

1

2

3

Гончаров А. Е., Залуцкий И. В., Прохорова А. В.,

¹Романова И. В., ³Попок В. И.

ПОДГОТОВКА ВАКЦИН НА ОСНОВЕ АУТОЛОГИЧНЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ТЕРАПИИ РАКА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

*¹ Республиканский научно-практический центр эпидемиологии
и микробиологии, г. Минск,*

*Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, г. Минск,
Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск*

Рак поджелудочной железы (РПЖ) относится к одной из самых агрессивных опухолей органов пищеварения. Заболевание характеризуется крайне неблагоприятным прогнозом даже после радикального оперативного вмешательства, неэффективностью химиотерапии и лучевой терапии. В этой связи проводятся поиски новых методов лечения данного заболевания. Терапия аутологичными дендритными клетками (ДК), праймированными антигенами опухоли, к настоящему времени вошла в арсенал средств лечения рака во многих странах. Показана эффективность такого лечения пациентов с раком молочной железы, раком простаты, опухолей головного мозга. В 2007-2012 гг. в ряде зарубежных клиник проведены пилотные исследования, которые показали возможность использования такого подхода для терапии РПЖ.

Цель: адаптация метода получения дендритных клеток для терапии пациентов, страдающих РПЖ.

Материалы и методы. Исследовано 5 образцов венозной крови пациентов с РПЖ и 6 образцов крови доноров. Моноциты выделяли из мононуклеарных клеток крови методом адгезии и культивировали в течение 7 суток в питательной среде AIM-V, содержащей рекомбинантные GM-CSF и ИЛ-4. Производили подсчет клеток, оценивали их иммунофенотип, жизнеспособность и показатель апоптоза. Для праймирования ДК культивировали на протяжении 6 чв питательной среде с 100 мкг/мл лизата аутологичной опухоли. Для изучения способности ДК стимулировать пролиферацию Т-клеток, аутологичные лимфоциты, предварительно инкубированные с CFSE, культивировали со зрелыми праймированными ДК в разных соотношениях на протяжении 72 ч, после чего определяли пролиферативную активность CD3+ клеток. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием непараметрических методов. Значения показателей представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха между 25-й и 75-й перцентилями. Нормальность распределения величин оценивали с использованием W-критерия Шапиро-Уилка. Для сравнения двух независимых выборок применяли непараметрический U-критерий Манна-Уитни, для сравнения связанных выборок — критерий Уилкоксона. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Полученные культуры ДК как у пациентов, так и у доноров были морфологически однородны, клетки характеризовались звездчатыми клеточными формами с наличием типичных цитоплазматических отростков. Клетки находились во взвешенном состоянии, некоторые из них были объединены в кластеры. Во всех культурах ДК присутствовала примесь лимфоцитов, составлявшая не более 30 %. ДК экспрессировали молекулу гистосовместимости HLA-DR, маркер моноцитарных ДК — CD1a, молекулы адгезии CD11c и CD54 (ICAM-1), костимуляторные молекулы CD86 (B7.2) и CD80 (B7.1), рецепторы CD205 (DEC-205), CD206 и CD209 (DC-SIGN), маркеры созревания CD83 и CD208 (DC-LAMP), в невысокой степени — коингибиторные молекулы CD273 (H7-DC) и CD274 (B7-H1). Клетки не экспрессировали молекулы CD14, CD16 и CD207. В то же время экспрессия молекулы CD1a ДК пациентов с РПЖ по сравнению с ДК доноров была существенно снижена, что указывает на нарушение дифференцировки моноцитов в ДК. Комплексная оценка жизнеспособности и апоптоза клеток методом проточной цитофлуориметрии с использованием 7-AAD и аннексина-V показала, что в культурах ДК содержится не более 10 % мертвых клеток и клеток в состоянии апоптоза, что удовлетворяет требованиям, предъявляемым к культурам ДК.

Результаты исследований свидетельствуют о наличии выраженного эффекта ДК на пролиферацию аутологичных Т-лимфоцитов. В отсутствие ДК доля пролиферирующих лимфоцитов составила 1,0 (0,4-1,1) %. В присутствии непраймированных ДК лимфоциты образовывали дочерние популяции клеток, доля которых составила 3,2 (1,4-5,8) %. Добавление в культуры лимфоцитов ДК, праймированных лизатом опухоли, привело к достоверному увеличению числа дочерних популяций клеток. Наибольшее количество дочерних клеток было выявлено при культивировании ДК с лимфоцитами в соотношении 1 : 10 (14,3 (9,6-16,6) %), наименьшее — при их соотношении 1 : 40 (5,6 (2,3-6,0) %).

Выводы. Показана возможность получения ДК из моноцитов пациентов, страдающих РПЖ. Полученные ДК характеризовались высокой жизнеспособностью и низкими показателями апоптоза, зрелым иммунофенотипом (CD 1 a+CD 14⁻CD80⁺CD86⁺HLA-DR⁺CD83⁺CD208⁺), типичной морфологией, хорошим ответом на действие индукторов созревания. Установлено, что ДК, праймированные лизатами опухолей поджелудочной железы, способны стимулировать пролиферацию и активацию *in vitro* антигенспецифических Т-клеток, что указывает на потенциальную эффективность их применения для терапии РПЖ.