

О.М. Караман  
Н.І. Федосова  
І.М. Восійкова  
О.М. Пясковська  
Г.В. Діденко  
Г.І. Соляник

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

**Ключові слова:** пухлино-асоційована анемія, карцинома легені Льюїс LLC/R9, протипухлинні вакцини, ІЛ-10, ІЛ-4, ІФН- $\gamma$ , ІЛ-1 $\beta$ .

## РІВЕНЬ ДЕЯКИХ ПРО-ТА ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ЦИТОКІНІВ У МИШЕЙ З ВИСОКОАНГІОГЕННОЮ КАРЦИНОМОЮ ЛЕГЕНІ ЛЬЮІС НА ФОНІ ЗАСТОСУВАННЯ ПРОТИПУХЛИННИХ ВАКЦИН

**Мета:** дослідити рівень деяких про- та протизапальних цитокінів у мишей з високоангіогенним варіантом карциноми легені Льюїс на фоні застосування протипухлинних вакцин, виготовлених на основі антигенів клітин високоангіогенного (LLC/R9) або низькоангіогенного (LLC) варіантів карциноми. **Об'єкт і методи:** дослідження проведено на мишах-самцях C<sub>57</sub>/Bl з перещепленою LLC/R9. При виготовленні протипухлинних вакцин (отриманих із клітин LLC або LLC/R9) як ад'ювант використовували білоквісний метаболіт *B. subtilis* з м.м. 70 кДа. Схема вакцинації включала 4-разове підшкірне введення, яке розпочинали на 12-ту добу після перещеплення LLC/R9. Контролем служували інтактні тварини та невакциновані миші з LLC/R9. На 33-тю добу пухлинного росту в сироватці крові (СК) та супернатантах спленоцитів визначали рівні фактора некрозу пухлини альфа (ФНП- $\alpha$ ), інтерферону гамма (ІФН- $\gamma$ ), інтерлейкіну (ІЛ)-1, -4, -10. **Результати:** у мишей з LLC/R9 важлива роль у формуванні пухлиноасоційованої анемії належить ІЛ-10 та ІФН- $\gamma$ . Застосування вакцин, виготовленої з клітин LLC, запобігло на пізніх стадіях пухлинного росту накопиченню в СК ІФН- $\gamma$ , що, очевидно, і зумовило можливість сформувати достатній для антиметастатичного ефекту протипухлинний захист. Водночас введення цієї вакцини не запобігло формуванню імуносупресивного стану (підвищена здатність спленоцитів до продукції ІЛ-10 з одночасним зниженням продукції ІЛ-1 $\beta$ ). Застосування вакцин, виготовленої з клітин LLC/R9, не впливало на пізніх стадіях пухлинного росту на рівень у СК ІФН- $\gamma$  та підвищувало рівень ІЛ-4 та -1 $\beta$ , що, ймовірно, спричинило в цій групі розвиток більш вираженої анемії. Застосування цієї вакцини також не впливало на функціональний стан спленоцитів: відзначали зниження продукції ІФН- $\gamma$ . **Висновки:** одержані дані підтверджують гуморальний (зокрема зумовлений рівнями цитокінів ІЛ-10, ІФН- $\gamma$  та ІЛ-1 $\beta$ ) механізм формування асоційованої з розвитком LLC/R9 анемії, а також можуть стати підґрунтям для розроблення показань використання аутологічних вакцин з урахуванням проявів паранеопластичного синдрому.

Питання щодо вивчення механізмів патогенезу паранеопластичних синдромів (ПНС) та можливості їх корекції у хворих зі злюкисними пухлинами все ще залишаються актуальними [1, 2]. На сьогодні налічується близько 70 видів ПНС, причому їх перелік постійно поповнюється [1, 3, 4]; частота виникнення ПНС з прогресуванням пухлинного процесу зростає до 75% [4]. Серед порушень, що реєструють при пухлинному процесі, важливими з огляду на можливість проведення спеціального лікування, є гематологічні порушення, зокрема пухлиноасоційована анемія [3, 5]. Відомо, що пухлиноасоційована анемія погіршує стан хворого, негативно впли-

ває на прогноз лікування та може бути обмеженням для проведення спеціального протипухлинного лікування [5, 6].

З метою корекції пухлиноасоційованої анемії у клінічній практиці вже використовують еритропоетини [7], але пошук та дослідження безпечніших щодо стимуляції пухлинного процесу засобів продовжуються. Так, на моделі штаму карциноми легені Льюїс LLC/R9 мишей [8], який характеризується високою швидкістю росту первинної пухлини, високим ангіогенним та низьким метастатичним потенціалом, а також формуванням на ранніх стадіях пухлинного росту ПНС [9, 10], досліджено можливість

корекції асоційованої з ростом LLC/R9 анемії за допомогою поліфенолів винограду [11], сорбентів [12], а також протипухлинних вакцин (ПВ) [13]. Застосування поліфенолів та сорбентів хоча і призводило до коригування деяких проявів ПНС, але не впливало на ріст та метастазування LLC/R9 [11, 12].

Застосування ПВ на основі антигенів високоангіогенного (LLC/R9) або низькоангіогенного (LLC) штамів карциноми легені Льюїс у мишей з LLC/R9 підвищувало виживаність вакцинованих мишей із пухлиною, але не запобігало розвитку пухлиноасоційованої анемії та спленомегалії. Зазначимо, що застосування вакцини, виготовленої з клітин LLC, достовірно зменшувало кількість та об'єм метастазів, а також на пізніх стадіях пухлинного росту сприяло підвищенню цитотоксичної активності природних клітин-кілерів та запобігало негативному впливу пухлини на вагові та клітинні характеристики тимусу, специфічну цитотоксичну активність спленоцитів та макрофагів у присутності сироватки крові (СК) [13]. Однак у роботі [13] не досліджені рівні про- і протизапальних цитокінів та вплив на них ПВ у мишей із високоангіогенним варіантом LLC/R9. Також відомо, що пухлиноасоційована анемія опосередковується гуморальними факторами як пухлинної, так і імунної природи (продукуються ефекторними клітинами протипухлинної імунної відповіді) [3, 14], зокрема підвищенням рівня таких цитокінів, як фактор некрозу пухлини (ФНП)- $\alpha$ , інтерлейкін (ІЛ)-1, ІЛ-6, інтерферон-гамма (ІФН- $\gamma$ ). Надлишок зазначених цитокінів призводить до порушення утилізації заліза, супресії диференціювання клітин — попередників еритроцитів, некоректної продукції еритропоетину тощо [14, 15].

Мета проведеної роботи — дослідити рівень деяких про- та протизапальних цитокінів у мишей з високоангіогенною карциномою легені Льюїс (LLC/R9) на фоні застосування протипухлинних вакцин, виготовлених на основі антигенів високоангіогенної карциноми легені Льюїс або на основі її вихідного низькоангіогенного штаму.

## ОБ'ЄКТ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Робота виконана на експериментальному матеріалі.

**Експериментальні тварини.** Використовували статевозрілих мишей-самців лінії C<sub>57</sub>Bl/6 (вік — 2–2,5 міс, маса тіла 20–23 г), які одержані з розплідника віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології (ІЕПОР) ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Утримання тварин та роботу з ними здійснювали відповідно до загальноприйнятих міжнародних правил з біоетики щодо проведення робіт з експериментальними тваринами [16, 17].

**Пухлинні штами та протипухлинні вакцини.** У дослідженнях використовували два різні за ангіогенним потенціалом штами експериментальних пухлин карциноми легені Льюїс (LLC) (вихідний низькоангіогенний штам LLC та високоангіогенний штам

LLC/R9) як джерела пухлинних антигенів при приготуванні протипухлинних вакцин. Для моделювання пухлинного процесу використано високоангіогенний штам LLC/R9. Характеристика штамів, виготовлення пухлинних вакцин, індукування первинних пухлин детально описано в нашій попередній роботі [13].

**Схема експерименту, експериментальні групи.** ПВ вводили 4-разово (12-, 15-, 22- та 29-та доба пухлинного росту) підшкірно по 0,3 мл/мишу ([С] = 0,09 мг/мишу на 1 ін'єкцію). Сформовано 4 експериментальні групи: інтактні тварини (група «ІК», n = 4); невакциновані миші з LLC/R9 — контроль пухлинного росту (група «КПР», n = 12); миші з LLC/R9, яким вводили вакцину LLC/R9 (група «ПВ-LLC/R9», n = 12); миші з LLC/R9, яким вводили вакцину LLC (група «ПВ-LLC», n = 12).

На 33-тю добу росту LLC/R9 у СК та супернатантах (Сн) спленоцитів мишей дослідних груп оцінювали рівні ФНП- $\alpha$ , ІФН- $\gamma$ , ІЛ-1 $\beta$ , -4, -10, а також їх співвідношення.

**Отримання сироваток крові.** СК експериментальних тварин отримували стандартним методом [18]. Зібрані СК заморожували та зберігали при -20 °С. Розмороження СК проводили безпосередньо перед проведенням тестування; повторне заморожування/розморожування СК не допускалося.

**Отримання супернатантів спленоцитів.** Сн спленоцитів отримували як описано [18]. 18-годинні Сн відбирали після центрифугування (15 хв при 3000 об./хв) у стерильні пробірки типу епендорф, заморожували та зберігали при -20 °С. Сн розморожували безпосередньо перед проведенням тестування; повторне заморожування/розморожування Сн не допускалося.

**Визначення рівня цитокінів в СК та Сн спленоцитів.** Рівень ФНП- $\alpha$ , ІФН- $\gamma$ , ІЛ-1 $\beta$ , -4 та -10 визначали методом імуноферментного аналізу (ІФА) з використанням комерційних тест-систем BD OptEIA Set Mouse (BD Biosciences, США) відповідно до інструкції виробника. Вимірювання оптичної густини проводили при  $\lambda=450$  нм проти  $\lambda=570$  нм на автоматичному рідері StatFax 2100 (США). Рівні зазначених цитокінів визначали в пкг/мл за допомогою калібрувальної кривої.

Для порівняння показників вакцинованих мишей з відповідними показниками контрольних груп («ІК», «КПР») розраховували індекси модуляції (ІМ) [19].

$$ІМ = \frac{P_d - P_k}{P_k} \cdot 100\%,$$

де  $P_d$  — показник рівня цитокіну у СК (або Сн) мишей дослідних груп;

$P_k$  — показник рівня цитокіну у СК (або Сн) мишей групи «ІК» або «КПР».

**Статистичний аналіз.** Статистичну обробку результатів проводили з використанням методів варіаційної статистики за допомогою програ-

ми StatSoft STATISTICA 7.0. Для оцінки достовірності відмінностей показників досліджуваних груп використовували t-критерій Стьюдента. Різницю між показниками вважали статистично достовірною при  $p < 0,05$  [20].

Також розраховано коефіцієнти кореляції Пірсона між показниками кількості та об'єму метастазів (результати опубліковані у нашій попередній роботі [13]) та показниками нижченаведених співвідношень ІФН- $\gamma$ /ІЛ-4, ІФН- $\gamma$ /ІЛ-10, ІЛ-1 $\beta$ /ІЛ-4, ІЛ-1 $\beta$ /ІЛ-10.

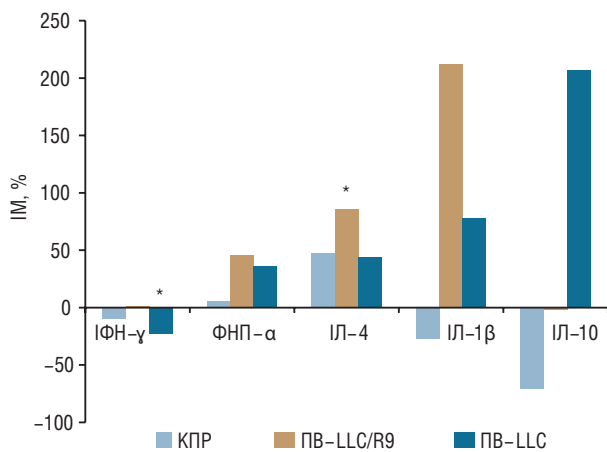
## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати дослідження рівнів у СК та Сн спленоцитів інтактних мишей і тварин з LLC/R9 деяких про- (ІФН- $\gamma$ , ІЛ-1 $\beta$ , ФНП- $\alpha$ ) та протизапальних (ІЛ-4, ІЛ-10) цитокінів представлені у табл. 1 та на рис. 1, 2.

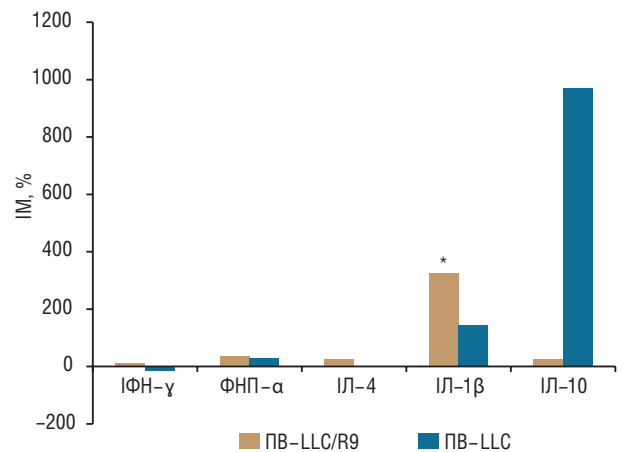
Як видно, на 33-тю добу росту LLC/R9 у невакцинованих мишей з пухлиною порівняно з показниками групи «ІК» відзначався певний дисбаланс рівнів цитокінів як в СК, так і в Сн. Незважаючи на те що внаслідок гетерогенізації жоден із дослі-

джених показників у групі «КПР» не досягнув статистичної значимості, відзначили тенденцію до підвищення рівня ІЛ-10 в Сн спленоцитів, що може свідчити про формування та накопичення в їх популяції клітин з імуносупресорними властивостями, а також ролі ІЛ-10 у розвитку анемії, формування якої характеризується ріст модельної пухлини LLC/R9 [8–10]. Наші дані зіставні з результатами роботи [21], в якій показана роль ІЛ-10 у патогенезі анемії у хворих із запальним захворюванням кишечника. Автори вважають, що формування анемії головним чином пов'язане із прямим впливом ІЛ-10 на трансляцію феритину і, ймовірно, подальше зберігання заліза в активованих моноцитах/макрофагах, що може обмежити доступність заліза до клітин — попередників еритроцитів.

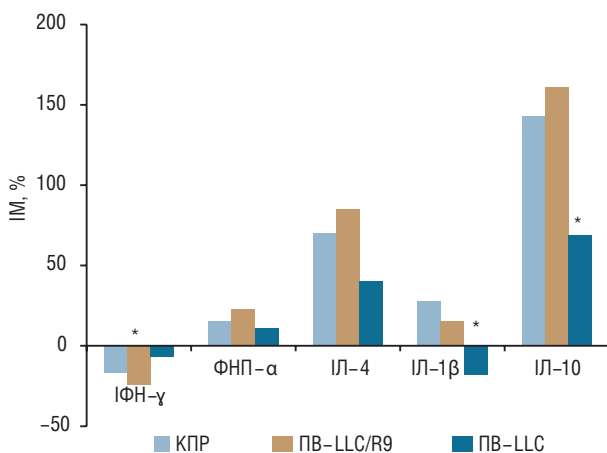
Ефекти введення ПВ залежали від виду вакцини. У групі «ПВ-LLC» в СК відзначали достовірне зниження рівня ІФН- $\gamma$  ( $p < 0,05$  порівняно з показниками групи «ІК») та тенденцію до підвищення ФНП- $\alpha$  ( $0,05 < p < 0,1$  порівняно з показниками груп «ІК» та «КПР»). Також відзначено підвищений рівень ІЛ-10, який внаслідок гетерогенізації не до-



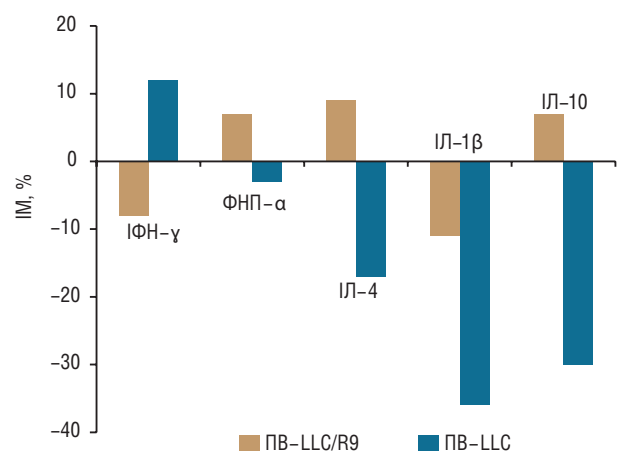
А



А



Б



Б

**Рис. 1.** Зміни рівнів цитокінів в СК (А) та Сн спленоцитів (Б) невакцинованих і вакцинованих мишей з LLC/R9 на 33-тю добу пухлинного росту порівняно з інтактними тваринами (\* $p < 0,05$ )

**Рис. 2.** Зміни рівнів цитокінів у СК (А) та Сн спленоцитів (Б) вакцинованих мишей із LLC/R9 на 33-тю добу пухлинного росту порівняно з показниками групи «КПР» (\* $p < 0,05$ )

Таблиця 1

Рівень деяких про- та протизапальних цитокінів у інтактних мишей та невакцинованих і вакцинованих тварин з високоангіогенним варіантом LLC/R9 на 33-тю добу пухлинного росту

Цитокін	ІК	Групи мишей з LLC/R9		
		КПР	ПВ-LLC/R9	ПВ-LLC
Рівень (пкг/мл) в СК				
ІФН- $\gamma$	372,4 ± 20,5	335,1 ± 51,9	374,4 ± 86,3	285,7 ± 5,8 <sup>1</sup>
ФНП- $\alpha$	40,8 ± 4,2	43,1 ± 1,5	59,6 ± 10,2	55,5 ± 4,9
ІЛ-4	7,9 ± 1,8	11,6 ± 3,9	14,7 ± 2,0 <sup>1</sup>	11,4 ± 0,9
ІЛ-1 $\beta$	78,8 ± 21,3	57,6 ± 13,4	245,7 ± 68,8 <sup>2</sup>	140,0 ± 71,2
ІЛ-10	38,7 ± 6,9	11,1 ± 9,1	37,8 ± 18,6	118,7 ± 77,5
Рівень(пкг/мл) в Сн спленоцитів				
ІФН- $\gamma$	230,2 ± 15,6	190,9 ± 29,5	175,5 ± 10,3 <sup>1</sup>	213,5 ± 14,5
ФНП- $\alpha$	20,4 ± 3,3	23,4 ± 0,9	25,0 ± 0,9	22,7 ± 1,2
ІЛ-4	6,7 ± 1,6	11,4 ± 1,4	12,4 ± 3,3	9,4 ± 1,5
ІЛ-1 $\beta$	16,9 ± 0,8	21,7 ± 4,5	19,4 ± 3,3	13,8 ± 0,4 <sup>1</sup>
ІЛ-10	35,7 ± 5,5	86,6 ± 28,0	93,0 ± 26,2	60,3 ± 3,7 <sup>1</sup>

<sup>1</sup>p < 0,05 порівняно з показниками групи «ІК»; <sup>2</sup>p < 0,05 порівняно з показниками групи «КПР».

сягнув статистичної значимості. Такий рівень досліджених цитокінів у СК, можливо, і забезпечував у вакцинованих тварин збереження цитотоксичної активності макрофагів при додаванні до них аутологічної СК, як показано раніше [13]. Спленоцити вакцинованих мишей цієї групи характеризувалися достовірно зниженою (порівняно з показниками групи «ІК», але не групи «КПР») здатністю до продукції ІЛ-1 $\beta$  та достовірно підвищеною здатністю продукувати ІЛ-10 (p < 0,05 порівняно з показниками групи «ІК»).

Представлені дані добре узгоджуються з отриманими раніше результатами [13] щодо антиметастатичної дії та імунологічних ефектів цієї ПВ, а також відсутністю впливу на пухлиноасоційовану анемію. Як уже зазначалося вище, ІЛ-1 $\beta$  та -10 — одні з цитокінів, які можуть спричиняти формування анемії [14, 21]. Щодо рівня в СК ІФН- $\gamma$ , то відомо, що високий вміст цього цитокіну на пізніх стадіях пухлинного росту є поганою прогностичною ознакою, оскільки цей цитокін може спричиняти стимулювання пухлини як за рахунок безпосереднього впливу на пухлинні клітини (сприяння формуванню імуноінвазивного фенотипу), так і через імунні механізми. Зокрема, ІФН- $\gamma$  встановлює імунодепресивне мікросередовище пухлини, запускаючи гомеостатичну реакцію для обмеження запалення і стимулюючи таким чином пухлинні клітини виробляти імунодепресивні молекули (наприклад IDO1), що спричиняє місцеве виснаження амінокислот триптофану, пригнічуючи цитотоксичні Т-лімфоцити та природні кілери й активуючи (або вербуючи нові) Т-регуляторні клітини (Tregs) та мієлоїдні клітини-супресори (MDSC) [22]. Водночас деяке підвищення рівня ФНП- $\alpha$  є достатнім для позитивного впливу СК на цитотоксичну активність макрофагів.

У групі «ПВ-LLC/R9» в СК відзначали достовірно підвищення рівнів ІЛ-4 (p < 0,05 порівняно з показником групи «ІК») та ІЛ-1 $\beta$  (p < 0,05 порів-

няно з показником групи «КПР»). Відзначимо, що таке підвищення ІЛ-1 $\beta$  у СК стало, ймовірно, однією з причин, що призвели до більш вираженої в цій групі анемії [13]. Спленоцити мишей групи «ПВ-LLC/R9» характеризувалися здатністю до достовірно зниженої продукції ІФН- $\gamma$  (p < 0,05 порівняно з показниками групи «ІК») з одночасною тенденцією до підвищеної продукції ІЛ-10 (0,05 < p < 0,1 порівняно з показниками групи «ІК»).

З метою оцінки балансу про- та протизапальних цитокінів, які є важливими для формування протипухлинної резистентності [23], було оцінено в СК та Сн такі співвідношення ІФН- $\gamma$ /ІЛ-4, ІФН- $\gamma$ /ІЛ-10, ІЛ-1 $\beta$ /ІЛ-4, ІЛ-1 $\beta$ /ІЛ-10 (табл. 2). Як видно, у мишей групи «КПР» в СК показники співвідношень ІФН- $\gamma$ /ІЛ-10 та ІЛ-1 $\beta$ /ІЛ-10, хоча і недостовірно (внаслідок гетерогенізації показника), все ж перевищували відповідні рівні у групі інтактного контролю. Причому розраховані коефіцієнти кореляції між цими співвідношеннями та об'ємом і кількістю метастазів становлять відповідно, 0,780 і 0,836 та 0,910 і 0,867. Достовірно зниження показника співвідношення ІФН- $\gamma$ /ІЛ-4 у Сн невакцинованих мишей з LLC/R9 (p < 0,05 порівняно з показниками «ІК») узгоджується з нашим припущенням щодо накопичення клітин із імуносупресорною активністю; коефіцієнти кореляції становлять (-0,991) та (-0,999). У мишей групи «ПВ-LLC» фіксували достовірно зниження порівняно з групою «ІК» (p < 0,05) показників співвідношення ІФН- $\gamma$ /ІЛ-4 (в СК та Сн) та ІЛ-1 $\beta$ /ІЛ-4 (в Сн), що, вірогідно, свідчить про формування імуносупресивного стану, але відсутність різкого дисбалансу таких цитокінів, як ІФН- $\gamma$ , ІЛ-1 $\beta$  та -10. Коефіцієнти кореляції між рівнем ІЛ-1 $\beta$ /ІЛ-4 в Сн та об'ємом і кількістю метастазів становили відповідно 0,841 та 0,766.

Таблиця 2

Показники співвідношення про- та протизапальних цитокінів

Показник	ІК	Групи мишей з LLC/R9		
		КПР	ПВ-LLC/R9	ПВ-LLC
СК				
ІФН- $\gamma$ /ІЛ-4	47,1 ± 3,5	35,1 ± 7,3	32,6 ± 11,4	25,5 ± 2,3 <sup>1</sup>
ІФН- $\gamma$ /ІЛ-10	9,6 ± 1,5	262,6 ± 126,2	23,6 ± 13,9	12,6 ± 7,2
ІЛ-1 $\beta$ /ІЛ-4	10,0 ± 2,3	7,7 ± 3,6	18,5 ± 2,8	13,6 ± 7,6
ІЛ-1 $\beta$ /ІЛ-10	2,0 ± 0,7	52,1 ± 23,4	9,1 ± 2,7 <sup>1</sup>	11,5 ± 8,6
Сн				
ІФН- $\gamma$ /ІЛ-4	34,4 ± 2,1	17,6 ± 3,9 <sup>1</sup>	17,5 ± 4,1 <sup>1</sup>	24,0 ± 2,5 <sup>1</sup>
ІФН- $\gamma$ /ІЛ-10	6,4 ± 1,2	3,1 ± 0,9	2,3 ± 0,5 <sup>1</sup>	3,5 ± 0,1
ІЛ-1 $\beta$ /ІЛ-4	2,5 ± 0,1	2,0 ± 0,5	2,0 ± 0,8	1,6 ± 0,3 <sup>1</sup>
ІЛ-1 $\beta$ /ІЛ-10	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1

<sup>1</sup>p < 0,05 порівняно з показниками групи «ІК».

У мишей групи «ПВ-LLC/R9» фіксували в СК достовірно вищий (p < 0,05 порівняно з показником групи «ІК») показник співвідношення ІЛ-1 $\beta$ /ІЛ-10 (коефіцієнти кореляції становили відповідно (-0,652) та (-0,980)) та достовірно нижчий (порівняно з показником групи «ІК») в Сн показники співвідношень ІФН- $\gamma$ /ІЛ-4 (коефіцієнт кореляції між цим показником та об'ємом метастазів становив 0,879) та ІФН- $\gamma$ /ІЛ-10 (коефіцієнт кореляції

між цим показником та об'ємом метастазів становив  $(-0,997)$ ), що, вірогідно, і спричинило поглиблення пухлиноасоційованої анемії [13].

Таким чином, у мишей із високоангіогенною пухлиною LLC/R9 важливим фактором у формуванні пухлиноасоційованої анемії є ІЛ-10, а також ІФН- $\gamma$ . Застосування вакцини, виготовленої з клітин вихідного (низькоангіогенного) штаму LLC, запобігало на пізніх стадіях пухлинного росту накопиченню в сироватці крові ІФН- $\gamma$ , що, ймовірно, і зумовило можливість сформувати достатній для антиметастатичного ефекту протипухлинний захист. Водночас введення цієї вакцини не запобігало формуванню імуносупресивного стану (підвищена здатність спленоцитами до продукції ІЛ-10 з одночасним зниженням продукції ІЛ-1 $\beta$ ). Застосування вакцини, виготовленої з клітин високоангіогенного штаму LLC/R9, не впливало на пізніх стадіях пухлинного росту на рівень накопичення в сироватці крові ІФН- $\gamma$  та підвищувало рівень ІЛ-4 та -1 $\beta$ , що, вірогідно, й зумовило в цій групі розвиток більш вираженої анемії. Застосування цієї вакцини також не впливало на функціональний стан спленоцитів: відзначали зниження продукції ІФН- $\gamma$ .

## ВИСНОВКИ

Одержані дані підтверджують гуморальний, зокрема зумовлений рівнями цитокінів ІЛ-10, ІФН- $\gamma$  та ІЛ-1 $\beta$ , механізм формування асоційованої з розвитком LLC/R9 анемії, а також можуть стати підґрунтям для розроблення показань використання аутологічних вакцин з урахуванням проявів паранеопластичного синдрому.

Робота виконана в рамках цільової програми наукових досліджень відділення біохімії, фізіології і молекулярної біології НАН України «Фундаментальна геноміка і метаболоміка в системній біології».

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Bilynsky BT, Dzhus MB, Litvinyak RI. The conceptual and clinical problems of paraneoplastic syndrome in oncology and internal medicine. *Exp Oncol* 2015; **37**: 82–8.
2. Blyakhman I, Chakravarthy K. Updated review and treatment recommendations on paraneoplastic neurologic syndromes and chronic pain. *Pain Physician* 2019; **22**: 433–45.
3. Henry K. Paraneoplastic syndromes: Definitions, classification, pathophysiology and principles of treatment. *Sem Diagnostic Pathol* 2019; **36** (4): 204–10.
4. Boyiadzis M, Lieberman FS, Geskin LJ, et al. Paraneoplastic syndromes. In: *Cancer: principles and practice of oncology*. 8<sup>th</sup> ed. DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA (eds). New York: Lippincott, Williams & Wilkins, 2008: 2343–62.
5. Schwartz RN. Anemia in patients with cancer: incidence, causes, impact, management, and use of treatment guidelines and protocols. *Am J Health Syst Pharm* 2007; **64**: S5–S13.
6. Pelosof LC, Gerber DE. Paraneoplastic syndromes: an approach to diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 2010; **85** (9): 838–54.
7. Debeljak N, Solár P, Sytkowski AJ. Erythropoietin and cancer: the unintended consequences of anemia correction. *Front Immunol* 2014; **5**: Article 563: 1–14.
8. Peskovskaya OM, Solyanyk GI, Fedorchuk, et al. The method of obtaining a modified variant of Lewis lung cancer. *Pat.*

№48525 Ukraine, MPK G 01 N 33/15. №u2009 08956; stat. 28.08.2009; publish. 25.03.2010, Bull. № 6 (in Ukrainian)

9. Pyaskovskaya ON, Dasyukevich OI, Kolesnik DL, et al. Changes in VEGF level and tumor growth characteristics during Lewis lung carcinoma progression towards cis-DDP resistance. *Exp Oncol* 2007; **29** (3): 197–202.

10. Fedorchuk OG, Pyaskovskaya OM, Skivka LM, et al. Paraneoplastic syndrome in mice bearing high-angiogenic variant of Lewis lung carcinoma: Relations with tumor derived VEGF. *Cytokine* 2012; **57** (1): 81–8.

11. Pyaskovskaya OM, Gorbyk GV, Yakshibaeva YUR, et al. Correction of tumor-associated anemia with grape polyphenols. *Farmakol ta likars'ka toksykol* 2014; **(1 (37))**: 91–8.

12. Sarnatskaya VV, Nikolaev VG, Yushko LA, et al. Effect of enterosorption on paraneoplastic symptom manifestation in mice with highly angiogenic variant of Lewis lung carcinoma. *Exp Oncol* 2015; **37** (4): 255–61.

13. Karaman OM, Fedosova NI, Voyeykova IM, et al. Manifestations of tumor-associated anemia in mice with Lewis lung carcinoma at the background of use of cancer vaccines. *Onkologiya* 2016; **18** (4): 262–8 (in Ukrainian).

14. Lavrova VS, Chernova YeN, Karpova GV, et al. Disregulating processes in the blood system during cancer. *Bull Sib Med* 2006; **(2)**: 75–84 (in Russian).

15. Bron D, Meuleman N, Mascaux C. Biological basis of anemia. *Semin Oncol* 2001; **28** (2, Suppl 8): 1–16.

16. Kozhemyakin YuM, Khromov OS, Boldyreva NE, et al. Scientific and practical recommendations for keeping laboratory animals and working with them. K: Interservis, 2017. 182 p. (in Ukrainian).

17. Council Directive 2010/63/EU of 22 september 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official J Eur Commun* 2010; **276**: 33–79.

18. Klaus J. Lymphocytes. *Methods*. M: Mir, 1990. 395 p. (in Russian).

19. Kovbasyuk SA, Yudin VM, Kravchenko SP. Immunomodulatory effect of cyclophosphamide with various schemes of its administration to mice. *Cytologia* 1985; **(3)**: 316–21 (in Russian).

20. Sidenko AV, Vishnyakov VV, Isaev SM. The theory of statistics. *Manual*. M: MAKS-Press, 2011. 343 p. (in Russian).

21. Tilg H, Ulmer H, Kaser A, Weiss G. Role of IL-10 for induction of anemia during inflammation. *J Immunol* 2002; **169** (4): 2204–9.

22. Mojic M, Takeda K, Hayakawa Y. The dark side of IFN- $\gamma$ : its role in promoting cancer immunoevasion. *Int J Mol Sci* 2017; **19** (1): 89.

23. Lee HL, Jang JW, Lee SW et al. Inflammatory cytokines and change of Th1/Th2 balance as prognostic indicators for hepatocellular carcinoma in patients treated with transarterial chemoembolization. *Sci Rep* 2019; **9**: 3260.

## THE LEVEL OF SOME PRO- AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES IN MICE BEARING HIGHLY ANGIOGENIC LEWIS LUNG CARCINOMA AFTER APPLICATION OF CANCER VACCINES

O.M. Karaman, N.I. Fedosova, I.M. Voyeykova,  
O.M. Pyaskovska, H.V. Didenko, G.I. Solyanyk

R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology,  
Oncology and Radiobiology of NAS of Ukraine, Kyiv,  
Ukraine

**Summary. Aim:** To investigate the level of some pro- and anti-inflammatory cytokines in mice bearing highly angiogenic variants of Lewis lung carcinoma after the application of anticancer vaccines based on cell anti-

gens of highly angiogenic (LLC/R9) or low-angiogenic (LLC) variants of the carcinoma. **Object and methods:** The study was performed on male C57/Bl mice bearing LLC/R9. As an adjuvant, a protein-containing metabolite of *B. subtilis* with m.m. of 70 kDa was used in cancer vaccine production (based on LLC or LLC/R9 cells). The vaccination schedule consisted of 4 subcutaneous injections that were started on day 12 after the LLC/R9 transplantation. Intact mice and unvaccinated mice bearing LLC/R9 were used as the control. On day 33 of tumor growth, the level of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), interleukin (IL) -1, -4, -10 were determined in blood serum (BS) and splenocytes supernatants. **Results:** IL-10 and IFN- $\gamma$  play an important role in the development of tumor-associated anemia in mice bearing LLC/R9. The application of the vaccine based on LLC cells prevented the accumulation of IFN- $\gamma$  in the BS at the late stages of tumor growth; this most likely underlies the possibility to gain antitumor protection, sufficient to reach antimetastatic effect. Nevertheless, this vaccine did not prevent the formation of an immunosuppressive state (increased ability of splenocytes to produce IL-10 with a simultaneous decrease in the production of IL-1 $\beta$ ). The vaccine based on LLC/R9 cells, at the

late stages of tumor growth, did not affect the BS level of IFN- $\gamma$  and increased the level of IL-4 and IL-1 $\beta$ , which most probably caused the development of more severe anemia in this group. Moreover, this vaccine did not affect the functional state of splenocytes: a decrease in IFN- $\gamma$  production was noted. **Conclusion:** the obtained results confirm the humoral (in particular, because of cytokines IL-10, IFN- $\gamma$  and IL-1 $\beta$  level) mechanism of LLC/R9-associated anemia development; this can set the ground for the development of indications for autologous vaccines application according to paraneoplastic syndromes manifestations.

**Key Words:** tumor-associated anemia, Lewis lung carcinoma LLC/R9, antitumor vaccines, IL-10, IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ .

**Адреса для листування:**

Караман О.М.

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України  
вул. Васильківська, 45, Київ, 03022

E-mail: kmolga1977@gmail.com

Одержано: 18.09.2020