

УДК 616.37-006.6 -085.37

DOI: 10.15587/2519-4798.2017.90950

## ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГЕНЕРИРОВАННЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИММУНОТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© Н. Н. Храновская, О. В. Скачкова, С. В. Земсков

Целью исследования было изучение фенотипических характеристик дендритных клеток (ДК), полученных из моноцитов периферической крови у больных раком поджелудочной железы (РПЖ). ДК использовались в качестве естественных адъювантов в составе противоопухолевых вакцин при комплексном лечении больных РПЖ. Установлено, что уровень экспрессии молекул CD83, CD86, HLA-DR возрастал на каждом этапе проведения иммунотерапии

**Ключевые слова:** рак поджелудочной железы, иммунотерапия, противоопухолевые вакцины, дендритные клетки, фенотипические характеристики

### 1. Введение

Рак поджелудочной железы (РПЖ) входит в семерку самых распространенных раков и является самым агрессивным среди всех гастроинтестинальных раков. Более 90 % РПЖ представлено протоковой аденокарциномой. Среди современных подходов к лечению рассматривают хирургическое, которое дает шанс на 5-летнюю выживаемость не более 15–18 % больных, несмотря на адъювантное лечение. Химиотерапия, эффект от которой отмечается примерно у 40 % больных, имеет минимальное влияние на выживаемость. Роль радиотерапии активно дискутируют: в европейских исследованиях, в отличие от США, ее эффект не доказан, а таргетная терапия при этой локализации не оправдала надежд, возложенных на нее еще 15 лет назад [1].

Иммунотерапия (ИТ) онкологических заболеваний имеет богатую историю, несмотря на это поле применения методов специфической иммунотерапии в клинической практике довольно ограничено. Поэтому конструирование новых противоопухолевых вакцин, изучение механизма их действия и обоснование рекомендаций по применению в клинической практике будет способствовать более широкому применению этих противоопухолевых средств в клинической практике, что позволит существенно увеличить продолжительность и качество жизни онкологических больных [2].

Настоящее исследование посвящено оценке использования генерированных дендритных клеток в качестве естественных адъювантов в составе противоопухолевых вакцин для проведения ИТ у больных РПЖ.

### 2. Обоснование исследования

Одним из новых подходов в лечении больных РПЖ с целью улучшения их выживаемости, на наш взгляд, является ИТ, действие которой направлено на инициацию и/или усиление иммунного ответа (ИО) против опухоли. Этого можно достичь многими подходами, включающих вакцинацию, адоптивный перенос иммунных клеток и иммуномодуляции с целью усиления уже существующего ИО [3].

Известно, что наиболее мощные специализированные антиген-представляющие дендритные клетки (ДК) – имеют способность активировать все основные эффекторы противоопухолевого иммунитета, а именно CD8 Т-клетки, Т-хелперы 1 типа (Th1), натуральные клетки-киллеры (НК) и НК Т-лимфоциты (НКТ). Именно поэтому использование ДК в качестве «естественных адъювантов» находит все более широкое применение в разных направлениях иммунотерапии, в частности в вакцинотерапии рака [4, 5].

Существуют методы мобилизации ДК в организме онкологических больных, который предусматривает введение ростовых факторов и цитокинов, таких как гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) человека, FLT-3L, IL-12, IL-15, CD40L и TNF- $\alpha$ . После экспансии ДК *in vivo* больным вводят опухолевые антигены. Однако как стало известно эндогенные ДК, которые дозрели в организме онкологического больного, оказываются значительно менее эффективными в сравнении с ДК, которые получены путем культивирования *in vitro*. Следует отметить, что в иммунотерапии рака наибольшего распространения приобрели методы выращивания аутологичных ДК из их предшественников вне организма. После чего, их «нагружают» опухоль-ассоциированными антигенами (ОАА), индуцируют дозревание и вводят больному [6]. В данном случае, иммунный ответ на ОАА начинается *in vitro*, где можно достаточно точно контролировать количество и функциональное состояние ДК, а заканчивается в организме образованием специфических цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ). Кроме того, пластичность незрелых ДК позволяет, меняя условия среды *in vitro*, получать из них ДК с определенными функциональными свойствами, в частности, способность активировать иммунологические реакции с привлечением преимущественно клеточного звена иммунной системы. Для этого к набору цитокинов, который используется для культивирования ДК, вводят факторы, которые стимулируют их дозревание [7, 8].

Степень зрелости считается крайне важной характеристикой ДК при их использовании в качестве естественных адъювантов в составе противоопухолевых вакцин [9]. Это обусловлено тем, что использование ДК с незрелым фенотипом, которые владеют слабыми иммуногенными свойствами, может приводить к абортинвой пролиферации и анергии клеток-эффекторов и индукции толерантности к опухолевым антигенам в результате активации CD4 и CD8 регуляторных Т-клеток (Treg), которые секретируют IL-10 и TGF- $\beta$ .

Следует отметить, что четких критериев стандартизации ДК при создании противоопухолевых вакцин не существует. Известно, что ДК должны отвечать целому ряду требований, которые отражают их способность презентации антигенов и стимуляции Т-клеток, быть жизнеспособными, экспрессировать высокий уровень маркеров зрелости, костимуляторных молекул и молекул адгезии, секретировать цитокины, активировать ЦТЛ и Th1 – опосредствованный иммунный ответ [10].

Как было показано, у онкологических больных функциональная активность ДК полученных из предшественников, как правило, снижена. В частности, они часто являются нечувствительными ко многим активирующим стимулам и остаются незрелыми. Противоопухолевая химио- и лучевая терапия также может снижать эффективность и тормозить дозревание ДК, что, в свою очередь, может лимитировать и осложнять применение ДК [11]. Вместе с тем, известно, что незрелые или частично зрелые ДК также является оптимальной популяцией ДК для их использования в противоопухолевой иммунотерапии. В частности, первая коммерческая вакцина Sipuleucel-T для терапии больных метастатическим гормонорезистентным раком предстательной железы, одобренная FDA, содержит смесь незрелых и частично зрелых ДК, нагруженных пептидами простат-специфического антигена [12]. С другой стороны, некоторые авторы отмечают существенный недостаток зрелых ДК – дефицит хоуминг-рецептора CD62L для миграции в лимфатические узлы из кровеносного русла через эндотелиальный слой [13].

В настоящее время важно определить в клинических исследованиях характеристики ДК, которые имеют терапевтическую эффективность.

### 3. Цель исследования

Исследовать фенотипические характеристики ДК моноцитарного происхождения, применявшиеся в качестве клеточной основы в противоопухолевой ИТ больных РПЖ.

### 4. Материалы и методы

В ходе проведения исследований был использован биологический материал 22 больных РПЖ II–III стадии (в возрасте от 32 до 72 лет ( $59,4 \pm 4,7$ )), которые получали комплексное лечение на клинической базе кафедры общей хирургии №1 НМУ имени А. А. Богомольца, в Киевском центре хирургии пе-

чени, поджелудочной железы и желчных протоков имени В. С. Земскова (КМКЛ №10) с 2012 по 2016 гг. и 10 практически здоровых людей (ПЗЛ) (в возрасте от 23 до 45 лет ( $34,9 \pm 5,4$ )). Противоопухолевую вакцину на основе ДК изготавливали из моноцитов периферической крови больных и ПЗЛ на базе научно-исследовательской лаборатории экспериментальной онкологии Национального института рака. Лейкоциты выделяли методом центрифугирования в градиенте плотности фиколла «Histopaque-10077» («Sigma», США), после чего клетки ресуспендировали в среде RPMI-1640 («Sigma», США) с добавлением 2 мМ/л L-Gly, 100 мкг/мл стрептомицина и 100 ед/мл пенициллина («Дарница», Украина) и инкубировали в пластиковом флаконе при температуре 37 °С, 5 % CO<sub>2</sub> в течение 2–3 часов. После чего клетки слегка встряхивали и удаляли те, которые не прикрепились, путем их смывания. Концентрацию клеток доводили до  $0,5 \times 10^6$  /мл средой культивирования и добавляли 1 % аутологичной плазмы и 100 нг/мл ГМ-КСФ человека («Leucomax Novartis», Индия), 20 нг/мл интерлейкина-4 (IL-4) («Sigma», США) и культивировали 8 суток в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора при температуре 37 °С и 5 % содержания CO<sub>2</sub>. Ростовые факторы повторно добавляли к ДК на 3-и сутки культивирования. На 6-е сутки культивирования в ДК больных РПЖ в качестве источника ОАА использовали аутологичные механо-активированные лиофилизированные опухолевые клетки в концентрации 0,05 мг/мл культуральной среды. На 7-е сутки созревания к ДК добавляли 100 нг/мл LPS («Sigma», США) и 2 $\alpha$ b-IFN («Лаферобион», «Биофарма», Украина) в концентрации 10 тыс. МЕ/мл. Все манипуляции проводились с соблюдением правил асептики. На 8-е сутки ДК отмывали в 40 мл 0,9 % раствора хлорида натрия и производили подсчет и оценку жизнеспособности ДК в камере Горяева в 0,4 % растворе трипанового синего. Получали  $(3,0–6,0) \times 10^6$  клеток с жизнеспособностью не менее 95 %, примесь лимфоцитов не более 20 %.

Также проводился анализ фенотипических характеристик ДК методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител к маркерам CD83, CD86 меченых флюоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) и антител к HLA-DR, меченных фикоэритрин («Becton Coulter», США). Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur («Becton Dickinson», США) с помощью программы CellQuest-PRO («Becton Dickinson», США).

Лечение больных РПЖ предусматривало проведение радикальной операции в условиях Центра и 6 курсов адъювантной полихимиотерапии (ПХТ) по протоколу гемцитабин 1000 мг/м<sup>2</sup> + тегафур 800 мг/сут перорально).

В исследование были включены больные с онкологическими стадиями Ia – IIb по классификации TNM UICC ver.7, во всех случаях гистологически была подтверждена протоковая аденокарцинома поджелудочной железы.

У больных РПЖ иммунотерапию на основе ДК назначали в адъювантном режиме параллельно

с химиотерапией. Проведение иммунотерапии начинали не ранее чем через 14 суток после операции. ДК вводили внутривенно, количество клеток на одно введение составляло  $(3,0-6,0) \times 10^6$ . Всем больным проводили 4 инъекции с периодичностью 1 раз в месяц. Все больные были извещены о проведении исследований и дали информированное согласие на их выполнение. Исследования было одобрено локальным этическим комитетом (протокол Комиссии по вопросам этики НМУ имени А. А. Богомольца № 83 от 11/12/2012). Статистическая обработка проводилась с применением пакета программ Statistica 10.0 (Stasoft Inc., США). Для сравнения данных в двух группах использовали t-критерий Стьюдента и тест Манна-Уитни. Разница считалась статистически достоверной при  $p < 0,05$ .

### 5. Результаты исследования

В наших предыдущих исследованиях было показано, что сочетание двух активирующих сигналов в схеме получения моноцитарных ДК – IFN- $\alpha$  и LPS имеет существенный модулирующее влияние на их цитокин- и хемокинсекреторную активность, обуславливая доминирование провоспалительного потенциала. Такая технология была успешно использована для получения ДК и применена в ИТ больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) [14]. Исходя из накопленного опыта, эту же технологию мы использовали для дифференцировки ДК и создания противоопухолевой вакцины на их основе для больных РПЖ.

Как показали результаты исследований, введение ДК-вакцины, как правило, не сопровождается развитием каких-либо существенных побочных или токсических реакций у больных. Не отмечено значимого ухудшения самочувствия пациентов и развития побочных явлений в виде аллергических или аутоиммунных расстройств, регионарной лимфаденопатии, связанных с введением вакцины. Из нежелательных эффектов зафиксировано лишь развитие гипертермической реакции с ознобом через 1–6 ч после инъекции в 10 % случаев, которую устраняли с помощью жаропонижающих средств

Контроль качества ДК включал оценку количественных и фенотипических характеристик на конечном этапе изготовления ДК-вакцины непосредственно перед ее введением.

Нами было установлено, что количество ДК генерируемых из моноцитов периферической крови больных РПЖ незначительно снижено на начальных этапах ИТ по отношению к значениям у ПЗЛ. На 3-м этапе проведения ИТ наблюдается незначительное увеличение количества ДК генерированных у больных, однако эти изменения происходили на уровне тенденции (рис. 1). Следует отметить, что у всех больных РПЖ нам удалось вырастить достаточное количество жизнеспособных ДК для проведения ИТ.

Фенотип ДК свидетельствует о готовности клеток к выполнению определенных функций: взаимодействия с Т-клетками, клетками микроокружения

определенных тканей, секреции цитокинов. Основными маркерами ДК, характеризующими степень их зрелости и функциональную способность, являются поверхностные молекулы CD80, CD86, CD40, CD83 и HLA-DR и др. Фенотип ДК зависит от стадии созревания и активации. На рис. 2–3 представлены результаты оценки фенотипической зрелости ДК генерированных *in vitro* у больных РПЖ на этапах проведения ИТ и ПЗЛ.

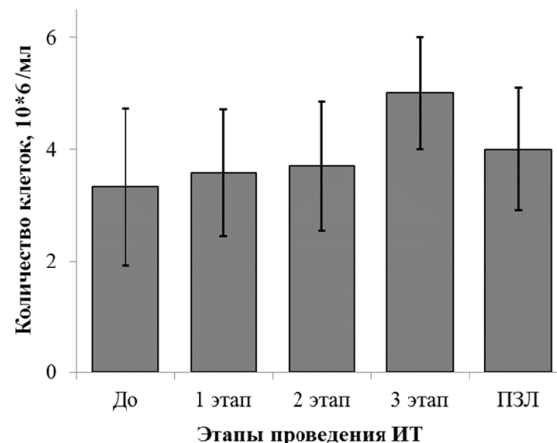


Рис. 1. Количество ДК генерированных *in vitro* у больных РПЖ на этапах проведения иммунотерапии (n=22) и ПЗЛ – практически здоровых людей (n=10)

Результаты исследования показали, что на начальных этапах проведения ИТ ДК больных РПЖ имели среднюю степень зрелости. Так, уровень одновременной ко-экспрессии CD86<sup>+</sup> и HLA-DR<sup>+</sup>-антигенов составляли: до начала проведения ИТ (58,20±6,61) % на 1 этапе ИТ – (66,40±3,78) % и они были достоверно ниже значений ДК генерированных у ПЗЛ – (83,39±4,91) %,  $p < 0,05$ .

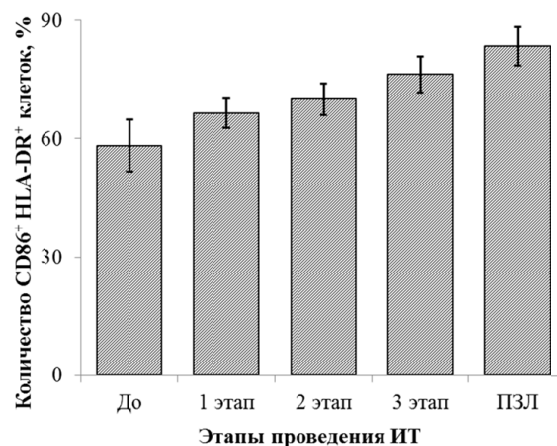


Рис. 2. Изменения ко-экспрессии дифференцировочных антигенов CD86 и HLA-DR на ДК на этапах проведения иммунотерапии больных РПЖ (n=22) и ПЗЛ – практически здоровых людей (n=10): 0 –  $p < 0,05$  в сравнении со значениями ПЗЛ; \* –  $p < 0,05$  в сравнении со значениями до ИТ; # –  $p < 0,05$  в сравнении со значениями 1этапа ИТ

В ходе проведения исследования нами было установлено, что уже на 2-м и 3-м этапах ИТ степень

зрелости ДК больных РПЖ значительно возрастает. Так уровень ко-экспрессии антигенов CD86<sup>+</sup> и HLA-DR<sup>+</sup> составлял (70,00±4,00) % и (76,30±4,62) % соответственно и был достоверно выше значений до проведения ИТ,  $p < 0,05$ .

Установлено, что уровень экспрессии маркера дифференцировки CD83, который определяет степень зрелости ДК, повышался с каждым последующим этапом ИТ, но не достигал уровня ПЗЛ. Так, на заключительном 4-м этапе ИТ он составлял (34,83±3,49) % против (24,44±1,70) %,  $p < 0,05$ .

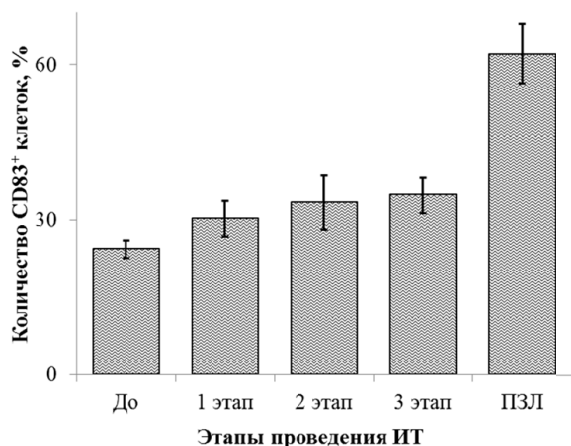


Рис. 3. Изменения экспрессии дифференцировочных антигенов CD83 на ДК на этапах проведения иммунотерапии больных РПЖ (n=22) и ПЗЛ – практически здоровых людей (n=10): \* –  $p < 0,05$  в сравнении со значениями до ИТ

### 5. Обсуждение результатов исследования

Нами было установлено, что существенных побочных или токсических реакций при проведении ИТ у больных РПЖ не наблюдалось. Возможно лишь умеренное повышение температуры тела и слабость, что может быть связано с общим иммунным ответом организма. Полученные результаты совпадают с данными М. Okamoto и соавт., которые проводили пилотные исследования эффективности ДК-вакцинотерапии у больных РПЖ в Японии [15].

Анализ количества и жизнеспособности ДК показал, что у всех больных РПЖ удалось выра-

стить достаточное количество жизнеспособных ДК для проведения иммунотерапии. Уровень экспрессии дифференцировочных антигенов CD83, CD86 и HLA-DR на ДК генерируемых *in vitro* значительно увеличивается на этапах проведения ИТ больным РПЖ. Полученные данные могут свидетельствовать о том, что для формирования более стойкого противоопухолевого специфического иммунного ответа на аутологичные ОАА у больных РПЖ требует не меньше 3–4 введений ДК, «нагруженных» ОАА. Полученные результаты могут служить дополнительным обоснованием при выборе схемы проведения иммунотерапии у больных РПЖ, в частности, при выборе необходимого количества этапов ДК-иммунотерапии.

Анализируя вышеизложенное, можно сделать вывод, что специфическая ИТ при РПЖ требует дальнейшего совершенствования и клинических исследований, в частности, стандартизации протоколов получения противоопухолевых вакцин и их применения, проведения масштабных рандомизированных клинических исследований с включением больших групп пациентов. Возможно, данный метод лечения позволит усовершенствовать и разработать наиболее эффективные протоколы лечения больных РПЖ.

### 7. Выводы

1. Анализ количества и жизнеспособности ДК показал, что у всех больных РПЖ удалось вырастить достаточное количество жизнеспособных ДК для проведения ИТ.

2. Уровень ко-экспрессии дифференцировочных антигенов CD86 и HLA-DR на ДК генерируемых *in vitro* значительно увеличивается на этапах проведения ИТ больным РПЖ,  $p < 0,05$ .

3. Уровень экспрессии маркера CD83, который определяет степень зрелости ДК, растет на этапах проведения ИТ больным РПЖ,  $p < 0,05$ .

4. Таким образом, изучение фенотипических характеристик ДК, даст возможность усовершенствовать и разработать наиболее эффективные протоколы рационального применения ДК-вакцин у больных РПЖ.

### Литература

1. Ryan, D. P. Pancreatic adenocarcinoma [Text] / D. P. Ryan, T. S. Hong, N. Bardeesy // New England Journal of Medicine. – 2014. – Vol. 371, Issue 11. – P. 1039–1049. doi: 10.1056/nejmra1404198
2. Kirkwood, J. M. Immunotherapy of cancer in 2012 [Text] / J. M. Kirkwood, L. B. Butterfield, A. A. Tarhini, H. Zarour, P. Kalinski, S. Ferrone // CA: A Cancer Journal for Clinicians. – 2012. – Vol. 62, Issue 5. – P. 309–335. doi: 10.3322/caac.20132
3. Sabado, R. Cancer immunotherapy: dendritic-cell vaccines on the move [Text] / R. Sabado, N. Bhardwaj // Nature. – 2015. – Vol. 519, Issue 7543. – P. 300–301. doi: 10.1038/nature14211
4. Dhodapkar, M. V. Antigen-Specific Inhibition of Effector T Cell Function in Humans after Injection of Immature Dendritic Cells [Text] / M. V. Dhodapkar, R. M. Steinman, J. Krasovsky, C. Munz, N. Bhardwaj // The Journal of Experimental Medicine. – 2001. – Vol. 193, Issue 2. – P. 233–238. doi: 10.1084/jem.193.2.233
5. Figdor, C. G. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way [Text] / C. G. Figdor, I. J. M. de Vries, W. J. Lesterhuis, C. J. M. Melief // Nature Medicine. – 2004. – Vol. 10, Issue 5. – P. 475–480. doi: 10.1038/nm1039
6. Palucka, K. Cancer immunotherapy via dendritic cells [Text] / K. Palucka, J. Banchereau // Nature Reviews Cancer. – 2012. – Vol. 12, Issue 4. – P. 265–277. doi: 10.1038/nrc3258

7. Hettihewa, L. M. Prolonged expression of MHC class I – peptide expression in bone marrow derived retrovirus transfected matured dendritic cells by continuous centrifugation in the presence of IL-4 [Text] / L. M. Hettihewa // The Indian Journal of Medical Research. – 2011. – Vol. 134, Issue 5. – P. 672–678. doi: 10.4103/0971-5916.90993
8. Dudek, A. M. Immature, Semi-Mature, and Fully Mature Dendritic Cells: Toward a DC-Cancer Cells Interface That Augments Anticancer Immunity [Text] / A. M. Dudek, S. Martin, A. D. Garg, P. Agostinis // Frontiers in Immunology. – 2013. – Vol. 4. – P. 438–452. doi: 10.3389/fimmu.2013.00438
9. Richter, C. Generation of Inducible Immortalized Dendritic Cells with Proper Immune Function In Vitro and In Vivo [Text] / C. Richter, S. Thieme, J. Bandoła, M. Laugsch, K. Anastasiadis, S. Brenner // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, Issue 4. – P. e62621. doi: 10.1371/journal.pone.0062621
10. Anguille, S. Dendritic Cells as Pharmacological Tools for Cancer Immunotherapy [Text] / S. Anguille, E. L. Smits, C. Bryant, H. H. Van Acker, H. Goossens, E. Lion et. al. // Pharmacological Reviews. – 2015. – Vol. 67, Issue 4. – P. 731–753. doi: 10.1124/pr.114.009456
11. Amigorena, S. Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells [Text] / S. Amigorena, A. Savina // Current Opinion in Immunology. – 2010. – Vol. 22, Issue 1. – P. 109–117. doi: 10.1016/j.coi.2010.01.022
12. Kantoff, P. W. Sipuleucel T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer [Text] / P. W. Kantoff, C. S. Higano, N. D. Shore, E. R. Berger, E. J. Small, D. F. Penson et. al. // New England Journal of Medicine. – 2010. – Vol. 363, Issue 5. – P. 411–422. doi: 10.1056/nejmoa1001294
13. Johnson, L. A. Cell Traffic and the Lymphatic Endothelium [Text] / L. A. Johnson, D. G. Jackson // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2008. – Vol. 1131, Issue 1. – P. 119–133. doi: 10.1196/annals.1413.011
14. Храновская, Н. Н. Разработка, обоснование и оценка эффективности противоопухолевой вакцинотерапии на основе дендритных клеток у больных со злокачественными новообразованиями [Текст] / Н. Н. Храновская, И. А. Крячок, В. Л. Ганул, Л. И. Воробьева, Ю. А. Гриневич, В. Э. Орел, О. В. Скачкова и др. // Клиническая онкология. – 2014. – Т. 2, № 14. – С. 62–70.
15. Okamoto, M. Dendritic cell-based vaccine for pancreatic cancer in Japan [Text] / M. Okamoto // World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics. – 2016. – Vol. 7, Issue 1. – P. 133–138. doi: 10.4292/wjgpt.v7.i1.133

*Рекомендовано до публікації д-р мед. наук Ковальська І. О.  
Дата надходження рукопису 13.01.2017*

**Храновская Наталья Николаевна**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, научно-исследовательская лаборатория экспериментальной онкологии, Национальный институт рака, ул. Ломоносова, 33/43, г. Киев, Украина, 03022

E-mail: nkhranovska@ukr.net

**Скачкова Оксана Владимировна**, кандидат биологических наук, научно-исследовательская лаборатория экспериментальной онкологии, Национальный институт рака, ул. Ломоносова, 33/43, г. Киев, Украина, 03022

E-mail: oksanaskachkova@ukr.net

**Земсков Сергей Владимирович**, кандидат медицинских наук, доцент, кафедра общей хирургии № 1, Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца, бул. Т. Шевченко, 13, г. Киев, Украина, 01601

E-mail: szemskov@yahoo.com