

OBSEVANJE IN GENSKA TERAPIJA S KEMOKINOMA CCL5 ALI CCL17 NA MIŠJIH MODELIH KARCINOMA

Tim Božič^{1,2}, Simona Kranjc Brezar^{1,2}, Boštjan Markelc¹, Maja Čemažar^{1,3}

¹Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

²Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

³Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Polje 42, 6310 Izola, Slovenija

Elektronski naslov: tbozic@onko-i.si

Kemokini so majhni signalni proteini iz družine citokinov, ki inducirajo migracijo imunskih celic. Vrsta in stopnja infiltracije imunskih celic v tumorskem mikrookolju lahko vpliva na potek bolezni in korelira z učinkovitostjo imunoterapij pri bolnikih z rakom. Poleg tega je znano, da z radioterapijo, kot enim od glavnih načinov zdravljenja raka, lahko sprožimo pozitivne imunomodulatorne učinke. Iz navedenih razlogov genski elektroprenos (GET) plazmidne DNA z zapisom za vnetna kemokina CCL5 ali CCL17 v kombinaciji s klasično radioterapijo tako predstavlja enega izmed potencialnih pristopov pri zdravljenju raka.

Vpliv plazmidne DNA z zapisom za kemokina CCL5 ali CCL17 na viabilnost in izražanje vnetnih citokinov smo najprej določevali pri dveh mišjih celičnih linijah raka debelega črevesa CT26 in raka dojke 4T1 *in vitro*. Viabilnost smo določevali s testom PrestoBlue, izražanje pa s qRT-PCR. Kemotaktične lastnosti obeh kemokinov smo določili s testi kemotakse *in vitro* in z modelom dorzalnega okna *in vivo*. Pri tem smo spremljali migracijo imunskih celic proti mišjim tumorskim celicam in tumorjem CT26 in 4T1, transfeciranim s plazmidno DNA z zapisom za posamezni kemokin. Protitumorsko učinkovitost kombinirane terapije GET kemokinov in dveh obsevalnih režimov (enkratna doza 10 Gy ali frakcionirana doza 3 x 5 Gy) smo določevali z določevanjem zaostanka v rasti tumorjev in izražanjem vnesenih kemokinov, ter vnetnih citokinov. Sestavo tumorskega mikrookolja po kombinirani terapiji smo določevali z imunofluorescenčnim označevanjem imunskih celic in žil (CD4, CD8 in CD31).

Viabilnost celic po transfekciji s plazmidno DNA z zapisom za kemokina je bila > 75 %. Poleg tega je transfekcija vodila v povišano izražanje vnesenih kemokinov ter vnetnih citokinov CXCL9, CXCL10 in IL-6, ki sodelujejo pri usmerjanju imunskih celic. Testi kemotakse so pokazali, da kemokina CCL5 in CCL17 lahko inducirata migracijo mišjih makrofagov RAW264.7 *in vitro* in splenocitov v tumorje *in vivo*. Zaostanek v rasti tumorjev CT26 in 4T1 po samostojnem GET je bil zanemarljiv in primerljiv med tretiranimi skupinami. Primerjava stopnje infiltracije posameznih imunskih celic v tumorsko mikrookolje je pokazala, da se število CD4+ celic T pomagalk in citotoksičnih CD8+ celic T ubijalk pri obeh tumorskih modelih poveča po GET kemokinov in zmanjša po samem obsevanju. Zmanjšanje števila imunskih celic je bilo opaženo tudi pri kombinirani terapiji in korelira z zmanjšanjem CD31+ endotelnih celic, ki predstavljajo žilje. Zaostanek v rasti tumorjev CT26 in 4T1 je bil statistično

značilno daljši po kombinirani terapiji tumorjev z GET kemokinov pri obeh obsevalnih režimih, pri čemer smo dosegli tudi popolne odgovore tumorjev na zdravljenje. Pri tumorskem modelu CT26 je bilo v primerjavi s tumorskim modelom 4T1 večje število popolnih odgovorov, vendar pa smo protitumorsko učinkovitost kemokinov dokazali le pri tumorjih 4T1. Rezultati kažejo na potencial kemokinov v imunoterapiji raka, vendar je za njihovo implementacijo potrebna nadaljnja optimizacija kombinirane terapije.

P1