środowisku IL-10 nie wpływa na zwiększenie ekspresji jej receptora. Natomiast rezultatem kontaktu niedojrzałych DC z antygenami pochodzenia nowotworowego (TAg) lub lipopolisacharydem (LPS) było zwiększenie ekspresji IL-10R. W odniesieniu do kontroli nietraktowanej najwyższy poziom ekspresji badanego genu obserwowano po dodaniu LPS (Ryc. 50 A). Z tego powodu optymalizację procesu transdukcji DC rozpoczęto od określenia wydajności wyciszenia IL-10R w modyfikowanych komórkach dendrytycznych stymulowanych LPS. Jednak ze względu na fakt, że docelowo w schemacie terapii przeciwnowotworowej zaplanowano podawanie DC/TAg, dalszą optymalizację przeprowadzono na komórkach traktowanych TAg.

Ponadto charakterystykę zmodyfikowanych DC rozszerzono o ocenę efektywności wyciszenia IL-10R w kontekście fosforylacji białka STAT3. Wykazano, że do zwiększenia wewnątrzkomórkowej ekspresji pSTAT3 doszło pod wpływem stymulacji IL-10 (Ryc. 50 B). W związku z tym wyciszenie IL-10R, które doprowadzi do obniżenia wrażliwości DC na działanie IL-10 będzie także widoczne w zmniejszonej fosforylacji białka STAT3.



Ryc. 50. Ocena ekspresji IL-10R i fosforylacji czynnika STAT3 w komórkach dendrytycznych po stymulacji różnymi czynnikami. Względny poziom ekspresji mRNA dla IL-10R w DC stymulowanych przez 24 godziny różnymi czynnikami: rm IL-10 (1 μ g/ml), TAg (10% v/v) lub LPS (1 μ g/ml), określony metodą reakcji PCR w czasie rzeczywistym (A). Fosforylację czynnika STAT3 w komórkach dendrytycznych CD11c⁺ określono z wykorzystaniem metody cytometrii przepływowej. Komórki dendrytyczne przez 15 minut stymulowano czynnikami: rm IL-10, PMA lub LPS (w stężeniach 1 μ g/ml). Po tym czasie komórki permeabilizowano i utrwalano, a następnie wśród komórek CD11c⁺ określono poziom ekspresji czynnika pSTAT3 przedstawianej jako średnia intensywność fluorescencji (MFI) (B). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane z testu przeprowadzonego w trzech powtórzeniach. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A, B). Znaki „#” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a grupą kontrolną – DC (#p<0,05; ##p<0,01; ####p<0,0001).

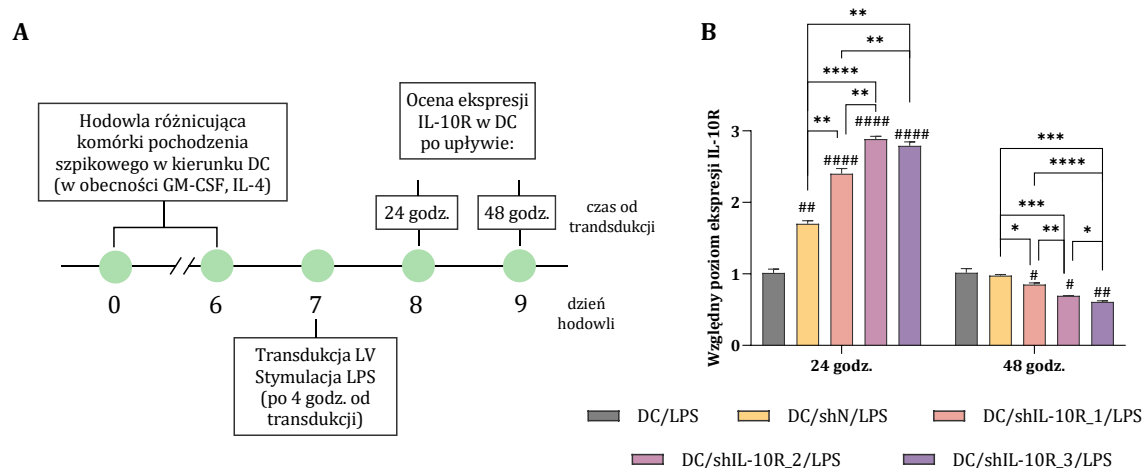
4.4.3. Określenie kinetyki i skuteczności wyciszenia IL-10R w komórkach dendrytycznych z wykorzystaniem wybranych sekwencji shRNA

Komórki dendrytyczne poddano modyfikacji prowadzącej do wyciszenia receptora IL-10 wykorzystując system lentiwirusowy III generacji. W tym celu użyto wektory lentiwirusowe (LV) niosące różne sekwencje shRNA (oznaczone jako **shIL-10R_1**, **shIL-10R_2**, **shIL-10R_3**) skierowane przeciwko mysiemu receptorowi IL-10. Dodatkowo, w celu określenia wpływu procesu transdukcji wirusowej na zmiany zachodzące w DC, zastosowano kontrolną sekwencję negatywną (**shN**), skierowaną przeciwko ludzkiemu GAPDH. Na podstawie przeprowadzonej fenotypowej i funkcjonalnej charakterystyki otrzymanych transduktantów, do doświadczenia terapeutycznego została zarekomendowana jedna sekwencja shIL-10R.

W schemacie skojarzonej terapii przeciwnowotworowej, który został opracowany w naszym laboratorium podawane są dojrzałe DC, które uzyskuje się podczas 8-dniowej hodowli różnicującej. W trakcie procesu optymalizacji transdukcji lentiwirusowej prowadzącej

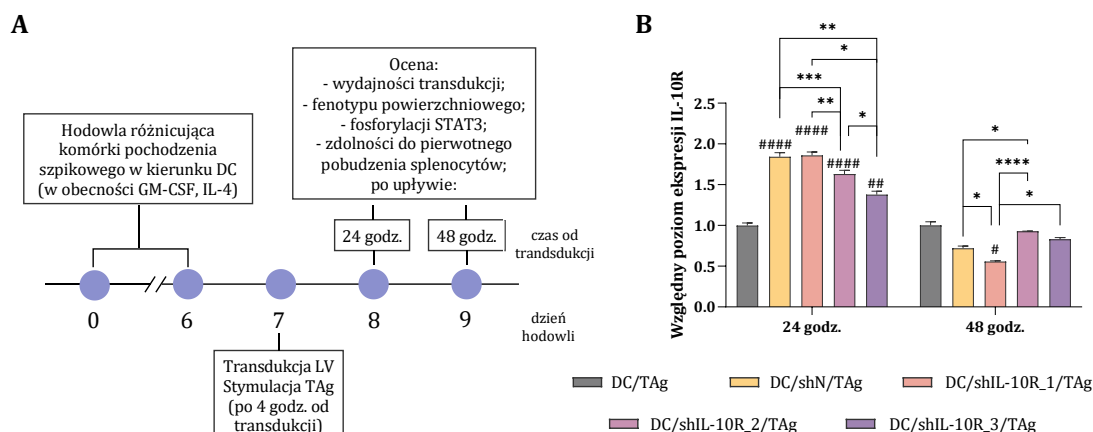
do wyciszenia IL-10R, próbowano zachować ten protokół i wektory LV podano 7. dnia hodowli, tak jak zostało to opisane w podrozdziale 3.2.13. Jednak w trakcie początkowych prób uzyskania modyfikowanych DC wykazano, że po upływie 24 godzin od transdukcji nie następuje wyciszenie *Il10ra*, lecz dochodzi do wzmożonej ekspresji tego genu. Prawdopodobnie było to wynikiem kontaktu DC z wektorami LV. W związku z tym, podjęto decyzję o przeprowadzeniu oceny kinetyki wyciszenia ekspresji IL-10R w DC po upływie 24 oraz 48 godzin od transdukcji LV.

4.4.3.1. Kinetyka wyciszenia IL-10R w komórkach dendrytycznych po stymulacji LPS



Ryc. 51. Kinetyka wyciszenia ekspresji IL-10R w komórkach dendrytycznych po upływie 24 oraz 48 godzin od transdukcji lentiwirusowej i stymulacji LPS. Schemat doświadczenia (A). Siedmiodniowe DC transdukowano w warunkach *in vitro* wektorami kodującymi trzy różne sekwencje shRNA dla IL-10R (oznaczone jako IL-10R_1; IL-10R_2; IL-10R_3). Jako kontrolę transdukcji zastosowano wektor kodujący negatywną sekwencję shRNA (shN). Po upływie 24 oraz 48 godzin od transdukcji i stymulacji LPS metodą reakcji PCR w czasie rzeczywistym określono wydajność wyciszenia ekspresji IL-10R (B). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane z testu przeprowadzonego w trzech powtórzeniach. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a. Znaki „#” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a grupą kontrolną – DC/LPS; pozostałe istotności pomiędzy grupami są prezentowane w formie klamer i znaków „*” (*#p<0,05; **/#p<0,01; ***p<0,001; ****/####p<0,0001).

Analiza relatywnego poziomu ekspresji IL-10R w DC stymulowanych LPS wykazała najwyższą ekspresję badanego genu po upływie 24 godzin od podania wektorów LV i w tym punkcie czasowym wyciszenie *Il10ra* było nieskuteczne. Wydłużenie tego czasu do 48 godzin (licząc od momentu transdukcji LV i stymulacji LPS) umożliwiło istotnie statystycznie obniżenie ekspresji badanego genu, zarówno w odniesieniu do DC/LPS, jak i sekwencji negatywnej (DC/shN/LPS) stanowiącej kontrolę procesu transdukcji. W tym punkcie czasowym, najniższą ekspresję IL-10R odnotowano po zastosowaniu sekwencji shIL-10R_3 (zmniejszenie o ok. 50%). Pozostałe badane sekwencje również spowodowały zmniejszenie ekspresji IL-10R w komórkach dendrytycznych (Ryc. 51).

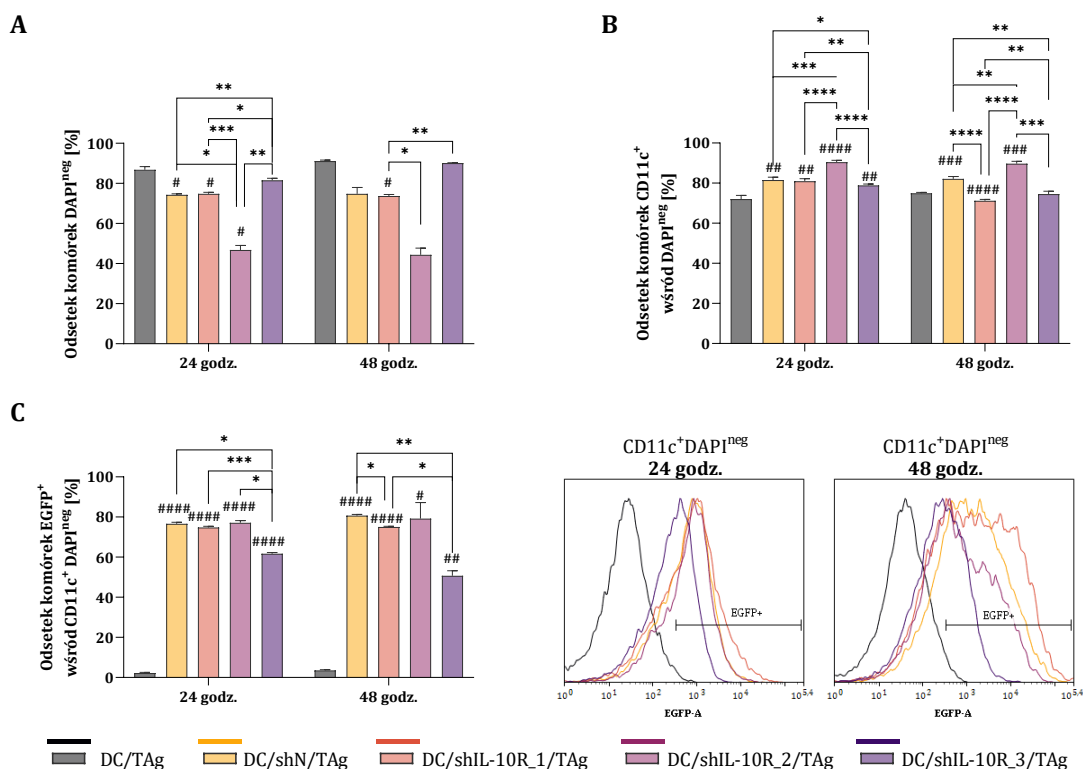
4.4.3.2. Kinetyka wyciszenia *IL-10R* w komórkach dendrytycznych po stymulacji TAG

Ryc. 52. Kinetyka wyciszenia ekspresji *IL-10R* w komórkach dendrytycznych po upływie 24 oraz 48 godzin od transdukcji lentiwirusowej i stymulacji TAG. Schemat doświadczenia (A). Siedmiodniowe DC transdukowano w warunkach *in vitro* wektorami kodującymi trzy różne sekwencje shRNA dla *IL-10R* (oznaczone jako *IL-10R_1*; *IL-10R_2*; *IL-10R_3*). Jako kontrolę transdukcji zastosowano wektor kodujący negatywną sekwencję shRNA (shN). Po upływie 24 oraz 48 godzin od transdukcji i stymulacji TAG metodą reakcji PCR w czasie rzeczywistym określono wydajność wyciszenia ekspresji *IL-10R* (B). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane z testu przeprowadzonego w trzech powtórzeniach. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a. Znaki „#” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a nietransdukowaną grupą kontrolną – DC/TAG; pozostałe istotności pomiędzy grupami są prezentowane w formie klamer i znaków „**” (*/# $p < 0,05$; **/### $p < 0,01$; ***/### $p < 0,001$; ****/##### $p < 0,0001$).

W kolejnym etapie badań oceniono kinetykę wyciszenia receptora *IL-10* w komórkach dendrytycznych poddanych transdukcji lentiwirusowej i stymulacji TAG (Ryc. 52 A). Wykazano zwiększenie ekspresji *IL-10R*, które nastąpiło po 24 godzinach od podania wektorów LV. W porównaniu do nietransdukowanych komórek (DC/TAG) poziom ekspresji genu *Il10ra* był blisko 2-krotnie wyższy nawet w przypadku sekwencji negatywnej (DC/shN/TAG). Tymczasem jedynie po upływie 48 godzin od zastosowania sekwencji shIL-10R_1 odnotowano znaczące, sięgające prawie 50%, zmniejszenie ekspresji docelowego genu, w odniesieniu do kontroli nietransdukowanej (DC/TAG). Ponadto zmiana ta była istotna statystycznie w porównaniu do kontrolnej sekwencji negatywnej oraz pozostałych badanych sekwencji shIL-10R (Ryc. 52 B).

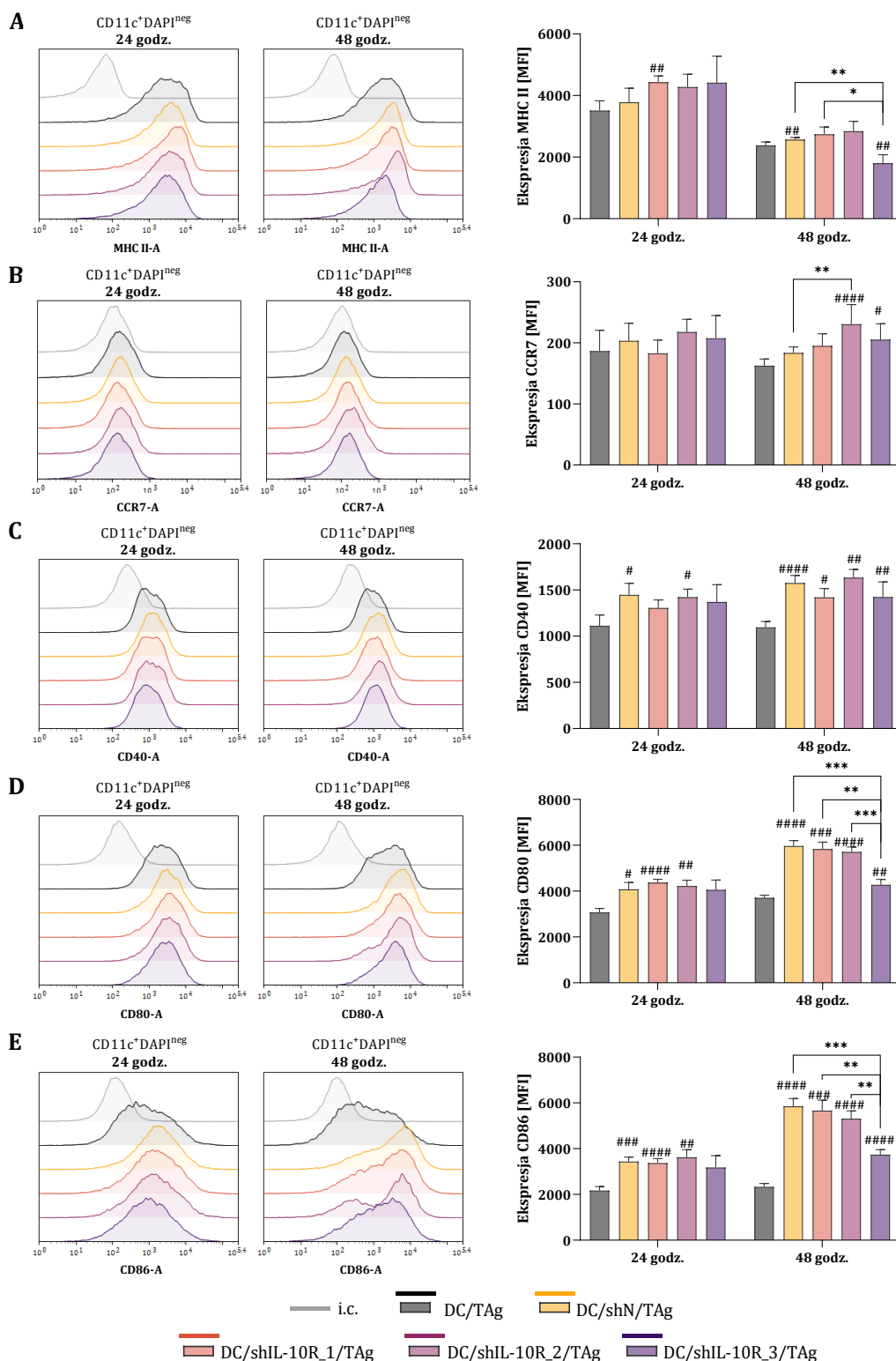
4.4.3.3. Określenie wpływu wyciszenia ekspresji *IL-10R* na zmiany w fenotypie i w aktywności komórek dendrytycznych stymulowanych TAG

Charakterystykę transdukowanych DC stymulowanych TAG rozszerzono o określenie zmian w żywotności (populacja DAPI^{neg}) oraz w fenotypie zmodyfikowanych komórek dendrytycznych (CD11c⁺DAPI^{neg}). Co więcej, dzięki wykorzystaniu reporterowego genu *Egfp* w konstrukcji wektora LV, możliwe było ocenienie wydajności transdukcji (EGFP⁺CD11c⁺DAPI^{neg}).



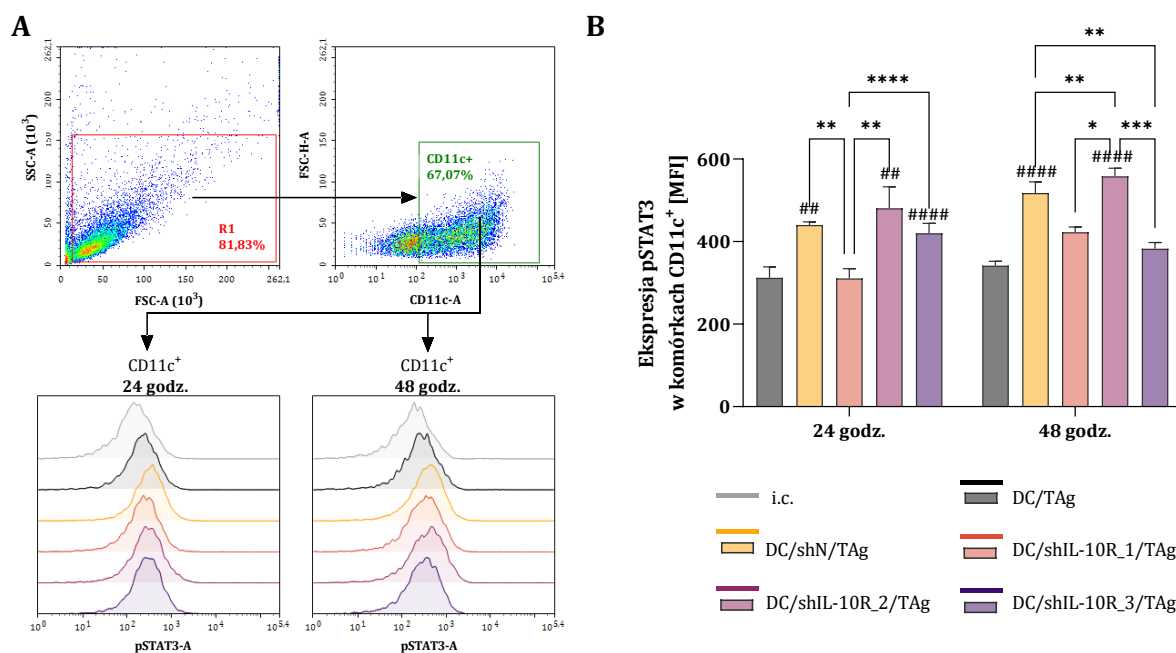
Ryc. 53. Udział procentowy komórek żywych, komórek CD11c⁺ oraz komórek EGFP⁺ określony po upływie 24 oraz 48 godzin od transdukcji lentiwirusowej i stymulacji TAG. Po upływie 24 oraz 48 godzin od transdukcji lentiwirusowej DC (schemat doświadczenia na Ryc. 52 A) oceniono żywotność komórek (A), ekspresję cząsteczki CD11c⁺ (B) oraz ekspresję genu reporterowego EGFP (C). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane z testu przeprowadzonego w sześciu powtórzeniach. Na histogramach zamieszczono ekspresję EGFP w DC będącą reprezentatywną dla każdej grupy doświadczalnej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A-C). Znaki „#” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a nietransdukowaną grupą kontrolną – DC/TAG; pozostałe istotności pomiędzy grupami są prezentowane w formie klamer i znaków „*” (*#p<0,05; **##p<0,01; ***###p<0,001; ****/####p<0,0001).

Analiza cytometryczna wykazała, że proces transdukcji lentiwirusowej wpłynął na żywotność DC, jednak porównując oba badane punkty czasowe nie obserwowano, aby wydłużenie czasu transdukcji powodowało pogłębienie tego efektu. W grupie DC/shIL-10R_2/TAG zaledwie 50% wszystkich analizowanych komórek zostało zidentyfikowanych jako komórki żywe, a w przypadku pozostałych sekwencji, odsetek komórek DAPI^{neg} mieścił się w przedziale 70-80% (Ryc. 53 A). Po upływie 24 godzin od transdukcji odnotowano zwiększenie udziału procentowego komórek CD11c⁺ we wszystkich grupach poddanych modyfikacji, lecz po upływie 48 godzin od transdukcji efekt ten utrzymał się jedynie w grupach DC/shN/TAG oraz DC/shIL-10R_2/TAG (Ryc. 53 B). Obserwowany wysoki odsetek komórek EGFP⁺ wskazuje na skuteczną modyfikację komórek dendrytycznych. Spośród badanych sekwencji shRNA najmniejszy udział procentowy komórek EGFP⁺ odnotowano po zastosowaniu shIL-10R_3, zarówno wśród komórek zebranych po 24, jak i po 48 godzinach od transdukcji (Ryc. 53 C).



Ryc. 54. Charakterystyka fenotypowa komórek wykonana po upływie 24 oraz 48 godzin od transdukcji lentivirusowej i stymulacji TAg. Po upływie 24 oraz 48 godzin od transdukcji (zgodnie ze schematem z Ryc. 52 A) określono fenotyp komórek CD11c⁺DAPI^{neg} na podstawie ekspresji cząsteczki MHC II (A); CCR7 (B) oraz cząsteczek kostymulujących: CD40 (C); CD80 (D); CD86 (E), przedstawianej jako średnia intensywność fluorescencji (MFI). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane z testu przeprowadzonego w sześciu powtórzeniach. Na histogramach zamieszczono ekspresje badanych cząsteczek reprezentatywne dla każdej grupy doświadczalnej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A-E). Znaki „#” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a nietransdukowaną grupą kontrolną – DC/TAg; pozostałe istotności pomiędzy grupami są prezentowane w formie klamer i znaków „*” (*/#p<0,05; **/###p<0,01; ***/####p<0,001; ####p<0,0001).

Dalsza ocena fenotypu powierzchniowego wykazała, że pod wpływem zastosowania wektorów LV doszło do pobudzenia komórek dendrytycznych – wskazuje na to zwiększona ekspresja cząsteczek MHC II, CD40, CD80 i CD86 (Ryc. 54). Po upływie 24 godzin od transdukcji odnotowano wzrost ekspresji cząsteczek MHC II, a w grupie DC/shIL-10R_1/TAg zmiana ta była istotna statystycznie. Choć komórki dendrytyczne zebrane po upływie 48 godzin od transdukcji charakteryzowały się niższą ekspresją cząsteczek MHC II niż te zebrane dobie wcześniej, to pobudzenie DC pod wpływem użycia wektorów LV było nadal utrzymane. Wyjątek stanowiły komórki transdukowane sekwencją shIL-10R_3, które charakteryzowały się znacząco niższą ekspresją antygenów MHC II (Ryc. 54 A). Odnotowano także zwiększenie aktywności migracyjnej DC, o czym świadczył wzrost wartości MFI dla cząsteczek CCR7, szczególnie po zastosowaniu sekwencji shIL-10R_2 (Ryc. 54 B). Ponadto wykazano, iż pod wpływem transdukcji LV doszło do zwiększenia ekspresji cząsteczek kostymulujących – CD40, CD80 i CD86, szczególnie po upływie 48 godzin od transdukcji. Chociaż w odniesieniu do kontroli nietransdukowanej, poziom ekspresji tych antygenów powierzchniowych był zwiększony, to w porównaniu do pozostałych modyfikowanych DC, komórki z grupy DC/shIL-10R_3/TAg były najslabiej pobudzone (Ryc. 54 C-E).

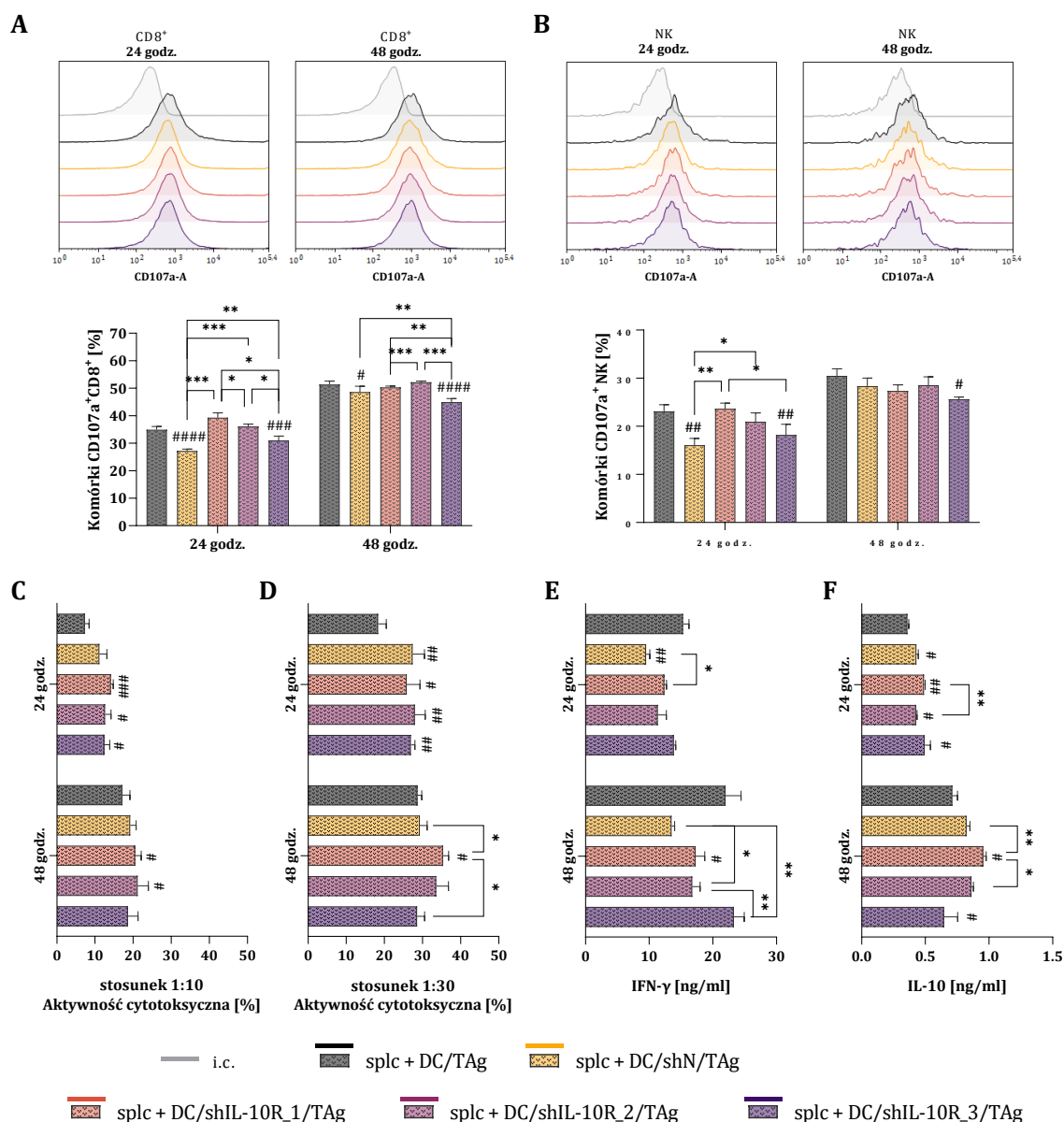


Ryc. 55. Indukowana za pomocą IL-10 fosforylacja czynnika STAT3 w komórkach dendrytycznych z wyciszoną ekspresją IL-10R określana po upływie 24 oraz 48 godzin od transdukcji lentiwirusowej i stymulacji TAg. Po upływie 24 oraz 48 godzin od transdukcji lentiwirusowej (schemat doświadczenia na Ryc. 52 A) komórki dendrytyczne stymulowano rm IL-10 (1 µg/ml) przez 15 minut. Po tym czasie komórki permeabilizowano i utrwalano, a następnie wśród komórek CD11c⁺ określono poziom ekspresji czynnika pSTAT3 przedstawionej jako średnia intensywność fluorescencji (MFI). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane z testu przeprowadzonego w sześciu powtórzeniach. Na histogramach zamieszczono ekspresję pSTAT3 w DC reprezentatywne dla każdej grupy doświadczalnej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a. Znaki „#” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a nietransdukowaną grupą kontrolną – DC/TAg; pozostałe istotności pomiędzy grupami są prezentowane w formie klamer i znaków „*” (*p<0,05; **/##p<0,01; ***/###p<0,001; ****/####p<0,0001).

Określono wpływ wyciszenia receptora IL-10 na fosforylację czynnika transkrypcyjnego STAT3 (Ryc. 55 A). Wykazano, że zmodyfikowane komórki dendrytyczne stymulowane IL-10 cechowała wyższa ekspresja pSTAT3 w porównaniu do DC/TAg. Było to szczególnie widoczne w komórkach, które transdukowano z wykorzystaniem sekwencji shN, shIL-10R_2 lub shIL-10R_3. Po upływie 24 godzin od transdukcji LV najmniejszą fosforylację badanego białka odnotowano w grupie DC/shIL-10R_1/TAg, a efekt ten był utrzymany w 48-godzinnych transduktantach. W przypadku komórek DC/shIL-10R_3/TAg zebranych po 48 godzinach od transdukcji odnotowano podobną zależność – poziom ekspresji pSTAT3 był podobny, jak w grupach DC/TAg lub DC/shIL-10R_1/TAg (Ryc. 55 B).

Ocenie poddano także zdolność zmodyfikowanych DC do tworzenia odpowiedzi przeciwnowotworowej – w tym celu DC zebrane po 24 oraz 48-godzinach od transdukcji i stymulacji TAg wykorzystano do pierwotnego pobudzenia dziewiczych splenocytów. Następnie analizowano wydzielanie ziaren cytolitycznych (CD107a⁺) przez pobudzone splenocyty oraz aktywność cytotoksyczną komórek śledzionowych względem komórek nowotworowych (Ryc. 56). Znacząco wyższy odsetek komórek CD107a⁺CD8⁺ oraz CD107a⁺NK odnotowano w grupie, w której do pobudzenia komórek śledzionowych zastosowano 24-godzinne transduktanty DC/shIL-10R_1/TAg (splc + DC/shIL-10R_1/TAg). Niemniej jednak DC zebrane po upływie 48 godzin od transdukcji, silniej stymulowały komórki śledzionowe do ekspozycji ziaren cytolitycznych, w porównaniu do DC zebranych dobie wcześniej. Ponadto w odniesieniu do grupy splc + DC/TAg, splenocyty pobudzone przez 48-godzinne transduktanty DC/shN/TAg lub DC/shIL-10R_3/TAg indukowały mniejszy odsetek komórek CD107a⁺CD8⁺, a w przypadku tej ostatniej grupy obserwowano także najmniejszy udział procentowy komórek CD107a⁺NK.

Należy także podkreślić, że komórki śledzionowe pobudzone przez komórki dendrytyczne transdukowane sekwencją shIL-10R_1 skutecznie eliminowały komórki nowotworowe MC38. W grupie splc + DC/shIL-10R_1/TAg wykazano największą aktywność cytotoksyczną splenocytów, szczególnie gdy do ich pobudzenia wykorzystano 48-godzinne transduktanty DC/shIL-10R_1/TAg. Analiza profilu cytokinowego znad pierwotnie stymulowanych komórek śledzionowych wykazała, że pod wpływem zastosowania transdukowanych DC z jednej strony nastąpiło obniżenie zdolności splenocytów do produkcji IFN- γ , a z drugiej – komórki te wydzielały więcej IL-10 do środowiska. Najniższe stężenie IFN- γ wykazano w grupie splc + DC/shN/TAg, natomiast najwyższe stężenie IL-10 odnotowano w grupie splc + DC/shIL-10R_1/TAg.



Ryc. 56. Zdolność komórek dendrytycznych z wyciszoną ekspresją IL-10R do pierwotnego pobudzenia komórek śledzionowych. Po upływie 24 oraz 48 godzin od transdukcji lentiwirusowej (schemat doświadczenia na Ryc. 52 A), DC wykorzystano w 5-dniowej hodowli mieszanej ze splenocytami (splc) pochodzącymi od zdrowej myszy. Odsetek komórek CD107a⁺ określono wśród limfocytów T CD8⁺ (A) i komórek NK (B) po 2-godzinnej inkubacji pobudzonych splenocytów z komórkami MC38. Na histogramach zamieszczono ekspresje cząsteczek CD107a reprezentatywne dla każdej grupy doświadczalnej. Aktywność cytotoksyczną efektorowych splenocytów wobec komórek nowotworowych przedstawiono jako odsetek martwych komórek MC38 po 4-godzinnej inkubacji z komórkami efektorowymi w stosunku wynoszącym 1:10 (C) i 1:30 (D). Stężenie IFN-γ (E) i IL-10 (F) oceniano w nadsączach z nad 5-dniowej hodowli mieszanej transdukowanych DC i komórek śledzionowych. Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane z testu przeprowadzonego w sześciu powtórzeniach. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A-F). Znaki „#” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a grupą kontrolną – splc + DC/TAg; pozostałe istotności pomiędzy grupami są prezentowane w formie klamer i znaków „*,” (**/*#p<0,05; **/**#p<0,01; ***/**#p<0,001; ####p<0,0001).

4.4.4. Podsumowanie

Spośród badanych sekwencji shRNA wybrano sekwencję **shIL-10R_1**. Tę decyzję podjęto na podstawie najniższej ekspresji genu *I10ra* odnotowanej po upływie 48 godzin od transdukcji LV i stymulacji TAg. Komórki dendrytyczne modyfikowane wektorami niosącymi tę sekwencję zostały wydajnie stransdukowane o czym świadczył wysoki odsetek komórek EGFP⁺. W grupie DC/shIL-10R_1/TAg odnotowano umiarkowane obniżenie żywotności a także ekspresji cząsteczki CD11c⁺, jednak rezultatem transdukcji lentiwirusowej było pobudzenie DC, co potwierdzono zwiększeniem ekspresji badanych antygenów powierzchniowych. Ponadto DC transdukowane sekwencją shIL-10R_1 cechowała niższa ekspresja pSTAT3 w odpowiedzi na stymulację przez IL-10 pochodzenia egzogenne, w porównaniu do komórek z grupy DC/shN/TAg. Dalsze analizy potwierdziły wpływ obniżenia ekspresji IL-10R w komórkach dendrytycznych stymulowanych TAg na ich zwiększoną zdolność do tworzenia swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Komórki śledzionowe pobudzone przez 48-godzinne transduktanty DC/shIL-10R_1/TAg charakteryzowały się największą aktywnością cytotoksyczną wobec komórek MC38, w porównaniu do pozostałych grup.

Podsumowując, zablokowanie supresorowego wpływu IL-10 pochodzenia nowotworowego, wymaga zebrania szczepionkowych komórek dendrytycznych po upływie 48 godzin od transdukcji lentiwirusowej i stymulacji TAg. W przeciwnym razie, okołoguzowe podanie DC zebranych po upływie 24 godzin od zastosowania wektorów LV, wpłynie na wytworzenie słabszej odpowiedzi przeciwnowotworowej – głównie ze względu na wyższą ekspresję IL-10R, a tym samym większą wrażliwość szczepionkowych DC na IL-10. W zaplanowanym ostatnim doświadczeniu terapeutycznym zostaną wykorzystane szczepionki komórkowe na bazie DC zmodyfikowanych sekwencją shIL-10R_1 i stymulowanych TAg (w dalszej części opisu wyników ta sekwencja będzie określana mianem **shIL-10R**).

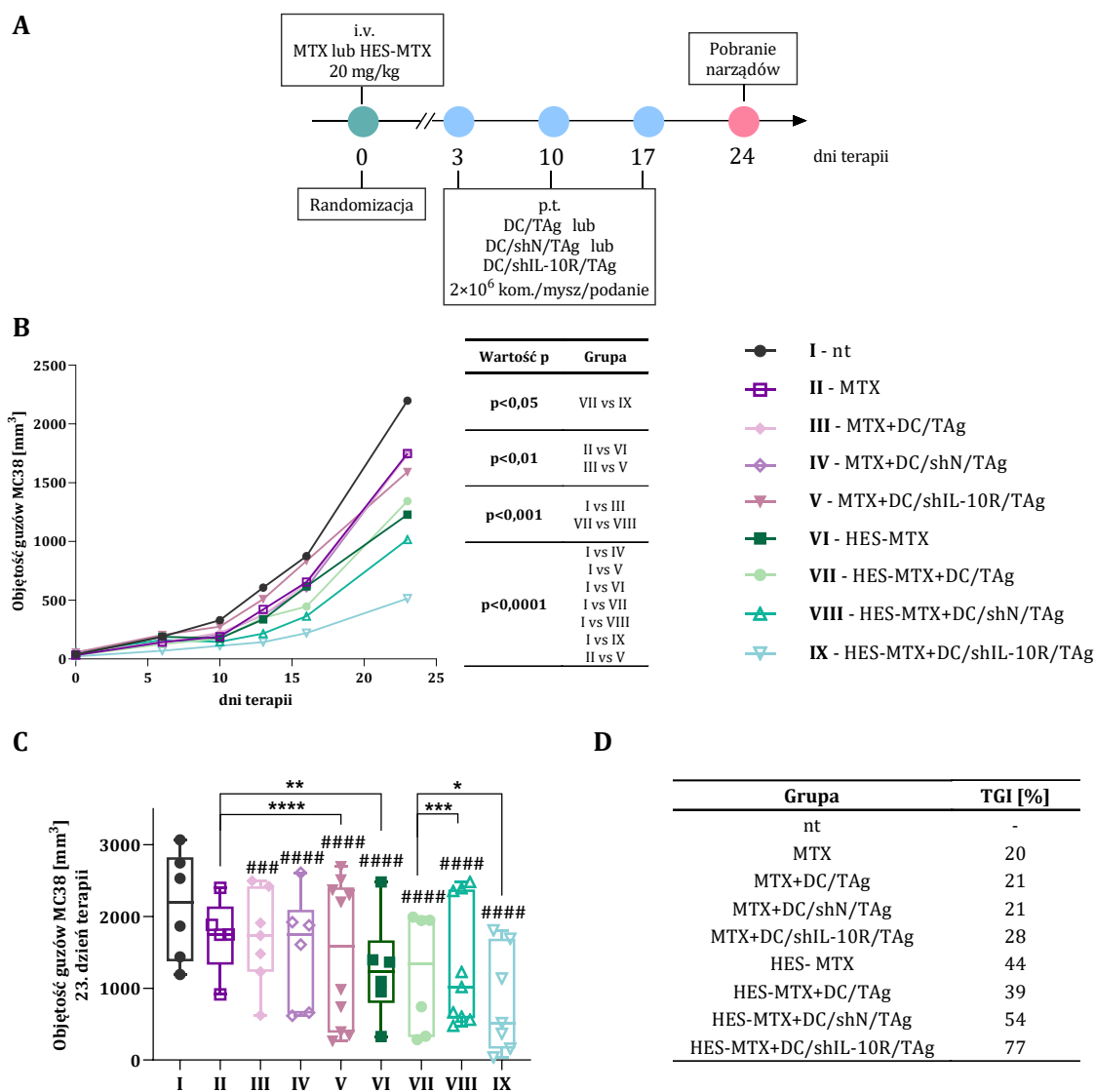
4.5. Określenie efektu przeciwnowotworowego chemioimmunoterapii z udziałem MTX lub HES-MTX oraz szczepionek komórkowych na bazie dojrzałych komórek dendrytycznych z wyciszoną ekspresją receptora IL-10

W ostatnim etapie badań przeprowadzono doświadczenie, w którym myszy obarczone nowotworem MC38 otrzymały skojarzoną terapię opartą na chemioterapeutyku oraz szczepionkach komórkowych na bazie DC poddanych transdukcji lentiwirusowej prowadzącej do wyciszenia ekspresji IL-10R. Jak zostało przedstawione na Ryc. 57 A, okołoguzowe podanie szczepionkowych DC rozpoczęto 3. dnia po dożylnym podaniu chemioterapeutyków. Podobnie jak w poprzednim doświadczeniu terapeutycznym, zaplanowano trzykrotne iniekcje szczepionek komórkowych w tygodniowych odstępach. Aby ocenić wpływ skojarzonej terapii na zmiany w lokalnej i ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej, siódmego dnia po ostatnim podaniu komórek dendrytycznych, od myszy pobrano guzy nowotworowe, węzły chłonne oraz śledziony.

4.5.1. Wzrost guzów MC38 u myszy poddanych chemioimmunoterapii

Pomiary objętości guzów prowadzone podczas trwania doświadczenia terapeutycznego umożliwiły sporządzenie krzywych wzrostu guza oraz określenie zahamowania rozwoju nowotworu w odniesieniu do kontroli nietraktowanej (Ryc. 57). Na podstawie wartości TGI stwierdzono, że zastosowanie w terapii MTX, zarówno w formie monoterapii, jak również w połączeniu z immunoterapią spowolniło wzrost nowotworu, lecz jedynie w umiarkowanym stopniu. Spośród grup myszy otrzymujących MTX, najwyższą wartość TGI (28%) obliczono dla grupy MTX + DC/shIL-10R/TAg (Ryc. 57 B-D).

Rezultatem zastosowania HES-MTX jako chemioterapeutyku było znaczące wyhamowanie rozwoju nowotworu. Odnotowano, że w grupie myszy traktowanych nanokoniugatem w formie monoterapii guzy miały o 44% mniejszą objętość niż guzy w grupie kontrolnej. Pomimo iż uzupełnienie terapii o podanie niemodyfikowanych DC/TAg nie pogłębiło tego efektu (TGI 39%), to zastosowanie DC transdukowanych wektorami lentiwirusowymi przyczyniło się do znacznego ograniczenia wzrostu nowotworu. W grupie myszy otrzymujących HES-MTX + DC/shN/TAg obliczone TGI wynosiło 54%, natomiast zastosowanie nanokoniugatu i szczepionek komórkowych na bazie DC z wyciszoną ekspresją IL-10R (HES-MTX + DC/shIL-10R/TAg) spowodowało największe zahamowanie wzrostu nowotworu – w tej grupie otrzymana wartość TGI wynosiła aż 77% (Ryc. 57 B-D).

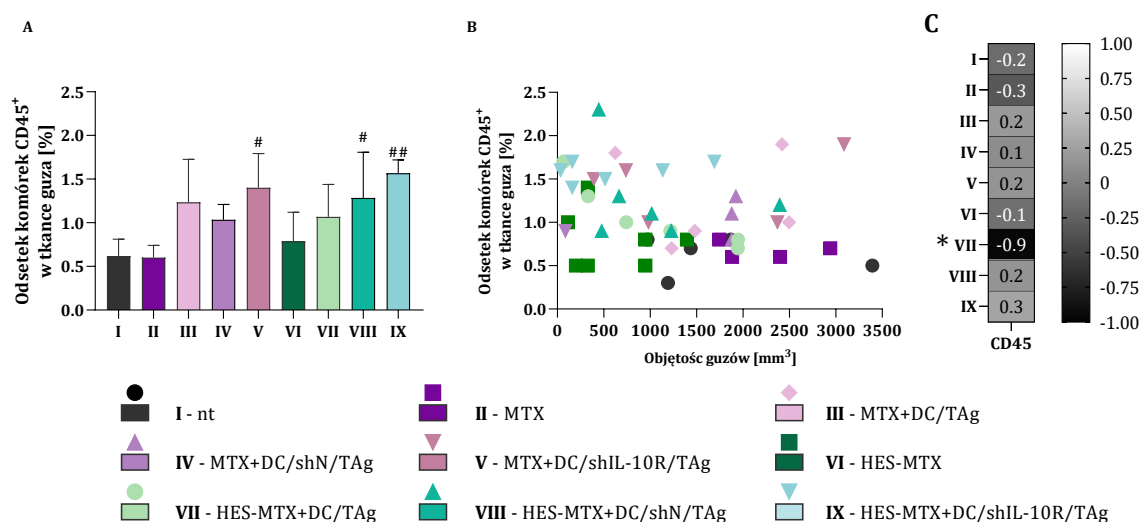


Ryc. 57. Wzrost guzów MC38 u myszy poddanych chemioimmunoterapii z udziałem metotreksatu lub nanokoniugatu HES-MTX oraz komórek dendrytycznych z wyciszoną ekspresją IL-10R i stymulowanych antygenami nowotworowymi. Mysiom z rosnącymi podskórnie guzami MC38 dożylnie (i.v.) podano metotreksat (MTX) lub nanokoniugat (HES-MTX) w dawce 20 mg/kg, a następnie trzeciego dnia rozpoczęto trzykrotne okołoguzowe (p.t.) podania komórek dendrytycznych z wyciszoną ekspresją IL-10R i stymulowanych antygenami nowotworowymi (DC/shIL-10R/TAg). Schemat doświadczenia (A). Mediany objętości guzów wyznaczonych na podstawie pomiarów prowadzonych co 3-5 dni (B). Mediany objętości guzów zmierzonych w 23. dniu terapii (C). Wartości zahamowania wzrostu nowotworu (TGI) obliczone dla 23. dnia terapii w odniesieniu do kontroli nietraktowanej (nt) (D). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego dwuczynnikowego testu ANOVA i *post hoc* testu Bonferroniego. Znaki „#” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a nietransdukowaną grupą kontrolną – nt; pozostałe istotności pomiędzy grupami są prezentowane w formie klamer i znaków „*” (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****/#####p<0,0001).

4.5.2. Ocena lokalnej odpowiedzi przeciwnowotworowej u myszy poddanych chemioimmunoterapii

4.5.2.1. Populacje komórek limfoidalnych w guzach MC38

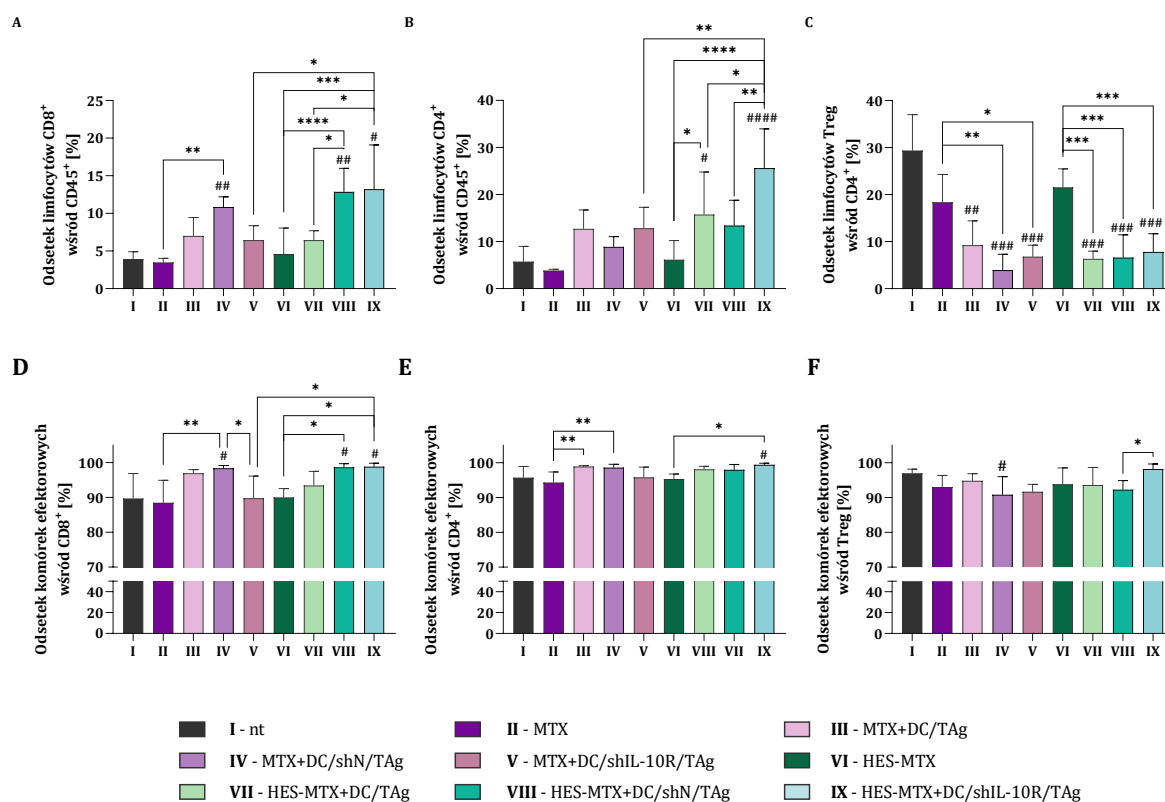
Aby określić wpływ zastosowania skojarzonej terapii na zmiany w wielkości populacji komórek limfoidalnych napływających do tkanki guzów, przeprowadzono analizę cytometryczną zgodnie ze schematem prezentowanym na Ryc. 10 w podrozdziale 4.2.2.1. Wyznaczono ogólny odsetek komórek CD45⁺ w tkance guzów, a wśród nich oszacowano odsetek poszczególnych populacji limfocytów T (CD8⁺, CD4⁺ oraz Treg), komórek CD19⁺, NK i NKT. Ponadto na podstawie ekspresji cząsteczek CD44 oraz CD62L, wśród limfocytów T określono wielkości populacji komórek efektorowych i pamięci.



Ryc. 58. Ocena nacieku leukocytów w guzach nowotworowych MC38 pobranych od myszy poddanych chemioimmunoterapii. Na wykresie słupkowym przedstawiono uśrednione wartości (+SD) odsetka komórek CD45⁺ uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 6-8 myszy/grupę (zgodnie ze schematem przedstawionym na Ryc. 10) (A). Na wykresie punkowym przedstawiono rozmiar guzów MC38 mierzonych w 23. dniu terapii oraz wielkość nacieku komórek CD45⁺ do tkanki guza przygotowany dla każdej myszy w doświadczeniu terapeutycznym (B). Heat-mapa korelacji pomiędzy wielkością guzów a udziałem procentowym populacji CD45⁺ w każdej z grup badanych, wyliczonej z wykorzystaniem nieparametrycznego testu korelacji Spearman'a. W poszczególnych polach mapy zamieszczono otrzymane wartości r_s (C). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A). Znaki „#” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a grupą kontrolną – nt ([#]p<0,05; ^{##}p<0,01). Znak „*” na wykresie (C) wskazuje na istotność statystyczną wyliczonej korelacji *p<0,05.

Analiza cytometryczna komórek CD45⁺ wyizolowanych z tkanki guzów wykazała, że ich zwiększony napływ do tkanki nowotworowej wywołała skojarzona terapia. W wyniku podania szczepionek komórkowych na bazie transdukowanych DC, w szczególności DC/shIL-10R/TAg, obserwowano najwyższy udział procentowy leukocytów, lecz pomiędzy grupami myszy otrzymującymi DC z wyciszoną ekspresją IL-10R, nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic (Ryc. 58 A). Na podstawie pomiaru objętości guza prowadzonego

indywidualnie dla każdej myszy oraz określonego odsetka leukocytów w tkance tych guzów, obliczono korelację a z otrzymanych wartości r_s sporządzono heat-mapę. Spośród wszystkich grup myszy istotną statystycznie korelację odnotowano w grupie HES-MTX + DC/TAg ($r_s = -0,9$). Otrzymana wartość r_s wskazywała na silną korelację ujemną – większej infiltracji leukocytów towarzyszyła mniejsza objętość guzów. W pozostałych grupach myszy wyliczone korelacje nie były istotne statystycznie, a otrzymane wartości r_s wskazują na słabą korelację ujemną w przypadku grupy nietraktowanej ($r_s = -0,2$) oraz grup chemioterapeutycznych (MTX $r_s = -0,3$; HES-MTX $r_s = -0,1$). Natomiast w przypadku grup myszy otrzymujących skojarzoną terapię odnotowano dodatnie wartości r_s z zakresu 0,1-0,3.

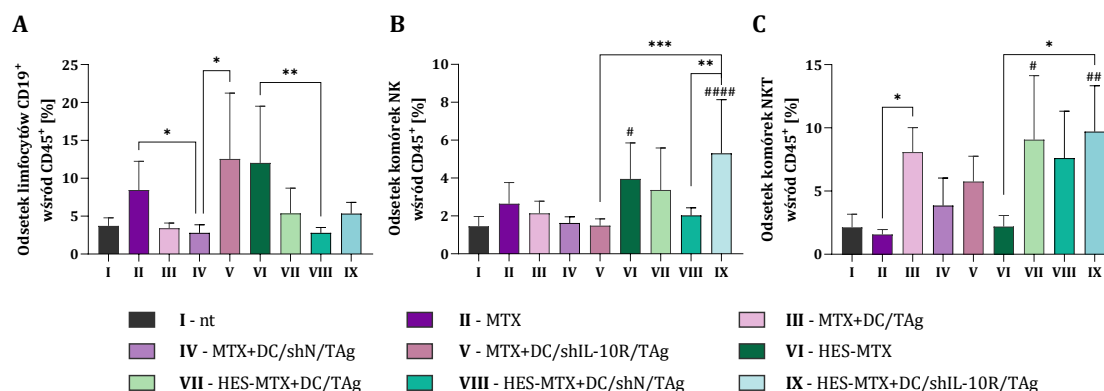


Ryc. 59. Ocena nacieku i stopnia pobudzenia limfocytów T w guzach nowotworowych MC38 pobranych od myszy poddanych chemioimmunoterapii. Wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} w tkance guza, zidentyfikowano populacje limfocytów T CD8⁺ (A) i CD4⁺ (B) i limfocytów Treg określonych wśród limfocytów T CD4⁺ (C) (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 10). Zidentyfikowano subpopulacje komórek efektorowych (CD44⁺CD62L⁻) wśród populacji limfocytów T CD8⁺ (D), CD4⁺ (E) i Treg (F). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy pobranych od 6-8 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (E); nieparametrycznego testu Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna (D,F) lub testu ANOVA w modyfikacji Browna-Forsythe'a i Welcha i testu *post hoc* T3 Dunnetta (A-C). Znaki „#” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a grupą kontrolną – nt; pozostałe istotności pomiędzy grupami są prezentowane w formie klamer i znaków „*,” (*/# p<0,05; */## p<0,01; ***/### p<0,001; ****/#### p<0,0001).

Oceniając wielkość populacji limfocytów T CD8⁺ wykazano, że zwiększenie odsetka tych komórek nastąpiło jedynie po zastosowaniu skojarzonej terapii przeciwnowotworowej. W grupach myszy otrzymujących MTX lub HES-MTX oraz niemodyfikowane DC/TAg odnotowano niewielki

wzrost odsetka komórek CD8⁺, a najkorzystniejszy efekt został wywołany, gdy w terapii wykorzystano transdukowane DC. W przeciwieństwie do MTX, zastosowanie HES-MTX uzupełnione o DC/shIL-10R/TAg znacząco wpłynęło na zwiększoną infiltrację tkanki guzów przez limfocyty T CD8⁺. Pomimo że najwyższy odsetek badanych komórek obserwowano w grupach HES-MTX + DC/shN/TAg oraz HES-MTX + DC/shIL-10R/TAg, to pomiędzy nimi nie wykazano znaczących różnic (Ryc. 59 A). Chociaż we wszystkich grupach myszy otrzymujących szczepionki na bazie DC wykazano zwiększony napływ limfocytów T CD4⁺ do tkanki guzów, to zmiany istotne statystycznie obserwowano jedynie, gdy podanie DC było poprzedzone zastosowaniem HES-MTX. Wykorzystanie nanokoniugatu oraz DC/shIL-10R/TAg spowodowało gwałtowny wzrost odsetka komórek CD4⁺, nie tylko w odniesieniu do pozostałych grup myszy otrzymujących HES-MTX, lecz także w porównaniu do grupy MTX + DC/shIL-10R/TAg (Ryc. 59 B). W guzach pobranych od myszy otrzymujących immunoterapię, niezależnie od rodzaju zastosowanych DC, odnotowano znaczne zmniejszenie udziału procentowego limfocytów T regulatorowych. Świadczy to o tym, że zastosowanie DC jest wystarczające do zmniejszenia napływu limfocytów Treg do tkanki nowotworu, a obniżenie wrażliwości DC na IL-10 nie pogłębiło tego efektu (Ryc. 59 C).

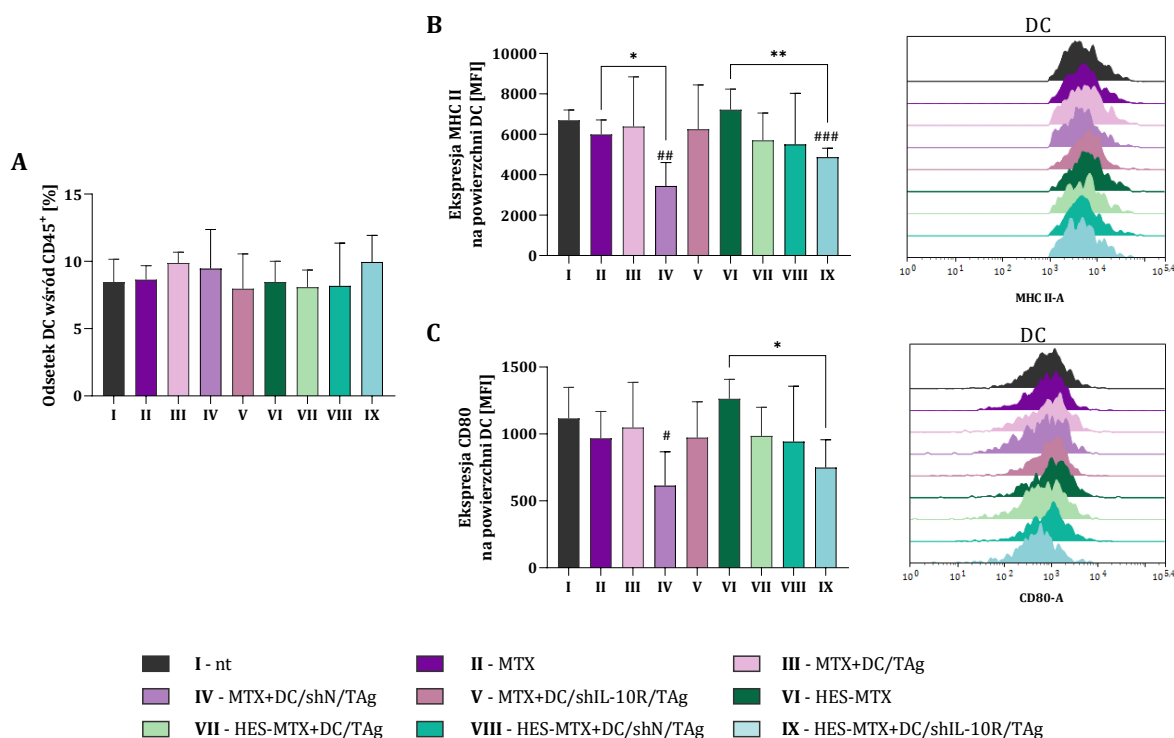
Wprawdzie przeważająca większość limfocytów T napływających do tkanki guzów okazała się pobudzonymi komórkami, jednak wynikiem podawania szczepionek na bazie zmodyfikowanych DC było dodatkowe zwiększenie udziału procentowego efektorowych limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ (Ryc. 59 D, E). W przypadku efektorowych limfocytów Treg najniższy odsetek tych komórek wykazano w grupie MTX + DC/shN/TAg, a najwyższy – w grupie HES-MTX + DC/shIL-10R/TAg (Ryc. 59 F).



Ryc. 60. Ocena nacieku komórek limfoidalnych w guzach nowotworowych MC38 pobranych od myszy poddanych chemioimmunoterapii. Wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} w tkance guza, zidentyfikowano populacje limfocytów CD19⁺ (A) komórek NK (B) i komórek NKT (C) (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 10). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 6-8 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (B) lub nieparametrycznego testu Kruskalla-Wallisa i testu *post hoc* Dunna (A,C). Znaki „#” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a grupą kontrolną – nt; pozostałe istotności pomiędzy grupami są prezentowane w formie klamer i znaków „*” (*#p<0,05; **/#p<0,01; ***p<0,001; ####p<0,0001).

Analiza wielkości populacji limfocytów B napływających do tkanki guzów wykazała, że po zastosowaniu chemioterapeutyków w formie monoterapii doszło do zwiększenia odsetka komórek CD19⁺. Podobny rezultat odnotowano w grupie MTX + DC/shIL-10R/TAg (Ryc. 60 A). Nanokoniugat zastosowany oddzielnie, jak również w połączeniu z DC/TAg lub DC/shIL-10R/TAg spowodował zwiększony napływ komórek NK do tkanki guzów. Najwyższy odsetek tych komórek obserwowano w grupie HES-MTX + DC/shIL-10R/TAg i w porównaniu do grup MTX + DC/shIL-10R/TAg oraz HES-MTX + DC/shN/TAg zmiana ta była istotna statystycznie (Ryc. 60 B). Rezultatem zastosowania immunoterapii, szczególnie w grupach otrzymujących nanokoniugat, był zwiększony udział procentowy komórek NKT. W odniesieniu do kontroli nietraktowanej, wzrost odsetka tych komórek obserwowano w guzach pobranych od myszy z grup: HES-MTX + DC/TAg oraz HES-MTX + DC/shIL-10R/TAg (Ryc. 60 C).

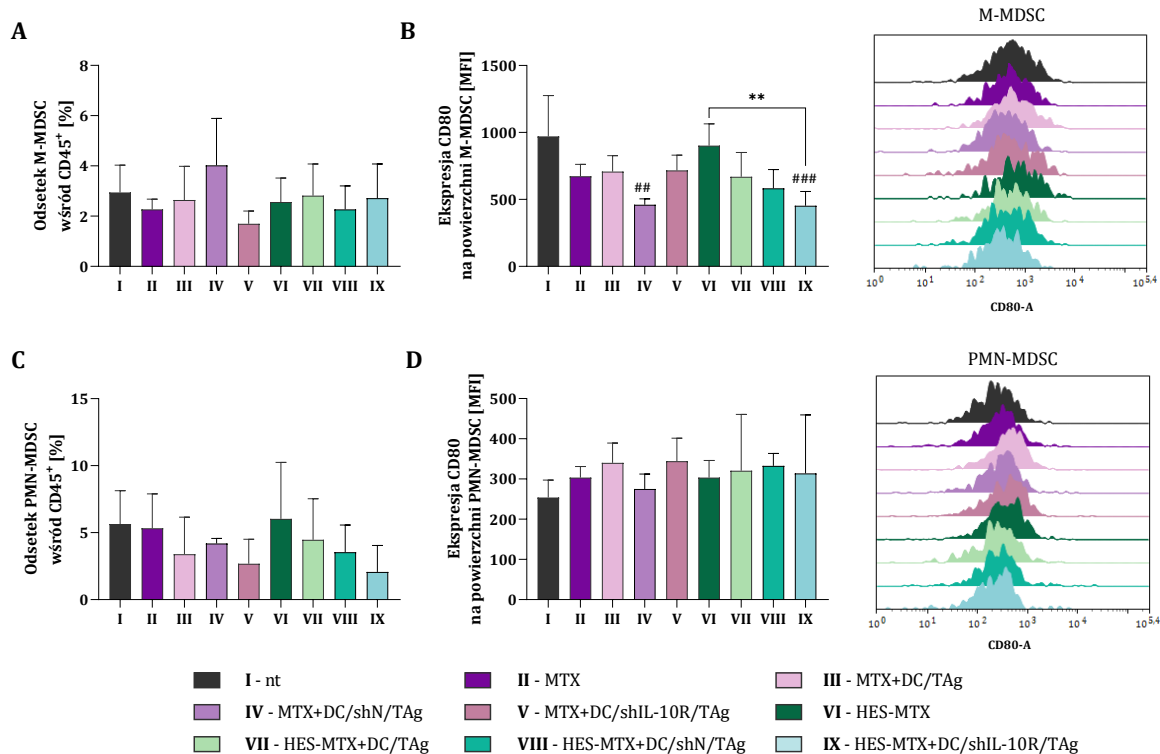
4.5.2.2. Populacje komórek mieloidalnych w guzach MC38



Ryc. 61. Ocena nacieku i stopnia pobudzenia komórek dendrytycznych w guzach nowotworowych myszy poddanych chemioimmunoterapii. Wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} w tkance guza zidentyfikowano populację DC (A) oraz określono ekspresję cząsteczek MHC II (B) oraz CD80 (C) na powierzchni tych komórek (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 14). Ekspresję cząsteczek MHC II i CD80 zaprezentowano jako średnią intensywność fluorescencji (MFI). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 6-8 myszy/grupę. Na histogramach zamieszczono ekspresje cząsteczek MHC II lub CD80 reprezentatywne dla każdej grupy z doświadczenia chemioimmunoterapeutycznego. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (C); nieparametrycznego testu Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna (A) lub testu ANOVA w modyfikacji Browna-Forsythe'a i Welch'a i testu *post hoc* T3 Dunnetta (B). Znaki „#” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a grupą kontrolną – nt; pozostałe istotności pomiędzy grupami są prezentowane w formie klamer i znaków „*” (*#p<0,05; **###p<0,01; ###p<0,001).

Podobnie jak podczas poprzednich doświadczeń terapeutycznych, w celu oceny wpływu chemioimmunoterapii na zmiany w wielkości populacji komórek mieloidalnych napływających do tkanki guzów, przeprowadzono analizę cytometryczną zgodnie ze schematem prezentowanym na Ryc. 14 w podrozdziale 4.2.2.2.

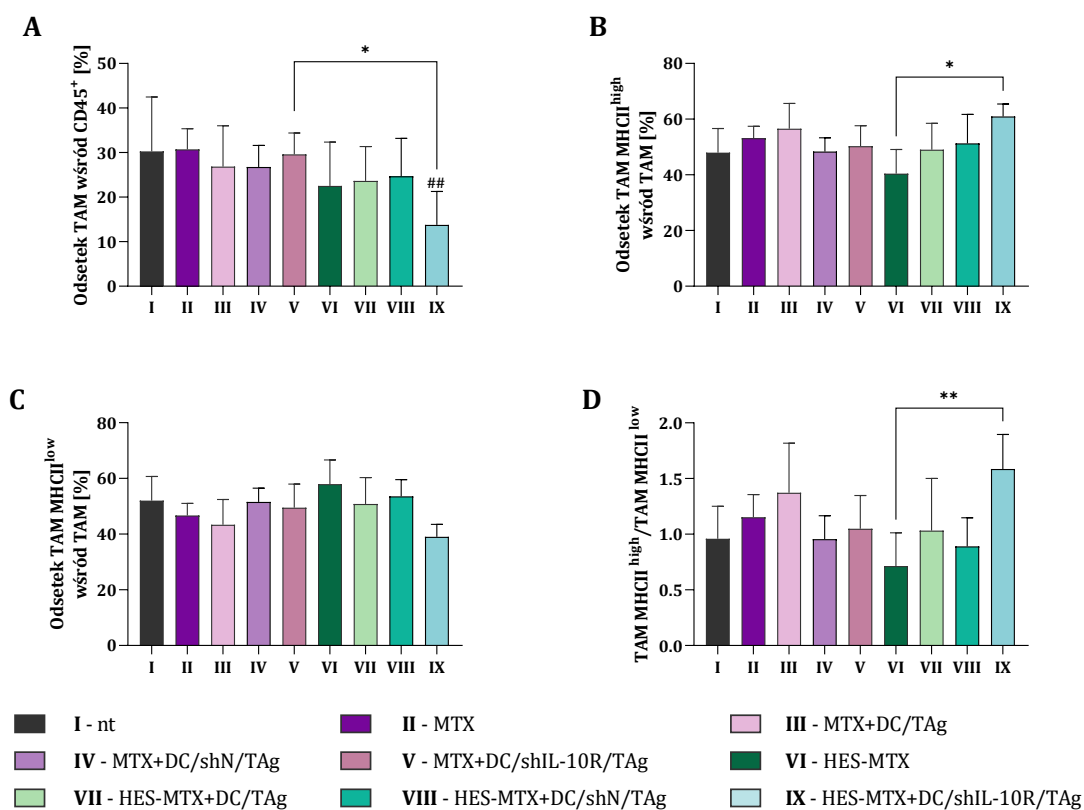
Podczas oceny wielkości populacji DC w tkance nowotworowej nie odnotowano wpływu zastosowanej terapii na znaczące zmiany w odsetku tych komórek (Ryc. 61 A). Analiza stopnia pobudzenia DC w tkance guzów wykazała, że w grupach MTX + DC/shN/TAg oraz HES-MTX + DC/shIL-10R/TAg doszło do istotnego statystycznie obniżenia ekspresji cząsteczek MHC II i CD80 na powierzchni tych komórek (Ryc. 61 B, C).



Ryc. 62. Ocena nacieku i stopnia pobudzenia komórek supresorowych pochodzenia mieloidalnego w guzach nowotworowych MC38 pobranych od myszy poddanych chemioimmunoterapii. Wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} w tkance guza zidentyfikowano populacje M-MDSC (A) i PMN-MDSC (C) na powierzchni których określono ekspresję cząsteczek CD80 (B, D) (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 14). Ekspresję badanych cząsteczek przedstawiono jako średnią intensywność fluorescencji (MFI). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 6-8 myszy/grupę. Na histogramach zamieszczono ekspresje cząsteczek MHC II lub CD80 reprezentatywne dla każdej grupy z doświadczenia chemioimmunoterapeutycznego. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A,C) lub nieparametrycznego testu Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna (B,D). Znaki „#” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a grupą kontrolną – nt; pozostałe istotności pomiędzy grupami są prezentowane w formie klamer i znaków „*“ (**/##p<0,01; ###p<0,001).

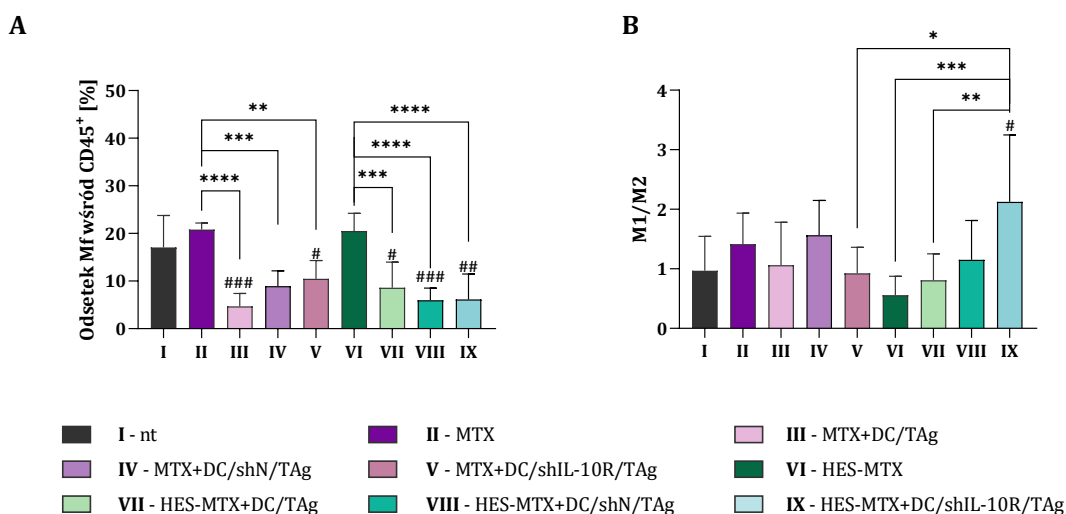
Zastosowana skojarzona terapia nie wpłynęła na wielkość populacji komórek M-MDSC (Ryc. 62 A). Natomiast obserwowano zmniejszenie ekspresji cząsteczki CD80 na powierzchni tych komórek we wszystkich grupach terapeutycznych, w odniesieniu do kontroli nietraktowanej.

Najniższe wartości MFI dla CD80 odnotowano w grupach MTX + DC/shN/TAg oraz HES-MTX + DC/shIL-10R/TAg (Ryc. 62 B). W przypadku komórek PMN-MDSC wykazano, że zastosowanie szczepionek na bazie DC wpłynęło na nieistotnie statystycznie zmniejszenie odsetka PMN-MDSC w tkance guzów. Najmniejsze udziały procentowe tych komórek odnotowano w grupach myszy traktowanych MTX + DC/shIL-10R/TAg oraz HES-MTX + DC/shIL-10R/TAg (Ryc. 62 C). To sugeruje, że zastosowanie DC o obniżonej wrażliwości na IL-10 przyczyniło się do mniejszej infiltracji tkanki nowotworu MC38 przez granulocytarną subpopulację MDSC, jednak ze względu na brak istotności statystycznej wyniki są trudne do jednoznacznej interpretacji. Oceniając stopień pobudzenia komórek PMN-MDSC wykazano, że zastosowane terapie nieznacznie zwiększyły ekspresję cząsteczek CD80 na powierzchni analizowanej populacji komórek mieloidalnych (Ryc. 62 D).



Ryc. 63. Ocena nacieku makrofagów związanych z nowotworem i określenie zmian w proporcji populacji tych komórek o różnej ekspresji cząsteczki MHC II w tkance guzów MC38 pobranych od myszy poddanych chemioimmunoterapii. Wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} w tkance guza zidentyfikowano populację TAM (A) wśród których na podstawie ekspresji cząsteczki MHC II, wyodrębniono komórki TAM MHC II^{high} (B) i TAM MHC II^{low} (C). Uśrednione wartości ilorazu odsetka komórek TAM MHC II^{high} oraz TAM MHC II^{low} (D) uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 6-8 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A) lub testu ANOVA w modyfikacji Browna-Forsythe'a i Welcha i testu *post hoc* T3 Dunnetta (B-D). Znaki „#” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a grupą kontrolną – nt; pozostałe istotności pomiędzy grupami są prezentowane w formie klamer i znaków „*” (*/#p<0,05; **/###p<0,01).

Kolejną populacją komórek ocenianą wśród komórek mieloidalnych w tkance nowotworowej były makrofagi związane z nowotworem (TAM). Analiza cytometryczna wykazała, że jedynie terapia z udziałem nanokoniugatu wpłynęła na zmniejszenie napływu tych komórek do tkanki guzów, a najniższy udział procentowy TAM odnotowano w grupie HES-MTX + DC/shIL-10R/TAg (Ryc. 63 A). Ponadto po zastosowaniu terapii składającej się z nanokoniugatu oraz DC o wyciszzonej ekspresji IL-10R obserwowano z jednej strony najwyższy odsetek komórek TAM MHC II^{high}, a z drugiej – najniższy odsetek komórek TAM MHC II^{low} (Ryc. 63 B, C). W tej grupie myszy odnotowano także najwyższy współczynnik TAM MHC II^{high}/TAM MHC II^{low} (Ryc. 63 D).



Ryc. 64. Ocena nacieku i polaryzacji makrofagów w guzach nowotworowych MC38 pobranych od myszy poddanych chemioimmunoterapii. Wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} w tkance guza zidentyfikowano populację Mf (A). Spośród komórek mieloidalnych (CD11b⁺), na podstawie wewnątrzkomórkowej ekspresji cząsteczki CD206, wyodrębniono populacje makrofagów typu M1 (F4/80⁺CD206⁻) i M2 (F4/80⁺CD206⁺) (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 14) i wyznaczono wartości ilorazu odsetka komórek typu M1 oraz odsetka komórek typu M2 (B). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 6-8 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A, B). Znaki „#” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a grupą kontrolną – nt; pozostałe istotności pomiędzy grupami są prezentowane w formie klamer i znaków „*” (*/#p<0,05; **/##p<0,01; ***/###p<0,001; ****p<0,0001).

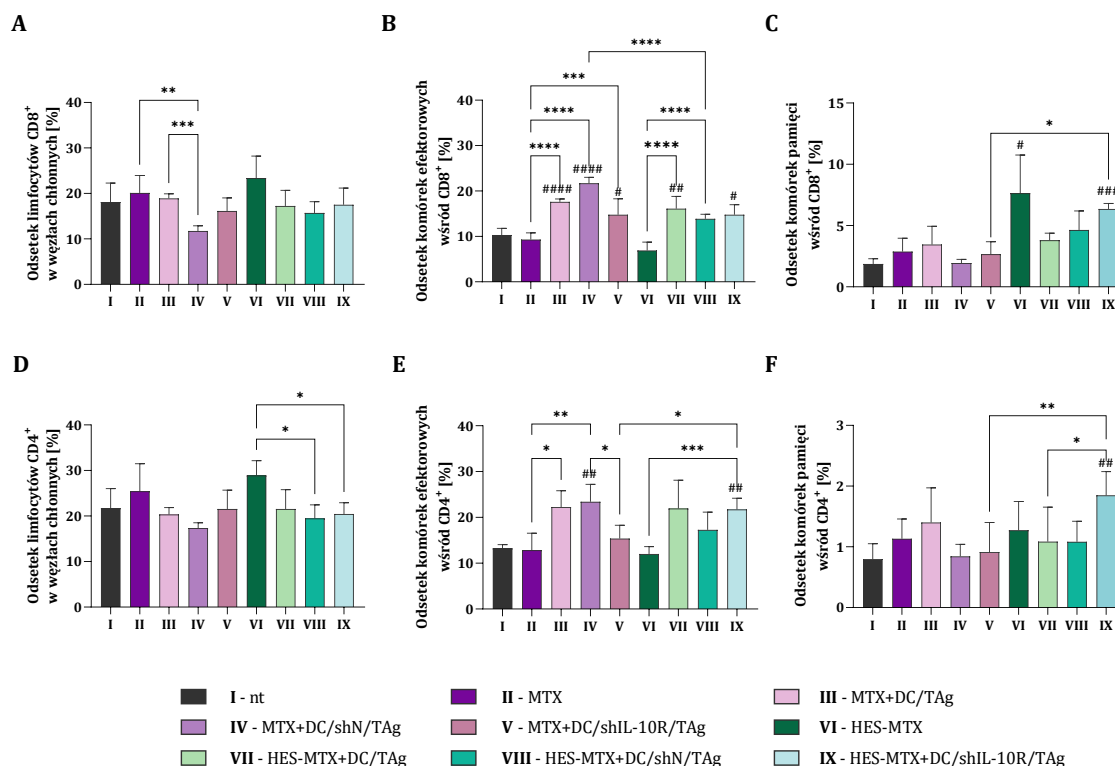
W dalszym etapie wieloparametrycznej analizy określono odsetek makrofagów obecnych w tkance guzów, a także oceniono kierunek polaryzacji wszystkich makrofagów występujących w nowotworze na podstawie ekspresji cząsteczki CD206. Rezultatem zastosowania immunoterapii było gwałtowne obniżenie odsetka Mf, zarówno w odniesieniu do kontroli nietraktowanej, jak również w stosunku do grup otrzymujących jedynie chemioterapeutyki. Niemniej jednak pomiędzy grupami, którym podawano DC nie obserwowano istotnych statystycznie różnic (Ryc. 64 A).

Ocena ekspresji cząsteczki CD206 wykazała, że tylko terapia składająca się z HES-MTX + DC/shIL-10R/TAg spowodowała polaryzację makrofagów występujących w nowotworze w kierunku komórek typu M1. Świadczy o tym najwyższy współczynnik M1/M2, a zmiana ta była

istotna statystycznie w odniesieniu do grupy nietraktowanej oraz MTX + DC/shIL-10R/TAg (Ryc. 64 B).

4.5.2.3. Populacje komórek limfoidalnych w węzłach chłonnych drenujących nowotwór

Wykorzystując analizę cytometryczną, której schemat przedstawiono na Ryc. 38 w podrozdziale 4.3.2.3 wśród komórek wyizolowanych z węzłów chłonnych drenujących nowotwór MC38 wykazano zmiany w populacjach komórek limfoidalnych.

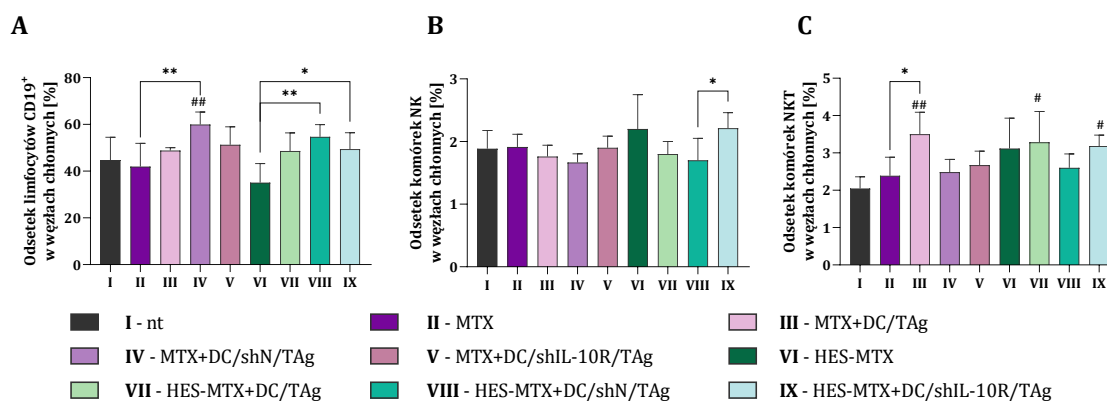


Ryc. 65. Ocena odsetka i poziomu aktywacji limfocytów T w węzłach chłonnych drenujących nowotwór MC38 myszy poddanych chemioimmunoterapii. Wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} w węzłach chłonnych, zidentyfikowano populacje limfocytów T CD8⁺ (A) i CD4⁺ (D). Na podstawie ekspresji cząsteczek CD44 i CD62L wyodrębniono subpopulacje komórek efektorowych (CD62L⁻CD44⁺) oraz komórek pamięci (CD62L⁺CD44⁺) wśród populacji limfocytów T CD8⁺ (B, C) i CD4⁺ (E, F). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy guzów pobranych od 6-8 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A,B); nieparametrycznego testu Kruskalla-Wallisa i testu *post hoc* Dunna (C,F) lub testu ANOVA w modyfikacji Browna-Forsythe'a i Welcha i testu *post hoc* T3 Dunnetta (D,E). Znaki „#” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a grupą kontrolną – nt; pozostałe istotności pomiędzy grupami są prezentowane w formie klamer i znaków „**” (*#p<0,05; **/###p<0,01; ***/####p<0,001; ****/#####p<0,0001).

Obniżenie odsetka limfocytów T CD8⁺ w węzłach chłonnych odnotowano jedynie w grupie MTX + DC/shN/TAg, w pozostałych grupach wielkość populacji tych komórek utrzymała się na poziomie kontroli nietraktowanej (Ryc. 65 A). Rezultatem zastosowania skojarzonej terapii był blisko 2-krotny wzrost odsetka efektorowych komórek CD8⁺, w odniesieniu do kontroli nietraktowanej lub monoterapii (Ryc. 65 B). W przypadku limfocytów T CD8⁺ pamięci, decydujący

wpływ na wzrost populacji miało podanie HES-MTX, a najwyższy odsetek tych komórek obserwowano w grupach: HES-MTX oraz HES-MTX + DC/shIL-10R/TAg (Ryc. 65 C).

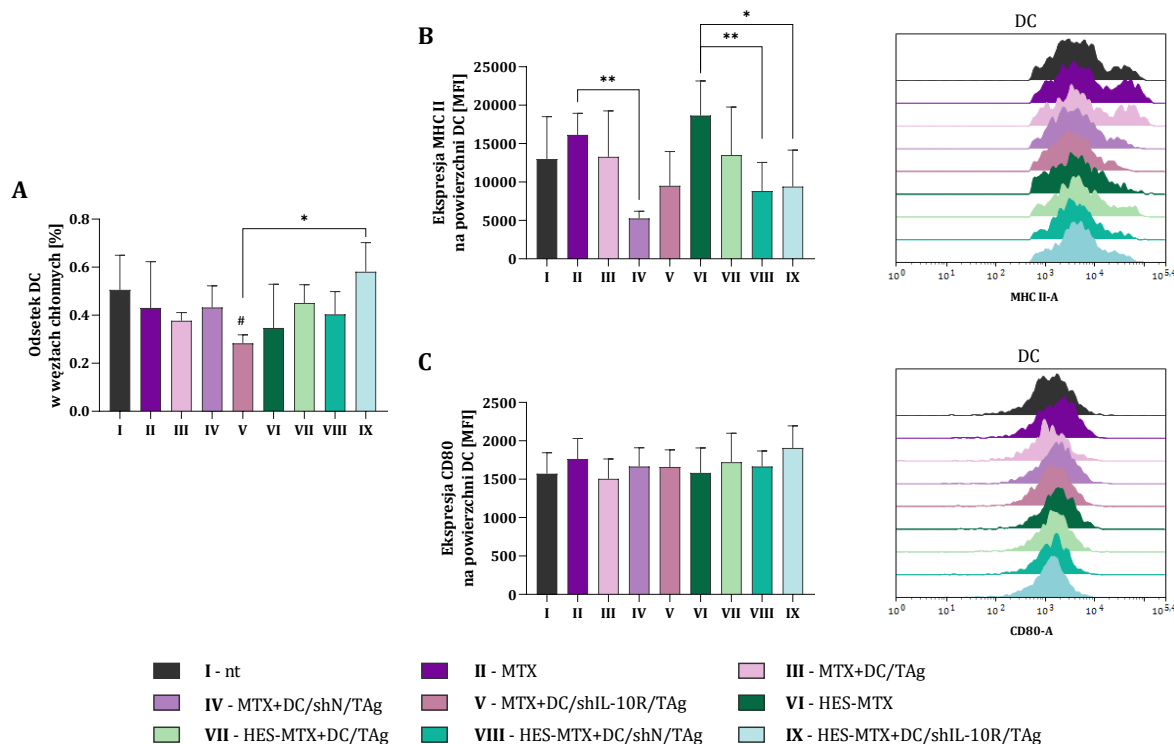
Choć w węzłach chłonnych pobranych od myszy otrzymujących chemioterapeutyki w formie monoterapii odnotowano nieistotne statystycznie zwiększenie udziału procentowego limfocytów T CD4⁺, to zmiany w stopniu ich pobudzenia zostały wywołane po zastosowaniu skojarzonej terapii (Ryc. 65 D). Zwiększenie wielkości populacji efektorowych limfocytów T CD4⁺ odnotowano po zastosowaniu szczepionek na bazie DC, szczególnie w grupach MTX + DC/shN/TAg oraz HES-MTX + DC/shIL-10R/TAg, a w tej ostatniej – wykazano najwyższy odsetek komórek pamięci (Ryc. 65 E, F). Porównując obie grupy myszy, które otrzymywały DC/shIL-10R/TAg, większe pobudzenie limfocytów T stwierdzono w grupie myszy traktowanych HES-MTX + DC/shIL-10R/TAg.



Ryc. 66. Ocena odsetka komórek limfoidalnych w węzłach chłonnych drenujących nowotwór MC38 myszy poddanych chemioimmunoterapii. W trakcie wieloparametrycznej analizy cytometrycznej wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} w węzłach chłonnych, zidentyfikowano populacje limfocytów CD19⁺ (A), komórek NK (B) oraz komórek NKT (C). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy węzłów chłonnych pobranych od 6-8 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (B) lub nieparametrycznego testu Kruskalla-Wallisa i testu *post hoc* Dunna (A,C). Znaki „#” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a grupą kontrolną – nt; pozostałe istotności pomiędzy grupami są prezentowane w formie klamer i znaków „*”, „**” (*#[#]p<0,05; **/#[#]p<0,01).

Analiza wielkości populacji limfocytów B wykazała, że w odniesieniu do grup chemioterapeutycznych, uzupełnienie terapii o transdukowane DC spowodowało zwiększenie odsetka komórek CD19⁺ w węzłach chłonnych. Największą wartość udziału procentowego limfocytów B odnotowano w grupie MTX + DC/shN/TAg (Ryc. 66 A). W przypadku populacji komórek NK stwierdzono zwiększenie ich udziału procentowego w grupie HES-MTX + DC/shIL-10R/TAg, a zmiana ta była istotna statystycznie w odniesieniu do grupy HES-MTX + DC/shN/TAg (Ryc. 66 B). Z kolei, w obrębie populacji komórek NKT wzrost odsetka tych komórek nastąpił w obu grupach myszy otrzymujących DC/TAg oraz w grupie HES-MTX + DC/shIL-10R/TAg (Ryc. 66 C).

4.5.2.4. Aktywność komórek dendrytycznych w węzłach chłonnych drenujących nowotwór MC38

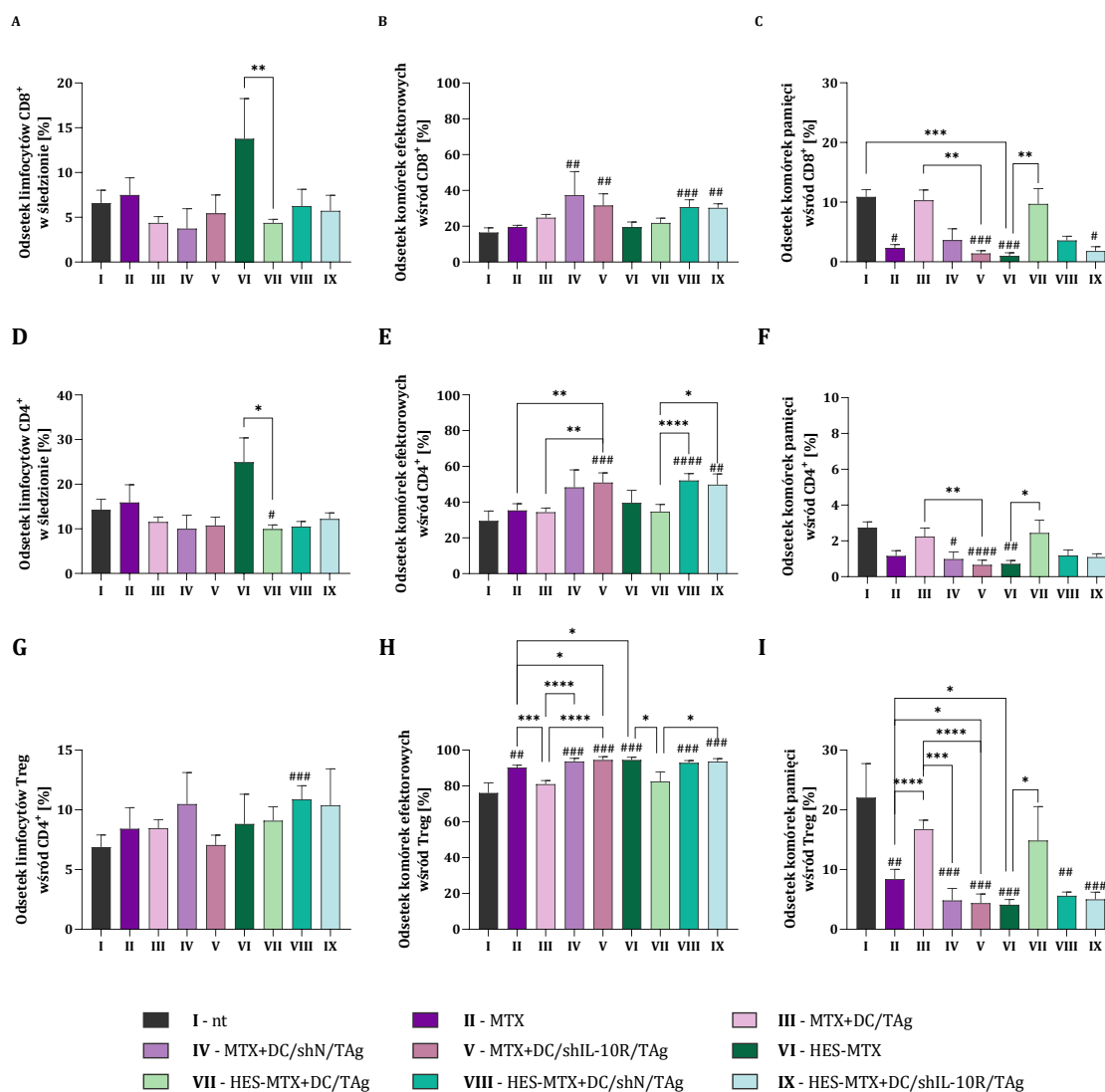


Ryc. 67. Ocena odsetka komórek dendrytycznych oraz stopnia ich pobudzenia w węzłach chłonnych drenujących nowotwór MC38 myszy poddanych chemioimmunoterapii. Wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} w węzłach chłonnych, zidentyfikowano populacje DC (A) na powierzchni których określono ekspresję cząsteczek MHC II (B) i CD80 (C). Ekspresję badanych cząsteczek przedstawiono jako średnią intensywność fluorescencji (MFI) uzyskaną podczas analizy populacji DC. Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy węzłów chłonnych pobranych od 6-8 myszy/grupę. Na histogramach zamieszczono ekspresje cząsteczek MHC II lub CD80 reprezentatywne dla każdej grupy z doświadczenia chemioimmunoterapeutycznego. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (B,C) lub testu ANOVA w modyfikacji Browna-Forsythe'a i Welcha i testu *post hoc* T3 Dunnetta (A). Znaki „#” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a grupą kontrolną – nt; pozostałe istotności pomiędzy grupami są prezentowane w formie klamer i znaków „*” (*#p<0,05; **p<0,01).

Wykorzystując analizę cytometryczną, której schemat przedstawiono na Ryc. 41 w podrozdziale 4.3.2.4 określono wpływ zastosowania skojarzonej terapii na zmiany w aktywności komórek dendrytycznych w węzłach chłonnych. We wszystkich grupach myszy poddanych terapii obserwowano zmniejszenie odsetka DC, a najniższy udział procentowy wykazano w grupie MTX + DC/shIL-10R/TAg. Wyjątek stanowiła grupa HES-MTX + DC/shIL-10R/TAg, w której wielkość populacji DC utrzymała się na poziomie obserwowanym dla kontroli nietraktowanej (Ryc. 67 A). Ponadto komórki dendrytyczne zidentyfikowane w dtLN pobranych od myszy otrzymujących transdukowane DC, cechowała obniżona ekspresja cząsteczek MHC II, podczas gdy ekspresja CD80 pozostała na niezmiennym poziomie (Ryc. 67 B, C).

4.5.3. Ocena ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej u myszy poddanych chemioimmunoterapii

4.5.3.1. Populacje komórek limfoidalnych w śledzionach myszy obciążonych nowotworem MC38

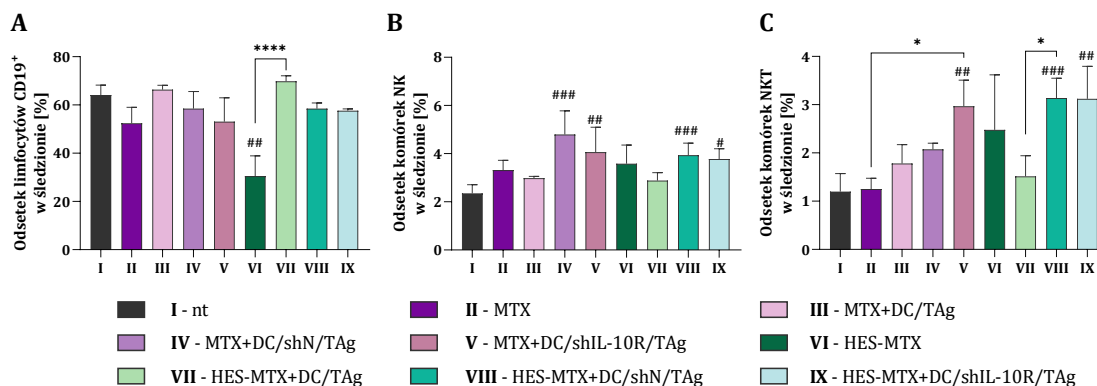


Ryc. 68. Ocena odsetka i poziomu aktywacji limfocytów T w śledzionach myszy obciążonych nowotworem MC38 i poddanych chemioimmunoterapii. Wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} w śledzionie, zidentyfikowano populacje limfocytów T CD8⁺ (A), limfocytów T CD4⁺ (D) oraz limfocytów Treg określonych wśród limfocytów T CD4⁺ (G) (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 21). Zidentyfikowano subpopulacje komórek efektorowych (CD62L⁺CD44⁺) oraz komórek pamięci (CD62L⁺CD44⁺) wśród populacji limfocytów T CD8⁺ (B, C), CD4⁺ (E, F) i Treg (H, I). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy śledzion pobranych od 6-8 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (C-E,G-I) lub nieparametrycznego testu Kruskalla-Wallisa i testu *post hoc* Dunna (A,B,F). Znaki „#” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a grupą kontrolną – nt; pozostałe istotności pomiędzy grupami są prezentowane w formie klamer i znaków „*” (*/#p<0,05; **/#p<0,01; ***/###p<0,001; ****/####p<0,0001).

W kolejnym etapie oceniono wpływ zastosowania chemioimmunoterapii z udziałem nanokoniugatu i szczepionek komórkowych na bazie DC z wyciszoną ekspresją IL-10R na zmiany

w udziale procentowym komórek limfoidalnych w śledzionie. W tym celu przeprowadzono wieloparametryczną analizę cytometryczną splenocytów zgodnie ze schematem prezentowanym na Ryc. 21 w podrozdziale 4.2.3.1.

Ocena udziału procentowego limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ w śledzionach wykazała nieistotne statystycznie zwiększenie odsetka tych komórek w grupie myszy traktowanych HES-MTX w formie monoterapii. Zastosowanie szczepionek na bazie DC, niezależnie od ich rodzaju, spowodowało nieznaczne zmniejszenie wielkości populacji limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺. W grupach myszy, które poza chemioterapeutykiem otrzymywały zmodyfikowane DC, z jednej strony obserwowano wzrost odsetka komórek efektorowych, natomiast z drugiej strony – obniżenie udziału procentowego komórek pamięci w obu populacjach limfocytów T. Znaczące zmniejszenie odsetka komórek pamięci wśród komórek CD4⁺ i CD8⁺ obserwowano także w grupach MTX i HES-MTX (Ryc. 68 A-F). Ponadto wykazano nieistotne statystycznie zwiększenie udziału procentowego limfocytów Treg we wszystkich grupach myszy poddanych terapii, z wyjątkiem grupy MTX + DC/shIL-10R/TAg (Ryc. 68 G). Ocena stopnia pobudzenia komórek Treg wykazała, że zastosowanie chemioterapeutyków samodzielnie lub w połączeniu z transdukowanymi DC skutkowało zwiększeniem odsetka komórek efektorowych, przy jednoczesnym zmniejszeniu wielkości populacji komórek pamięci (Ryc. 68 H, I).

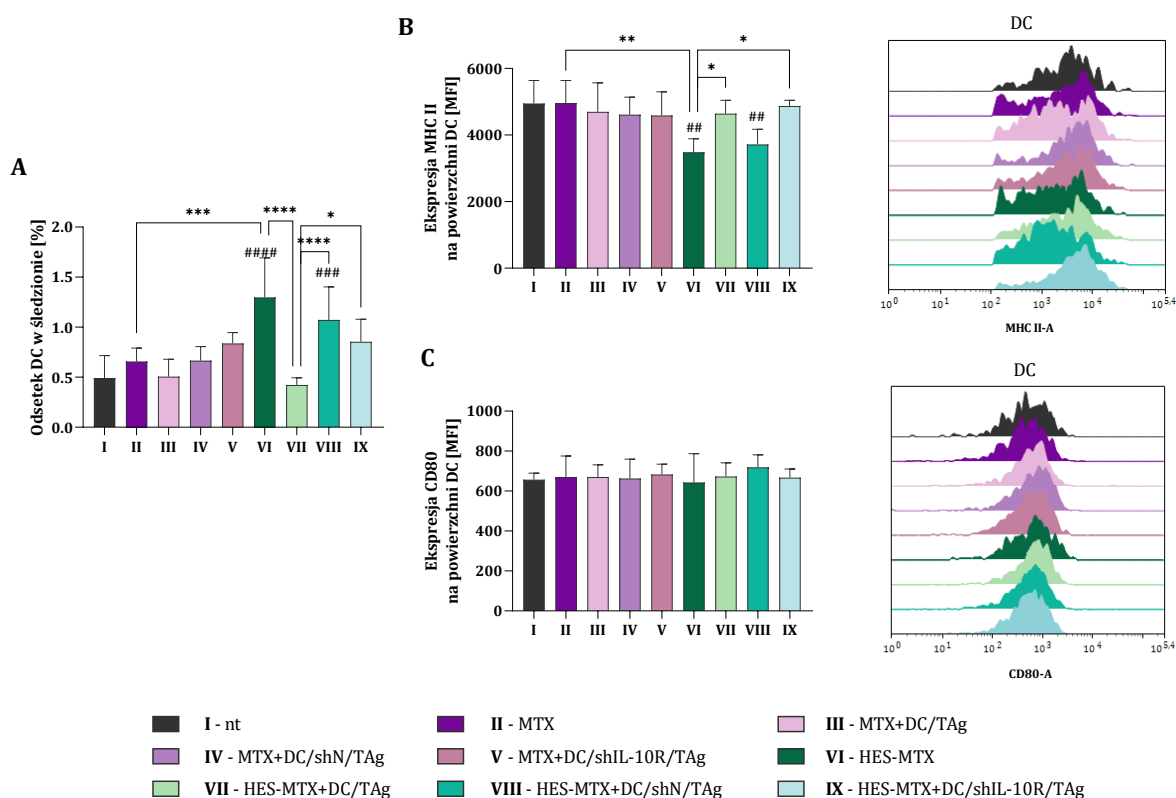


Ryc. 69. Ocena odsetka komórek limfoidalnych w śledzionach myszy obciążonych nowotworem MC38 i poddanych chemioimmunoterapii. Wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} w śledzionie zidentyfikowano populacje limfocytów CD19⁺ (A), komórek NK (B) oraz komórek NKT (C) (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 23). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy śledzion pobranych od 6-8 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu Kruskalla-Wallisa i testu *post hoc* Dunna (A-C). Znaki „#” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a grupą kontrolną – nt; pozostałe istotności pomiędzy grupami są prezentowane w formie klamer i znaków „*” (*#p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001; ****p<0,0001).

Podczas oceny wielkości populacji komórek CD19⁺ w śledzionach pobranych od myszy otrzymujących chemioterapeutyki i DC/TAg odnotowano utrzymywanie się odsetka limfocytów B na poziomie kontroli nietraktowanej, a w przypadku pozostałych grup terapeutycznych – niewielkie obniżenie udziału procentowego tych komórek. Istotnie statystycznie

zmniejszenie wielkości populacji komórek CD19⁺ stwierdzono w grupie HES-MTX (Ryc. 69 A). Wykorzystanie transdukowanych DC w skojarzonej terapii wpłynęło na wzrost odsetka komórek NK, w porównaniu do grupy nietraktowanej (Ryc. 69 B). Z kolei, po zastosowaniu metotreksatu lub nanokoniugatu w połączeniu z DC/shIL-10R/TAg nastąpiło zwiększenie wielkości populacji komórek NKT. Podobny efekt wywołała terapia składająca się z HES-MTX + DC/shN/TAg (Ryc. 69 C).

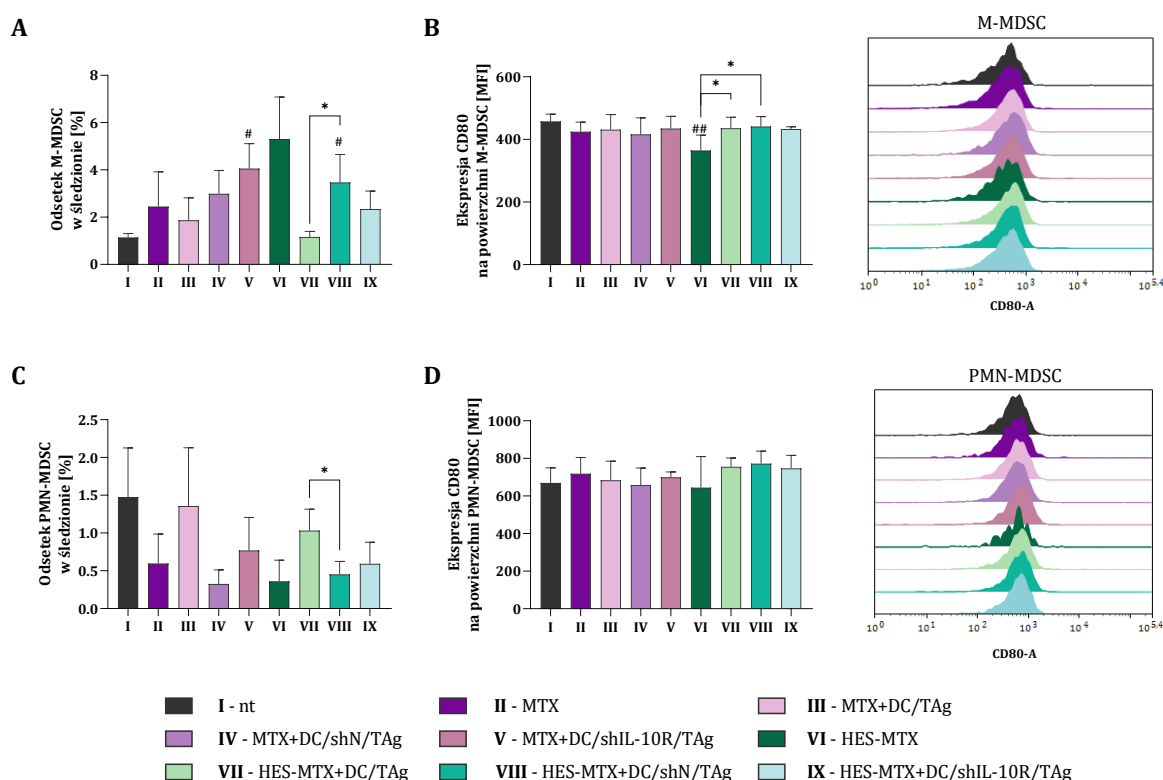
4.5.3.2. Populacje komórek mieloidalnych w śledzionach myszy obciążonych nowotworem MC38



Ryc. 70. Ocena odsetka i stopnia pobudzenia komórek dendrytycznych w śledzionach myszy obciążonych nowotworem MC38 i poddanych chemioimmunoterapii. Wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} w śledzionie zidentyfikowano populację DC (A) oraz określono ekspresję cząsteczek MHC II (B) oraz CD80 (C) na powierzchni tych komórek (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 24). Ekspresję cząsteczek MHC II i CD80 zaprezentowano jako średnią intensywność fluorescencji (MFI). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy śledzion pobranych od 6-8 myszy/grupę. Na histogramach zamieszczono ekspresję cząsteczek MHC II lub CD80 reprezentatywne dla każdej grupy z doświadczenia chemioimmunoterapeutycznego. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (B); nieparametrycznego testu Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna (C) lub testu ANOVA w modyfikacji Browna-Forsythe'a i Welch'a i testu *post hoc* T3 Dunnetta (A). Znaki „#” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a grupą kontrolną – nt; pozostałe istotności pomiędzy grupami są prezentowane w formie klamer i znaków „*” (**p*<0,05; **/###*p*<0,01; ***/####*p*<0,001; ****/#####*p*<0,0001).

W dalszym etapie oceny wpływu skojarzonej terapii na zmiany w ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej, przeprowadzono analizę wielkości populacji komórek

pochodzenia mieloidalnego (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 24 w podrozdziale 4.2.3.2). W przeciwieństwie do grup myszy otrzymujących szczepionki komórkowe oparte na niemodyfikowanych DC/TAg, uzupełnienie chemioterapii o transdukowane DC spowodowało zwiększenie wielkości populacji DC wśród komórek śledzionowych. Istotnie statystycznie zwiększenie odsetka DC odnotowano w grupie HES-MTX + DC/shN/TAg, a także HES-MTX (Ryc. 70 A). Ponadto w tych grupach wykazano obniżenie ekspresji cząsteczek MHC II na powierzchni śledzionowych DC (Ryc. 70 B). Żadna z zastosowanych terapii nie wpłynęła na zmiany w poziomie ekspresji cząsteczek CD80 (Ryc. 70 C).



Ryc. 71. Ocena odsetka i stopnia pobudzenia komórek supresorowych pochodzenia mieloidalnego w śledzionach myszy obciążonych nowotworem MC38 i poddanych chemioimmunoterapii. Wśród komórek CD45⁺DAPI^{neg} w śledzionie zidentyfikowano populacje M-MDSC (A) i PMN-MDSC (C) na powierzchni których określono ekspresję cząsteczek CD80 (B, D) (zgodnie ze schematem analizy przedstawionej na Ryc. 24). Ekspresję badanych cząsteczek przedstawiono jako średnią intensywność fluorescencji (MFI). Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy śledzion pobranych od 6-8 myszy/grupę. Na histogramach zamieszczono ekspresję cząsteczek CD80 reprezentatywne dla każdej grupy z doświadczenia chemioimmunoterapeutycznego. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (B-D) lub testu ANOVA w modyfikacji Browna-Forsythe'a i Welcha i testu *post hoc* T3 Dunnetta (A). Znaki „#” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a grupą kontrolną – nt; pozostałe istotności pomiędzy grupami są prezentowane w formie klamer i znaków „*” (*#p<0,05; **p<0,01).

W grupach myszy, które poddano terapii (z wyjątkiem HES-MTX + DC/TAg) obserwowano zwiększony udział procentowy komórek M-MDSC w śledzionie. Najwyższy odsetek tych komórek wykazano w grupie HES-MTX, jednak w porównaniu do kontroli nieleczonej istotne

statystycznie zwiększenie wielkości tej populacji komórek odnotowano w grupach MTX + DC/shIL-10R/TAg oraz HES-MTX + DC/shN/TAg (Ryc. 71 A). Niewielkie obniżenie poziomu ekspresji cząsteczki CD80 na powierzchni śledzionowych M-MDSC stwierdzono po zastosowaniu HES-MTX w formie monoterapii (Ryc. 71 B). W przypadku populacji PMN-MDSC wykazano, że zmniejszenie odsetka tych komórek, choć nieistotne statystycznie, nastąpiło po podaniu chemioterapeutyków stosowanych samodzielnie lub w połączeniu ze szczepionkami na bazie transdukowanych DC (Ryc. 71 C). Nie stwierdzono zmian w stopniu pobudzenia PMN-MDSC zachodzących pod wpływem terapii – wartości MFI dla ekspresji cząsteczek CD80 na ich powierzchni były na jednakowym poziomie we wszystkich grupach myszy (Ryc. 71 D).

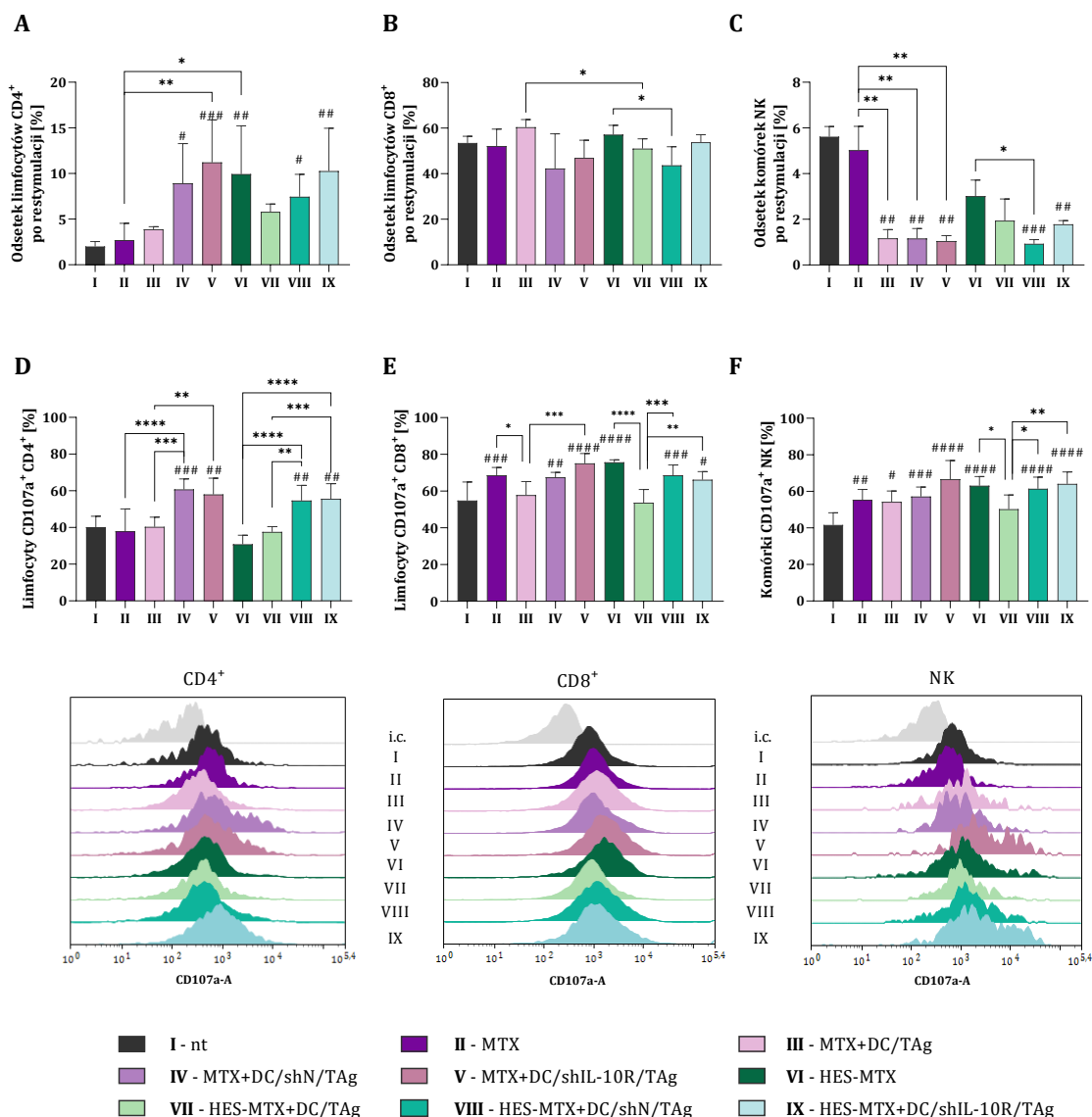
4.5.3.3. Zdolność komórek śledzionowych do aktywowania swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej w następstwie ponownego kontaktu z komórkami MC38

Podobnie jak przedstawiono w podrozdziale 4.3.3.3., ocenę zmian w ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej wykonano w oparciu o analizę fenotypu powierzchniowego i profilu cytokinowego restymulowanych komórek śledzionowych, a także określono ich aktywność cytotoksyczną względem komórek nowotworowych.

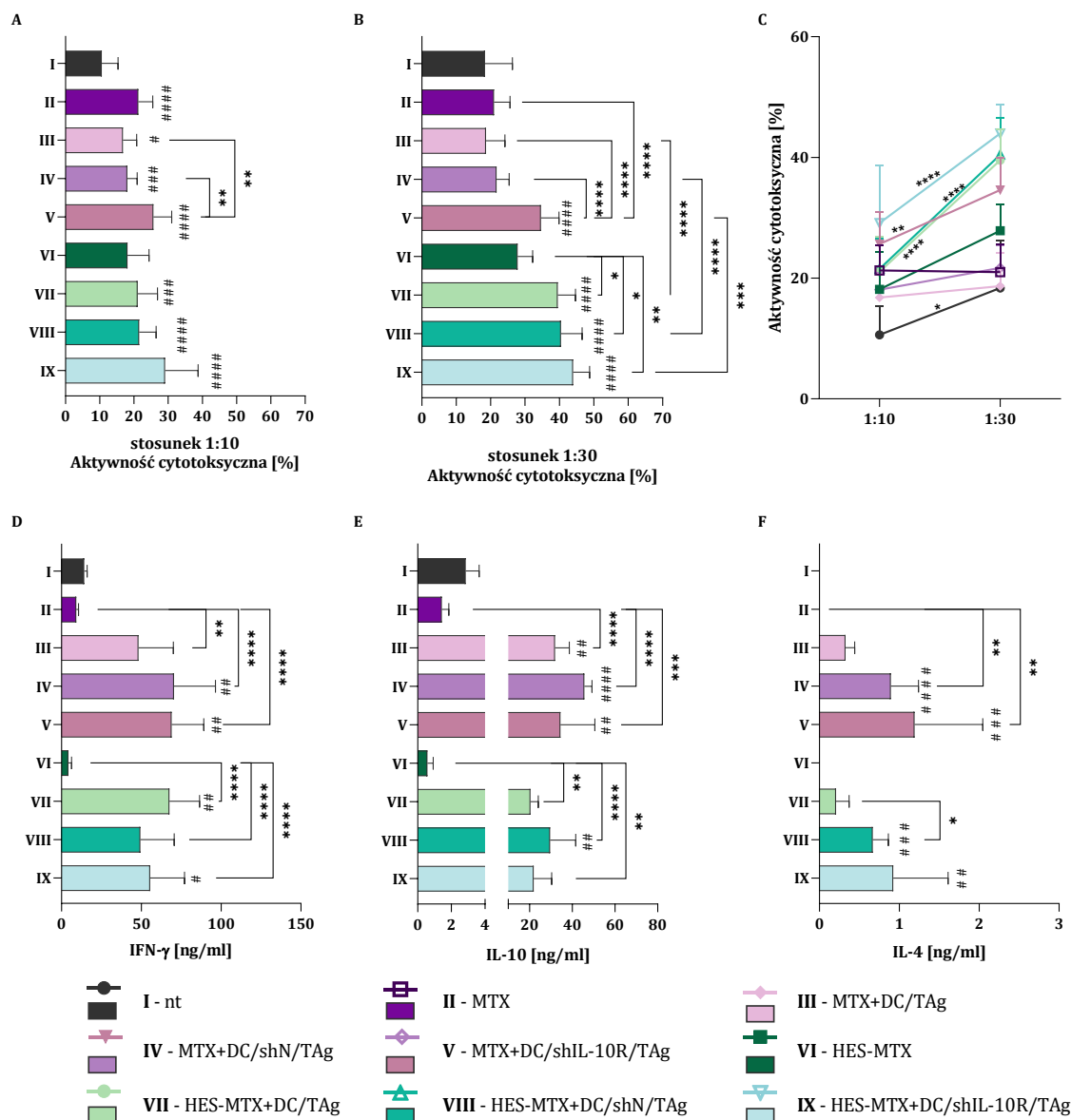
Analizę rozpoczęto od porównania efektów podania chemioterapeutyków w formie monoterapii, na wielkość populacji limfocytów T CD4⁺. W wyniku restymulacji stwierdzono znaczące zwiększenie ich odsetka w grupie myszy otrzymujących nanokoniugat. Uzupełnienie chemioterapii o DC/shN/TAg lub DC/shIL-10R/TAg, spowodowało istotny statystycznie wzrost udziału procentowego komórek CD4⁺, przy czym najwyższy odsetek odnotowano w grupach MTX + DC/shIL-10R/TAg oraz HES-MTX + DC/shIL-10R/TAg (Ryc. 72 A). Nieco inaczej po restymulacji zmieniała się wielkość populacji limfocytów T CD8⁺. Zastosowanie chemioterapeutyków nie wpłynęło na wysokość odsetka tych komórek. Zaobserwowano natomiast obniżenie ich udziału procentowego po zastosowaniu transdukowanych DC, w porównaniu do kontroli nietraktowanej (Ryc. 72 B). Stwierdzono również, gwałtowne obniżenie odsetka komórek NK, a efekt ten był podobny we wszystkich grupach otrzymujących immunoterapię, niezależnie od rodzaju szczepionkowych komórek (Ryc. 72 C).

Ocena ekspresji cząsteczki CD107a na powierzchni limfocytów T CD4⁺ ujawniła, że komórki śledzionowe pobrane od myszy otrzymujących transdukowane DC cechowała większa zdolność do wydzielania ziaren cytolitycznych (Ryc. 72 D). W przypadku limfocytów T CD8⁺, wyższy odsetek komórek CD107a⁺ wykazano w grupach myszy otrzymujących chemioterapeutyki w formie monoterapii oraz w połączeniu z transdukowanymi DC (Ryc. 72 E). Natomiast wzrost odsetka komórek CD107a⁺NK odnotowano we wszystkich traktowanych grupach, a najwyższe

udziały procentowe tych komórek stwierdzono w grupach MTX + DC/shIL-10R/TAg oraz HES-MTX + DC/shIL-10R/TAg (Ryc. 72 F).



Ryc. 72. Ocena odsetka komórek limfoidalnych wśród restymulowanych splenocytów pobranych od myszy obciążonych nowotworem MC38 i poddanych chemioimmunoterapii. Odsetek limfocytów T CD4⁺ (A) CD8⁺ (B) oraz komórek CD49⁺ (C) określono wśród restymulowanych splenocytów z komórkami MC38 w 5-dniowej hodowli mieszanej. Odsetek komórek CD107a⁺ określono wśród limfocytów T CD4⁺ (D), T CD8⁺ (E) i komórek NK (F) po 2-godzinnej inkubacji restymulowanych splenocytów z komórkami MC38. Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy składników pobranych od 6-8 myszy/grupę. Na histogramach zamieszczono ekspresję cząsteczek CD107a reprezentatywnie dla każdej grupy z doświadczenia chemioimmunoterapeutycznego. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (D,F); nieparametrycznego testu Kruskala-Wallisa i testu *post hoc* Dunna (A,C) lub testu ANOVA w modyfikacji Browna-Forsythe'a i Welcha i testu *post hoc* T3 Dunnetta (B,E). Znaki „#” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a grupą kontrolną – nt; pozostałe istotności pomiędzy grupami są prezentowane w formie klamer i znaków „**” (*#p<0,05; **/###p<0,01; ***/####p<0,001; ****/#####p<0,0001).



Ryc. 73. Aktywność restymulowanych splenocytów pobranych od myszy obciążonych nowotworem MC38 i poddanych chemioimmunoterapii. Aktywność cytotokсыczną restymulowanych komórek śledzionowych wobec komórek nowotworowych przedstawiono jako odsetek martwych komórek MC38 po 4-godzinnej inkubacji z komórkami efektorowymi w stosunku 1:10 i 1:30 (A, B, C). Stężenie IFN- γ (D), IL-10 (E) i IL-4 (F) określono w nadsączach z nad 5-dniowej hodowli mieszanej splenocytów i komórek MC38. Na wykresach przedstawiono uśrednione wartości (+SD) uzyskane podczas analizy śledzion pobranych od 6-8 myszy/grupę. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą parametrycznego testu ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a (A); nieparametrycznego testu Kruskalla-Wallisa i testu *post hoc* Dunna (D-F) lub testu ANOVA w modyfikacji Browna-Forsythe'a i Welcha i testu *post hoc* T3 Dunnetta (A-B). Znaki „#” znajdujące się nad słupkami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy daną grupą a grupą kontrolną – nt. Pozostałe istotności pomiędzy grupami są prezentowane w formie klamer i znaków „*„. Znaki „*„ znajdujące się nad liniami na Ryc. 73 F prezentują istotność statystyczną pomiędzy aktywnością cytotokсыczną w stosunkach 1:10 i 1:30 w obrębie danej grupy (*# $p < 0,05$; **/# $p < 0,01$; ***/### $p < 0,001$; ****/#### $p < 0,0001$).

Chociaż na podstawie udziału procentowego komórek CD107a⁺ nie wykazano różnic pomiędzy grupami otrzymującymi transdukowane DC, to zmiany zależne od rodzaju terapii obserwowano w aktywności cytotokсыcznej restymulowanych komórek śledzionowych.

Największy odsetek martwych komórek MC38, zarówno w stosunku 1:10, jak również 1:30, odnotowano w grupie HES-MTX + DC/shIL-10R/TAg i w odniesieniu do grupy MTX + DC/shIL-10R/TAg zmiana ta była statystycznie istotna (Ryc. 73 A-C).

Analiza stężeń cytokin w nadsączach znad 5-dniowej hodowli mieszanej wykazała, że zastosowanie w skojarzonej terapii komórek dendrytycznych, niezależnie od ich rodzaju, zwiększyło zdolność splenocytów do wydzielania IFN- γ , IL-10 oraz IL-4 (Ryc. 73 D-F). W odniesieniu do grupy MTX + DC/TAg, użycie w terapii MTX i transdukowanych DC wpłynęło na wzmożoną produkcję IFN- γ przez restymulowane komórki śledzionowe. Z kolei, po zastosowaniu nanokoniugatu obserwowano tendencję odwrotną – splenocyty pobrane od myszy otrzymujących HES-MTX i transdukowane DC produkowały mniej IFN- γ niż z grupy HES-MTX + DC/TAg (Ryc. 73 D). W nadsączach znad komórek śledzionowych pobranych od myszy otrzymujących nanokoniugat odnotowano niższe stężenia IL-10 niż w grupach traktowanych MTX. Ponadto stwierdzono tendencję wskazującą na nieznaczny wzrost stężenia tej cytokiny w obu grupach otrzymujących DC/shN/TAg, niezależnie od użytego chemioterapeutyku (Ryc. 73 E). Natomiast najwyższe stężenia IL-4 wykazano po podaniu DC z wyciszoną ekspresją IL-10R (Ryc. 73 F).

4.5.4. Podsumowanie

Efektem zastosowania terapii składającej się z nanokoniugatu i DC/shIL-10R/TAg było znaczące zahamowanie wzrostu nowotworu (TGI 77%). Mimo iż w grupie myszy otrzymujących HES-MTX i DC/shN/TAg wyliczone TGI było umiarkowanie wysokie (TGI 54%), to jedynie zastosowanie DC o obniżonej wrażliwości na IL-10 umożliwiło rozwinięcie skutecznej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Pod wpływem terapii z udziałem HES-MTX + DC/shIL-10R/TAg doszło do znaczących zmian w mikrośrodkowisku nowotworowym – z jednej strony obserwowano zwiększony napływ limfocytów T CD4⁺ oraz komórek NK do tkanki guzów, a z drugiej – zmniejszenie wielkości populacji komórek supresorowych takich jak PMN-MDSC oraz TAM. Ponadto jedynie w tej grupie myszy wykazano korzystną polaryzację nowotworowych makrofagów – wyliczony współczynnik M1/M2 był najwyższy, co wskazuje na dominację populacji komórek typu M1 w tkance guzów. Warto podkreślić, że takich zmian nie obserwowano w grupie myszy MTX + DC/shIL-10R/TAg.

Analiza poziomu aktywacji limfocytów T w węzłach chłonnych wykazała, że po zastosowaniu immunoterapii doszło do zwiększenia odsetka komórek efektorowych, a w wyniku terapii skojarzonej z HES-MTX oraz DC/shIL-10R/TAg nastąpiło ponadto zwiększenie populacji komórek pamięci.

Oceniając ogólnoustrojową odpowiedź przeciwnowotworową odnotowano, że zmiany w odsetku poszczególnych populacji komórek układu odpornościowego w śledzionach, zostały wywołane pod wpływem transdukowanych komórek dendrytycznych. Jednak pomiędzy grupami myszy otrzymującymi DC/shN/TAg lub DC/shIL-10R/TAg nie obserwowano istotnych różnic. Pomimo że w obu grupach myszy traktowanych komórkami dendrytycznymi z wyciszoną ekspresją IL-10R nie wykazano zmian w odsetku komórek CD107a⁺, to splenocyty pobrane od myszy otrzymujących HES-MTX + DC/shIL-10R/TAg najskuteczniej eliminowały komórki nowotworowe. W tej grupie myszy aktywność cytotoksyczna komórek śledzionowych była największa, o czym świadczy najwyższy odsetek martwych komórek MC38.

4.6. Końcowe podsumowanie wyników

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że po zastosowaniu monoterapii z udziałem nanokoniugatu nastąpiło znaczne zahamowanie wzrostu guzów MC38, a najlepszy efekt terapeutyczny wywołało podanie 20 mg/kg HES-MTX. W krótkim czasie od jego podania doszło do immunomodulacji, co potwierdzono na poziomie lokalnej i ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Wśród leukocytów napływających do tkanki guzów stwierdzono wzrost udziału procentowego komórek o funkcjach efektorowych (limfocytów T CD8⁺, komórek NK i NKT). Ponadto odnotowano zwiększoną polaryzację makrofagów w kierunku komórek typu M1. Jednak zastosowanie chemioterapeutyku nie spowodowało redukcji wielkości obu subpopulacji komórek MDSC w tkance guzów. Analizując kinetykę zmian w lokalnej odpowiedzi odpornościowej wykazano długotrwały wpływ tej terapii na mikrośrodowisko nowotworowe. W przypadku ogólnoustrojowej odpowiedzi odpornościowej, największe zmiany w wielkości populacji leukocytów w śledzienie stwierdzono jedynie w 3. dniu terapii, a świadczył o tym wzrost odsetka limfocytów T CD8⁺, komórek NK i NKT. Co więcej, wykazano zwiększoną zdolność splenocytów do eliminacji komórek MC38.

Powyższe wyniki wskazują, że w 3. dniu po podaniu najwyższej dawki nanokoniugatu zostały stworzone odpowiednie warunki do aktywowania swoistej odpowiedzi odpornościowej. Zatem zasadnym było okołoguzowe podawanie szczepionek na bazie dojrzałych komórek dendrytycznych począwszy od 3. dnia terapii. Zastosowanie nanokoniugatu w dawce 20 mg/kg uzupełnione o wielokrotne iniekcje komórkami dendrytycznymi stymulowanymi lizatem z komórek nowotworowych MC38 (DC/TAg) spowodowało wzrost nowotworu. Ponadto stwierdzono tendencję wskazującą na zwiększony napływ efektorowych komórek układu odpornościowego do tkanki guza po zastosowaniu takiej terapii. Zmianom tym towarzyszył najniższy odsetek komórek o cechach supresorowych, w tym Mf i PMN-MDSC. Wykazano także zwiększone wydzielanie ziaren cytolitycznych przez restymulowane splenocyty, czemu towarzyszyła większa aktywność cytotoksyczna tych komórek.

W celu pogłębienia efektu terapeutycznego immunoterapii, podjęto decyzję o zmniejszeniu podatności szczepionkowych komórek dendrytycznych na negatywny wpływ mikrośrodowiska nowotworowego. Ze względu na obecność czynników supresorowych, takich jak IL-10, szczepionkowe komórki dendrytyczne poddano transdukcji lentiwirusowej prowadzącej do wyciszenia receptora tej cytokiny. Zastosowanie TAg jako czynnika indukującego dojrzewanie DC powodowało zwiększenie ekspresji IL-10R, tym bardziej uzasadnionym było wykorzystanie w skojarzonej terapii DC/shIL-10R/TAg.

Rezultatem terapii składającej się z nanokoniugatu i wielokrotnych okołoguzowych podań DC/shIL-10R/TAg było znaczące zahamowanie wzrostu nowotworu, a objętości guzów w tej grupie były aż o 77% mniejsze niż w grupie nietraktowanej. Warto dodać, że zmiana ta była

także istotna statystycznie w odniesieniu do grupy HES-MTX + DC/TAg. Pod wpływem zastosowania HES-MTX + DC/shIL-10R/TAg nastąpiły zmiany w lokalnej i ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Wykazano zwiększenie napływu efektorowych komórek układu odpornościowego do tkanki guzów (limfocyty T CD4⁺, komórki NK), przy jednoczesnej redukcji wielkości populacji komórek o cechach supresorowych (PMN-MDSC, TAM, makrofagi typu M2). Korzystny wpływ tej terapii odnotowano także na poziomie aktywności splenocytów, które w wyniku restymulacji *ex vivo*, wydajnie eliminowały komórki nowotworowe MC38.

Biorąc pod uwagę wyniki z przeprowadzonych doświadczeń terapeutycznych wnioskuję, że w przeciwieństwie do MTX, po podaniu nanokoniugatu doszło do wytworzenia odpowiedniej niszy środowiskowej. Umożliwiło to rozwój skutecznej odpowiedzi przeciwnowotworowej zainicjowanej przez szczepionkowe komórki dendrytyczne, a efekt terapeutyczny został zwiększony w rezultacie zastosowania DC o obniżonej wrażliwości na działanie, obecnej w nowotworze MC38, IL-10.

5. Dyskusja

Komórki dendrytyczne ze względu na zdolność wydajnej prezentacji antygenów, najskuteczniej pobudzają limfocyty T i z tego powodu są uważane za ważny element odpowiedzi przeciwnowotworowej. Na tej podstawie opracowano schematy immunoterapii, w których wykorzystuje się szczepionki na bazie DC różnicowanych i stymulowanych *ex vivo*, w nadziei, że dostarczenie takich DC pozwoli na reaktywację odpowiedzi odpornościowej skierowanej przeciwko komórkom nowotworowym. Pomimo obiecujących rezultatów osiągniętych we wczesnych fazach badań klinicznych, szczepionki na bazie DC nie wywołują długotrwałego efektu terapeutycznego w postaci spowolnienia rozwoju choroby nowotworowej. Jednym z powodów obniżających skuteczność immunoterapii jest obecność IL-10 w mikrośrodowisku nowotworu, która zaburza prawidłowe funkcjonowanie szczepionkowych DC. Z tego względu w badaniach przedklinicznych podejmowane są próby odpowiedniego przygotowania DC, które będą zdolne do inicjowania wydajnej odpowiedzi przeciwnowotworowej w niekorzystnych warunkach panujących w TME. Ponadto w celu zwiększenia skuteczności immunoterapii schematy leczenia rozszerza się o podanie leków cytostatycznych. Zastosowanie chemioterapeutyków zapewnia eliminację komórek nowotworowych, a dodatkowo może wspomagać aktywację odpowiedzi przeciwnowotworowej. Wykazano, że niektóre cytostatyki, użyte w odpowiednich dawkach mogą działać immunomodulująco, poprzez zmniejszanie wielkości populacji komórek o cechach supresorowych, a także mogą zwiększać właściwości cytotoksyczne komórek efektorowych [Landreneau i in. 2015]. Ponadto w celu poprawy efektu terapeutycznego chemioterapii, cytostatyki przyłącza się do nośników zapewniających korzystniejszą dystrybucję leku w organizmie.

W niniejszej pracy zastosowano skojarzoną terapię przeciwnowotworową opartą na immunomodulującej dawce nanokoniugatu metotreksatu i hydroksyetyloskrobi (HES-MTX) oraz komórkach dendrytycznych z wyciszoną ekspresją receptora IL-10 w modelu mysiego raka jelita grubego MC38.

Jednym z powodów obniżenia efektu terapeutycznego chemioterapii opartej na niskocząsteczkowych związkach, takich jak MTX, jest szybkie wydalanie leku z organizmu. Ponadto nadrzędnym celem zastosowania chemioterapeutyków jest eliminacja komórek nowotworowych, jednak ze względu na niską specyficzność cytostatyków uszkodzeniu mogą ulegać także komórki prawidłowe w organizmie. Aby ominąć powyższe problemy prowadzone są badania nad opracowaniem systemu selektywnego dostarczania preparatów, który doprowadzi do ukierunkowanej akumulacji leku w tkance guzów. Przykładem takiego rozwiązania jest nanokoniugat HES-MTX, którego aktywność przeciwnowotworową określano w niniejszej pracy doktorskiej.

Skoniugowanie MTX z HES miało na celu zmianę rozprowadzania chemioterapeutyku w organizmie oraz zwiększenie specyficzności jego działania względem tkanek docelowych. Ważnym aspektem biodystrybucji nanokoniugatu jest efekt zwiększonej przepuszczalności i retencji naczyń (EPR), który zakłada, że nanocząsteczki o średnicy hydrodynamicznej (d_H) większej niż 10 nm, są selektywnie przepuszczane przez naczynia krwionośne obecne w nowotworze [Maeda 2010; Fang i in. 2011; Golombek i in. 2018]. Efekt EPR jest często obserwowany w guzach litych, głównie ze względu na szybką angiogenezę prowadzącą do uformowania nieprawidłowych naczyń krwionośnych, które cechuje zwiększona aktywność metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej, warunkująca ich dużą przepuszczalność [Maeda i in. 2000; Kobayashi i in. 2013; Goos i in. 2020]. Według przeprowadzonej analizy fizykochemicznej, wartość d_H dla cząsteczki HES-MTX wynosi $15,2 \pm 6,2$ nm [Goszczyński i in. 2014], zatem może podlegać wspomnianemu efektowi EPR. Należy wspomnieć, że MTX przedostaje się do komórek wykorzystując zredukowany przenośnik folianów (RFC), co determinuje jego ogólnoustrojową toksyczność, gdyż RFC występuje także na komórkach prawidłowych [Visentin i in. 2012; Abolmaali i in. 2013; Hao i in. 2019]. Natomiast poprzez przyłączenie do 1 cząsteczki hydroksyetyloskrobi ok. 50 cząsteczek metotreksatu [Goszczyński i in. 2014], taki preparat zyskuje cechy poliwalentności [Thomas i in. 2011, 2012]. To z kolei umożliwia interakcję HES-MTX z podjednostką α receptora folianów (FR α) o wyższej stałej wiązania w porównaniu do wolnej formy MTX. Na tej podstawie przyjęto założenie, że siła oddziaływania nanokoniugatu z komórkami nowotworowymi będzie zależała od poziomu ekspresji FR α na ich powierzchni. Otrzymane wyniki potwierdziły tę hipotezę. Spośród badanych mysich linii nowotworowych, komórki MC38 cechowała najwyższa ekspresja FR α , ponadto komórki te charakteryzowały się największą wrażliwością na nanokoniugat w warunkach *in vitro*. Zależna od receptorów folianów aktywność przeciwnowotworowa różnych typów koniugatów metotreksatu, została także potwierdzona przez inne zespoły badawcze. Álvarez-González i in. dowiedli, że aktywność antyproliferacyjna koniugatu MTX i nanocząsteczek złota wobec komórek ludzkiego nowotworu jelita grubego HTC-116 była związana z obecnością receptorów folianów na ich powierzchni [Álvarez-González i in. 2020]. Podobne wnioski płyną z badań przeprowadzonych przez zespół Chen i in., którzy wykazali zahamowanie proliferacji ludzkich komórek raka nabłonkowego KBv pod wpływem miceli skoniugowanych z MTX [Chen i in. 2015]. Chociaż w przytoczonych publikacjach autorzy nie precyzują, która podjednostka FR ma nadrzędne znaczenie w tym zakresie, postawiona przez nich hipoteza została potwierdzona.

Badania *in vitro* przeprowadzone w ramach niniejszej pracy wykazały, że w porównaniu do MTX, nanokoniugat HES-MTX wykazywał ok. 10-krotnie słabszy efekt antyproliferacyjny wobec komórek MC38. Jest to zgodne z wynikami uzyskanymi przez Goszczyńskiego i in., którzy udowodnili, że HES-MTX blisko 10-krotnie słabiej hamował proliferację komórek białaczki

zarówno mysiej (P388), jak i ludzkiej (MV4-11) [Goszczyński i in. 2014]. W tym miejscu należy zwrócić uwagę na istotną kwestię dotyczącą degradacji HES-MTX, która wynika z budowy nanokoniugatu. Koniugacja hydroksyetyloskrobi z metotreksatem nie wymaga użycia dodatkowych elementów – następuje ona pomiędzy estryfikowanymi grupami hydroksylowymi w HES, a kwasem glutaminowym będącym integralną częścią MTX. W związku z tym, uwalnianie MTX z nanokoniugatu zachodzi na drodze enzymatycznej hydrolizy przez esterazy i amylazy, a powstające produkty degradacji – glukoza i metotreksat, są stopniowo uwalniane i wydalone z organizmu. Wpływa to na przedłużone działanie cytostatyku, co zostało także potwierdzone dłuższym okresem półtrwania HES-MTX w ludzkim osoczu [Goszczyński i in. 2014]. Stwierdzona w warunkach *in vitro* słabsza aktywność antyproliferacyjna HES-MTX względem testowanych komórek nowotworowych wynikała zatem z faktu, że w warunkach hodowli, ocenianych w określonym czasie, aktywność esteraz i amylaz była zbyt niska, aby doszło do uwalniania z nanokoniugatu kolejnych cząsteczek MTX. Zatem słabsza aktywność antyproliferacyjna koniugatów metotreksatu w warunkach *in vitro*, nie zawsze jest związana z ich słabszą aktywnością przeciwnowotworową w warunkach *in vivo*, co zostało także wykazane w badaniach nad efektem terapeutycznym koniugatów MTX z fibrynogenem [Goszczyński, Nevozhay, i in. 2013], dekstranem [Nevozhay i in. 2006] lub glukozą [Woźniak i in. 2021]. Znaczące spowolnienie wzrostu guzów P388 i MV4-11 po zastosowaniu nanokoniugatu HES-MTX, które wykazali w swoich badaniach Goszczyński i in. potwierdza powyższy wniosek [Goszczyński i in. 2014].

Aby zrealizować postawiony cel pracy, określono efekt terapeutyczny chemioterapii z udziałem nanokoniugatu HES-MTX. Dodatkowo oceniono modulację odpowiedzi przeciwnowotworowej po zastosowaniu różnych dawek chemioterapeutyków. Otrzymane wyniki wskazują, że w przeciwieństwie do MTX, zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej nanokoniugatu w dawce 20 mg/kg spowodowało korzystne, długotrwałe zmiany w mikrośrodowisku nowotworowym. Z jednej strony zmiany te obejmowały zwiększony napływ limfocytów T CD8⁺ do tkanki guzów MC38, a z drugiej strony – stwierdzono utrzymanie dominacji komórek TAM o wysokiej ekspresji cząsteczki MHC II, a także mniejszą polaryzację komórek mieloidalnych w kierunku makrofagów typu M2. Należy podkreślić, że w przypadku efektorowych komórek układu odpornościowego, już 3. dnia od podania HES-MTX odnotowano tendencję wskazującą na zwiększony napływ tych komórek do tkanki guza. Natomiast jednoznaczny wpływ zastosowanej terapii na zmiany w lokalnej odpowiedzi przeciwnowotworowej stwierdzono po dłuższym czasie od podania 20 mg/kg nanokoniugatu. Wyjątek stanowiły limfocyty T regulatorowe, których zmniejszony napływ do tkanki guzów, choć nieistotny statystycznie, był obserwowany jedynie w trzecim dniu po podaniu chemioterapeutyku, a zmiana ta nie zależała od rodzaju użytego preparatu.

Warto podkreślić, że trzeciego dnia od podania najwyższej dawki chemioterapeutyków, stwierdzono tendencję wskazującą na zwiększony napływ komórek monocytarnej populacji MDSC (M-MDSC) do tkanki guzów. Dalsza analiza wielkości populacji tych komórek wykazała, że jedynie w przypadku zastosowania HES-MTX w dawce 20 mg/kg odsetek komórek M-MDSC wrócił do poziomu obserwowanego w kontroli nietraktowanej. Wskazuje to, że w przeciwieństwie do MTX, po dłuższym czasie od podania nanokoniugatu nie następuje zwiększona akumulacja tych komórek w tkance guza. Niemniej jednak, żaden z zastosowanych preparatów nie doprowadził do eliminacji MDSC z mikrośrodowiska nowotworowego. Powyższy wniosek jest niezwykle istotny ze względu na fakt, że komórki MDSC, obok makrofagów związanych z nowotworem, są uznawane za głównych producentów IL-10 w tkance guza [Ibrahim i in. 2018; Yaseen i in. 2020; Wang i in. 2021]. Po podaniu chemioterapeutyków nie wykazano zmniejszenia ekspresji cząsteczki CD80 na powierzchni MDSC, co pośrednio świadczy o utrzymaniu właściwości supresorowych tych komórek. Wykazano bowiem, że jednym ze sposobów tłumienia odpowiedzi odpornościowej wykorzystywanych przez komórki MDSC jest oddziaływanie ich cząsteczek CD80 z cząsteczkami CTLA-4 występującymi na powierzchni limfocytów Treg, których aktywność wpływa hamująco na efektorowe limfocyty T [Poschke i in. 2010]. Jak dowiódł zespół Yang i in. wyciszenie ekspresji cząsteczki CD80 w komórkach MDSC pochodzących z mysiego raka jajnika doprowadziło do zmniejszenia ich właściwości supresorowych [Yang i in. 2006]. Ponadto Liu i in. wykazali, że wyciszeniu ekspresji cząsteczki CD80 w mysich komórkach MDSC towarzyszyła zmniejszona aktywność arginazy 1, co także wpłynęło na obniżoną aktywność immunosupresorową tych komórek [Liu i in. 2009]. W świetle przytoczonych przykładów, a także ze względu na obserwowany zwiększający się udział procentowy komórek MDSC podczas rozwoju guza MC38, któremu towarzyszył wzrost poziomu ekspresji cząsteczki CD80, należy stwierdzić, że te komórki mogą mieć istotny, lecz niekorzystny wpływ na tworzenie skutecznej odpowiedzi odpornościowej.

Makrofagi związane z nowotworem stanowią największą populację komórek mieloidalnych w tkance guza, co więcej uważa się, że wśród nich można wyodrębnić komórki o przeciwstawnych właściwościach. W początkowej fazie rozwoju nowotworu, w TME dominują komórki TAM o wysokiej ekspresji MHC II (TAM MHC II^{high}), a wraz z dalszym postępowaniem choroby, stopień pobudzenia tych komórek zmniejsza się, przez co znaczący udział w rozwoju nowotworu odgrywają komórki TAM o niskiej ekspresji MHC II (TAM MHC II^{low}) [Movahedi i in. 2010; Wang i in. 2011]. W związku z tym, że zastosowanie chemioterapeutyków nie wpłynęło znacząco na zmiany w ogólnym odsetku komórek TAM w tkance guzów, analizę rozszerzono o określenie stopnia pobudzenia tych komórek. Wprawdzie wykazano, że rozwojowi guzów MC38 towarzyszyło zwiększanie udziału procentowego komórek TAM MHC II^{low}, jednak w przypadku zastosowania najwyższej dawki nanokoniugatu stwierdzono utrzymującą się dominację komórek TAM MHC II^{high}. Zatem można wnioskować, że pod wpływem terapii najwyższą dawką

nanokoniugatu zostało znacząco zmniejszone przekształcanie TAM w kierunku makrofagów o właściwościach pronowotworowych.

W przypadku ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej stwierdzono, że zmiany w wielkości populacji komórek układu odpornościowego zostały wywołane po podaniu najwyższej dawki nanokoniugatu, lecz były one krótkotrwałe. Jedynie w śledzionach pobranych w trzecim dniu terapii odnotowano zwiększony odsetek limfocytów T CD8⁺, komórek NK i NKT, któremu towarzyszyło zmniejszenie udziału procentowego limfocytów Treg i limfocytów B. Podobne obniżenie odsetka komórek Treg i CD19⁺ w śledzionach zostało zaobserwowane także pod wpływem innego cytostatyku – cyklofosfamidu. Lutsiak i in. dowiedli, że już w czwartej dobie po podaniu immunomodulującej dawki cyklofosfamidu doszło do znaczącego zmniejszenia wielkości obu populacji komórek w mysich śledzionach. Co więcej, 10. dnia od podania cytostatyku liczba limfocytów Treg i limfocytów B w śledzionie powróciła do poziomu wyjściowego [Lutsiak i in. 2005]. Wskazuje to, że choć nanokoniugat metotreksatu ma inny mechanizm działania niż cyklofosfamid, to wpłynął w podobny sposób na wielkość populacji tych śledzionowych komórek.

Analizując kinetykę zmian w wielkości populacji limfocytów T CD8⁺ w śledzionach i guzach stwierdzono, że pod wpływem zastosowania najwyższej dawki HES-MTX początkowo dochodzi do zwiększenia odsetka tych komórek w obu tkankach. Natomiast po dłuższym czasie, aktywowane w śledzionie limfocyty T CD8⁺ migrują do guzów, aby zainicjować odpowiedź odpornościową skierowaną przeciwko komórkom nowotworowym. Odnotowane w 17. dniu terapii obniżenie odsetka komórek CD8⁺ wśród splenocytów, któremu towarzyszyło zwiększenie wielkości populacji tych komórek w guzach nowotworowych, potwierdza powyższy wniosek. Warto zaznaczyć, że zmiany wywołane podaniem najwyższej dawki nanokoniugatu były także widoczne w zdolności splenocytów do wtórnej aktywacji swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Wykazano, że pod wpływem ponownego kontaktu splenocytów z komórkami MC38, w krótkim czasie od podania HES-MTX w dawce 20 mg/kg, pobudzone były limfocyty T CD8⁺, a w późniejszym czasie aktywowana była odpowiedź przeciwnowotworowa zależna od komórek NK. Jednocześnie wraz z upływem czasu od podania preparatu, zmniejszała się zdolność komórek śledzionowych do eliminacji komórek nowotworowych. Powyższa zależność jest związana ze zdolnością splenocytów do wydzielania IL-10 do środowiska, lecz niewątpliwie może wynikać z faktu, że w mikrośrodowisku nowotworu stężenie IL-10 zwiększa się wraz z progresją choroby nowotworowej oraz zwiększoną infiltracją tkanki guza przez komórki supresorowe produkujące tę cytokinę. W rezultacie IL-10 pochodzenia nowotworowego wpływa negatywnie na odpowiedź odpornościową inicjowaną zarówno w guzach, jak i śledzionach. W związku z tym, w 3. dniu od podania 20 mg/kg HES-MTX, kiedy stężenie IL-10 w TME było niewielkie, odpowiedź przeciwnowotworowa aktywowana przez pobudzone splenocyty nie została stłumiona, o czym także świadczyła niska zdolność splenocytów do produkcji IL-10 *ex vivo*. Jednak w następstwie

wydłużenia czasu od traktowania myszy nanokoniugatem, niskiej aktywności cytotoksycznej restymulowanych splenocytów towarzyszyło gwałtowne zwiększenie ich zdolności do produkcji IL-10.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że jedynie pod wpływem terapii nanokoniugatem w najwyższej dawce doszło do modulacji odpowiedzi odpornościowej, której rezultatem było spowolnienie rozwoju guzów MC38. Dzięki analizie kinetyki zmian w lokalnej i ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej możliwe było określenie do jakiego mikrośrodowiska nowotworu zostaną podane szczepionkowe komórki dendrytyczne zaplanowane w schemacie skojarzonej terapii. Stwierdzono, że trzeciego dnia po podaniu HES-MTX w dawce 20 mg/kg nastąpiło zwiększenie wielkości populacji komórek efektorowych oraz ich aktywności cytotoksycznej. Zatem podane okołoguzowo DC będą w stanie wytworzyć skuteczną odpowiedź odpornościową prowadzącą do eliminacji komórek nowotworowych.

Obserwowane różnice pomiędzy działaniem MTX użytego w wolnej formie a MTX przyłączonego do nośnika powinny być wiązane z ulepszoną dystrybucją nanokoniugatu w organizmie, o czym wspomniano wcześniej. Rezultatem koniugacji MTX z HES było zwiększenie okresu półtrwania nanokoniugatu w osoczu [Goszczyński i in. 2014], a to z kolei determinuje przedłużone działanie cytostatyku po dożylnym podaniu. Guzy nowotworowe raka jelita grubego MC38 są silnie unaczynione, co obserwujemy podczas sekcji przeprowadzanych po zakończeniu doświadczeń *in vivo*. Zatem bazując na założeniach efektu EPR należy przypuszczać, że lepszy efekt terapeutyczny po podaniu HES-MTX wynikał ze zwiększonej akumulacji nanokoniugatu w tkance guzów MC38.

W kolejnym etapie badań, w terapii myszy obciążonych nowotworem MC38 wykorzystano immunomodulującą dawkę nanokoniugatu (20 mg/kg), którą uzupełniono o wielokrotne iniekcje szczepionek na bazie dojrzałych komórek dendrytycznych. Efektem zastosowania tej terapii były zmiany w wielkości i aktywności poszczególnych populacji komórek układu odpornościowego. Należy podkreślić, że po zastosowaniu immunoterapii stwierdzono tendencję wskazującą na zmniejszoną infiltrację tkanki nowotworowej przez komórki o charakterze supresorowym (limfocyty T regulatorowe i komórki PMN-MDSC). Mimo że powyższe zmiany nie były istotne statystycznie, to uzyskane wyniki wskazują na konieczność kompleksowego podejścia w terapii chorób nowotworowych – wykorzystanie samych chemioterapeutyków nie jest wystarczające do długotrwałej eliminacji tych komórek układu odpornościowego z TME. W następstwie skojarzonej terapii złożonej z HES-MTX + DC/TAg, z jednej strony odnotowano zwiększony napływ limfocytów T CD8⁺ do tkanki guzów MC38, a z drugiej – najmniejszy odsetek makrofagów, natomiast wielkość populacji komórek M-MDSC i TAM nie uległa zmianie. Stwierdzono także, że po zastosowaniu tej terapii nastąpiło pobudzenie śledzionowych limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ o czym świadczyły najwyższe odsetki komórek efektorowych. Potwierdzenie uruchomienia swoistej

odpowiedzi przeciwnowotworowej pod wpływem terapii składającej się z nanokoniugatu i DC/TAg można znaleźć w zwiększonej zdolności restymulowanych komórek śledzionowych do wydzielania ziaren cytolitycznych i zabijania komórek nowotworowych MC38.

Wszystkie powyższe obserwacje mogą wyjaśnić spowolnienie wzrostu guzów MC38, które w grupie HES-MTX + DC/TAg wyniosło 55% w stosunku do myszy nietraktowanych. Choć w grupie myszy otrzymujących HES-MTX w formie monoterapii, wyliczone TGI było wyższe (64%) to redukcji wielkości guza nie towarzyszyła reaktywacja układu odpornościowego gospodarza. Odnotowana mniejsza wartość TGI w grupie HES-MTX + DC/TAg może wynikać z wpływu innych czynników supresorowych obecnych w TME, uniemożliwiających pogłębienie efektu terapeutycznego po zastosowaniu DC/TAg. Podobną zależność wykazano w naszych wcześniejszych badaniach, w których TGI w grupie myszy otrzymujących cyklofosfamid (CY) było nieznacznie wyższe, niż w grupie myszy otrzymujących skojarzoną terapię CY + DC/TAg. Jednak uzupełnienie terapii o wielokrotne okołoguzowe podania wektorów lentiwirusowych wyciszających ekspresję IL-10 w TME zwiększyło efekt terapeutyczny – szczególnie gdy zastosowano terapię składającą się z CY + DC/TAg + shIL-10 [Rossowska i in. 2018]. Na tej podstawie można przypuszczać, że odnotowany słabszy efekt terapeutyczny po zastosowaniu HES-MTX + DC/TAg był związany z obecnością IL-10 w tkance guzów, której supresorowe właściwości obniżyły aktywność komórek dendrytycznych podawanych okołoguzowo. W związku z tym, że wykorzystanie nanokoniugatu w połączeniu z szczepionkami na bazie dojrzałych DC uruchomiło odpowiedź przeciwnowotworową, to pełna skuteczność tej terapii mogła zostać ograniczona poprzez negatywny wpływ IL-10, obecnej w tkance guzów MC38.

W doświadczeniach prowadzonych w modelu mysiego nowotworu MC38 obserwowano, że zdolność komórek wyizolowanych z tkanki guza do produkcji tej cytokiny zwiększała się wraz ze stopniem zaawansowania rozwoju nowotworu (dane niepublikowane). Uwzględniając fakt, że komórki MC38 hodowane w warunkach *in vitro* nie wydzielają IL-10 do medium hodowlanego, można przypuszczać, iż za produkcję tej cytokiny w guzach nowotworowych MC38 są odpowiedzialne komórki układu odpornościowego infiltrujące tkankę guzów [Anger-Góra i in. 2021]. Powyższe obserwacje były niezwykle ważne w kontekście dalszego doświadczenia, które obejmowało wykorzystanie szczepionek na bazie DC o obniżonej wrażliwości na wpływ IL-10.

Supresorowe działanie IL-10 na komórki dendrytyczne jest dobrze poznane. Już na początku dwudziestego pierwszego wieku Corinti i in. dowiedli, że ta cytokina negatywnie oddziałując na dojrzewanie DC, zmniejsza ich zdolność do pobudzania odpowiedzi odpornościowej typu Th1 [Corinti i in. 2001]. W badaniach przeprowadzonych podczas realizacji niniejszej pracy doktorskiej potwierdzono, że obecność IL-10 w środowisku uniemożliwiała pełną aktywację komórek dendrytycznych w następstwie stymulacji LPS, co może negatywnie wpływać na inicjowanie wydajnej odpowiedzi odpornościowej. W istocie, zostało udowodnione, że DC traktowane IL-10,

wykazując cechy tolerogennych DC, słabiej pobudzały limfocyty T i wprowadzały antygenowo-swoiste limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺ w stan anergii [Steinbrink i in. 2002; Bellinghausen i in. 2006]. Występowanie tego zjawiska w chorobie nowotworowej może doprowadzić do ucieczki komórek nowotworowych spod nadzoru immunologicznego [Alonso i in. 2018], a podwyższone stężenie IL-10 w surowicy pacjentów cierpiących z powodu chorób nowotworowych jest korelowane z niekorzystnymi rokowaniami [Zhao i in. 2015; Abtahi i in. 2017; Li i in. 2019].

Zmniejszenie negatywnego wpływu IL-10 na odpowiedź przeciwnowotworową jest ciągle przedmiotem badań. Dotychczas prowadzone prace naukowe w tym obszarze zakładały zniesienie działania tej cytokiny na dwóch płaszczyznach, z jednej strony zmniejszono jej zawartość w organizmie, a z drugiej – blokowano charakterystyczne dla niej receptory. W tym celu wykorzystywano przeciwciała neutralizujące IL-10 [Kalli i in. 2013; Rossowska i in. 2015; Gordy i in. 2018] lub przeciwciała skierowane przeciwko receptorowi tej cytokiny [Ruffell i in. 2014; Chen i in. 2014; Llopiz i in. 2016]. Miało to zapobiec efektowi immunosupresyjnemu wynikającemu z naturalnego działania IL-10, czyli wyciszenia stanu zapalnego. Zatem ogólnoustrojowe zablokowanie działania tej cytokiny może doprowadzić do zaburzeń o podłożu autoimmunologicznym np. chorób zapalnych jelit, takich jak choroba Leśniowskiego-Crohna lub wrzodziejące zapalenie jelita grubego [Kim i in. 2011; Papoutsopoulou i in. 2021]. Z tego powodu poszukiwano rozwiązań działających miejscowo, które omijają ten problem. Dla przykładu, z badań przeprowadzonych w naszym laboratorium wynika, że zmniejszenie stężenia IL-10 w TME, które osiągnięto poprzez wielokrotne, doguzowe iniekcje wektorów lentiwirusowych niosących sekwencję shRNA wyciszającą IL-10, znacząco poprawiło skuteczność szczepionek na bazie komórek dendrytycznych i przyczyniło się do zahamowania wzrostu guzów MC38 [Rossowska i in. 2018].

W schemacie terapii przeciwnowotworowej będącej przedmiotem badań niniejszej pracy, w celu otrzymania dojrzałych DC wykorzystywany jest lizat pochodzący z komórek nowotworowych MC38 (TAg). Jednak wykazano, iż rezultatem takiej stymulacji jest zwiększenie ekspresji receptora IL-10, co dodatkowo wskazuje na konieczność obniżenia wrażliwości szczepionkowych DC na supresorowy wpływ IL-10. Aby to osiągnąć wykorzystano wektory lentiwirusowe niosące sekwencję shRNA skierowaną przeciwko IL-10R. Efektem transdukcji lentiwirusowej prowadzącej do obniżenia ekspresji receptora tej cytokiny, było zwiększenie ekspresji cząsteczek MHC II oraz cząsteczek kostymulujących (CD40, CD80 i CD86) na powierzchni modyfikowanych DC. Zmianom tym towarzyszył także wzrost ekspresji antygeny CCR7 i na tej podstawie można wnioskować, że takie komórki będą posiadać zwiększone zdolności migracyjne. Podobne obserwacje stwierdzono w komórkach transdukowanych sekwencją negatywną (DC/shN/TAg) i należy je wytłumaczyć immunogennością wektorów lentiwirusowych. Z badań opublikowanych przez Breckpot i in. wynika, że mieloidalne DC rozpoznają antygeny

lentiwirusowe poprzez receptory toll-podobne takie jak TLR3 i TLR7, a rezultatem tej stymulacji jest produkcja IFN- β przez pobudzone komórki, a także zwiększenie ekspresji MHC II, CD40, CD80 oraz CD86 na ich powierzchni [Breckpot i in. 2010].

Należy podkreślić, że obniżenie relatywnego poziomu ekspresji IL-10R o ok. 50% w stosunku do DC/TA α było wystarczające, aby zwiększyć zdolność zmodyfikowanych DC do aktywacji swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Pobudzone przez DC/shIL-10R_1/TA α , dziewicze limfocyty T cechowała najwyższa aktywność cytotoksyczna, o czym świadczył znacząco wyższy odsetek zabitych komórek MC38, zarówno w porównaniu do skuteczności działania nietransdukowanych DC/TA α , jak i DC/shN/TA α . Powyższe dane są zgodne z wynikami uzyskanymi przez Thepmalee i in., którzy wykazali, że limfocyty T pobudzone przez transdukowane DC z obniżoną o połowę ekspresją IL-10R, wykazywały zwiększoną aktywność cytotoxiczną wobec komórek raka dróg żółciowych, w porównaniu do limfocytów pobudzanych przez DC transdukowane kontrolną sekwencją shRNA [Thepmalee i in. 2020]. Taki sam rezultat osiągnięto używając przeciwciał anti-IL-10R, co potwierdza znaczące zwiększenie skuteczności tworzonej odpowiedzi przeciwnowotworowej po obniżeniu wrażliwości DC na działanie IL-10 [Thepmalee i in. 2018]. Kim i in. dowiedli, że rezultatem zastosowania DC z wyciszoną ekspresją IL-10R w terapii myszy obciążonych nowotworem TC-1 była silna antygenowo-swoista odpowiedź limfocytów T CD8⁺, która doprowadziła do znacznego spowolnienia rozwoju guza [Kim i in. 2011].

Wykorzystanie w terapii immunomodulującej dawki nanokoniugatu oraz szczepionek na bazie transdukowanych DC z wyciszoną ekspresją IL-10R najskuteczniej spowolniło rozwój nowotworu – objętości guzów w tej grupie myszy były o 77% mniejsze w porównaniu do grupy nietraktowanej. Chociaż znaczne zahamowanie wzrostu guzów (TGI 54%) wykazano również w grupie myszy otrzymujących HES-MTX + DC/shN/TA α , to analiza odpowiedzi odpornościowej gospodarza wykazała, że jedynie zastosowanie DC o obniżonej wrażliwości na IL-10 przyczyniło się do rozwinięcia skutecznej odpowiedzi przeciwnowotworowej.

Na podstawie przeprowadzonej analizy cytometrycznej tkanki nowotworowej wykazano, że chociaż zwiększony napływ leukocytów dotyczył wszystkich grup myszy otrzymujących skojarzoną terapię, to zasadnicze zmiany zależne od rodzaju składowych tej terapii stwierdzono w oparciu o różnice w wielkości poszczególnych subpopulacji komórek układu odpornościowego. Terapia z udziałem HES-MTX + DC/shIL-10R/TA α spowodowała zwiększoną infiltrację tkanki guza przez limfocyty T CD8⁺ i CD4⁺, a także komórki NK i NKT, czego nie wykazano w guzach pobranych od myszy traktowanych MTX + DC/shIL-10R/TA α . Wzrost udziału procentowego tych komórek można wytłumaczyć zmianami zachodzącymi w obrębie komórek o cechach supresorowych. Wykazano, że rezultatem terapii HES-MTX + DC/shIL-10R/TA α było zmniejszenie wielkości populacji TAM napływających do tkanki guza, co jest uznawane za dobry marker prognostyczny [Xiang i in. 2021]. Supresorowe właściwości komórek TAM (wydzielanie

IL-10 i wzmożona ekspresja arginazy 1) wpływają na hamowanie aktywności i proliferacji limfocytów T [Wang i in. 2021]. Zatem redukcja wielkości populacji TAM w guzach MC38, przy jednoczesnej dominacji TAM MHC II^{high}, pośrednio umożliwiła zwiększoną akumulację komórek układu odpornościowego, które wydajniej eliminowały komórki nowotworowe. Co więcej, jedynie w guzach myszy otrzymujących terapię składającą się z nanokoniugatu i DC o obniżonej ekspresji IL-10R dominowały komórki typu M1, a to wskazuje na korzystną polaryzację makrofagów w kierunku komórek o silnych cechach przeciwnowotworowych, zdolnych do pobudzania odpowiedzi typu Th1 [Sica, Mantovani 2012].

Porównując obie subpopulacje MDSC, silniejsze właściwości immunosupresorowe cechują komórki M-MDSC i to właśnie one są odpowiedzialne za tłumienie odpowiedzi przeciwnowotworowej podczas rozwoju guza [Haverkamp i in. 2014]. Uważa się również, iż to komórki M-MDSC cechuje większa zdolność do hamowania aktywności limfocytów T, w porównaniu do subpopulacji granulocytarnej. W związku z powyższym, skuteczna terapia przeciwnowotworowa powinna prowadzić do eliminacji subpopulacji M-MDSC z mikrośrodowiska nowotworu [Yaseen i in. 2020]. Podczas oceny wielkości i aktywności obu subpopulacji MDSC w guzach MC38 nie wykazano zmniejszenia odsetka M-MDSC, lecz rezultatem terapii składającej się z HES-MTX + DC/shIL-10R/TA_g było obniżenie poziomu ekspresji CD80 na ich powierzchni, co świadczy o zmniejszonych właściwościach supresorowych tych komórek. Natomiast w przypadku subpopulacji PMN-MDSC stwierdzono zmniejszenie ich odsetka po zastosowaniu każdego rodzaju szczepionek na bazie DC, jednak ich cechy supresorowe wynikające z ekspresji cząsteczki CD80, pozostały na niezmiennym poziomie.

Obserwacje dokonane podczas analizy wielkości leukocytów w tkance guzów MC38 pozwoliły na stwierdzenie, że zmiany wywołane po zastosowaniu terapii opartej na HES-MTX + DC/shIL-10R/TA_g mają wielokierunkowy wymiar i są wzajemnie powiązane. To potwierdza jak bardzo złożone jest funkcjonowanie poszczególnych populacji komórek układu odpornościowego w mikrośrodowisku nowotworowym. Mianowicie – zmniejszenie aktywności oraz wielkości populacji komórek o cechach supresorowych (TAM, M2, Treg, PMN-MDSC oraz obniżona ekspresja CD80 na M-MDSC) umożliwiło szczepionkowym komórkom dendrytycznym skuteczne pobudzenie komórek efektorowych (limfocyty T CD4⁺, CD8⁺, komórki NK i NKT), które proliferując w TME wydajnie aktywowały mechanizmy odpowiedzi odpornościowej, prowadzące do eliminacji komórek nowotworowych. Co więcej, uwzględniając utrzymujący się napływ komórek M-MDSC do tkanki guzów, należy stwierdzić, że stanowiły one główne źródło IL-10 w TME, zatem zastosowanie DC o obniżonej wrażliwości na działanie IL-10 było kluczowe w ominięciu negatywnego wpływu tej cytokiny na aktywowanie skutecznej odpowiedzi odpornościowej.

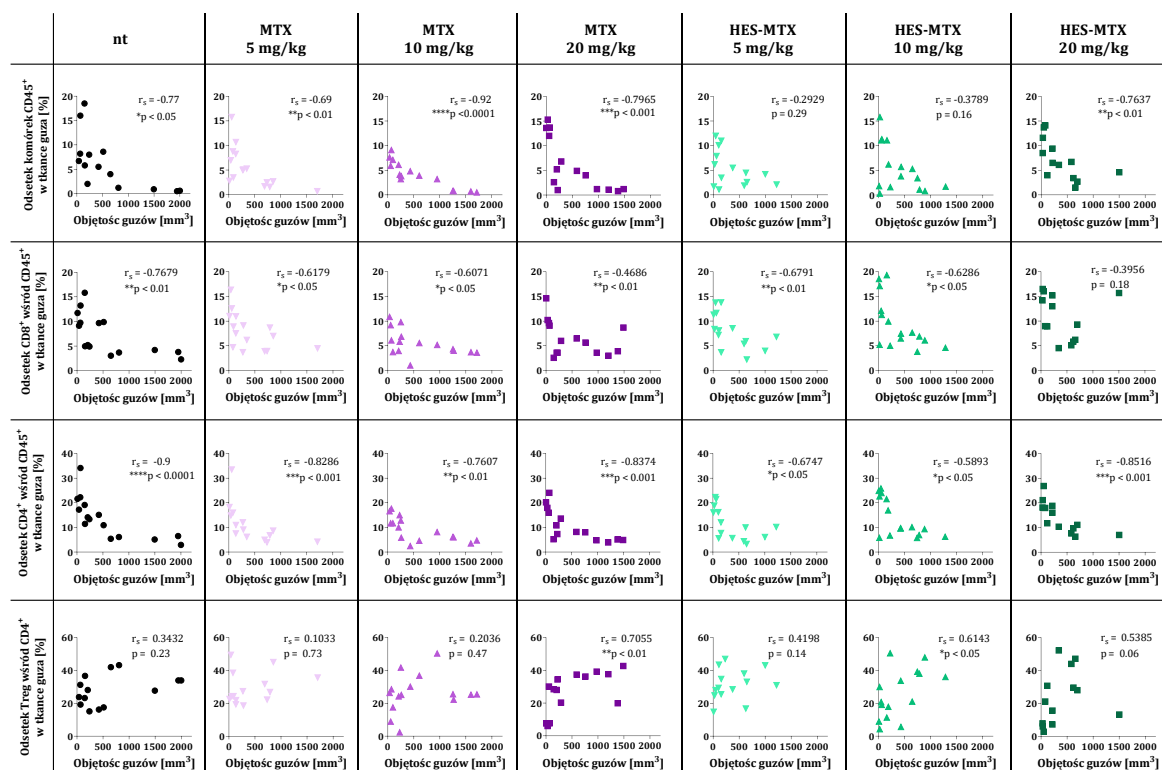
Niezależnie od rodzaju zastosowanego chemioterapeutyku odnotowano podobne zmiany w odsetku komórek odpornościowych w śledzionach myszy traktowanych DC/shN/TAg lub DC/shIL-10R/TAg. Świadczy to o silniejszej aktywacji odpowiedzi odpornościowej pod wpływem DC pobudzonych transdukcją lentiwirusową i powinno być to związane z immunogennością wektorów LV. Niemniej jednak, oceniając wpływ zastosowania skojarzonej terapii na aktywność cytotoksyczną komórek śledzionowych stwierdzono, że splenocyty pobrane od myszy otrzymujących HES-MTX + DC/shIL-10R/TAg najskuteczniej eliminowały komórki nowotworowe. Wskazuje to, że zmiany, które zostały wywołane na poziomie lokalnej odpowiedzi odpornościowej w tkance guzów, mają decydujący wpływ na tworzenie skutecznej swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej na poziomie ogólnoustrojowym.

W tym miejscu należy podkreślić, że rodzaj wykorzystanego cytostatyku ma szczególne znaczenie w kontekście skuteczności skojarzonej terapii. Na podstawie uzyskanych wyników wnioskuję, że efekt wywołany po podaniu chemioterapeutyku jest kluczowym elementem decydującym o kierunku rozwoju odpowiedzi przeciwnowotworowej inicjowanej przez komórki dendrytyczne. Zatem rezultatem zastosowania immunomodulującej dawki nanokoniugatu były korzystne zmiany w TME oraz w ogólnoustrojowej odpowiedzi odpornościowej gospodarza, a to z kolei umożliwiło rozwój skutecznej odpowiedzi przeciwnowotworowej zainicjowanej przez szczepionkowe DC/shIL-10R/TAg.

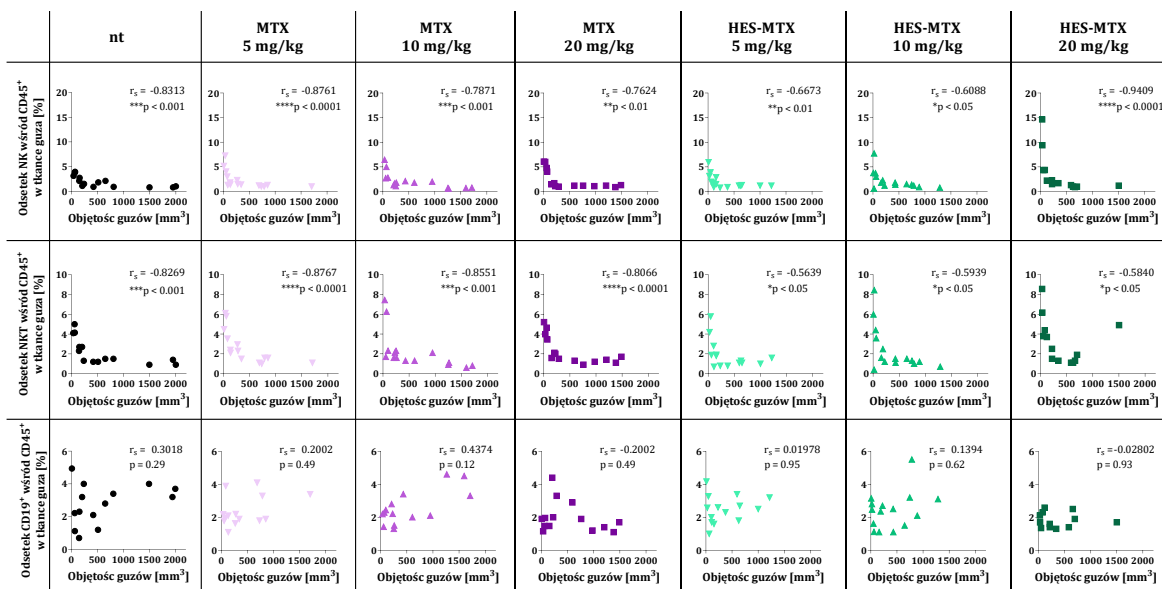
6. Wnioski

1. Zastosowanie nanokoniugatu w dawce 20 mg/kg prowadzi do spowolnienia wzrostu guzów MC38 oraz modulacji odpowiedzi odpornościowej stwarzającej korzystne warunki do inicjowania odpowiedzi przeciwnowotworowej przez podawane okołoguzowo szczepionki na bazie DC/TAg.
2. Transdukcja lentiwirusowa sekwencją shIL-10R_1 prowadząca do efektywnego obniżenia ekspresji IL-10R w DC zmniejsza ich wrażliwość na supresorowy wpływ IL-10, a w konsekwencji zwiększa skuteczność w aktywowaniu swoistej odpowiedzi odpornościowej.
3. Zastosowanie skojarzonej terapii złożonej z immunomodulującej dawki nanokoniugatu oraz dojrzałych komórek dendrytycznych z wyciszoną ekspresją IL-10R wpływa na znaczne zahamowanie rozwoju guzów MC38, wynikające ze zwiększonego napływu efektorowych komórek układu odpornościowego do tkanki guza, przy jednoczesnej redukcji wielkości populacji komórek o cechach supresorowych, a także indukcji wydajnej i swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej.

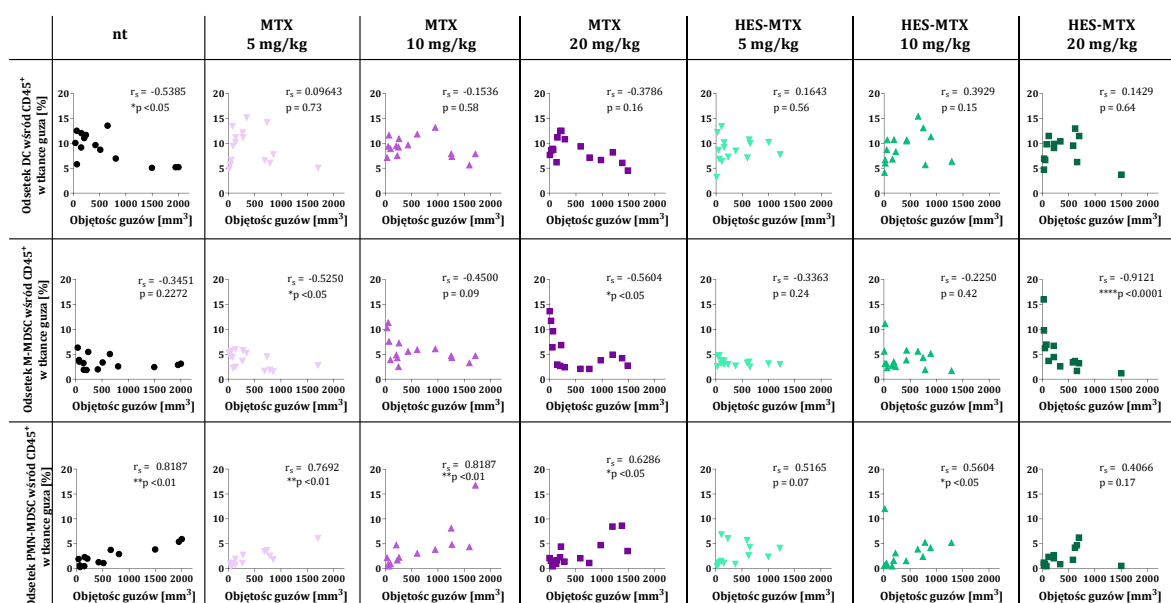
7. Supplement



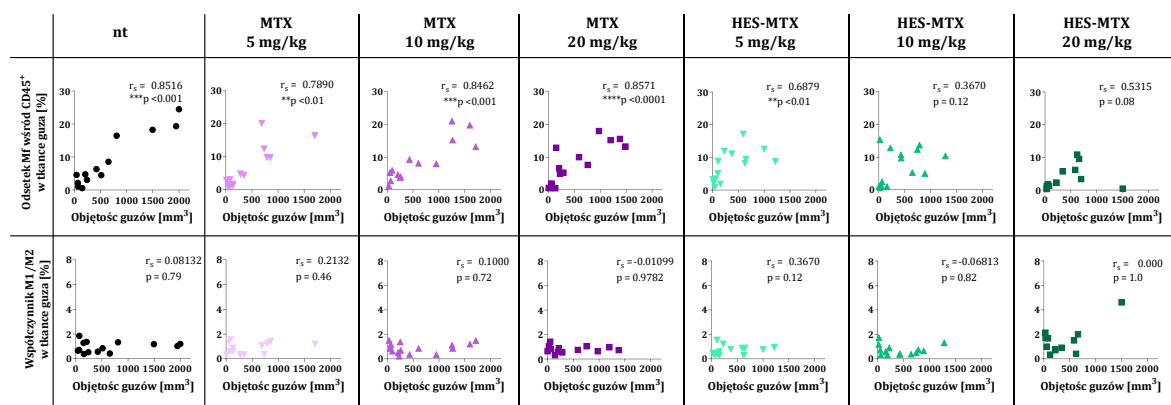
Ryc. 74. Korelacja między odsetkiem populacji komórek CD45⁺, CD8⁺, CD4⁺ oraz Treg napływających do tkanki nowotworu a objętością guzów MC38 pobranych od myszy poddanych chemioterapii. Punkty na wykresach przedstawiają objętość guza w odniesieniu do wielkości populacji komórek zidentyfikowanych w tym guzie (indywidualnie dla każdej myszy, liczebność grup: 14-15). Korelacje wyliczono z wykorzystaniem nieparametrycznego testu Spearmana, a otrzymane wartości r_s oraz wartości p przedstawiono na wykresach.



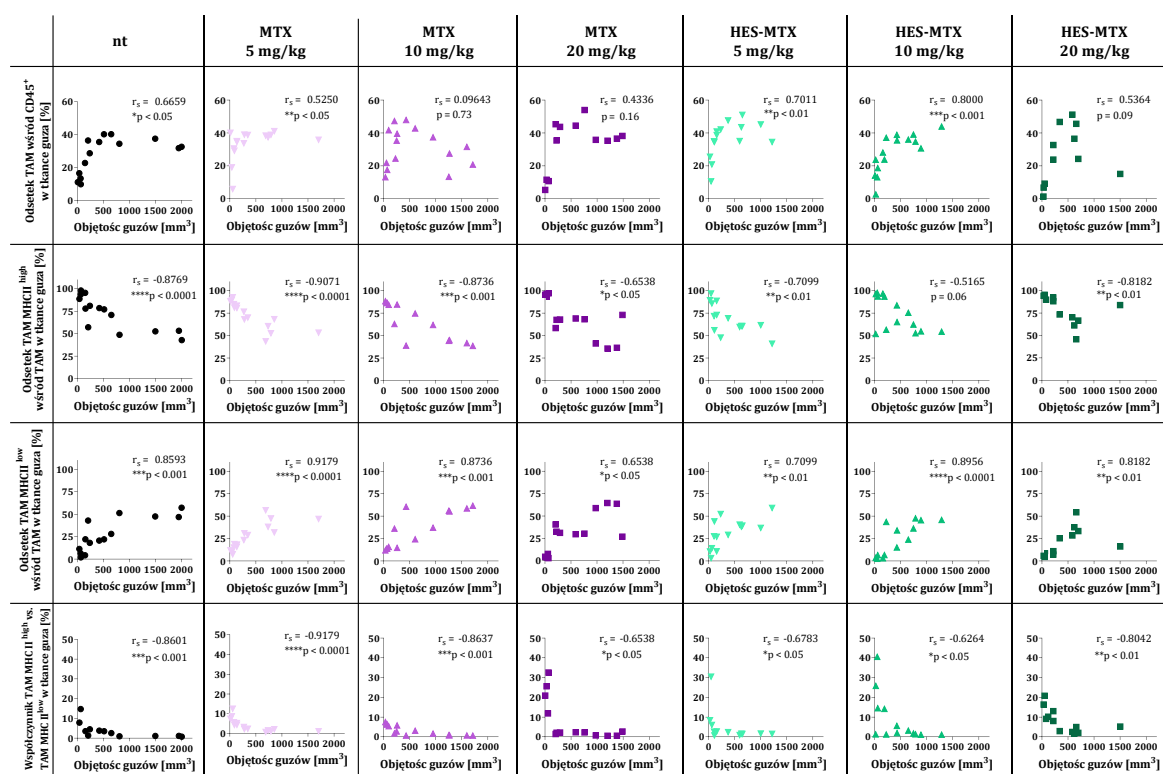
Ryc. 75. Korelacja między odsetkiem populacji komórek NK, NKT i CD19⁺ napływających do tkanki nowotworu a objętością guzów MC38 pobranych od myszy poddanych chemioterapii. Punkty na wykresach przedstawiają objętość guza w odniesieniu do wielkości populacji komórek zidentyfikowanych w tym guzie (indywidualnie dla każdej myszy, liczebność grup: 14-15 myszy). Korelacje wyliczono z wykorzystaniem nieparametrycznego testu Spearmana osobno dla każdej grupy myszy, a otrzymane wartości r_s oraz wartości p przedstawiono na wykresach.



Ryc. 76. Korelacja między odsetkiem populacji DC, M-MDSC i PMN-MDSC napływających do tkanki nowotworu a objętością guzów MC38 pobranych od myszy poddanych chemioterapii. Punkty na wykresach przedstawiają objętość guza w odniesieniu do wielkości populacji komórek zidentyfikowanych w tym guzie (indywidualnie dla każdej myszy, liczebność grup: 14-15 myszy). Korelacje wyliczono z wykorzystaniem nieparametrycznego testu Spearmana osobno dla każdej grupy myszy, a otrzymane wartości r_s oraz wartości p przedstawiono na wykresach.



Ryc. 77. Korelacja między wielkością populacji Mf napływających do tkanki nowotworu lub współczynnikiem M1/M2 a objętością guzów MC38 pobranych od myszy poddanych chemioterapii. Punkty na wykresach przedstawiają objętość guza w odniesieniu do wielkości populacji komórek zidentyfikowanych w tym guzie (indywidualnie dla każdej myszy, liczebność grup: 14-15 myszy). Korelacje wyliczono z wykorzystaniem nieparametrycznego testu Spearmana osobno dla każdej grupy myszy, a otrzymane wartości r_s oraz wartości p przedstawiono na wykresach.



Ryc. 78. Korelacja między wielkością populacji TAM napływających do tkanki nowotworu lub współczynnikiem TAM MHC II^{high}/TAM MHC II^{low} a objętością guzów MC38 pobranych od myszy poddanych chemioterapii. Punkty na wykresach przedstawiają objętość guza w odniesieniu do wielkości populacji komórek zidentyfikowanych w tym guzie (indywidualnie dla każdej myszy, liczebność grup: 14-15 myszy). Korelacje wyliczono z wykorzystaniem nieparametrycznego testu Spearmana osobno dla każdej grupy myszy, a otrzymane wartości r_s oraz wartości p przedstawiono na wykresach.

Spis rycin i tabel

Ryciny

Ryc. 1	Różnice pomiędzy niedojrzałą i dojrzałą DC. Oddziaływanie dojrzałych DC z dziewiczymi limfocytami T w obszarze synapsy immunologicznej.....	15
Ryc. 2	Ucieczka komórek nowotworowych spod nadzoru immunologicznego i udział komórek układu odpornościowego w procesie immunoredagowania.....	18
Ryc. 3	Schemat przedstawiający proces wyciszenia genu w komórce docelowej w następstwie transdukcji wektorami lentiwirusowymi kodującymi shRNA.....	32
Ryc. 4.	Mapa plazmidu transferowego pGLV-H1-GFP+puro.....	47
Ryc. 5.	Schematy doświadczeń <i>in vitro</i> prowadzących do wyciszenia receptora IL-10 w komórkach dendrytycznych stymulowanych LPS lub TAg oraz zakres przeprowadzonych analiz fenotypowych i funkcjonalnych otrzymanych komórek.....	58
Ryc. 6.	Schemat przygotowania szczepionek komórkowych na bazie DC z wyciszonym receptorem IL-10.....	59
Ryc. 7.	Schematy doświadczenia chemioterapeutycznego oraz chemioimmunoterapeutycznego.....	62
Ryc. 8.	Zahamowanie proliferacji komórek linii nowotworowych MC38, CT26, LL2 traktowanych metotreksatem lub nanokoniugatem HES-MTX. Ekspresja receptora α dla folianów (FR α) w tych komórkach.....	67
Ryc. 9.	Wzrost guzów MC38 u myszy poddanych chemioterapii z udziałem metotreksatu lub nanokoniugatu metotreksatu i hydroksyetyloskrobi.....	69
Ryc. 10.	Schemat analizy populacji komórek limfoidalnych naciekających guzy MC38.....	71
Ryc. 11.	Ocena nacieku leukocytów w guzach nowotworowych MC38 pobranych od myszy poddanych chemioterapii.....	72
Ryc. 12.	Ocena nacieku limfocytów T w guzach nowotworowych MC38 pobranych od myszy poddanych chemioterapii.....	73
Ryc. 13.	Ocena nacieku komórek limfoidalnych w guzach nowotworowych MC38 pobranych od myszy poddanych chemioterapii.....	74
Ryc. 14.	Schemat analizy populacji komórek mieloidalnych naciekających guzy MC38.....	76
Ryc. 15.	Ocena nacieku komórek dendrytycznych oraz stopnia ich pobudzenia w guzach nowotworowych MC38 pobranych od myszy poddanych chemioterapii.....	77
Ryc. 16.	Ocena nacieku i stopnia pobudzenia monocytarnych komórek supresorowych pochodzenia mieloidalnego w guzach nowotworowych MC38 pobranych od myszy poddanych chemioterapii.....	78
Ryc. 17.	Ocena nacieku i stopnia pobudzenia granulocytarnych komórek supresorowych pochodzenia mieloidalnego w guzach nowotworowych MC38 pobranych od myszy poddanych chemioterapii.....	79
Ryc. 18.	Ocena nacieku makrofagów związanych z nowotworem i określenie zmian w proporcji populacji tych komórek o różnej ekspresji cząsteczki MHC II w tkance guzów MC38 pobranych od myszy poddanych chemioterapii.....	81

Ryc. 19.	Ocena nacieku i polaryzacji makrofażów w guzach nowotworowych MC38 pobranych od myszy poddanych chemioterapii.....	82
Ryc. 20.	Heat-mapa przedstawiająca korelację pomiędzy wielkością guzów a udziałem procentowym poszczególnych populacji komórek układu odpornościowych napływających do guzów MC38 myszy poddanych chemioterapii.....	84
Ryc. 21.	Schemat analizy populacji komórek limfoidalnych w śledzionach myszy obarczonych nowotworem MC38.....	86
Ryc. 22.	Ocena odsetka limfocytów T w śledzionach myszy obarczonych nowotworem MC38 i poddanych chemioterapii.....	87
Ryc. 23.	Ocena odsetka komórek limfoidalnych w śledzionach myszy obarczonych nowotworem MC38 i poddanych chemioterapii.....	89
Ryc. 24.	Schemat analizy populacji komórek mieloidalnych w śledzionach myszy obarczonych nowotworem MC38.....	90
Ryc. 25.	Ocena odsetka i stopnia pobudzenia komórek dendrytycznych w śledzionach myszy obarczonych nowotworem MC38 i poddanych chemioterapii.....	91
Ryc. 26.	Ocena odsetka i stopnia pobudzenia monocytarnych komórek supresorowych pochodzenia mieloidalnego w śledzionach myszy obarczonych nowotworem MC38 i poddanych chemioterapii.....	92
Ryc. 27.	Ocena odsetka i stopnia pobudzenia komórek supresorowych pochodzenia mieloidalnego w śledzionach myszy obarczonych nowotworem MC38 i poddanych chemioterapii.....	93
Ryc. 28.	Ocena odsetka komórek limfoidalnych wśród restymulowanych splenocytów pochodzących ze śledzion od myszy obarczonych nowotworem MC38 i poddanych chemioterapii.....	94
Ryc. 29.	Aktywność restymulowanych splenocytów pobranych od myszy obarczonych nowotworem MC38 i poddanych chemioterapii.....	96
Ryc. 30.	Wzrost guzów MC38 u myszy poddanych chemioimmunoterapii z udziałem metotreksatu lub nanokoniugatu metotreksatu i hydroksyetyloskrobi oraz komórek dendrytycznych stymulowanych antygenami nowotworowymi.....	99
Ryc. 31.	Ocena nacieku leukocytów w guzach nowotworowych MC38 pobranych od myszy poddanych chemioimmunoterapii.....	100
Ryc. 32.	Ocena nacieku i stopnia pobudzenia limfocytów T w guzach nowotworowych MC38 pobranych od myszy poddanych chemioimmunoterapii.....	101
Ryc. 33.	Ocena nacieku komórek limfoidalnych w guzach nowotworowych MC38 Pobranych od myszy poddanych chemioimmunoterapii.....	102
Ryc. 34.	Ocena nacieku i stopnia pobudzenia komórek dendrytycznych w guzach nowotworowych myszy poddanych chemioimmunoterapii.....	103
Ryc. 35.	Ocena nacieku i stopnia pobudzenia komórek supresorowych pochodzenia mieloidalnego w guzach nowotworowych MC38 pobranych od myszy poddanych chemioimmunoterapii.....	104

Ryc. 36.	Ocena nacieku makrofagów związanych z nowotworem i określenie zmian w proporcji populacji tych komórek o różnej ekspresji cząsteczki MHC II w tkance guzów MC38 pobranych od myszy poddanych chemioimmunoterapii.....	105
Ryc. 37.	Ocena nacieku i polaryzacji makrofagów w guzach nowotworowych MC38 pobranych od myszy poddanych chemioimmunoterapii.....	106
Ryc. 38.	Schemat analizy populacji komórek limfoidalnych w węzłach chłonnych drenujących nowotwór MC38.....	107
Ryc. 39.	Ocena odsetka i poziomu aktywacji limfocytów T w węzłach chłonnych drenujących nowotwór MC38 myszy poddanych chemioimmunoterapii.....	108
Ryc. 40.	Ocena odsetka komórek limfoidalnych w węzłach chłonnych drenujących nowotwór MC38 myszy poddanych chemioimmunoterapii.....	109
Ryc. 41.	Schemat analizy populacji komórek mieloidalnych w węzłach chłonnych drenujących nowotwór MC38.....	109
Ryc. 42.	Ocena odsetka komórek dendrytycznych oraz stopnia ich pobudzenia w węzłach chłonnych drenujących nowotwór MC38 myszy poddanych chemioimmunoterapii.....	110
Ryc. 43.	Ocena odsetka i poziomu aktywacji limfocytów T w śledzionach myszy obciążonych nowotworem MC38 i poddanych chemioimmunoterapii.....	111
Ryc. 44.	Ocena odsetka komórek limfoidalnych w śledzionach myszy obciążonych nowotworem MC38 i poddanych chemioimmunoterapii.....	112
Ryc. 45.	Ocena odsetka i stopnia pobudzenia komórek dendrytycznych w śledzionach myszy obciążonych nowotworem MC38 i poddanych chemioimmunoterapii.....	113
Ryc. 46.	Ocena odsetka i stopnia pobudzenia komórek supresorowych pochodzenia mieloidalnego w śledzionach myszy obciążonych nowotworem MC38 i poddanych chemioimmunoterapii.....	114
Ryc. 47.	Ocena odsetka komórek limfoidalnych wśród restymulowanych splenocytów pobranych od myszy obciążonych nowotworem MC38 i poddanych chemioimmunoterapii.....	115
Ryc. 48.	Aktywność restymulowanych splenocytów pobranych od myszy obciążonych nowotworem MC38 i poddanych chemioimmunoterapii.....	116
Ryc. 49.	Charakterystyka fenotypowa DC różnicowanych w kierunku dojrzałych komórek w obecności IL-10.....	120
Ryc. 50.	Ocena ekspresji IL-10R i fosforylacji czynnika STAT3 w komórkach dendrytycznych po stymulacji różnymi czynnikami.....	121
Ryc. 51.	Kinetyka wyciszenia ekspresji IL-10R w komórkach dendrytycznych po upływie 24 oraz 48 godzin od transdukcji lentiwirusowej i stymulacji LPS.....	122
Ryc. 52.	Kinetyka wyciszenia ekspresji IL-10R w komórkach dendrytycznych po upływie 24 oraz 48 godzin od transdukcji lentiwirusowej i stymulacji TAg.....	123
Ryc. 53.	Udział procentowy komórek żywych, komórek CD11c ⁺ oraz komórek EGFP ⁺ określony po upływie 24 oraz 48 godzin od transdukcji lentiwirusowej i stymulacji TAg.....	124

Ryc. 54.	Charakterystyka fenotypowa komórek wykonana po upływie 24 oraz 48 godzin od transdukcji lentiwirusowej i stymulacji TAg.....	125
Ryc. 55.	Indukowana za pomocą IL-10 fosforylacja czynnika STAT3 w komórkach dendrytycznych z wyciszoną ekspresją IL-10R określana po upływie 24 oraz 48 godzin od transdukcji lentiwirusowej i stymulacji TAg.....	126
Ryc. 56.	Zdolność komórek dendrytycznych z wyciszoną ekspresją IL-10R do pierwotnego pobudzenia komórek śledzionowych.....	128
Ryc. 57.	Wzrost guzów MC38 u myszy poddanych chemioimmunoterapii z udziałem metotreksatu lub nanokoniugatu HES-MTX oraz komórek dendrytycznych z wyciszoną ekspresją IL-10R i stymulowanych antygenami nowotworowymi.....	131
Ryc. 58.	Ocena nacieku leukocytów w guzach nowotworowych MC38 pobranych od myszy poddanych chemioimmunoterapii.....	132
Ryc. 59.	Ocena nacieku i stopnia pobudzenia limfocytów T w guzach nowotworowych MC38 pobranych od myszy poddanych chemioimmunoterapii.....	133
Ryc. 60.	Ocena nacieku komórek limfoidalnych w guzach nowotworowych MC38 Pobranych od myszy poddanych chemioimmunoterapii.....	134
Ryc. 61.	Ocena nacieku i stopnia pobudzenia komórek dendrytycznych w guzach nowotworowych myszy poddanych chemioimmunoterapii.....	135
Ryc. 62.	Ocena nacieku i stopnia pobudzenia komórek supresorowych pochodzenia mieloidalnego w guzach nowotworowych MC38 pobranych od myszy poddanych chemioimmunoterapii.....	136
Ryc. 63.	Ocena nacieku makrofagów związanych z nowotworem i określenie zmian w proporcji populacji tych komórek o różnej ekspresji cząsteczki MHC II w tkance guzów MC38 pobranych od myszy poddanych chemioimmunoterapii.....	137
Ryc. 64.	Ocena nacieku i polaryzacji makrofagów w guzach nowotworowych MC38 pobranych od myszy poddanych chemioimmunoterapii.....	138
Ryc. 65.	Ocena odsetka i poziomu aktywacji limfocytów T w węzłach chłonnych drenujących nowotwór MC38 myszy poddanych chemioimmunoterapii.....	139
Ryc. 66.	Ocena odsetka komórek limfoidalnych w węzłach chłonnych drenujących nowotwór MC38 myszy poddanych chemioimmunoterapii.....	140
Ryc. 67.	Ocena odsetka komórek dendrytycznych oraz stopnia ich pobudzenia w węzłach chłonnych drenujących nowotwór MC38 myszy poddanych chemioimmunoterapii.....	141
Ryc. 68.	Ocena odsetka i poziomu aktywacji limfocytów T w śledzionach myszy obarczonych nowotworem MC38 i poddanych chemioimmunoterapii.....	142
Ryc. 69.	Ocena odsetka komórek limfoidalnych w śledzionach myszy obarczonych nowotworem MC38 i poddanych chemioimmunoterapii.....	143
Ryc. 70.	Ocena odsetka i stopnia pobudzenia komórek dendrytycznych w śledzionach myszy obarczonych nowotworem MC38 i poddanych chemioimmunoterapii.....	144
Ryc. 71.	Ocena odsetka i stopnia pobudzenia komórek supresorowych pochodzenia mieloidalnego w śledzionach myszy obarczonych nowotworem MC38 i poddanych chemioimmunoterapii.....	145

Ryc. 72.	Ocena odsetka komórek limfoidalnych wśród restymulowanych splenocytów pobranych od myszy obarczonych nowotworem MC38 i poddanych chemioimmunoterapii.....	147
Ryc. 73.	Aktywność restymulowanych splenocytów pobranych od myszy obarczonych nowotworem MC38 i poddanych chemioimmunoterapii.....	148
Ryc. 74.	Korelacja między odsetkiem populacji komórek CD45 ⁺ , CD8 ⁺ , CD4 ⁺ oraz Treg napływających do tkanki nowotworu a objętością guzów MC38 pobranych od myszy poddanych chemioterapii.....	165
Ryc. 75.	Korelacja między odsetkiem populacji komórek NK, NKT i CD19 ⁺ napływających do tkanki nowotworu a objętością guzów MC38 pobranych od myszy poddanych chemioterapii.....	165
Ryc. 76.	Korelacja między odsetkiem populacji DC, M-MDSC i PMN-MDSC napływających do tkanki nowotworu a objętością guzów MC38 pobranych od myszy poddanych chemioterapii.....	166
Ryc. 77.	Korelacja między wielkością populacji Mφ napływających do tkanki nowotworu lub współczynnikiem M1/M2 a objętością guzów MC38 pobranych od myszy poddanych chemioterapii.....	166
Ryc. 78.	Korelacja między wielkością populacji TAM napływających do tkanki nowotworu lub współczynnikiem TAM MHC II ^{high} /TAM MHC II ^{low} a objętością guzów MC38 pobranych od myszy poddanych chemioterapii.....	167

Tabele

Tabela 1.	Przeciwciała monoklonalne stosowane w oznaczeniach cytometrycznych.....	44
Tabela 2.	Zestawy ELISA wykorzystane do oznaczenia stężeń cytokin w nadsączach znad hodowli komórkowych.....	46
Tabela 3.	System lentiwirusowy III generacji – charakterystyka stosowanych plazmidów.....	46
Tabela 4.	Charakterystyka sekwencji shRNA znajdujących się w plazmidzie transferowym pGLV-H1-GFP+puro.....	47
Tabela 5.	Sondy stosowane w określaniu ekspresji genów metodą reakcji PCR w czasie rzeczywistym.....	47
Tabela 6.	Charakterystyka stosowanych linii komórkowych.....	48
Tabela 7.	Enzymy restrykcyjne i bufony stosowane podczas analizy restrykcyjnej plazmidowego DNA.....	56
Tabela 8.	Charakterystyka fenotypowa komórek śledzionowych pobudzonych w pięciodniowej hodowli mieszanej.....	60
Tabela 9.	Charakterystyka fenotypowa populacji komórek układu odpornościowego identyfikowanych w śledzionach, guzach nowotworowych oraz węzłach chłonnych drenujących nowotwór.....	64

Piśmiennictwo

- Abolmaali S. S., Tamaddon A. M., Dinarvand R. 2013.** A review of therapeutic challenges and achievements of methotrexate delivery systems for treatment of cancer and rheumatoid arthritis. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 71 (5), 1115–1130.
- Abtahi S., Davani F., Mojtahedi Z., Hosseini S. V., Bananzadeh A., Ghaderi A. 2017.** Dual association of serum interleukin-10 levels with colorectal cancer. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 13 (2), 252–256.
- Ahn Y.-H., Hong S.-O., Kim J. H., Noh K. H., Song K.-H., Lee Y.-H., Jeon J.-H., Kim D.-W., Seo J. H., Kim T. W. 2015.** The siRNA cocktail targeting interleukin 10 receptor and transforming growth factor- β receptor on dendritic cells potentiates tumour antigen-specific CD8(+) T cell immunity. *Clinical and Experimental Immunology*, 181 (1), 164–178.
- Alonso R., Flament H., Lemoine S., Sedlik C., Bottasso E., Péguillet I., Prémel V., Denizeau J., Salou M., Darbois A., Núñez N. G., Salomon B., Gross D., Piaggio E., Lantz O. 2018.** Induction of anergic or regulatory tumor-specific CD4+ T cells in the tumor-draining lymph node. *Nature Communications*, 9 (1), 2113.
- Álvarez-González B., Rozalen M., Fernández-Perales M., Álvarez M. A., Sánchez-Polo M. 2020.** Methotrexate Gold Nanocarriers: Loading and Release Study: Its Activity in Colon and Lung Cancer Cells. *Molecules*, 25 (24), E6049.
- Anger-Góra N., Węgierek-Ciura K., Szczygieł A., Mierzejewska J., Pajtasz-Piasecka E., Rossowska J. 2021.** Treatment with lentiviral vectors encoding shRNA against interleukin 10 modulates the immunosuppressive activity of murine colon carcinoma-associated myeloid-derived suppressor cells. *Oncology Letters*, 22 (2), 582.
- 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.
- 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.
- Bellinghausen I., Sudowe S., König B., Reske-Kunz A. B., Knop J., Saloga J. 2006.** Interleukin-10-treated dendritic cells do not inhibit Th2 immune responses in ovalbumin/alum-sensitized mice. *International Archives of Allergy and Immunology*, 141 (1), 61–69.
- Berman R. M., Suzuki T., Tahara H., Robbins P. D., Narula S. K., Lotze M. T. 1996.** Systemic administration of cellular IL-10 induces an effective, specific, and long-lived immune response against established tumors in mice. *Journal of Immunology*, 157 (1), 231–238.
- Bofill-De Ros X., Gu S. 2016.** Guidelines for the optimal design of miRNA-based shRNAs. *Methods (San Diego, Calif.)*, 103, 157–166.
- Bol K. F., Schreibelt G., Gerritsen W. R., de Vries I. J. M., Figdor C. G. 2016.** Dendritic Cell-Based Immunotherapy: State of the Art and Beyond. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 22 (8), 1897–1906.
- Brecher M. E., Owen H. G., Bandarenko N. 1997.** Alternatives to albumin: starch replacement for plasma exchange. *Journal of Clinical Apheresis*, 12 (3), 146–153.
- Breckpot K., Escors D., Arce F., Lopes L., Karwacz K., Van Lint S., Keyaerts M., Collins M. 2010.** HIV-1 lentiviral vector immunogenicity is mediated by Toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR7. *Journal of Virology*, 84 (11), 5627–5636.
- Breckpot K., Heirman C., De Greef C., van der Bruggen P., Thielemans K. 2004.** Identification of new antigenic peptide presented by HLA-Cw7 and encoded by several MAGE genes

- using dendritic cells transduced with lentiviruses. *Journal of Immunology*, 172 (4), 2232–2237.
- 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.
- Burns J. C., Friedmann T., Driever W., Burrascano M., Yee J. K. 1993.** Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90 (17), 8033–8037.
- Butterfield L. H. 2013.** Dendritic cells in cancer immunotherapy clinical trials: are we making progress? *Frontiers in Immunology*, 4, 454.
- Butterfield L. H., Ribas A., Dissette V. B., Amarnani S. N., Vu H. T., Oseguera D., Wang H.-J., Elashoff R. M., McBride W. H., Mukherji B., Cochran A. J., Glaspy J. A., Economou J. S. 2003.** Determinant spreading associated with clinical response in dendritic cell-based immunotherapy for malignant melanoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 9 (3), 998–1008.
- Chen L., Shi Y., Zhu X., Guo W., Zhang M., Che Y., Tang L., Yang X., You Q., Liu Z. 2019.** IL-10 secreted by cancer-associated macrophages regulates proliferation and invasion in gastric cancer cells via c-Met/STAT3 signaling. *Oncology Reports*, 42 (2), 595–604.
- Chen S., Wang X., Wu X., Wei M. Q., Zhang B., Liu X., Wang Y. 2014.** IL-10 signalling blockade at the time of immunization inhibits Human papillomavirus 16 E7 transformed TC-1 tumour cells growth in mice. *Cellular Immunology*, 290 (1), 145–151.
- Chen X., Mangala L. S., Rodriguez-Aguayo C., Kong X., Lopez-Berestein G., Sood A. K. 2018.** RNA interference-based therapy and its delivery systems. *Cancer Metastasis Reviews*, 37 (1), 107–124.
- Chen Y., Zhang W., Huang Y., Gao F., Sha X., Lou K., Fang X. 2015.** The therapeutic effect of methotrexate-conjugated Pluronic-based polymeric micelles on the folate receptor-rich tumors treatment. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 4043–4057.
- Ciekot J., Goszczyński T., Boratyński J. 2012.** Methods for methotrexate determination in macromolecular conjugates drug carrier. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 69 (6), 1342–1346.
- 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.
- Corinti S., Albanesi C., la Sala A., Pastore S., Girolomoni G. 2001.** Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *Journal of Immunology*; 166 (7), 4312–4318.
- Correale P., Aquino A., Giuliani A., Pellegrini M., Micheli L., Cusi M. G., Nencini C., Petrioli R., Prete S. P., De Vecchis L., Turriziani M., Giorgi G., Bonmassar E., Francini G. 2003.** Treatment of colon and breast carcinoma cells with 5-fluorouracil enhances expression of carcinoembryonic antigen and susceptibility to HLA-A(*)02.01 restricted,

- CEA-peptide-specific cytotoxic T cells in vitro. *International Journal of Cancer*, 104 (4), 437–445.
- 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.
- Curiel T. J., Coukos G., Zou L., Alvarez X., Cheng P., Mottram P., Evdemon-Hogan M., Conejo-Garcia J. R., Zhang L., Burow M., Zhu Y., Wei S., Kryczek I., Daniel B., Gordon A., Myers L., Lackner A., Disis M. L., Knutson K. L., Chen L., Zou W. 2004.** Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Medicine*, 10 (9), 942–949.
- Curtsinger J. M., Lins D. C., Mescher M. F. 2003.** Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. *The Journal of Experimental Medicine*, 197 (9), 1141–1151.
- Davidov V., Jensen G., Mai S., Chen S.-H., Pan P.-Y. 2020.** Analyzing One Cell at a TIME: Analysis of Myeloid Cell Contributions in the Tumor Immune Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 11, 1842.
- De Guillebon E., Dardenne A., Saldmann A., Séguier S., Tran T., Paolini L., Lebbe C., Tartour E. 2020.** Beyond the concept of cold and hot tumors for the development of novel predictive biomarkers and the rational design of immunotherapy combination. *International Journal of Cancer*, 147 (6), 1509–1518.
- De Smedt T., Van Mechelen M., De Becker G., Urbain J., Leo O., Moser M. 1997.** Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *European Journal of Immunology*, 27 (5), 1229–1235.
- Demangel C., Bertolino P., Britton W. J. 2002.** Autocrine IL-10 impairs dendritic cell (DC)-derived immune responses to mycobacterial infection by suppressing DC trafficking to draining lymph nodes and local IL-12 production. *European Journal of Immunology*, 32 (4), 994–1002.
- Ding L., Linsley P. S., Huang L. Y., Germain R. N., Shevach E. M. 1993.** IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *Journal of Immunology*, 151 (3), 1224–1234.
- Duan Q., Zhang H., Zheng J., Zhang L. 2020.** Turning Cold into Hot: Firing up the Tumor Microenvironment. *Trends in Cancer*, 6 (7), 605–618.
- Dullaers M., Breckpot K., Van Meirvenne S., Bonehill A., Tuybaerts S., Michiels A., Straetman L., Heirman C., De Greef C., Van Der Bruggen P., Thielemans K. 2004.** Side-by-side comparison of lentivirally transduced and mRNA-electroporated dendritic cells: implications for cancer immunotherapy protocols. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 10 (4), 768–779.
- Dunn G. P., Old L. J., Schreiber R. D. 2004.** The three Es of cancer immunoediting. *Annual Review of Immunology*, 22, 329–360.
- Emens L. A., Middleton G. 2015.** The interplay of immunotherapy and chemotherapy: harnessing potential synergies. *Cancer Immunology Research*, 3 (5), 436–443.
- Emmerich J., Mumm J. B., Chan I. H., LaFace D., Truong H., McClanahan T., Gorman D. M., Oft M. 2012.** IL-10 directly activates and expands tumor-resident CD8(+) T cells without de novo infiltration from secondary lymphoid organs. *Cancer Research*, 72 (14), 3570–3581.

- Fang J., Nakamura H., Maeda H. 2011.** The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63 (3), 136–151.
- Feng L., Qi Q., Wang P., Chen H., Chen Z., Meng Z., Liu L. 2018.** Serum levels of IL-6, IL-8, and IL-10 are indicators of prognosis in pancreatic cancer. *The Journal of International Medical Research*, 46 (12), 5228–5236.
- Figueiró F., de Oliveira C. P., Bergamin L. S., Rockenbach L., Mendes F. B., Jandrey E. H. F., Moritz C. E. J., Pettenuzzo L. F., Sévigny J., Guterres S. S., Pohlmann A. R., Battastini A. M. O. 2016.** Methotrexate up-regulates ecto-5'-nucleotidase/CD73 and reduces the frequency of T lymphocytes in the glioblastoma microenvironment. *Purinergic Signalling*, 12 (2), 303–312.
- Fu C., Jiang A. 2018.** Dendritic Cells and CD8 T Cell Immunity in Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 9, 3059.
- 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., Celis E. i in. 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.
- Gardner A., Ruffell B. 2016.** Dendritic Cells and Cancer Immunity. *Trends in Immunology*, 37 (12), 855–865.
- 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*, 155 (6), 3112–3123.
- Golombek S. K., May J.-N., Theek B., Appold L., Drude N., Kiessling F., Lammers T. 2018.** Tumor Targeting via EPR: Strategies to Enhance Patient Responses. *Advanced drug delivery reviews*, 130, 17–38.
- Goos J. A. C. M., Cho A., Carter L. M., Dilling T. R., Davydova M., Mandleywala K., Puttick S., Gupta A., Price W. S., Quinn J. F., Whittaker M. R., Lewis J. S., Davis T. P. 2020.** Delivery of polymeric nanostars for molecular imaging and endoradiotherapy through the enhanced permeability and retention (EPR) effect. *Theranostics*, 10 (2), 567–584.
- Gordy J. T., Luo K., Francica B., Drake C., Markham R. B. 2018.** Anti-IL-10-mediated Enhancement of Antitumor Efficacy of a Dendritic Cell-targeting MIP3 α -gp100 Vaccine in the B16F10 Mouse Melanoma Model Is Dependent on Type I Interferons. *Journal of Immunotherapy* 41 (4), 181–189.
- Goszczyński T., Boratyński J., Wietrzyk J., Filip-Psurska B., Kempieńska K. 2013., wrzesień 6** Patent WO/2013/127885; A Conjugate of Methotrexate and Hydroxyethyl Starch for Use in the Treatment Cancer.
- Goszczyński T. M., Filip-Psurska B., Kempieńska K., Wietrzyk J., Boratyński J. 2014.** Hydroxyethyl starch as an effective methotrexate carrier in anticancer therapy. *Pharmacology Research & Perspectives*, 2 (3), e00047.

- Goszczyński T., Nevozhay D., Wietrzyk J., Omar M. S., Boratyński J. 2013.** The antileukemic activity of modified fibrinogen-methotrexate conjugate. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1830 (3), 2526–2530.
- Groth C., Hu X., Weber R., Fleming V., Altevogt P., Utikal J., Umansky V. 2019.** Immunosuppression mediated by myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) during tumour progression. *British Journal of Cancer*, 120 (1), 16–25.
- 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., Hon T., i in., 2016.** Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. *Immunity*, 45 (3), 669–684.
- 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.
- Hao F., Lee R. J., Yang C., Zhong L., Sun Y., Dong S., Cheng Z., Teng L., Meng Q., Lu J., Xie J., Teng L. 2019.** Targeted Co-Delivery of siRNA and Methotrexate for Tumor Therapy via Mixed Micelles. *Pharmaceutics*, 11 (2).
- Hargadon K. M. 2013.** Tumor-altered dendritic cell function: implications for anti-tumor immunity. *Frontiers in Immunology*, 4, 192.
- Hart K. M., Byrne K. T., Molloy M. J., Usherwood E. M., Berwin B. 2011.** IL-10 immunomodulation of myeloid cells regulates a murine model of ovarian cancer. *Frontiers in Immunology*, 2, 29.
- Haverkamp J. M., Smith A. M., Weinlich R., Dillon C. P., Qualls J. E., Neale G., Koss B., Kim Y., Bronte V., Herold M. J., Green D. R., Opferman J. T., Murray P. J. 2014.** Myeloid-derived suppressor activity is mediated by monocytic lineages maintained by continuous inhibition of extrinsic and intrinsic death pathways. *Immunity*, 41 (6), 947–959.
- Herber D. L., Cao W., Nefedova Y., Novitskiy S. V., Nagaraj S., Tyurin V. A., Corzo A., Cho H.-I., Celis E., Lennox B., Knight S. C., Padhya T., McCaffrey T. V., McCaffrey J. C., Antonia S., Fishman M., Ferris R. L., Kagan V. E., Gabrilovich D. I. 2010.** Lipid accumulation and dendritic cell dysfunction in cancer. *Nature Medicine*, 16 (8), 880–886.
- Hernandez C., Huebener P., Schwabe R. F. 2016.** Damage-associated molecular patterns in cancer: a double-edged sword. *Oncogene*, 35 (46), 5931–5941.
- 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 L. Y., Reis e Sousa C., Itoh Y., Inman J., Scott D. E. 2001.** IL-12 induction by a TH1-inducing adjuvant in vivo: dendritic cell subsets and regulation by IL-10. *Journal of Immunology*, 167 (3), 1423–1430.
- 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.
- Ibrahim M. L., Klement J. D., Lu C., Redd P. S., Xiao W., Yang D., Browning D. D., Savage N. M., Buckhaults P. J., Morse H. C., Liu K. 2018.** Myeloid-Derived Suppressor Cells Produce IL-10 to Elicit DNMT3b-Dependent IRF8 Silencing to Promote Colitis-Associated Colon Tumorigenesis. *Cell Reports*, 25 (11), 3036-3046.e6.
- 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.
- Jacobs B., Gebel V., Heger L., Grèze V., Schild H., Dudziak D., Ullrich E. 2021.** Characterization and Manipulation of the Crosstalk Between Dendritic and Natural Killer Cells Within the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 12, 670540.
- Kalbasi A., June C. H., Haas N., Vapiwala N. 2013.** Radiation and immunotherapy: a synergistic combination. *The Journal of Clinical Investigation*, 123 (7), 2756–2763.
- Kalli F., Machiorlatti R., Battaglia F., Parodi A., Conteduca G., Ferrera F., Proietti M., Tardito S., Sanguineti M., Millo E., Fenoglio D., De Palma R., Inghirami G., Filaci G. 2013.** Comparative analysis of cancer vaccine settings for the selection of an effective protocol in mice. *Journal of Translational Medicine*, 11, 120.
- Kaneno R., Shurin G. V., Tourkova I. L., Shurin M. R. 2009.** Chemomodulation of human dendritic cell function by antineoplastic agents in low noncytotoxic concentrations. *Journal of Translational Medicine*, 7, 58.
- 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.
- Karthaus N., Torensma R., Tel J. 2012.** Deciphering the message broadcast by tumor-infiltrating dendritic cells. *The American Journal of Pathology*, 181 (3), 733–742.
- Karwacz K., Bricogne C., MacDonald D., Arce F., Bennett C. L., Collins M., Escors D. 2011.** PD-L1 co-stimulation contributes to ligand-induced T cell receptor down-modulation on CD8⁺ T cells. *EMBO Molecular Medicine*, 3 (10), 581–592.
- Karyampudi L., Lamichhane P., Scheid A. D., Kalli K. R., Shreeder B., Krempski J. W., Behrens M. D., Knutson K. L. 2014.** Accumulation of memory precursor CD8 T cells in regressing tumors following combination therapy with vaccine and anti-PD-1 antibody. *Cancer Research*, 74 (11), 2974–2985.
- Kelemen L. E. 2006.** The role of folate receptor alpha in cancer development, progression and treatment: cause, consequence or innocent bystander? *International Journal of Cancer*, 119 (2), 243–250.
- Keller C. W., Freigang S., Lünemann J. D. 2017.** Reciprocal Crosstalk between Dendritic Cells and Natural Killer T Cells: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Frontiers in Immunology*, 8, 570.
- 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]. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej (Online)*, 68, 879–892.
- Kim J. H., Kang T. H., Noh K. H., Bae H. C., Ahn Y.-H., Lee Y.-H., Choi E. Y., Chun K.-H., Lee S.-J., Kim T. W. 2011.** Blocking the immunosuppressive axis with small interfering RNA targeting interleukin (IL)-10 receptor enhances dendritic cell-based vaccine potency. *Clinical and Experimental Immunology*, 165 (2), 180–189.
- Kim R., Emi M., Tanabe K. 2007.** Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, 121 (1), 1–14.

- Kobayashi H., Watanabe R., Choyke P. L. 2013.** Improving conventional enhanced permeability and retention (EPR) effects; what is the appropriate target? *Theranostics*, 4 (1), 81–89.
- Koźmiński P., Halik P. K., Chesori R., Gniazdowska E. 2020.** Overview of Dual-Acting Drug Methotrexate in Different Neurological Diseases, Autoimmune Pathologies and Cancers. *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (10).
- Krempski J., Karyampudi L., Behrens M. D., Erskine C. L., Hartmann L., Dong H., Goode E. L., Kalli K. R., Knutson K. L. 2011.** Tumor-infiltrating programmed death receptor-1+ dendritic cells mediate immune suppression in ovarian cancer. *Journal of Immunology*, 186 (12), 6905–6913.
- Ku A. W., Muhitch J. B., Powers C. A., Diehl M., Kim M., Fisher D. T., Sharda A. P., Clements V. K., O’Loughlin K., Minderman H., Messmer M. N., Ma J., Skitzki J. J., Steeber D. A., Walcheck B., Ostrand-Rosenberg S., Abrams S. I., Evans S. S. 2016.** Tumor-induced MDSC act via remote control to inhibit L-selectin-dependent adaptive immunity in lymph nodes. *ELife*, 5, e17375.
- Labbé R. P., Vessillier S., Rafiq Q. A. 2021.** Lentiviral Vectors for T Cell Engineering: Clinical Applications, Bioprocessing and Future Perspectives. *Viruses*, 13 (8), 1528.
- Landreneau J. P., Shurin M. R., Agassandian M. V., Keskinov A. A., Ma Y., Shurin G. V. 2015.** Immunological Mechanisms of Low and Ultra-Low Dose Cancer Chemotherapy. *Cancer Microenvironment: Official Journal of the International Cancer Microenvironment Society*, 8 (2), 57–64.
- Laoui D., Van Overmeire E., Di Conza G., Aldeni C., Keirsse J., Morias Y., Movahedi K., Houbracken I., Schoupe E., Elkrim Y., Karroum O., Jordan B., Carmeliet P., Gysemans C., De Baetselier P., Mazzone M., Van Ginderachter J. A. 2014.** Tumor hypoxia does not drive differentiation of tumor-associated macrophages but rather fine-tunes the M2-like macrophage population. *Cancer Research*, 74 (1), 24–30.
- Le H. K., Graham L., Cha E., Morales J. K., Manjili M. H., Bear H. D. 2009.** Gemcitabine directly inhibits myeloid derived suppressor cells in BALB/c mice bearing 4T1 mammary carcinoma and augments expansion of T cells from tumor-bearing mice. *International Immunopharmacology*, 9 (7–8), 900–909.
- Lesokhin A. M., Hohl T. M., Kitano S., Cortez C., Hirschhorn-Cymerman D., Avogadri F., Rizzuto G. A., Lazarus J. J., Pamer E. G., Houghton A. N., Merghoub T., Wolchok J. D. 2012.** Monocytic CCR2(+) myeloid-derived suppressor cells promote immune escape by limiting activated CD8 T-cell infiltration into the tumor microenvironment. *Cancer Research*, 72 (4), 876–886.
- Li B., Wang F., Ma C., Hao T., Geng L., Jiang H. 2019.** Predictive value of IL-18 and IL-10 in the prognosis of patients with colorectal cancer. *Oncology Letters*, 18 (1), 713–719.
- Li C., Li H., Jiang K., Li J., Gai X. 2014.** TLR4 signaling pathway in mouse Lewis lung cancer cells promotes the expression of TGF- β 1 and IL-10 and tumor cells migration. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 24 (1), 869–875
- Li H., Han Y., Guo Q., Zhang M., Cao X. 2009.** Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF- β 1. *Journal of Immunology*, 182 (1), 240–249.
- Li M.-H., Choi S. K., Thomas T. P., Desai A., Lee K.-H., Kotlyar A., Banaszak Holl M. M., Baker J. R. 2012.** Dendrimer-based multivalent methotrexates as dual acting nanoconjugates for cancer cell targeting. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 47 (1), 560–572.

- Liechtenstein T., Perez-Janices N., Escors D. 2013.** Lentiviral vectors for cancer immunotherapy and clinical applications. *Cancers*, 5 (3), 815–837.
- Liu J., Zhang N., Li Q., Zhang W., Ke F., Leng Q., Wang H., Chen J., Wang H. 2011.** Tumor-associated macrophages recruit CCR6+ regulatory T cells and promote the development of colorectal cancer via enhancing CCL20 production in mice. *PLoS One*, 6 (4), e19495.
- Liu Y., Yu Y., Yang S., Zeng B., Zhang Z., Jiao G., Zhang Y., Cai L., Yang R. 2009.** Regulation of arginase I activity and expression by both PD-1 and CTLA-4 on the myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 58 (5), 687–697.
- Liu Y.-T., Sun Z.-J. 2021.** Turning cold tumors into hot tumors by improving T-cell infiltration. *Theranostics*, 11 (11), 5365–5386.
- Llopiz D., Aranda F., Díaz-Valdés N., Ruiz M., Infante S., Belsúe V., Lasarte J. J., Sarobe P. 2016.** Vaccine-induced but not tumor-derived Interleukin-10 dictates the efficacy of Interleukin-10 blockade in therapeutic vaccination. *Oncoimmunology*, 5 (2), e1075113.
- 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.
- Macatonia S. E., Hosken N. A., Litton M., Vieira P., Hsieh C. S., Culpepper J. A., Wysocka M., Trinchieri G., Murphy K. M., O’Garra A. 1995.** Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *Journal of Immunology*, 154 (10), 5071–5079.
- Maeda H. 2010.** Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the EPR effect: background and future prospects. *Bioconjugate Chemistry*, 21 (5), 797–802.
- Maeda H., Wu J., Sawa T., Matsumura Y., Hori K. 2000.** Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 65 (1–2), 271–284.
- 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.
- Matsuda M., Salazar F., Petersson M., Masucci G., Hansson J., Pisa P., Zhang Q. J., Masucci M. G., Kiessling R. 1994.** Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression. *The Journal of Experimental Medicine*, 180 (6), 2371–2376.
- Mellman I. 2013.** Dendritic cells: master regulators of the immune response. *Cancer Immunology Research*, 1 (3), 145–149.
- Mellor A. L., Munn D. H. 2004.** IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nature Reviews. Immunology*, 4 (10), 762–774.
- 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.
- Milone M. C., O’Doherty U. 2018.** Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia*.
- Mittal D., Gubin M. M., Schreiber R. D., Smyth M. J. 2014.** New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Current Opinion in Immunology*, 27, 16–25.
- 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.
- 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.
- Mumm J. B., Emmerich J., Zhang X., Chan I., Wu L., Mauze S., Blaisdell S., Basham B., Dai J., Grein J., Sheppard C., Hong K., Cutler C., Turner S., LaFace D., Kleinschek M., Judo M., Ayanoglu G., Langowski J., Gu D., i in., 2011.** IL-10 elicits IFN γ -dependent tumor immune surveillance. *Cancer Cell*, 20 (6), 781–796.
- Munn D. H., Mellor A. L. 2007.** Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *The Journal of Clinical Investigation*, 117 (5), 1147–1154.
- Munn D. H., Sharma M. D., Baban B., Harding H. P., Zhang Y., Ron D., Mellor A. L. 2005.** GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity*, 22 (5), 633–642.
- Munn D. H., Sharma M. D., Mellor A. L. 2004.** Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4⁺ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *Journal of Immunology*, 172 (7), 4100–4110.
- Nagaraj S., Gupta K., Pisarev V., Kinarsky L., Sherman S., Kang L., Herber D. L., Schneck J., Gabrilovich D. I. 2007.** Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8⁺ T cell tolerance in cancer. *Nature Medicine*, 13 (7), 828–835.
- Naing A., Infante J. R., Papadopoulos K. P., Chan I. H., Shen C., Ratti N. P., Rojo B., Autio K. A., Wong D. J., Patel M. R., Ott P. A., Falchook G. S., Pant S., Hung A., Pekarek K. L., Wu V., Adamow M., McCauley S., Mumm J. B., Wong P., i in., 2018.** PEGylated IL-10 (Pegilodecakin) Induces Systemic Immune Activation, CD8⁺ T Cell Invigoration and Polyclonal T Cell Expansion in Cancer Patients. *Cancer Cell*, 34 (5), 775-791.e3.
- Naing A., Papadopoulos K. P., Autio K. A., Ott P. A., Patel M. R., Wong D. J., Falchook G. S., Pant S., Whiteside M., Rasco D. R., Mumm J. B., Chan I. H., Bendell J. C., Bauer T. M., Colen R. R., Hong D. S., Van Vlasselaer P., Tannir N. M., Oft M., Infante J. R. 2016.** Safety, Antitumor Activity, and Immune Activation of Pegylated Recombinant Human Interleukin-10 (AM0010) in Patients With Advanced Solid Tumors. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 34 (29), 3562–3569.
- Nars M. S., Kaneno R. 2013.** Immunomodulatory effects of low dose chemotherapy and perspectives of its combination with immunotherapy. *International Journal of Cancer*, 132 (11), 2471–2478.
- Nevozhay D., Budzynska R., Kanska U., Jagiello M., Omar M. S., Boratynski J., Opolski A. 2006.** Antitumor properties and toxicity of dextran-methotrexate conjugates are dependent on the molecular weight of the carrier. *Anticancer Research*, 26 (2A), 1135–1143.
- Ng T. H. S., Britton G. J., Hill E. V., Verhagen J., Burton B. R., Wraith D. C. 2013.** Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Frontiers in Immunology*, 4, 129.
- Ni G., Zhang L., Yang X., Li H., Ma B., Walton S., Wu X., Yuan J., Wang T., Liu X. 2020.** Targeting interleukin-10 signalling for cancer immunotherapy, a promising and complicated task. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 16 (10), 2328–2332.
- Nogueira E., Sárria M. P., Azoia N. G., Antunes E., Loureiro A., Guimarães D., Noro J., Rollett A., Guebitz G., Cavaco-Paulo A. 2018.** Internalization of Methotrexate Conjugates by Folate Receptor- α . *Biochemistry*, 57 (49), 6780–6786.
- O’Garra A., Vieira P. 2004.** Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nature Medicine*, 10 (8), 801–805.
- 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.

- Oldham R. A., Berinstein E. M., Medin J. A. 2015.** Lentiviral vectors in cancer immunotherapy. *Immunotherapy*, 7 (3), 271–284.
- Ostrand-Rosenberg S. 2018.** Myeloid derived-suppressor cells: their role in cancer and obesity. *Current Opinion in Immunology*, 51, 68–75.
- 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.
- Palucka K., Banchereau J. 2012.** Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature Reviews. Cancer*, 12 (4), 265–277.
- Palucka K., Banchereau J. 2013.** Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines. *Immunity*, 39 (1), 38–48.
- Pan P.-Y., Ma G., Weber K. J., Ozao-Choy J., Wang G., Yin B., Divino C. M., Chen S.-H. 2010.** Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Cancer Research*, 70 (1), 99–108.
- Pan Y., Yu Y., Wang X., Zhang T. 2020.** Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. *Frontiers in Immunology*, 11, 583084.
- Papoutsopoulou S., Pollock L., Walker C., Tench W., Samad S. S., Bergey F., Lenzi L., Sheibani-Tezerji R., Rosenstiel P., Alam M. T., Martins Dos Santos V. A. P., Müller W., Campbell B. J. 2021.** Impact of Interleukin 10 Deficiency on Intestinal Epithelium Responses to Inflammatory Signals. *Frontiers in Immunology*, 12, 690817.
- Petty A. J., Yang Y. 2017.** Tumor-associated macrophages: implications in cancer immunotherapy. *Immunotherapy*, 9 (3), 289–302.
- Pitt J. M., Marabelle A., Eggermont A., Soria J.-C., Kroemer G., Zitvogel L. 2016.** Targeting the tumor microenvironment: removing obstruction to anticancer immune responses and immunotherapy. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 27 (8), 1482–1492.
- Platt A. M., Randolph G. J. 2013.** Dendritic cell migration through the lymphatic vasculature to lymph nodes. *Advances in Immunology*, 120, 51–68.
- Pluta K., Kacprzak M. M. 2009.** Use of HIV as a gene transfer vector. *Acta Biochimica Polonica*, 56 (4), 531–595.
- Poschke I., Mougiakakos D., Hansson J., Masucci G. V., Kiessling R. 2010.** Immature immunosuppressive CD14+HLA-DR-/low cells in melanoma patients are Stat3hi and overexpress CD80, CD83, and DC-sign. *Cancer Research*, 70 (11), 4335–4345.
- Ramakrishnan R., Tyurin V. A., Turyin V. A., Veglia F., Condamine T., Amoscato A., Mohammadyani D., Johnson J. J., Zhang L. M., Klein-Seetharaman J., Celis E., Kagan V. E., Gabrilovich D. I. 2014.** Oxidized lipids block antigen cross-presentation by dendritic cells in cancer. *Journal of Immunology*, 192 (6), 2920–2931.
- Ribatti D. 2017.** The concept of immune surveillance against tumors. The first theories. *Oncotarget*, 8 (4), 7175–7180.
- Rodriguez P. C., Quiceno D. G., Zabaleta J., Ortiz B., Zea A. H., Piazuelo M. B., Delgado A., Correa P., Brayer J., Sotomayor E. M., Antonia S., Ochoa J. B., Ochoa A. C. 2004.** Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Research*, 64 (16), 5839–5849.

- Rodriguez P. C., Zea A. H., DeSalvo J., Culotta K. S., Zabaleta J., Quiceno D. G., Ochoa J. B., Ochoa A. C. 2003.** L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes. *Journal of Immunology*, 171 (3), 1232–1239.
- 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., Szczygiel 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., Pajtasz-Piasecka E., Anger N., Wojas-Turek J., Kicielińska J., Piasecki E., Duś D. 2014.** Cyclophosphamide and IL-12-transduced DCs enhance the antitumor activity of tumor antigen-stimulated DCs and reduce Tregs and MDSCs number. *Journal of Immunotherapy*, 37 (9), 427–439.
- 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.
- 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.
- 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.
- Santos P. M., Butterfield L. H. 2018.** Dendritic Cell-Based Cancer Vaccines. *Journal of Immunology*, 200 (2), 443–449.
- Saraiva M., Vieira P., O’Garra A. 2020.** Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *The Journal of Experimental Medicine*, 217 (1), e20190418.
- Sato T., McCue P., Masuoka K., Salwen S., Lattime E. C., Mastrangelo M. J., Berd D. 1996.** Interleukin 10 production by human melanoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2 (8), 1383–1390.
- Schmidt S. V., Nino-Castro A. C., Schultze J. L. 2012.** Regulatory dendritic cells: there is more than just immune activation. *Frontiers in Immunology*, 3, 274.
- Schreiber R. D., Old L. J., Smyth M. J. 2011.** Cancer immunoediting: integrating immunity’s roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331 (6024), 1565–1570.
- Serrano A. E., Menares-Castillo E., Garrido-Tapia M., Ribeiro C. H., Hernández C. J., Mendoza-Naranjo A., Gatica-Andrades M., Valenzuela-Díaz R., Zúñiga R., López M. N., Salazar-Onfray F., Aguillón J.-C., Molina M.-C. 2011.** Interleukin 10 decreases MICA expression on melanoma cell surface. *Immunology and Cell Biology*, 89 (3), 447–457.

- Shankaran V., Ikeda H., Bruce A. T., White J. M., Swanson P. E., Old L. J., Schreiber R. D. 2001.** IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, 410 (6832), 1107–1111.
- Shurin G. V., Tourkova I. L., Kaneno R., Shurin M. R. 2009.** Chemotherapeutic agents in noncytotoxic concentrations increase antigen presentation by dendritic cells via an IL-12-dependent mechanism. *Journal of Immunology*, 183 (1), 137–144.
- Shurin M. R., Naiditch H., Gutkin D. W., Umansky V., Shurin G. V. 2012.** ChemoImmunoModulation: immune regulation by the antineoplastic chemotherapeutic agents. *Current Medicinal Chemistry*, 19 (12), 1792–1803.
- Sica A., Mantovani A. 2012.** Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of Clinical Investigation*, 122 (3), 787–795.
- Singer O., Verma I. M. 2008.** Applications of lentiviral vectors for shRNA delivery and transgenesis. *Current Gene Therapy*, 8 (6), 483–488.
- Singh A., Trivedi P., Jain N. K. 2018.** Advances in siRNA delivery in cancer therapy. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46 (2), 274–283.
- 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.
- Son C.-H., Shin D. Y., Kim S.-D., Park H.-S., Jung M. H., Bae J.-H., Kang C.-D., Yang K., Park Y.-S. 2012.** Improvement of antitumor effect of intratumoral injection of immature dendritic cells into irradiated tumor by cyclophosphamide in mouse colon cancer model. *Journal of Immunotherapy*, 35 (8), 607–614.
- Srivastava M. K., Sinha P., Clements V. K., Rodriguez P., Ostrand-Rosenberg S. 2010.** Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Research*, 70 (1), 68–77.
- Stadtmauer E. A., Fajt T. H., Lowther D. E., Badros A. Z., Chagin K., Dengel K., Iyengar M., Melchiori L., Navenot J.-M., Norry E., Trivedi T., Wang R., Binder G. K., Amado R., Rapoport A. P. 2019.** Long-term safety and activity of NY-ESO-1 SPEAR T cells after autologous stem cell transplant for myeloma. *Blood Advances*, 3 (13), 2022–2034.
- Steinbrink K., Graulich E., Kubsch S., Knop J., Enk A. H. 2002.** CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood*, 99 (7), 2468–2476
- Steinbrink K., Jonuleit H., Müller G., Schuler G., Knop J., Enk A. H. 1999.** Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood*, 93 (5), 1634–1642.
- 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.
- Sumimoto H., Tsuji T., Miyoshi H., Hagihara M., Takada-Yamazaki R., Okamoto S., Ikeda Y., Takahashi T., Kawakami Y. 2002.** Rapid and efficient generation of lentivirally gene-modified dendritic cells from DC progenitors with bone marrow stromal cells. *Journal of Immunological Methods*, 271 (1–2), 153–165.
- Szkaradkiewicz A., Karpiński T. M., Drews M., Borejsza-Wysocki M., Majewski P., Andrzejewska E. 2010.** Natural killer cell cytotoxicity and immunosuppressive cytokines

- (IL-10, TGF-beta1) in patients with gastric cancer. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010, 901564.
- Taylor A., Akdis M., Joss A., Akkoç T., Wenig R., Colonna M., Daigle I., Flory E., Blaser K., Akdis C. A. 2007.** IL-10 inhibits CD28 and ICOS costimulations of T cells via src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120 (1), 76–83.
- Thepmalee C., Panya A., Junking M., Chieochansin T., Yenchitsomanus P.-T. 2018.** Inhibition of IL-10 and TGF- β receptors on dendritic cells enhances activation of effector T-cells to kill cholangiocarcinoma cells. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 14 (6), 1423–1431.
- Thepmalee C., Panya A., Sujjitjoo J., Sawasdee N., Pongvarin N., Junking M., Yenchitsomanus P.-T. 2020.** Suppression of TGF- β and IL-10 receptors on self-differentiated dendritic cells by short-hairpin RNAs enhanced activation of effector T-cells against cholangiocarcinoma cells. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 16 (10), 2318–2327.
- Thomas T. P., Goonewardena S. N., Majoros I. J., Kotlyar A., Cao Z., Leroueil P. R., Baker J. R. 2011.** Folate-targeted nanoparticles show efficacy in the treatment of inflammatory arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 63 (9), 2671–2680.
- Thomas T. P., Huang B., Choi S. K., Silpe J. E., Kotlyar A., Desai A. M., Zong H., Gam J., Joice M., Baker J. R. 2012.** Polyvalent dendrimer-methotrexate as a folate receptor-targeted cancer therapeutic. *Molecular Pharmaceutics*, 9 (9), 2669–2676.
- Tran Janco J. M., Lamichhane P., Karyampudi L., Knutson K. L. 2015.** Tumor-infiltrating dendritic cells in cancer pathogenesis. *Journal of Immunology*, 194 (7), 2985–2991.
- Tuettenberg A., Huter E., Hubo M., Horn J., Knop J., Grimbacher B., Kroczeck R. A., Stoll S., Jonuleit H. 2009.** The role of ICOS in directing T cell responses: ICOS-dependent induction of T cell anergy by tolerogenic dendritic cells. *Journal of Immunology*, 182 (6), 3349–3356.
- Vincent J., Mignot G., Chalmin F., Ladoire S., Bruchard M., Chevriaux A., Martin F., Apetoh L., Rébé C., Ghiringhelli F. 2010.** 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Research*, 70 (8), 3052–3061.
- Visentin M., Zhao R., Goldman I. D. 2012.** The antifolates. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 26 (3), 629–648, ix.
- Walters C. L., Arend R. C., Armstrong D. K., Naumann R. W., Alvarez R. D. 2013.** Folate and folate receptor alpha antagonists mechanism of action in ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 131 (2), 493–498.
- Wang B., Li Q., Qin L., Zhao S., Wang J., Chen X. 2011.** Transition of tumor-associated macrophages from MHC class II(hi) to MHC class II(low) mediates tumor progression in mice. *BMC Immunology*, 12, 43.
- Wang H., Tian T., Zhang J. 2021.** Tumor-Associated Macrophages (TAMs) in Colorectal Cancer (CRC): From Mechanism to Therapy and Prognosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (16), 8470.
- Weir G. M., Liwski R. S., Mansour M. 2011.** Immune modulation by chemotherapy or immunotherapy to enhance cancer vaccines. *Cancers*, 3 (3), 3114–3142.
- Wilhelm S., Tavares A. J., Din Q., Ohta S., Audet J., Dvorak H. F., Chan W. C. W. 2016.** Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nature Reviews Materials*, 1 (16014).
- Wojas J., Pajtasz-Piasecka E. 2010.** [Dendritic cell-regulatory T-cell interaction]. *Postępy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej (Online)*, 64, 167–174.

- 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.
- Woźniak M., Pastuch-Gawolek G., Makuch S., Wiśniewski J., Krenács T., Hamar P., Gamian A., Szeja W., Szkudlarek D., Krawczyk M., Agrawal S. 2021.** In Vitro and In Vivo Efficacy of a Novel Glucose-Methotrexate Conjugate in Targeted Cancer Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (4), 1748.
- Xiang X., Wang J., Lu D., Xu X. 2021.** Targeting tumor-associated macrophages to synergize tumor immunotherapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6 (1), 75.
- Yang R., Cai Z., Zhang Y., Yutzy W. H., Roby K. F., Roden R. B. S. 2006.** CD80 in immune suppression by mouse ovarian carcinoma-associated Gr-1+CD11b+ myeloid cells. *Cancer Research*, 66 (13), 6807–6815.
- Yao W., Li Y., Zeng L., Zhang X., Zhou Z., Zheng M., Wan H. 2019.** Intratumoral injection of dendritic cells overexpressing interleukin-12 inhibits melanoma growth. *Oncology Reports*, 42 (1), 370–376.
- Yaseen M. M., Abuharfeil N. M., Darmani H., Daoud A. 2020.** Mechanisms of immune suppression by myeloid-derived suppressor cells: the role of interleukin-10 as a key immunoregulatory cytokine. *Open Biology*, 10 (9), 200111.
- Zdanov A. 2010.** Structural analysis of cytokines comprising the IL-10 family. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 21 (5), 325–330.
- Zein R., Sharrouf W., Selting K. 2020.** Physical Properties of Nanoparticles That Result in Improved Cancer Targeting. *Journal of Oncology*, 2020, 5194780.
- Zhang Y., Zheng Y., Shou L., Shi Y., Shen H., Zhu M., Ye X., Jin J., Xie W. 2020.** Increased Serum Level of Interleukin-10 Predicts Poor Survival and Early Recurrence in Patients With Peripheral T-Cell Lymphomas. *Frontiers in Oncology*, 10, 584261.
- Zhao S., Wu D., Wu P., Wang Z., Huang J. 2015.** Serum IL-10 Predicts Worse Outcome in Cancer Patients: A Meta-Analysis. *PloS One*, 10 (10), e0139598.
- Zhong H., Han B., Tourkova I. L., Lokshin A., Rosenbloom A., Shurin M. R., Shurin G. V. 2007.** Low-dose paclitaxel prior to intratumoral dendritic cell vaccine modulates intratumoral cytokine network and lung cancer growth. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13 (18 Pt 1), 5455–5462.
- Zhu J. 2018.** T Helper Cell Differentiation, Heterogeneity, and Plasticity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10 (10), a030338.