

УДК 612.017.1: 618.146-006.6-085

## ОПЫТ КОНСТРУИРОВАНИЯ ДЕНДРИТНО-КЛЕТОЧНОЙ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

**Водолажский Д.И., Меньшенина А.П., Двадненко К.В., Новикова И.А.,  
Златник Е.Ю., Бахтин А.В., Моисеенко Т.И., Селютина О.Н., Франциянц Е.М.**  
*ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России,  
Ростов-на-Дону, e-mail: dvodolazhsky@gmail.com*

На основании морфологических и иммунофенотипических критериев показана возможность получения зрелых ДК методом их генерации из МНК крови доноров и больных. К 9-м суткам культивирования в присутствии GM-CSF, IL-4 и TNF- $\alpha$ , а также лизата культуры HeLa происходит утрата мембранных маркеров моноцитов (CD14, CD1a) при нарастании количества клеток, экспрессирующих маркеры ДК (CD83, CD86), что сопровождается характерными для ДК морфологическими признаками (приобретением многоугольной, отростчатой и веретеновидной формы). В этот срок наблюдения маркеры зрелых ДК экспрессированы на 99,6% (CD83) и 99,9% (CD86) клеток. Добавление лизата культуры HeLa в последние 2 дня культивирования ДК не угнетает их дифференцировку, а напротив, потенциально может являться фактором ее стимуляции.

**Ключевые слова:** рак шейки матки, дендритные клетки (ДК), иммунофенотипирование

## EXPERIENCE OF DENDRITIC CELL VACCINE DESIGN FOR CERVICAL CANCER TREATMENT

**Vodolazhskiy D.I., Menshenina A.P., Dvadnenko K.V., Novikova I.A., Zlatnik E.Y.,  
Bakhtin A.V., Moiseenko T.I., Selyutina O.N., Frantsiyants E.M.**  
*Rostov Research Oncologic Institute of Ministry of Health, the Russian Federation,  
Rostov-on-Don, e-mail: dvodolazhsky@gmail.com*

In our study we generated mature dendritic cell (DC) from peripheral blood monocytes (PBMC) of healthy donors and cervical cancer patients. The method of cultivating DC from PBMC in the presence of GM-CSF, IL-4, TNF- $\alpha$  and HeLa lysate has been worked out. Up to the nine day of cultivating PBMC lacked monocytoid CD14 and CD1a molecules, expression of CD83 and CD86 elevated, accompanying with specific morphological features (acquisition of fusiform, polygonal, branched form). At the late stage mature DC markers CD83 and CD86 expressed in 99,6% and 99,9% of cells respectively. Adding of HeLa lysate in last 2 days of cultivating can stimulate the DC differentiation.

**Keywords:** cervical cancer, dendritic cells (DC), immunophenotyping

Разработка методов лечения злокачественных опухолей с помощью клеточных технологий, в частности иммунотерапии, является одним из приоритетных направлений в онкологии. В настоящее время в мире ведется более 300 клинических испытаний по использованию вакцин на основе стволовых и дендритных клеток для лечения онкологических заболеваний, из которых 232 в США и только 3 в России (согласно данным U.S. National Institutes of Health (clinicaltrials.gov)). В НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск) разработаны и готовы к клиническим испытаниям специфические вакцины на основе активированных дендритных клеток, сенсibilизированных опухолевыми антигенами, против рака молочной железы, колоректального рака, рака простаты и яичника [1]. В НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова (С-Петербург) ведутся исследования по разработке и применению вакцин для иммунотерапии меланомы [2]. Оптимизация технологии и стандартизация получения

противоопухолевых вакцин на основе аутологичных дендритных клеток, диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. Применение клеточных технологий для иммунотерапии онкологических заболеваний может способствовать преодолению резистентности опухоли к химиотерапии и повышению эффективности лечения больных [4, 5, 6].

Среди современных направлений в области вакцинотерапии злокачественных опухолей следует отметить расширение нозологических форм, подлежащих этому методу лечения, а также оптимизацию методов получения дендритноклеточных вакцин и протоколов их применения. Представляется значительной вероятностью того, что рак шейки матки, в возникновении которого, как известно, велика роль вирусной инфекции, в частности ВПЧ высокого онкогенного риска, окажется чувствительным к иммунотерапии, например вакцинации дендритно-клеточными вакцинами.

Дендритные клетки (ДК) являются профессиональными антиген-представляющими клетками, участвующими в иммунном ответе благодаря своей способности активировать не только «наивные» CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты, но и Т-клетки памяти паракортикальных зон периферических лимфоидных органов. В связи с центральной ролью в формировании иммунных реакций изучение ДК является не только крайне важной фундаментальной, но и прикладной медико-биологической задачей. Имеющиеся в современной литературе данные свидетельствуют о значительном уменьшении количества ДК в опухолевой ткани, а также их функциональной неполноценности. В настоящее время разработаны методы получения дендритных клеток из CD34<sup>+</sup> костномозговых миелоидных предшественников и моноцитов периферической крови.

Целью данной работы является отработка метода получения зрелых дендритных клеток из крови доноров и больных раком шейки матки для получения ДК-вакцины.

#### Материалы и методы исследования

Для получения фракции мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови использовали ЭДТА-стабилизированную кровь 3-х здоровых женщин (доноров) и 3-х больных раком шейки матки (РШМ) в количестве 50 мл. Возраст доноров составлял 25, 34 и 65 лет; возраст больных 34, 36 и 39 лет.

Работу с клетками человека на всех этапах проводили в стандартных условиях стерильного модуля в ламинарно-потоковом шкафу II класса биологической защиты. Дендритные клетки получали из периферической крови с использованием стандартной процедуры [3]. В качестве ростовой среды использовали среду CellGroDC с добавлением 50 мкг/мл гентамицина, ростовых факторов и факторов дифференцировки GM-CSF (72 нг/мл) и IL-4 (20–45 нг/мл). На 3-й и 5-й день культивирования добавляли свежую порцию GM-CSF (72 нг/мл) и IL-4 (20–45 нг/мл). На 7-й день культивирования клетки из одного флакона использовали для анализа иммунофенотипа незрелых ДК на проточном цитометре. Во второй флакон добавляли ростовые факторы и факторы дифференцировки GM-CSF (72 нг/мл), IL-4 (20–45 нг/мл) и TNF- $\alpha$  (20 нг/мл), а также клеточный лизат культуры клеток HeLa в качестве антигенной нагрузки из расчета 3 клетки культуры HeLa на 1 дендритную клетку. Спустя 48 часов клетки снимали скрепером и после подсчета и анализа жизнеспособности в камере Горяева выполняли иммунофенотипирование зрелых ДК с помощью проточного цитометра путем выделения на графиках популяции МНК-ДК и очистки её от дебриса и лимфоцитов с помощью меток CD45, CD3, CD4, CD8, CD16+56, CD19. Оценка стадии созревания мононуклеаров производилась с помощью антител к CD1a, CD11c, CD14, CD33, CD38, CD83, CD86, HLA-DR.

#### Характеристика больных

Больная № 1 (34 года) 3 курса полихимиотерапии (ПХТ) в предоперационном периоде, курс дистанционной гамма-терапии (ДГТ). Операция: нервосберегающая экстирпация матки с придатками и верхней

третью влагалища, тазовая лимфаденэктомия. Кровь взята в послеоперационном периоде.

Больная № 2 (36 лет) 2 курса ХТ в предоперационном периоде, курс иммунотерапии препаратом «аллокин-альфа». Операция: нервосберегающая экстирпация матки с придатками и верхней третью влагалища, тазовая лимфаденэктомия. Кровь взята в послеоперационном периоде.

Больная № 3 (39 лет) 2 курса ХТ в предоперационном периоде, курс иммунотерапии препаратом «аллокин-альфа». Кровь взята до операции.

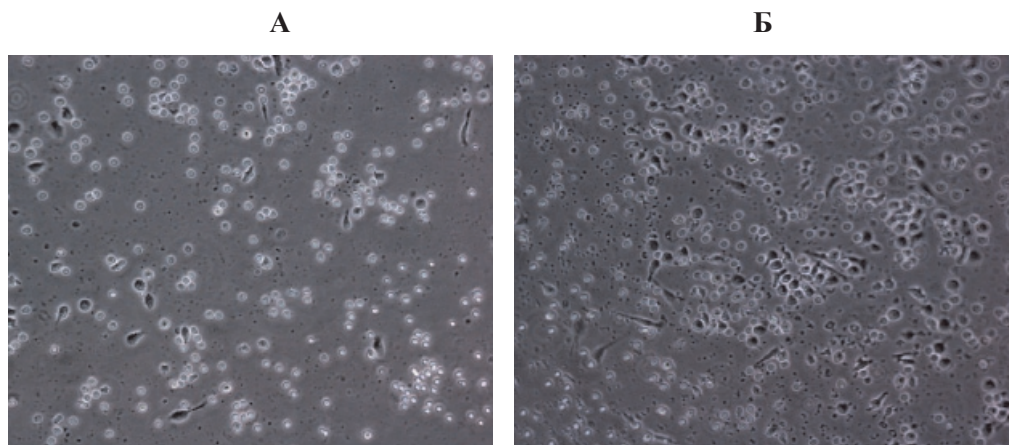
Основными критериями отбора больных для настоящего исследования являлись степень распространения процесса, соответствующая по классификации TNM: T1v2N0-xM0, T2aN0-xM0, T2vN0-xM0 и репродуктивный возраст больных.

Критерием исключения служили: наличие метаболического синдрома; наличие отдаленных метастазов, выявленных до начала или в процессе лечения; отсутствие эффекта или прогрессирование заболевания после проведения 2 курсов неoadъювантной химиоиммунотерапии; наличие общих противопоказаний для проведения плазмафереза: критический уровень белка крови (ниже 50 г/л); наличие анемии III ст. (гемоглобин ниже 70 г/л); недренируемый очаг гнойного воспаления; инкурабельные состояния больных.

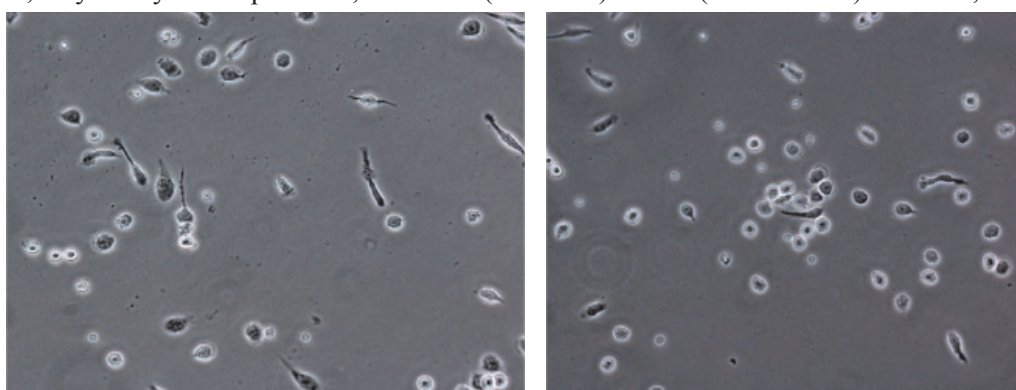
#### Результаты исследования и их обсуждение

При культивировании МНК крови отмечено, что уже через 3–4 часа начинается процесс прикрепления части моноцитов к субстрату подложки флакона. В процессе адгезии к подложке происходит увеличение размеров клеток, появление единичных отростков, распластывание по субстрату подложки. Через 3 суток становится заметно, что количество прикрепившихся к субстрату МНК здоровых доноров превышает количество МНК больных, что подтверждается и количественными данными, полученными при помощи камеры Горяева ( $1,5 \cdot 10^6$ /мл клеток больной и  $2,5 \cdot 10^6$ /мл клеток здорового донора), (рис. 1, а, б). Через 7 сут культивирования в пробе больной присутствует  $0,7 \cdot 10^6$ /мл, в донорской пробе  $1,18 \cdot 10^6$ /мл клеток. Снижение их количества по мере культивирования представляется закономерным, поскольку происходит гибель и отмывание лимфоцитов, после чего на пластике остаются преимущественно ДК различной степени зрелости. На 7-е сутки эксперимента клетки, растущие на подложке флакона, в основном имеют многоугольную, отростчатую и веретеновидную формы (рис. 1, в, г).

На 9-е сутки культивирования дендритных клеток в присутствии GM-CSF, IL-4 и TNF- $\alpha$ , а также лизата культуры HeLa (рис. 2, а, б) отмечены различия между клетками больных и доноров. Характерная для ДК отростчатая или веретеновидная форма более выражена у донорских клеток; они более крупного размера, чем клетки больных.

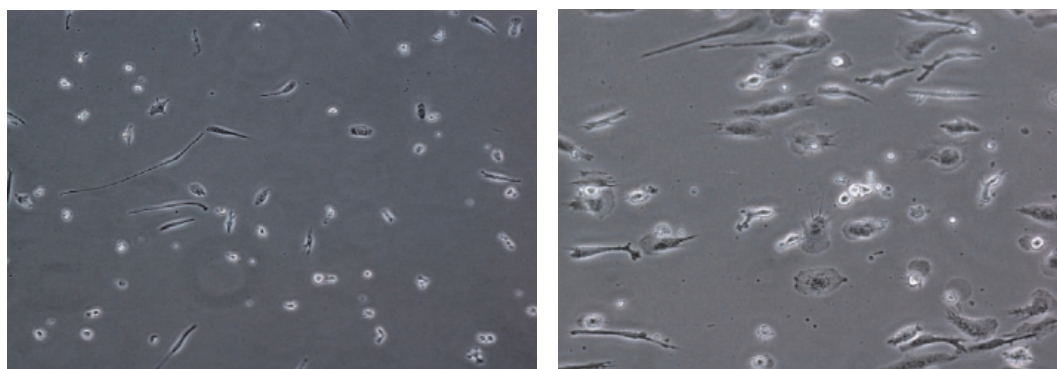


а б  
МНК, 3 суток культивирования, GM-CSF (72 нг/мл) и IL-4 (20-45 нг/мл). Об. x10, ок. x10



Б Г  
Дендритные клетки, 7-е сутки культивирования. GM-CSF (72 нг/мл), IL-4 (20-45 нг/мл) и TNF- $\alpha$  (20 нг/мл, лизат культуры HeLa). Об. x10, ок. x20

*Рис. 1. Количественные и структурные изменения МНК больных и доноров при культивировании в течение 7 дней:  
А – клетки больной; Б – клетки донора*



ДК больной

ДК донора

*Рис. 2. Результаты заключительного этапа генерации ДК из МНК больных и доноров (9 суток культивирования, 48 часов инкубации с лизатом HeLa в присутствии факторов роста и дифференцировки). Об. x20, ок. x10*

В таблице представлены результаты оценки эффективности генерации ДК из МНК 6 проб. Как видно из представленных данных, индивидуальная вариабельность результатов весьма значительна;

пробы МНК различаются как по количеству выделенных, так и по проценту погибших клеток. У 2-х доноров количество ДК превышало этот показатель больных на 1–2 порядка.

Результаты эксперимента по генерации ДК из МНК доноров и больных РСМ

Показатели	Доноры			Больные		
	1	2	3	1	2	3
Кол-во клеток в 1 мл	1.793.000	400.000	297.000	6.230.000	1.287.000	3.157.000
Погибшие клетки (%)	20	50	30	40	10	35
Дендритные клетки (%)	около 1000 клеток	50	15	–	4	0,7

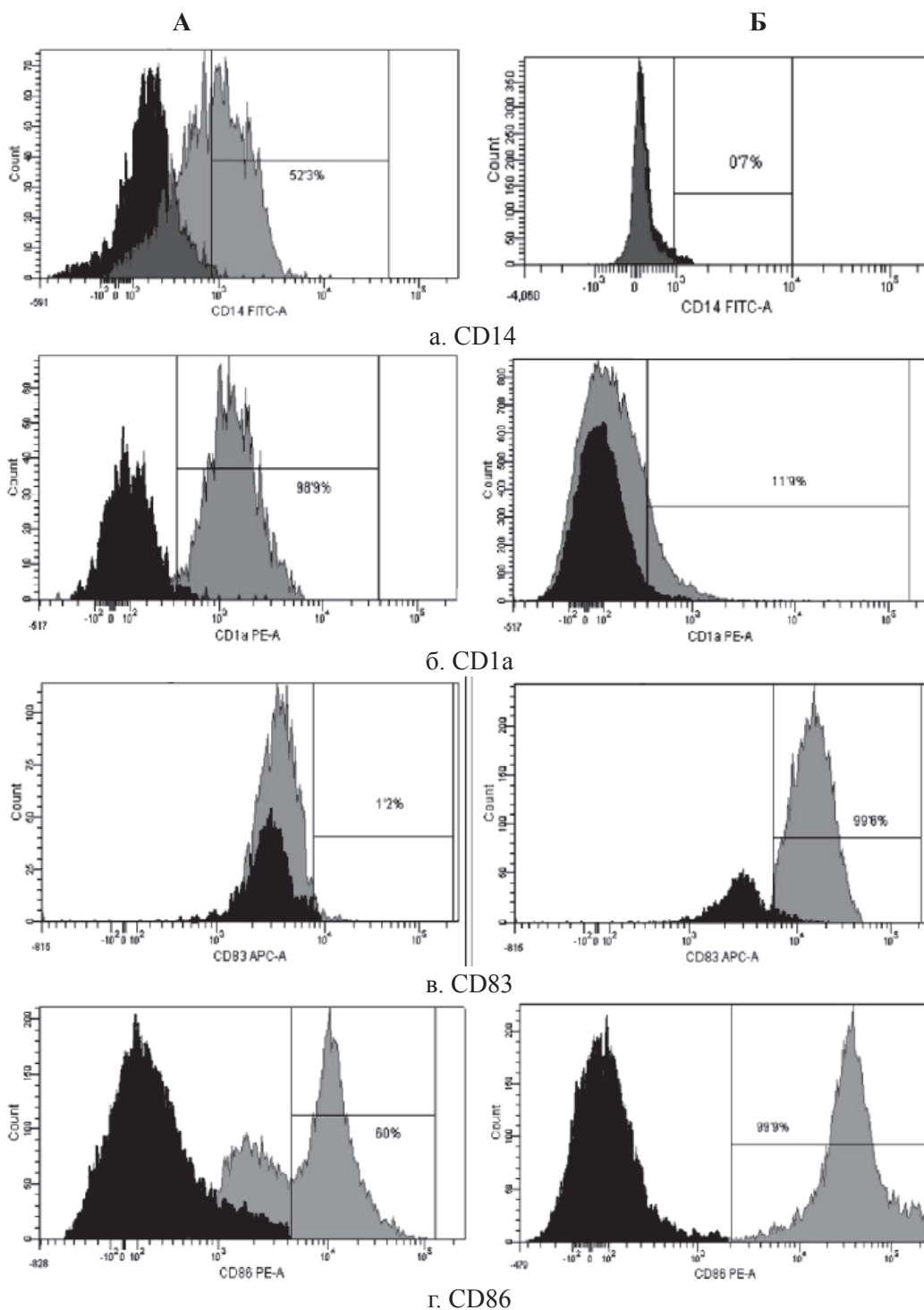


Рис. 3. Динамика изменения иммунофенотипа культуры:  
 А – на 7-й день; Б – на 9-й день культивирования.  
 Серым цветом окрашены ДК, чёрным – клетки, находящиеся в лимфоцитарном гейте

При иммунофенотипировании культуры ДК с использованием моноклональных антител к якорным общелейкоцитарным антигенам и антигенам, характеризующим различные стадии созревания ДК, выявлены следующие закономерности изменения экспрессии поверхностных кластеров дифференцировки (CD). На рис. 3 представлены результаты донорских проб, из которых удалось выделить максимальное количество клеток. По мере созревания культуры и трансформации МНК в дендритные клетки изменялась экспрессия основных поверхностных антигенов CD14, CD1a, CD83, CD86, CD33. Так, при культивировании в присутствии цитокиновых стимуляторов и лизата клеток HeLa в качестве антигена с 7-х по 9-е сутки МНК полностью теряли моноцитарный маркер CD14 (количество экспрессирующих его клеток снижалось с 52,3 до 0,7%; рис. 3, а А, Б) и маркер CD1a (с 98,9 до 11,9%; рис. 3, б А, Б). При этом в те же сроки на МНК возрастала экспрессия дендритноклеточных рецепторов CD83 (с 1,2 до 99,6%; рис. 3, в А, Б) и CD86 (с 60 до 99,9%; рис. 3, г А, Б), достигая максимальных значений на 9-й день культивирования, что свидетельствует о получении зрелой культуры ДК. Кроме того, по мере созревания ДК отмечалось возрастание экспрессии маркера CD33.

#### Заключение

Итак, результаты эксперимента по генерации ДК из МНК крови доноров и больных РШМ на основании морфологических и иммунофенотипических критериев показали возможность получения зрелых ДК в условиях, описанных выше. К 9-м суткам культивирования в присутствии GM-CSF, IL-4 и TNF- $\alpha$ , а также лизата культуры HeLa происходит утрата мембранных маркеров моноцитов (CD14, CD1a) при нарастании количества клеток, экспрессирующих маркеры ДК (CD83, CD86), что сопровождается характерными для ДК морфологическими признаками (приобретением многоугольной, отростчатой и веретеновидной формы). В этот срок наблюдения маркеры зрелых ДК экспрессированы на 99,6% (CD83) и 99,9% (CD86) клеток. Добавление лизата культуры HeLa в последние 2 дня культивирования ДК не угнетает их дифференцировку, а напротив, потенциально может являться фактором ее стимуляции.

*Работа создана при поддержке гранта «Новые технологии молекулярной детоксикации и клеточной иммунологии в персонализированном лечении больных при злокачественных опухолях гениталий» МК-4427.2014.7.*

#### Список литературы

1. Балдуева И.А., Данилова А.Б., Новик А.В., Комаров Ю.И., Нехаева Т.Л., Проценко С.А., Семенова А.И., Пипиа Н.П., Воробейчиков Е.В., Карицкий А.П., Климашевский Е.Н., Имянитов Е.Н., Беляев А.М. Дендритные клетки, активированные раково-тестикулярными антигенами (RTA+), в лечении метастатических сарком мягких тканей // Вопросы онкологии. – 2014. – Т. 60, № 6. – С. 700–706.
2. Балдуева И.А., Моисеенко В.М., Данилова А.Б., Данилов А.О., Нехаева Т.Л., Георгиев Г.П., Гнучев Н.В., Ла-

рин С.С., Киселёв С.Л. Клеточные технологии в терапии злокачественных опухолей // Росс. иммунол. журнал. – 2008. – Т.2(11), № 2-3. – С. 303–304.

3. Нехаева Т.Л., Балдуева И.А., Новик А.В., Данилова А.Б., Данилов А.О., Комаров Ю.И., Воробейчиков Е.В., Понмаренко В.М., Вааль А.И. Оптимизация технологии и стандартизация получения противоопухолевых вакцин на основе аутологичных дендритных клеток (ДК) // Российский иммунологический журнал. – 2013. – Т. 7 (16). – № 2–3. – С. 345.

4. Шевченко Ю.А., Хантакова Ю.Н., Курилин В.В., Лопатникова Ю.А., Сидоров С.В., Козлов В.А., Сенников С.В. Стимуляция цитотоксического иммунного ответа в культуре мононуклеарных клеток у больных раком молочной железы дендритными клетками, нагруженными антигенами опухолевых лизатов // Иммунология. – 2013 – Т. 34, № 6 – С. 327–330.

5. Dudley M.E., Wunderlich J.R., Robbins P.F., Yang J.C., Hwu P., Schwartzentruber D.J., Topalian S.L., Sherry R., Restifo N.P., Hubicki A.M., Robinson M.R., Raffeld M., Duray P., Seipp C.A., Rogers-Freezer L., Morton K.E., Mavroukakis S.A., White D.E., Rosenberg S.A. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes // Science. 2002. Oct. 19. Vol. 298(5594). P. 850–854.

6. Saha A, Chatterjee S.K., Foon K.A., Primus F.J., Sreedharan S., Mohanty K., Bhattacharya-Chatterjee M. Dendritic cells pulsed with an anti-idiotypic antibody mimicking carcinoembryonic antigen (CEA) can reverse immunological tolerance to CEA and induce antitumor immunity in CEA transgenic mice // Cancer Res. 2004. Jul. 15. Vol. 64(14). P. 4995–5003.

#### References

1. Baldueva I.A., Danilova A.B., Novik A.V., Komarov Yu.I., Nekhaeva T.L., Protsenko S.A., Semenova A.I., Pipia N.P., Vorobeichikov E.V., Karitskii A.P., Klimashevskii E.N., Imyanitov E.N., Belyaev A.M. Dendritnye kletki, aktivirovannye rakovo-testikulyarnymi antigenami (RTA+), v lechenii metastaticheskikh sarkom myagkikh tkanei. *Voprosy onkologii*, 2014, vol. 60, no. 6, pp. 700–706.

2. Baldueva I.A., Moiseenko V.M., Danilova A.B., Danilov A.O., Nekhaeva T.L., Georgiev G.P., Gnuchev N.V., Larin S.S., Kiselev S.L. Kletochnye tekhnologii v terapii zlokachestvennykh opukholei. *Ross. immun. zhurnal*, 2008, vol. 2(11), no. 2–3, pp. 303–304.

3. Dudley M.E., Wunderlich J.R., Robbins P.F., Yang J.C., Hwu P., Schwartzentruber D.J., Topalian S.L., Sherry R., Restifo N.P., Hubicki A.M., Robinson M.R., Raffeld M., Duray P., Seipp C.A., Rogers-Freezer L., Morton K.E., Mavroukakis S.A., White D.E., Rosenberg S.A. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes // Science. 2002. Oct. 19. Vol. 298(5594). P. 850–854.

4. Nekhaeva T.L., Baldueva I.A., Novik A.V., Danilova A.B., Danilov A.O., Komarov Yu.I., Vorobeichikov E.V., Ponomarenko V.M., Vaal' A.I. Optimizatsiya tekhnologii i standartizatsiya polucheniya protivopukholevykh vaktsin na osnove autologichnykh dendritnykh kletok (DK). *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal*, 2013, vol. 7(16), no. 2–3, pp. 345.

5. Shevchenko Yu.A., Khantakova Yu.N., Kurilin V.V., Lopatnikova Yu.A., Sidorov S.V., Kozlov V.A., Sennikov S.V. Stimulyatsiya tsitotoksicheskogo immunnogo otveta v kul'ture mononuklearnykh kletok u bol'nykh rakom molochnoi zhelezy dendritnymi kletkami, nagruzhennymi antigenami opukholevykh lizatov. *Immunologiya*, 2013, vol. 34, no. 6, pp. 327–330.

6. Saha A, Chatterjee S.K., Foon K.A., Primus F.J., Sreedharan S., Mohanty K., Bhattacharya-Chatterjee M. Dendritic cells pulsed with an anti-idiotypic antibody mimicking carcinoembryonic antigen (CEA) can reverse immunological tolerance to CEA and induce antitumor immunity in CEA transgenic mice // Cancer Res. 2004. Jul. 15. Vol. 64(14). pp. 4995–5003.

#### Рецензенты:

Шихлярова А.И., д.б.н., профессор, заведующая лабораторией изыскания новых противоопухолевых средств, ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону;

Николаева Н.В., д.м.н., ассистент кафедры онкологии, ГБОУ ВПО РостГМУ Минздрава России, г. Ростов-на-Дону.