

# KARAKTERIZACIJA IMUNSKEGA ODZIVA MIŠJIH TUMORJEV PRI RADIOTERAPIJI IN ELEKTROPRENOSU PLAZMIDNE DNA Z ZAPISOM ZA KEMOKINE

Lucija Kozjek Mencinger<sup>1</sup>, Tim Božič<sup>2,3</sup>, Gregor Serša<sup>1,2</sup>, Maja Čemažar<sup>2,4</sup>, Boštjan Markelc<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, Ljubljana, SI-1000, Slovenija

<sup>2</sup> Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, Ljubljana, SI-1000, Slovenija

<sup>3</sup> Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, Ljubljana, SI-1000, Slovenija

<sup>4</sup> Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Polje 42, 6310 Izola, Slovenija

Elektronski naslov: lucijakm@gmail.com

---

## Izvleček

Raziskava določuje infiltracijo imunskih celic (CD4+, CD8+ limfocitov T in makrofagov) v mišjem tumorskem modelu raka debelega črevesja CT26 in raka dojke 4T1 po genskem elektroprenosu kemokinov CCL5 in CCL17 v kombinaciji z enkratnim obsevanjem.

**Ključne besede:** tumorsko mikrookolje, fluorescenčna mikroskopija, genski elektroprenos, kemokini

---

## Uvod

V zadnjem času se velik pomen v procesu karcinogeneze pripisuje tumorskemu mikrookolju, ki pa je heterogeno, saj ga poleg tumorskih celic tvorijo tudi stromalne celice, fibroblasti, ter različne imunske celice (1). Vrsta in količina imunskih celic se med tumorskimi modeli razlikuje, zato lahko tumorje opredelimo glede na imunski status. Skrajna pola tako predstavljajo vnetni tumorji z visoko infiltracijo efektorskih imunskih celic, ter imunsko zapuščeni tumorji z malo imunskimi celicami ali pa z visoko infiltracijo supresorskih imunskih celic (2). Stopnja infiltracije imunskih celic v tumorsko tkivo lahko vpliva na potek bolezni in učinkovitost terapij, zato so terapije z imunomodulatornimi učinki pomembne. Ena izmed takih je tudi genska terapija, ki temelji na genskem elektroprenosu (GET) vnetnih kemokinov CCL5 in CCL17 v tumorje (3). Poleg tega je bila povečana prisotnost imunskih celic v tumorjih opažena tudi kot eden izmed učinkov obsevanja, ki ga pri zdravljenju raka prejme več kot polovica bolnikov (4-6). Zaradi tega se obsevanje že uporablja v kombinaciji z imunoterapijami zaviralcev imunskih kontrolnih točk. Ni pa še raziskano ali lahko s kombinirano terapijo GET kemokinov in obsevanja še povečamo infiltracijo imunskih celic v tumor.

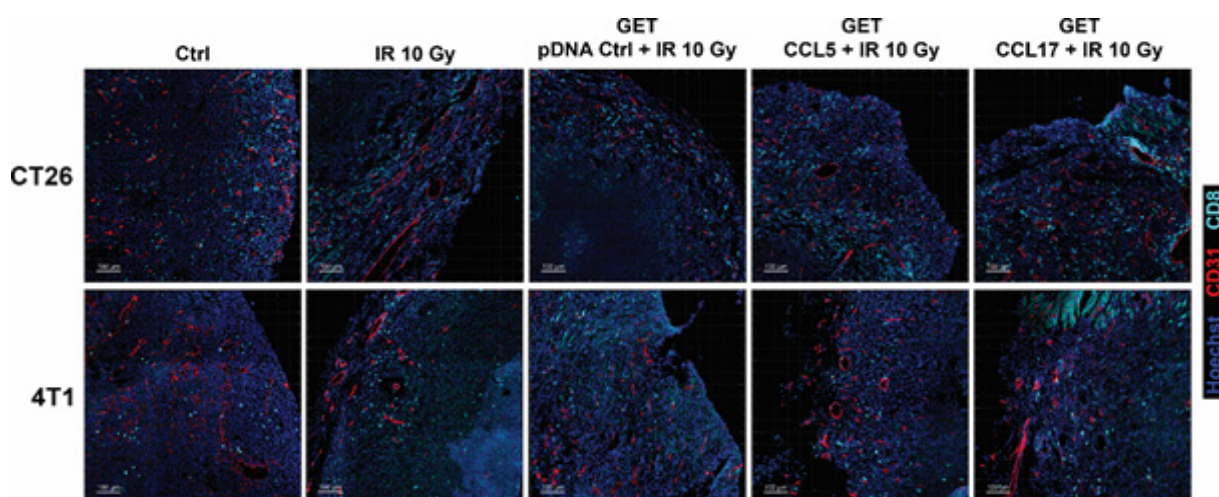
## Materiali in metode

Sestavo tumorskega mikrookolja mišjega tumorskega modela raka debelega črevesja CT26 in raka dojke 4T1 po kombinirani terapiji GET kemokinov in obsevanja smo določevali z imunofluorescenčnim barvanjem. Oba tumorska modela rasteta na singeni mišji liniji Balb/c, razlikujeta pa se po imunskem statusu. Tumorji CT26 spadajo med vnetni tumorski model, medtem ko tumorski model 4T1 velja za imunsko zapuščenega. Vzorci podkožno nasajenih tumorjev so bili pridobljeni v sklopu prejšnjih raziskav

(št. dovoljenja: U34401-1/2015/7). Tumorji so bili tretirani s terapijo GET plazmidne DNA z zapisom za kemokina CCL5 ali CCL17, ter kontrolnim plazmidom pDNA Ctrl v kombinaciji z obsevanjem z ekratno dozo (10 Gy). Tumorji so bili odvzeti sedmi dan od začetka terapije, in nato hitro zamrznjeni. Zmrzle tkivne rezine so bile pripravljene z uporabo kriostata in nato pobarvane s primarnimi protitelesi specifičnimi proti antigenom CD4, CD8, F4/80 in CD31 ter sekundarnimi fluorescenčnimi protitelesi proti primarnim protitelesom. Uporabili smo tudi barvilo Hoechst 33342, ki označuje celična jedra. Vzorce smo pregledali s konfokalnim mikroskopom Zeiss LSM 800. Uporabljene fluokrome smo vzbujali z laserji valovnih dolžin 405 nm, 488 nm, 561 nm ali 640 nm. Emitirano svetlobo pa smo zajeli z detektorjem iz galijevega fosfida (GaAsP) v kombinaciji z nastavljivim dikroičnim filtrom ter filtri specifičnimi za emitirano svetlobo posameznih fluorokromov. Za zajem slik smo uporabili program Zen 2.5 (Carl Zeiss), za analizo slik pa program Imaris (Bitplane).

## Rezultati

Primerjava stopnje infiltracije posameznih imunskih celic v tumorsko tkivo je pokazala, da se število CD4+ in citotoksičnih CD8+ limfocitov T pri obeh tumorskih modelih poveča že po samem obsevanju z enkratno dozo 10 Gy. Prav tako je število infiltriranih CD8+ limfocitov T pri obeh tumorskih modelih višje po kombinirani terapiji GET kontrolnega plazmida (pDNA Ctrl) in obsevanja z 10 Gy v primerjavi s kontrolo. Največja sprememba v številu infiltriranih CD8+ limfocitov T v primerjavi s kontrolo pa je bila pri tumorskem modelu CT26 po kombinirani terapiji GET CCL17 in obsevanja z 10 Gy, kar prikazuje tudi spodnja slika (Slika 1). Največja infiltracija CD4+ limfocitov T in makrofagov v primerjavi s kontrolo je bila opažena pri kombinirani terapiji GET CCL5 in obsevanja z 10 Gy pri obeh tumorskih modelih.



**Slika 1:** Infiltracija citotoksičnih CD8+ limfocitov T v tumorsko tkivo. Slika prikazuje robove tumorskih rezin tumorjev CT26 in 4T1 na sedmi dan od začetka terapije. Rezine tumorskega tkiva so bile pobarvane z anti-CD8 (ciano-modra, Cy3), anti-CD31 (rdeča, Alexa Fluor 647) in Hoechst 33342 (modra). Skala: 100  $\mu$ m

## Razprava

Preliminarni rezultati imunofluorescenčnega barvanja zmrzlih tumorskih rezin kažejo, da kombinirana terapija GET kemokinov in enkratnega obsevanja z dozo 10 Gy prispeva k višji infiltraciji CD4+ limfocitov T in citotoksičnih CD8+ limfocitov T v tumorsko tkivo. Poznavanje dinamike infiltracije imunskih celic v tumorsko tkivo po obsevanju ali po kombinirani terapiji bo pomagalo pri razumevanju mehanizmov odziva tumorja na terapijo ter pri nadaljnji optimizaciji kombinirane terapije.

## Zahvala

Raziskava je bila izvedena v okviru magistrske naloge bolonjskega študija 2. stopnje na Oddelku za eksperimentalno onkologijo Onkološkega inštituta Ljubljana in raziskovalnih programov J3-8202 in P3-0003. Sredstva so bila financirana s strani Agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS) in Evropskega sklada za regionalni razvoj v okviru projekta SmartGene.Si.

## Literatura

1. Hui L, Chen Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Lett* 2015; 368(1): 7-13.
2. Galluzzi L, Chan TA, Kroemer G, et al. The hallmarks of successful anticancer immunotherapy. *Sci Transl Med* 2018; 10(459): 1-15.
3. Bozic T, Sersa G, Kranjc Brezar S, et al. Gene electrotransfer of proinflammatory chemokines CCL5 and CCL17 as a novel approach of modifying cytokine expression profile in the tumor microenvironment. *Bioelectrochemistry* 2021; 140: 107795.
4. Dangaj D, Bruand M, Grimm AJ, et al. Cooperation between constitutive and inducible chemokines enables T cell engraftment and immune attack in solid tumors. *Cancer Cell* 2019; 35(6): 885-900.e10.
5. Semmling V, Lukacs-Kornek V, Thaiss CA, et al. Alternative cross-priming through CCL17-CCR4-mediated attraction of CTLs toward NKT cell-licensed DCs. *Nat Immunol* 2010; 11(4): 313-20.
6. Thangamathesvaran L, Shah R, Verma R, et al. Immune checkpoint inhibitors and radiotherapy—concept and review of current literature. *Ann Transl Med* 2018; 6(8): 155-155.