

УДК 616.31/.32-006.61-036.87-085: 611.018.83

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ДЕНДРИТНЫМИ КЛЕТКАМИ РЕЦИДИВОВ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ПОЛОСТИ РТА И РОТОГЛОТКИ

Тризна Н. М.¹, Дорошенко Т. М.², Северин И. Н.², Боброва Н. М.²

*ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии
и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова»,¹онкологическое
отделение малоинвазивной хирургии дневного пребывания;²онкологическое
отделение клеточных технологий,
г. Минск, Республика Беларусь*

Введение. Перспективным направлением лечения рецидивного рака слизистой оболочки полости рта и ротоглотки является терапия дендритными клетками.

Цель исследования — разработать методику получения дендритных клеток с использованием в качестве праймирующего агента аутологичных опухолевых клеток в состоянии апоптоза для клеточной терапии рецидивов плоскоклеточного рака полости рта и ротоглотки.

Объекты и методы. Для получения первичных клеточных культур плоскоклеточного рака использовали 54 образца опухолей языка и ротоглотки и их метастазов в лимфоузлы. Отличительной особенностью методики стало применение в качестве нагрузочного агента аутологичных опухолевых клеток *ex vivo*, и культур плоскоклеточного рака *in vitro* в состоянии индуцированного апоптоза.

Результаты. Разработана оригинальная методика получения первичных клеточных культур плоскоклеточного рака. В ходе исследования решены проблемы контаминации опухолевых образцов и подавления роста фибробластов в клеточной культуре плоскоклеточного рака. Полученные культуры демонстрировали морфологию клеток плоскоклеточного рака. При иммунофенотипическом анализе активированные дендритные клетки экспрессировали маркеры CD80, CD83, CD86, молекулы хоуминга CD197, антиген-презентирующую молекулу HLA-DR. Отсутствовала экспрессия моноцитарно-макрофагальных маркеров CD14 и CD115.

Заключение. Разработанная методика позволила изготовить индивидуальный биомедицинский клеточный продукт для клеточной терапии рака слизистой оболочки полости рта и ротоглотки.

Ключевые слова: дендритные клетки; рецидивный рак полости рта и ротоглотки; технология.

TECHNOLOGICAL ASPECTS OF CELL THERAPY WITH DENDRITIC CELLS FOR RECURRENT SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE ORAL CAVITY AND OROPHARYNX

Trizna N. M.¹, Doroshenko T. M.², Seviaryn I. N.², Bobrova N. M.²

*Republican Scientific and Practical Center of Oncology
and Medical Radiology named by N. N. Alexandrov,*

¹Oncology Department of minimally invasive day surgery;

*²Oncology Department of Cellular Technologies,
Minsk, Republic of Belarus*

Introduction. A promising area of treatment for recurrent oral and oropharyngeal cancer is dendritic cell therapy.

The purpose of the study is to develop a technology for obtaining dendritic cells using autologous tumor cells in a state of apoptosis as a priming agent for cell therapy of recurrent squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx.

Objects and methods. To obtain primary cell cultures of squamous cell carcinoma, 54 samples of tumors of the tongue and oropharynx and their metastases to the lymph nodes were used. A distinctive feature of the technique was the use of autologous tumor cells *ex vivo* and squamous cell carcinoma cultures *in vitro* in a state of induced apoptosis as a loading agent.

Results. An original method for obtaining primary cell cultures of squamous cell carcinoma has been developed. The study solved the problems of contamination of tumor samples and suppression of fibroblast growth in squamous cell carcinoma cell culture. The resulting cultures demonstrated the morphology of squamous cell carcinoma cells. In immunophenotypic analysis, activated dendritic cells expressed markers CD80, CD83, CD86, homing molecules CD197, and the antigen-presenting molecule HLA-DR. There was no expression of monocyte-macrophage markers CD14 and CD115.

Conclusion. The developed technique made it possible to produce an individual biomedical cell product for cell therapy of cancer of the oral mucosa and oropharynx.

Keywords: dendritic cells; recurrent oral and oropharyngeal cancer; technology.

Введение. Проблемы лечения злокачественных новообразований полости рта и глотки связана с особенностями опухолевого процесса данной локализации (быстрый рост, раннее метастазирование). Особенно актуальной задачей является предупреждения рецидивов за-

болевания. По данным различных авторов, частота рецидивирования опухолей варьирует в пределах 25–50% [1]. Основной метод лечения рецидивов — хирургический, однако, хирургические вмешательства после комбинированного лечения, лучевой и/или химиолучевой терапии являются важной частью мультидисциплинарного подхода в лечении рецидивов рака полости рта и ротоглотки. Отсутствие других, более эффективных методов лечения рецидивных опухолей требует исследования молекулярных механизмов резистентности плоскоклеточного рака головы и шеи и возможностей повышения эффективности противоопухолевой терапии.

Перспективным направлением иммунотерапии является терапия дендритными клетками (ДК) — это метод активной специфической иммунотерапии, в основе которой лежит стимуляция иммунного ответа пациента на свою собственную опухоль. Клеточная терапия может использоваться как после хирургического лечения при отсутствии клинически определяемых отдаленных метастазов, так и при диссеминации опухоли. По данным специальной литературы, клеточная терапия Т-клетками, НК-клетками, а также ДК клетками, может обеспечить выраженные противоопухолевые эффекты. Так, в работе Т. Whiteside на небольшой выборке пациентов показана высокая эффективность метода лечения с применением ДК, активированных аутологичными опухолевыми клетками. Все пациенты с распространенным первичным раком ротоглотки и полости рта, кто получил клеточную терапию в ходе исследования, прожили более 5 лет [2]. Р. J. Shuler et al. (2014) показали эффективность клеточной терапии с использованием в качестве антигена для ДК пептидов белка р53, рестриктированных по молекулам главного комплекса гистосовместимости (МНС). двухлетняя бессобытийная выживаемость составила 88% и трехлетняя — 80% [4]. В другом исследовании с применением в качестве антигена для ДК пептидов WT-1, рестриктированных по локусам МНС I класса, у 6 из 11 провакцинированных пациентов, имел место повторный рецидив после иммунотерапии. Медиана бессобытийной выживаемости составила 6,4 месяца, общей выживаемости — 12,1 месяцев [5].

Цель исследования — разработать методику получения дендритных клеток с использованием в качестве антигена аутологичных опухолевых клеток для клеточной терапии рецидивов плоскоклеточного рака полости рта и ротоглотки.

Объекты и методы. Культуры дендритных клеток получали по стандартной методике [3]. Дифференцировку моноцитов периферической крови пациентов проводили в присутствии факторов ИЛ-4 и ГМ-КСФ. На седьмые сутки в среду добавляли факторы созревания: ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ПГЕ2 и лизат клеток плоскоклеточного рака. На десятые сутки, дифференцированные ДК подсчитывали и анализировали методом проточной цитометрии.

Для получения первичных клеточных культур плоскоклеточного рака в исследовании использовали 54 образца опухолей языка и ротоглотки и метастазов опухолей в лимфоузлы. Образцы опухолей и метастазов переносили в стерильный ламинарный шкаф и далее процессировали с использованием правил асептики. Образцы разрезали на фрагменты размером около 5,0x5,0 мм, подвергали ферментативной обработке (300 ед/мл коллагеназы, 2–2,5 ед/мл диспазы, 50 ед/мл ДНКазы, 0,5 ед/мл гиалуронидазы) на шейкере. Отмытую клеточную взвесь высевали в культуральные флаконы в среде RPMI-1640 с добавлением 0,5% человеческого сывороточного альбумина, 5 нг/мл EGF, 1xITS, 1 мМ пирувата натрия. Клетки культивировали до субконфлюэнтности (80–90%), после чего пересевали во флаконы большего формата.

Исследование морфологов клеточных культур проводили ежедневно на инвертированном микроскопе Zeiss Axio Observer Z.1.

Дифференцированные ДК анализировали на наличие поверхностных маркеров моноцитов и ДК с использованием моноклональных антител CD14, CD83, CD86, CD197, HLA-DR по протоколу производителя антител. Клетки плоскоклеточного рака анализировали на присутствие поверхностной экспрессии эпителиального маркера CD326. После окрашивания клетки загружали на проточном цитометре Beckman Coulter FC500, результаты анализировали с помощью программного обеспечения Flowing Software 2.5.1.

Результаты. Разработанная методика основана на способности ДК поглощать, процессировать и презентировать опухолевые белки Т-лимфоцитам, активировать Т-лимфоциты, вызывать их массовое размножение с формированием опухоль-специфического клона.

Культуры клеток, полученные из операционного материала пациентов, как описано в разделе «Объекты и методы», демонстрировали морфологию клеток плоскоклеточного рака и смешанный иммунотип (рисунок 1). Как видно из данных микроскопии и про-

точной цитометрии, культуры содержали значительную примесь CD326-отрицательных фибробластов.

Для увеличения относительного содержания эпителиальных клеток применяли метод положительной иммуномагнитной селекции по специфическому маркеру CD326, который экспрессируется на поверхности эпителиоцитов, но отсутствует на фибробластах. В дальнейшем для экспериментов по нагрузке ДК использовались культуры плоскоклеточного рака, полученные в оптимизированной бессывороточной ППС и дополнительно очищенные иммуномагнитной сепарацией. Получаемые по методике, описанной в разделе «Объекты и методы», культуры ДК имели характерную морфологию крупных клеток с отростками и иммунофенотип, содержали клетки, положительные по коактивационным маркерам CD80, CD83, CD86, то есть были способны вызывать активацию Т-клеток крови. Также ДК экспрессировали CD197, отвечающую за миграцию ДК из периферических тканей в лимфатические органы, где происходит антиген-презентирование и активация Т-клеток. Клетки экспрессировали молекулу HLA-DR, ответственную непосредственно за презентацию антигенов Т-лимфоцитам. При этом получаемые ДК были отрицательны по экспрессии маркера моноцитов CD14.

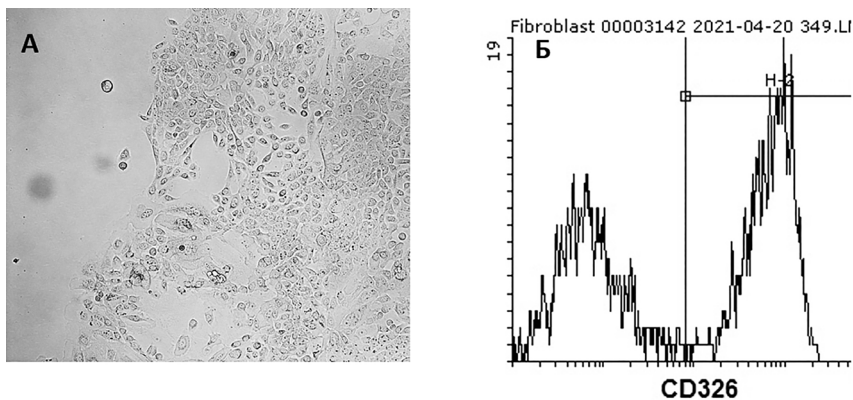


Рисунок 1 — Культура плоскоклеточного рака in vitro:
А — микрофотография культуры плоскоклеточного рака in vitro;
Б — гистограмма распределения культуры по маркеру EpCAM (CD326), маркер H-2 отграничивает CD326-положительные эпителиальные клетки.

Выявленная проблема деконтаминации образцов опухолевой ткани новообразований полости рта и ротоглотки была решена с учетом результатов ранее проведенного мониторингования выделяемой микрофлоры у пациентов онкологического отделения опухолей головы и шеи. Для подавления роста микроорганизмов использовали «Ванкомицин», «Колистин» и «Флуконазол» в концентрациях 10, 20, 40 и 80 мкг/мл каждого препарата.

Заключение. Разработана методика получения дендритных клеток с использованием в качестве нагрузочного агента лизата аутологичных опухолевых клеток, что позволит в перспективе изготовить пригодный к применению биомедицинский клеточный продукт для проведения клеточной терапии при плоскоклеточном раке слизистой оболочки полости рта и ротоглотки.

Литература.

1. Рецидивы рака слизистой оболочки полости рта и ротоглотки: клиника, диагностика, лечение / И. А. Задеренко [и др.] // Клиницист. — 2013. — № 1. — С. 48–54. doi: 10.17650/1818-8338-2013-1-48-54
2. Dendritic cell-based autologous tumor vaccines for head and neck squamous cell carcinoma: promise vs reality / T. L. Whiteside [et al.] // Head Neck. — 2016. — Vol. 38, N 1. — P. e494–e501. doi: 10.1002/hed.24025
3. Naik, S. Dendritic cell protocols / S. Naik. — Amsterdam Netherlands : Springer Protocols. Humana Press, 2010. — P. 43–55.
4. Phase I dendritic cell p53 peptide vaccine for head and neck cancer / P. J. Schuler [et al.] // Clin. Cancer Res. — 2014. — Vol. 20, N 9. — P. 2433–2444. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2617
5. Phase I/II pilot study of Wilms' tumor 1 peptide-pulsed dendritic cell vaccination combined with conventional chemotherapy in patients with head and neck cancer / M. Ogasawara [et al.] // Ther. Apher. Dial. — 2019. — Vol. 23, N 3. — P. 279–288. doi: 10.1111/1744-9987.12831