

На правах рукописи

Хантакова Юлия Николаевна

ВЛИЯНИЕ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК, ТРАНСФИЦИРОВАННЫХ
ПОЛИЭПИТОПНЫМИ ДНК-КОНСТРУКЦИЯМИ, НА ИНДУКЦИЮ
ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ОТВЕТА КУЛЬТУРЫ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК
БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

14.03.09 –Клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск-2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ)

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор

Сенников Сергей Витальевич

Официальные оппоненты: **Миронова Надежда Львовна**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии нуклеиновых кислот, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии наук

Повещенко Ольга Владимировна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией клеточных технологий, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Томский научно-исследовательский институт онкологии"

Защита диссертации состоится «__ _____» 2016 г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 001.001.01 в НИИФКИ по адресу: 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИФКИ и на сайте <http://niikim.ru/ru/диссовет/объявления-диссовета>

Автореферат разослан «__» _____ 201 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук

Белгородцев С.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Успехи в онкоиммунологии, связанные с пониманием причин возникновения опухолевого перерождения и закономерностей патогенетических механизмов развития опухолевого процесса, а также открытие ряда опухолевых антигенов, распознающихся иммунокомпетентными клетками, позволило начать разрабатывать методы воздействия на эффекторные клетки иммунной системы для формирования эффективного противоопухолевого иммунного ответа [Coussens 2002; Anderson, 2009; Mantovani A., 2007]. При онкологических заболеваниях показано ингибирование иммунного ответа, которое может быть связано как с недостаточной иммуногенностью опухолевых клеток, так и со способностью опухоли вызывать местную и системную иммунодепрессию, за счет секреции таких цитокинов, как интерлейкин-10 (ИЛ-10) и трансформирующего фактора роста бета (TGF β), а также ряда медиаторов, таких как простагландин E2 и IDO. [Nagorsen D., 2008]. Секретируемые опухолью факторы приводят к снижению активации и противоопухолевой функции дендритных клеток (ДК) и Т-лимфоцитов [Koski G.K., 2008]. Дендритные клетки являются привлекательным объектом исследований для коррекции нарушений презентации опухоль-ассоциированных антигенов (ОАА) и стимуляции образования антиген-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) благодаря их модулирующей активности в отношении иммунокомпетентных клеток [Шевченко Ю.А., 2009; Сенников С.В., 2009]. В настоящее время в мире активно разрабатываются различные способы доставки опухолевых антигенов в ДК, например с использованием антигенов лизата опухолевых клеток, пептидов, мРНК, ДНК-конструкций, кодирующих эпитопы ОАА [Paluchka A.K., 2011a, Banchereau J., 2005]. Каждая опухоль имеет индивидуальные антигенные особенности, поэтому использование лизата опухолевых клеток позволяет сформировать клеточный иммунный ответ против конкретной опухолевой ткани. Использование в качестве антиген-несущих конструкций мРНК, выделенных из опухолевых клеток, позволяет повысить концентрацию генов ОАА за счет многократного синтеза молекул пептидов после проникновения трансляционно-активной мРНК в дендритные клетки. Известно, что антигенный профиль опухоли может меняться в ходе опухолевого процесса и при проведении химио- и лучевой терапии. Поэтому, выделенные из самой ткани опухоли антигены будут характеризовать антигенный профиль опухолевых клеток на данном этапе развития, и не перекрывать его возможное изменения. В связи с этим, одним из перспективных подходов является использование в качестве источника антигенов ДНК-конструкций, кодирующих генетические последовательности опухолевых антигенов и/или их отдельных иммуногенных эпитопов. Благодаря возможности включения в состав ДНК-конструкций нескольких иммуногенных эпитопов различных ОАА, удастся достичь максимального перекрытия антигенного профиля опухолевых клеток, тем самым способствуя генерации наибольшего количества антиген-специфических клонов ЦТЛ, участвующих в элиминации трансформированных клеток. Используя методы компьютерного моделирования для создания ДНК-конструкций, удастся уменьшить риск развития аутоиммунных или иммуносупрессивных реакций, благодаря отбору только иммуностимулирующих эпитопов ОАА [Palucka K., 2011a]. В ходе разработки конструкций, происходит отбор эпитопов, которые наиболее эффективно могут быть представлены в комплексе с определенным МНС и, соответственно, разработка HLA-специфических генетических конструкций увеличивает шанс развития эффективного специфического CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеточного ответа. Кроме того, ДНК/РНК-конструкции обеспечивают более длительное представление иммуногенных эпитопов для процессинга и презентации зрелыми дендритными клетками. Таким образом, использование ДНК-конструкций, кодирующих различные эпитопы ОАА, в качестве источника целевых иммуногенов для трансфекции дендритных клеток, представляется актуальным и перспективным направлением по исследованию возможности стимуляции противоопухолевого иммунного ответа в культуре

моноклеарных клеток периферической крови больных раком молочной железы [Сенников С.В., 2015].

Целью данной работы является изучение эффективности индукции клеточного цитотоксического иммунного ответа в культуре моноклеарных клеток периферической крови больных раком молочной железы с помощью зрелых дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими иммуногенные эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов.

Задачи:

1. Изучить влияние дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопный иммуноген, содержащий HLA-A*02:01-специфичные антигенные детерминанты белка HER2-neu или кодирующими полноразмерный белок ErbB2, на цитотоксический потенциал (прямую цитотоксическую и перфорин-синтезирующую активность) моноклеарных клеток HLA-A*02 позитивных условно-здоровых доноров против клеточной линии рака молочной железы человека MCF-7.

2. Изучить эффективность индукции цитотоксического иммунного ответа в культуре моноклеарных клеток больных раком молочной железы с помощью дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A*02:01-специфичные антигенные детерминанты нескольких опухоль-ассоциированных антигенов.

3. Оценить эффективность индукции цитотоксического иммунного ответа в культуре моноклеарных клеток HLA-A*02-позитивных и HLA-A*02-негативных больных раком молочной железы с помощью дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A*02:01-специфичные антигенные детерминанты нескольких опухоль-ассоциированных антигенов

4. Сравнить эффективность стимуляции цитотоксического иммунного ответа в культуре моноклеарных клеток больных раком молочной железы дендритными клетками, праймированными антигенами лизата опухолевых клеток или полиэпитопными ДНК-конструкциями.

Научная новизна работы:

Продемонстрировано, что дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкцией, кодирующей поли-ЦТЛ-эпитопный иммуноген, содержащий HLA-A*02:01-специфичные антигенные детерминанты белка HER2-neu, по сравнению с дендритными клетками, трансфицированными ДНК-конструкцией, кодирующей полноразмерный белок ERBB2, более эффективно индуцируют способность моноклеарных клеток здоровых доноров вызывать гибель опухолевых клеток линии MCF-7, связанную с увеличением перфорин-позитивных клеток, как одних из возможных медиаторов цитотоксичности, что свидетельствует об эффективности использования отдельных иммуногенных эпитопов в составе ДНК-конструкции для презентации зрелыми дендритными клетками. Также впервые показано, что зрелые дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A*02:01-специфичные антигенные детерминанты нескольких опухоль-ассоциированных антигенов, индуцируют способность моноклеарных клеток вызывать гибель аутологичных опухолевых клеток при совместном культивировании, о чем свидетельствует повышение цитотоксической активности моноклеарных клеток больных раком молочной железы против аутологичных опухолевых клеток, а также увеличение количества перфорин-позитивных клеток в данных культурах. Установлено, что дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкцией, кодирующей поли-ЦТЛ-эпитопный иммуноген, содержащий HLA-A*02:01-специфичные антигенные детерминанты нескольких опухоль-ассоциированных антигенов индуцируют цитотоксический иммунный ответ в культуре моноклеарных

клеток против аутологичных опухолевых клеток рака молочной железы как при добавлении, так и без ИЛ-12 и ИЛ-18, в отличие от дендритных клеток, праймированных антигенами лизата аутологичных опухолевых клеток, которые индуцируют цитотоксический ответ МНК только при добавлении костимуляторных факторов ИЛ-12 и ИЛ-18.

Теоретическая и практическая значимости работы:

Использование для трансфекции зрелых дендритных клеток ДНК-конструкции, кодирующей поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A*02:01-специфичные антигенные детерминанты белка HER2-neu, является более эффективным способом активации мононуклеарных клеток больных раком молочной железы, чем использование ДНК-конструкций, кодирующих полноразмерный белок ERBB2. Использование дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A*02:01-специфичные антигенные детерминанты нескольких опухоль-ассоциированных антигенов является эффективным способом стимуляции цитотоксического потенциала мононуклеарных клеток больных раком молочной железы. Полученные данные указывают на то, что уровень стимуляции мононуклеарных клеток зрелыми дендритными клетками, трансфицированными ДНК-конструкциями, зависит от HLA-A-гаплотипа больного и от типа используемой ДНК-конструкции. В отсутствие иммунорегуляторных цитокинов ИЛ-12 и ИЛ-18 дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A*02:01-специфичные антигенные детерминанты нескольких опухоль-ассоциированных антигенов, индуцируют формирование эффективного цитотоксического ответа мононуклеарных клеток только при соответствующем гаплотипе HLA-A*02:01 больных раком молочной железы. Дополнительное воздействие иммунорегуляторных цитокинов ИЛ-12 и ИЛ-18 на совместные культуры дендритных клеток, трансфицированных полиэпитопными HLA-A*02:01-специфичными ДНК-конструкциями, и мононуклеарных клеток позволяет формировать клеточно-опосредованный цитотоксический ответ культуры мононуклеарных клеток против аутологичных опухолевых клеток также в группе HLA-A*02-негативных больных раком молочной железы. Полученные данные о цитотоксическом противоопухолевом эффекте дендритных клеток, трансфицированных полиэпитопными ДНК-конструкциями, сокультивированных с мононуклеарными клетками периферической крови, позволяют рассматривать их в качестве перспективного подхода для разработки новых методов клеточной иммунотерапии больных раком молочной железы. На основании проведенного исследования получен патент №2521506 «Способ генерации антиген-специфических цитотоксических клеток с противоопухолевой активностью при раке молочной железы» и подана заявка №201313546 на получение патента.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A*02:01-специфичные антигенные детерминанты нескольких опухоль-ассоциированных антигенов рака молочной железы, способствуют формированию цитотоксического клеточно-опосредованного иммунного ответа *in vitro*.

2. Способность к индукции цитотоксического ответа мононуклеарных клеток зрелыми дендритными клетками, трансфицированными ДНК-конструкциями, зависит от структуры подобранных иммуногенов, входящих в ДНК-конструкции, и от HLA-A-гаплотипа больного.

Апробация материалов диссертации:

Материалы диссертации доложены и обсуждены:

Всероссийской научной конференции «Дендритные клетки в норме и при патологии» в рамках Объединенного иммунологического форума, Нижний Новгород

2013. Региональная конференция молодых ученых-онкологов, посвященная памяти академика РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии», Томск, 2012. SACS Annual Meeting «Diversity and plasticity of dendritic cells», Париж, 2012. 18th NAT Conference «Common perspectives in transplant and tumor immunology», Милан, 2013. 8-й отчетная конференция НИИКИ СО РАМН «Иммунопатогенез и иммунотерапия основных заболеваний человека: от эксперимента к клинике», Новосибирск, 2011. XII Конференции иммунологов Урала, Пермь, 2015г

Публикации:

По теме диссертации опубликовано 16 работ, в том числе 4 статьи в издании, рекомендованном ВАК для опубликования материалов диссертации, 1 патент на изобретение.

Личный вклад автора в проведение исследования.

Результаты, представленные в данной работе, получены лично автором на базе лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ.

Структура и объем диссертации.

Диссертация изложена на 120 страницах машинописного текста, состоит из обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов и приложения. Библиографический указатель включает 194 источника, из них 177 зарубежных. Работа иллюстрирована 15 рисунками и 1 таблицей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

В работе использовалась венозная кровь от 40 пациенток с первично-верифицированным диагнозом «рак молочной железы», IA, IIA и IIB стадий, не проходивших химио- и/или лучевую терапию в неoadьювантном режиме, поступивших на хирургическое лечение в онкологическом отделении №3 ГКБ №1 (МБУЗ ГКБ №1 города Новосибирска). В день операции до оперативного вмешательства у пациенток забирали периферическую венозную кровь в контейнеры «Гемасин» в объеме 100мл. Во время операции забирался фрагмент опухолевого материала, объемом 1-2 см³. Определение уровня экспрессии рецептора Her2/neu на материале опухолевой ткани проводилось методом иммуногистохимического анализа, результаты предоставлены проф., д.м.н., Сидоровым С.В.. В таблице 1 представлена характеристика пациентов, вошедших в данное исследование. В качестве контроля использовалась периферическая венозная кровь 9 HLA-A*02 позитивных условно-здоровых доноров, средний возраст 37,7 года (от 25 до 56 лет). Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИФКИ (№91 от 25.09.2015) и проводилось с добровольного информированного согласия всех больных РМЖ и условно здоровых доноров.

Культивирование клеточной линии MCF-7.

Линия клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 была получена из Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург). Культивирование клеточной линии MCF-7 осуществлялось в полной среде EMEM. Пассажи проводились один раз в 3-4 дня, при достижении монослоя в культуральном флаконе, снятие клеток осуществлялось ферментативным способом с помощью раствора Версена и трипсина на льду. Жизнеспособность клеточной линии на момент использования в опыте составляла не менее 92%.

Выделение мононуклеарных клеток периферической крови

Мононуклеарные клетки (МНК) периферической крови выделяли в стерильных условиях стандартным методом в градиенте фиккола-урографина ($\rho=1,077$ г/л) [Boyum A., 1968]. Выделение моноцитов ПК проводилось методом адгезии на пластике [Wahl, 1995].

Таблица 1. Характеристика группы пациентов

Пол	Женский – 100% (40/40)
Средний возраст	58,6 лет (35-77)
Наличие HLA-A02 генотипа	HLA-A*02 – позитивные – 50% (20/40), HLA-A*02 – негативные – 50% (20/40).
Экспрессия рецептора ErbB2/Her2-neu на поверхности опухолевых клеток	Экспрессирующие рецептор Her2/neu – 65% (26/40), из них высокоэкспрессирующих (2+, 3+) - 46% (12/26). Неэкспрессирующие рецептор Her2/neu – 35% (14/40)
TNM	T1N0M0 – 32,5% (13/40), T1N1M0 – 10% (4/40), T2N0M0 – 30% (12/40), T2N1M0 – 27,5% (11/40)
Гистологический диагноз	Инфильтративно-протоковый рак – 95 % (38/40), аденокарцинома – 2,5% (1/40), папиллярный рак – 2,5% (1/40)

Получение лизата опухолевых клеток

Опухолевые клетки получали путем механической и ферментативной дезагрегации опухоли. Жизнеспособность полученных опухолевых клеток оценивали по окрашиванию эритрозинном, она составляла не менее 50%. Полученные клетки делили на две части. Первая часть клеток замораживалась для хранения и дальнейшего проведения цитотоксического теста. Из второй части клеток получали лизат опухолевых клеток с помощью 3 циклов замораживания-оттаивания. Общая концентрация белка в лизате определялась на приборе «NanoDrop» (Thermo Scientific, США) по соотношению оптической плотности на длине волны 260/280 нм.

ДНК-конструкции

Плазмидные вектора, используемые для трансфекции дендритных клеток, были разработаны и любезно предоставлены к.б.н. Максютковым А.З. (ООО «АваксисБиотерапевтикс»): *Плаزمида E* – плазмидная ДНК-конструкция **pDNA5-BC-E**, кодирующая полный ген ErbB2; *Плазмида A_{HER}* – плазмидная ДНК-конструкция **pDNA5-BC-A1**, кодирующая поли-ЦТЛ-эпитопный иммуноген, содержащий HLA-A*02:01-специфические антигенные детерминанты белка ErbB2/HER2-neu; *Плазмида A* – эквимоллярная смесь трех плазмидных ДНК-конструкций, **pDNA5-BC-A1**, **pDNA5-BC-A2** и **pDNA5-BC-A3**. Плазмидная ДНК-конструкция **pDNA5-BC-A2** кодирует поли-ЦТЛ-эпитопный иммуноген, содержащий 73 HLA-A*02:01-специфические антигенные детерминанты ОАА: HER2, mammaglobin, NY-BR-1, и hMena. Плазмидная ДНК-конструкция **pDNA5-BC-A3** кодирует поли-ЦТЛ-эпитопный иммуноген, содержащий 74 HLA-A*02:01-специфические антигенные детерминанты ОАА: WT1, hTERT, survivin, p53 и Muc1; *Плазмида p5* – контрольная плазмидная ДНК-конструкция **pDNA5-BC-C**, кодирующая белок Ag51, не являющийся опухолевым антигеном.

Получение популяции антиген-активированных дендритных клеток

Прилипшую фракцию МНК культивировали в полной среде RPMI-1640 в присутствии ростовых факторов: рчГМ-КСФ и рчИЛ-4 в течение 96 часов для получения популяции незрелых дендритных клеток. В часть лунок с популяцией незрелых ДК спустя 48 часов от начала культивирования добавлялся лизат аутологичных опухолевых клеток для получения популяции лизат-активированных ДК (ДК-Лизат). Для получения популяции зрелых ДК, во все лунки спустя 96 часов от начала культивирования, независимо от проведенной антигенной стимуляции, добавлялся рчФНО- α (25 нг/мл) [Obermaier В., 2003]. Для нагрузки оставшихся ДК опухолевыми антигенами через 24 часа

после добавления рчФНО- α проводили трансфекцию клеток ДНК конструкциями. В качестве контроля использовали популяцию ДК, созревание которых происходило без добавления лизата опухолевых антигенов и ДК, трансфицированных плазмидой, не кодирующей опухолевые антигены.

Трансфекция и оценка эффективности трансфекции ДК

Процедура магнитной трансфекции осуществлялась с помощью реактивов фирмы Promokine согласно протоколу производителя. Оценка эффективности трансфекции проводилась с помощью набора для ник-трансляции Promo-Fluor-500 Nick Translation Labeling Kit («Promokine»), с дальнейшим анализом на проточном цитофлуориметре с использованием метода Flow-Fish [Rufer N., 1999].

Определение фенотипических и функциональных показателей дендритных клеток.

Оценку фенотипа клеток, количества перфорин-позитивных клеток проводили методом проточной цитофлуориметрии на приборе BD FACS Aria (Becton Dickinson США), предварительно проведя мечение соответствующими моноклональными антителами CD3-Fitc/CD14-PE, HLA-DR-Fitc/ CD11c-PE, CD86-Fitc/CD83-PE, perforin-FITC. Способность полученных ДК к рецептор-опосредованному эндоцитозу оценивалась по захвату клетками FITC-меченого декстрана в зависимости от температуры культивирования [Sallusto F., 1995].

Совместное культивирование различных популяций ДК и МНК

Совместное культивирование исследуемых популяций дендритных клеток (ДК-А или ДК-А_{Her}, ДК-Л, ДК-Е) и неприлипшей фракции моноклеарных клеток (нфМНК) проводилось в течение 96 часов, в соотношении МНК к ДК как 10:1 в присутствии или отсутствии рчИЛ-12 и рчИЛ-18. В качестве контрольных популяций использовали неприлипшую фракцию МНК, а также совместные культуры неприлипшей фракции МНК с дендритными клетками, созревание которых происходило в отсутствие опухолевых антигенов (ДК(0)) или с дендритными клетками, трансфицированными контрольной плазмидой, не кодирующей опухолевые антигены (ДК(p5)).

Таким образом, в работе использовали следующие группы клеток:

- нфМНК и нфМНК + рчИЛ-12+рчИЛ-18;
- нфМНК + ДК(0) и нфМНК + ДК(0) + рчИЛ-12+рчИЛ-18;
- нфМНК + ДК(p5) и нфМНК + ДК(p5) + рчИЛ-12+рчИЛ-18.
- нфМНК + ДК(А_{Her}) и нфМНК + ДК(А_{Her}) + рчИЛ-12+рчИЛ-18;
- нфМНК + ДК(А) и нфМНК + ДК(А) + рчИЛ-12+рчИЛ-18;
- нфМНК + ДК(Е) и нфМНК + ДК-Е + рчИЛ-12+рчИЛ-18;
- нфМНК + ДК(Лизат) и нфМНК + ДК(Лизат) + рчИЛ-12+рчИЛ-18.

Определение цитотоксического эффекта на опухолевые клетки и клеточную линию MCF-7.

Для оценки цитолитической активности совместной культуры нфМНК и ДК использовали нерадиоактивный цитотоксический тест CytoTox96 (Promega, США), основанный на количественном определении содержания внутриклеточного фермента – лактатдегидрогеназы (ЛДГ), которое увеличивается пропорционально гибели опухолевых клеток. Процедуру осуществляли согласно протоколу фирмы-производителя. Уровень цитотоксичности оценивали как отношение оптической плотности в образце со смесью эффекторов и мишеней к оптической плотности в образце с полностью лизированными мишенями, выраженное в процентах. Учитывали поправки на присутствие ЛДГ в среде и спонтанный выход ЛДГ из эффекторов и клеток-мишеней (опухолевые клетки).

Генотипирование для выявления аллеля HLA-A*02.

Для генотипирования использовали оставшиеся клетки от неприлипшей фракции моноклеарных клеток. Выделение ДНК осуществлялось фенол-хлороформным способом с последующим типированием на наличие аллеля HLA-A*02 с использованием коммерческого набора ALLSET™ GOLD HLA A LOW RES SSP («Invitrogen», США)

согласно инструкции производителя. В ходе проведения работы набрана группа условно-здоровых доноров (27 человек), среди которых было выявлено 18 человек носителей аллеля HLA-A02, из них 3 имели гомозиготный набор. Все пациентки (n=40), входившие в исследование, были генотипированы на наличие аллеля HLA-A*02 (см.табл.1). Также было выявлено наличие аллеля HLA-A*02 у клеточной линия аденокарциномы молочной железы человека MCF-7.

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка результатов производилась при помощи программы «Statistica 6.0». Для статистической проверки значимости результатов использовались критерии ANOVA для повторных измерений, Уилкоксона и Манна-Уитни. Различия сравниваемых параметров считали статистически значимыми, если вероятность ошибки p была меньше 0,05. Все данные представлены в виде медианы и квартильного размаха для непараметрического распределения. Стрелками обозначены статистически значимые различия ($p < 0,05$). Для построения графиков использовалось программное обеспечение GraphPadPrism 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На сегодняшний день трансфекция ДНК-конструкциями рассматривается как эффективный способ доставки опухолевых антигенов дендритным клеткам для представления последних в комплексе с молекулами МНС и является современным вариантом получения иммунотерапевтических вакцин для лечения онкологических заболеваний [Palucka K., 2011a]. Создание полиэпитопных конструкций, содержащих не весь антиген, а только эпитопы, стимулирующие Th1 и цитотоксические клетки представляется наиболее перспективным подходом для стимуляции клеточного иммунного ответа в связи с отсутствием иммуносупрессивных эпитопов, которые содержатся в полноразмерных конструкциях. Полиэпитопные конструкции могут содержать эпитопы из различных белковых антигенов, и в тоже время покрывать заданное разнообразие аллельных вариантов молекул МНС. Для увеличения иммуногенности и для оптимизации МНС I- или МНС II-зависимой презентации эпитопов в состав полиэпитопных конструкций могут быть включены различные сигнальные последовательности. Известно, что в ходе онкогенеза опухолевые клетки способны изменять свой антигенный профиль, как под влиянием иммунных реакций организма, так и в ходе своего метастазирования и проводимой химио- и/или лучевой терапии. Благодаря включению в ДНК-конструкции иммуногенных эпитопов нескольких ОАА возможно максимально охватить антигенный репертуар опухолевых клеток и развить поликлональный Т-клеточный иммунный ответ.

Влияние дендритных клеток, трансфицированных ДНК конструкциями, на цитотоксический потенциал культуры мононуклеарных клеток условно-здоровых доноров

Оценка протокола получения зрелых ДК из прилипшей фракции МНК показала, что полученные ДК обладают фенотипом, относящимся к зрелым ДК (снижение CD14, увеличение CD83), и имеют соответствующую своей степени зрелости эндоцитозную способность. Полученные данные свидетельствуют о дифференцировке МНК в зрелые дендритные клетки при применении данного клеточного протокола в группе HLA-A*02-позитивных условно-здоровых доноров.

Известно, что природа и эпитопный состав АГ оказывает влияние на уровень и тип эффекторных реакций. В связи с чем, на первом этапе оценивалось влияние ДК, трансфицированных различными вариантами ДНК-конструкций (HLA-A*02:01-специфичной для белка HER2/neu, т.н.плазида A_{HER}, и кодирующей полноразмерный белок ERBB2, т.н.плазида E), на формирование цитотоксического иммунного ответа МНК против клеточной линии рака молочной железы человека MCF-7, экспрессирующей на своей поверхности целевые антигены ErbB2/HER2-neu в двух направлениях: цитотоксическую активность в отношении клеточной линии аденокарциномы молочной

железы человека MCF-7, а также стимуляцию культуры МНК по накоплению перфорин-позитивных клеток. Клеточная линия MCF-7 была выбрана в связи с показанной экспрессией опухолевого антигена ErbB2/HER2-neu и молекулы HLA-A*02:01 [Subik K., 2010].

Для оценки цитотоксичности МНК использовался тест, в котором определялось количество высвобожденного фермента ЛДГ при совместном культивировании клеток с клеточной линии аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 (рис 1А).

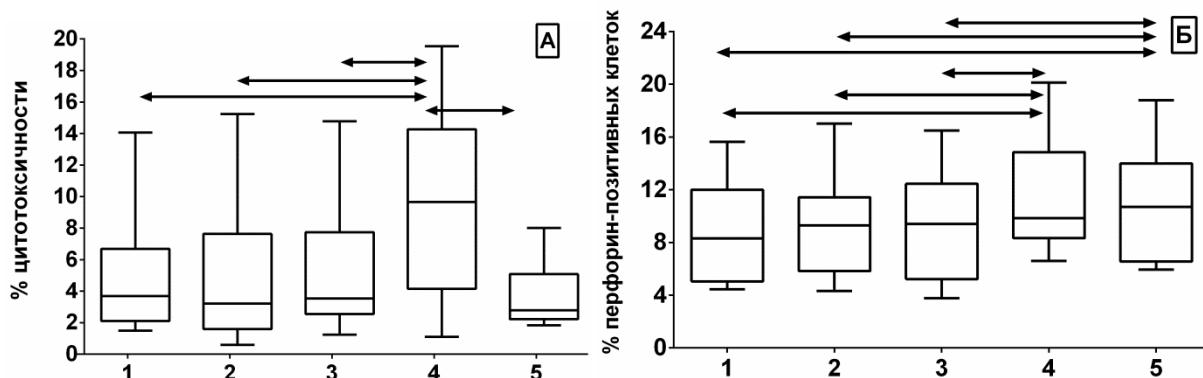


Рисунок 1 Цитотоксический эффект мононуклеарных клеток HLA-A*02 позитивных условно-здоровых доноров и аутологичных трансфицированных ДК: А) Цитотоксический тест против клеточной линии MCF-7 (N=8) Б) Количество перфорин-позитивных клеток (N=10)

*Примечание: 1. МНК – контрольная культура МНК; 2. МНК+ДК(0) –совместная культура МНК и ДК без трансфекции; 3. МНК+ДК(p5) – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных контрольной плазмидой pDNA5-BC-C; 4. МНК+ДК(A-Her) – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных ДНК-конструкцией, кодирующей поли-ЦТЛ-эпитопный иммуноген, содержащий HLA-A*02:01-специфичные антигенные детерминанты белка HER2-neu; 5. МНК+ДК (E) – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных ДНК-конструкцией, кодирующей полный белок ERBB2.*

В результате проведенного эксперимента нами установлено, что трансфекция зрелых ДК плазмидой A_{HER}, приводит к достоверному увеличению цитотоксического ответа культуры МНК по сравнению со всеми контрольными группами (нативной культурой МНК, совместной культурой МНК с ДК без трансфекции, совместной культурой МНК с ДК, трансфицированными контрольной плазмидой), а также с ДК, трансфицированными плазмидой E (рис. 1А). Однако, как следует из рисунка 1Б, трансфекция ДК обеими исследуемыми плазмидами (плазмидой A_{HER} и плазмидой E) достоверно увеличивают цитотоксический потенциал культуры МНК через стимуляцию префорин-позитивных клеток. Несмотря на низкие значения количества перфорин-позитивных клеток, развитие эффективного цитотоксического ответа позволяет предполагать, что данного количества клеток, несущих гранулы перфорина, достаточно для проникновения основных эффекторных гранул (гранзима В) для запуска грануло-опосредованного механизма апоптоза. Кроме того, не исключено, что данные клетки также принимают участие в рецептор-опосредованных механизмах элиминации опухолевых клеток.

Таким образом, в группе условно-здоровых доноров использование дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкцией, кодирующей поли-ЦТЛ-эпитопный иммуноген, содержащий HLA-A*02:01-специфичные антигенные детерминанты белка HER2/neu приводит к формированию эффективного клеточного цитотоксического ответа МНК против опухолевых клеток линии MCF-7. В работе МНК приобретают повышенный цитотоксический потенциал за счет накопления клеток, содержащих гранулы перфорина, и непосредственно оказывают специфический цитотоксический эффект на клеточную линию, экспрессирующую на своей поверхности молекулы-мишени (ErbB2/HER2-neu). Использование трансфекции ДК ДНК-конструкцией, кодирующей цельный белок ErbB2, является менее эффективным способом доставки целевого антигена, поскольку в эксперименте с клеточной линией MCF-7 не показано значимой стимуляции

цитотоксического потенциала МНК, несмотря на достоверное увеличение процента перфорин-позитивных клеток. Это может быть объяснено рядом причин. Во-первых, в состав полноразмерной конструкции входят как иммуногенные эпитопы, так и латентные и иммуносупрессивные эпитопы, которые способны подавлять развитие иммунного ответа. Во-вторых, при построении полиэпитопных ДНК-конструкций соединение эпитопов происходит через спейсеры, чувствительные к эндо- или протеасомным ферментам, которые обеспечивают оптимальный процессинг и презентацию иммуногенных эпитопов, тем самым мы можем предугадать размер и последовательность презентуемого эпитопа. Также, в конструкцию включают таргетные сигналы, которые непосредственно оказывают влияние на внутриклеточный транспорт белковой конструкции в специфические компартменты (протеасомы или эндоплазматический ретикулум), где происходит взаимодействие иммуногенного эпитопа с молекулами МНС. При использовании ДНК-конструкции, кодирующей весь белок ErbB2/HER2-neu, не происходит «отбора» только оптимальных иммуногенных эпитопов, необходимых для эффективной активации Т-клеток. В связи с чем, ДК осуществляют презентацию эпитопов АГ наивным Т-клеткам с дифференцировкой последних в ЦТЛ, что подтверждается увеличением количества перфорин-позитивных клеток в совместных культурах МНК и ДНК, трансфицированных полноразмерной ДНК конструкцией. Однако данная активация осуществляется, в том числе, и на не значимые эпитопы, поэтому не происходит увеличения цитотоксической активности культуры МНК. В-третьих, возможно недостаточное образование таких гуморальных факторов, как ИЛ-12, ИЛ-2 и ИФН- γ , которые необходимы для пролиферации и эффекторной функции CD8⁺-Т-лимфоцитов. При недостатке цитокинов происходит недостаточная экспрессия необходимых костимуляторных молекул, как на ДК, так и на Т-лимфоцитах, в связи с чем не формируется адекватный активационный сигнал для формирования эффекторной функции Т-лимфоцитов.

Таким образом, полученные данные подкрепляют утверждение, что использование ДНК конструкций позволяет прицельно стимулировать цитотоксический ответ против опухолевых клеток благодаря включению наиболее иммуногенных эпитопов опухолевых антигенов, специфичных к HLA-A*02:01-аллелю.

В дальнейшем, в связи с показанной неэффективностью применения плазмиды, кодирующей полноразмерный ген ErbB2/HER2-neu, было решено продолжить работу с использованием материала больных РМЖ под воздействием только HLA-A*02:01-специфичной конструкцией. В связи с гетерогенностью антигенного профиля аутологичных опухолевых клеток, в целях формирования эффективного иммунного ответа, было решено использовать трансфекцию ДК эквимольной смесью 3 HLA-A*02:01 ДНК-конструкций, кодирующих поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A*02:01-специфические антигенные детерминанты различных ОАА. Использование эквимольной смеси 3 ДНК-конструкций, позволяет уменьшить размер конструкции, что облегчает процесс трансфекции и последующие процессинг и презентацию антигенов дендритными клетками.

Влияние дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A*02:01-специфичные антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов, на цитотоксический потенциал мононуклеарных клеток больных раком молочной железы

Для проведения дальнейшей работы нами проводилась оценка эффективности протокола получения культуры зрелых дендритных клеток из прилипшей фракции мононуклеарных клеток периферической крови у больных РМЖ. Под действием соответствующих цитокинов МНК больных РМЖ дифференцируются в зрелые ДК и имеют фенотип, соответствующий характеристикам зрелых ДК (снижение CD14, увеличение CD83, CD86, HLA-DR, сниженная способность к эндцитозу). Использование

данного протокола получения культуры ДК позволяет получать функционально-зрелые дендритные клетки из мононуклеарных клеток периферической крови, что позволяет использовать их в дальнейшем исследовании возможности формирования противоопухолевого иммунного ответа в группе больных РМЖ.

На следующем этапе работы по исследованию возможности модуляции цитотоксического ответа культуры мононуклеарных клеток больных РМЖ с помощью трансфицированных ДК, оценивались: 1. цитотоксическая активность клеток против аутологичных опухолевых клеток, полученных из опухолевого материала; 2. потенциальная цитотоксичность по накоплению количества клеток, содержащих гранулы перфорина. Для усиления Th1-клеточных реакций использовались рекомбинантные цитокины ИЛ-12 и ИЛ-18, которые поляризуют наивных Т-лимфоцитов в сторону Т-хелперов 1-го типа [Якушенко Е.В., 2005]. Синергическое действие ИЛ-18 и ИЛ-12 усиливает пролиферацию Т-клеток и продукцию ИФН- γ , оказывает влияние на активацию, дифференцировку и выживаемость ЦТЛ *in vivo*, в его присутствии значительно возрастает эффекторная функция CD8⁺ клеток [Schmidt CS, 2002; Obleuhova I.A., 2013].

При анализе общей выборки пациентов было показано усиление цитотоксического эффекта при применении ДК, трансфицированных плазмидой А, по сравнению со всеми контрольными группами. При дополнительной стимуляции ИЛ-12 и ИЛ-18 было показано однонаправленное усиление цитотоксической активности в группе МНК с ДК, трансфицированными аллель-специфичными ДНК-конструкциями, по сравнению с клетками всех контрольных групп. Кроме того, отмечено достоверное влияние ИЛ-12 и ИЛ-18 на цитотоксическую активность данной культуры по сравнению с аналогичной культурой клеток без дополнительных стимуляторов (Рис. 2А) Данные результаты указывают на наличие у больных сенсibilизации МНК к иммуногенам собственных опухолевых клеток, которые в результате воздействия трансфицированных ДК перестают быть функционально инертными и становятся способны проявлять противоопухолевую активность.

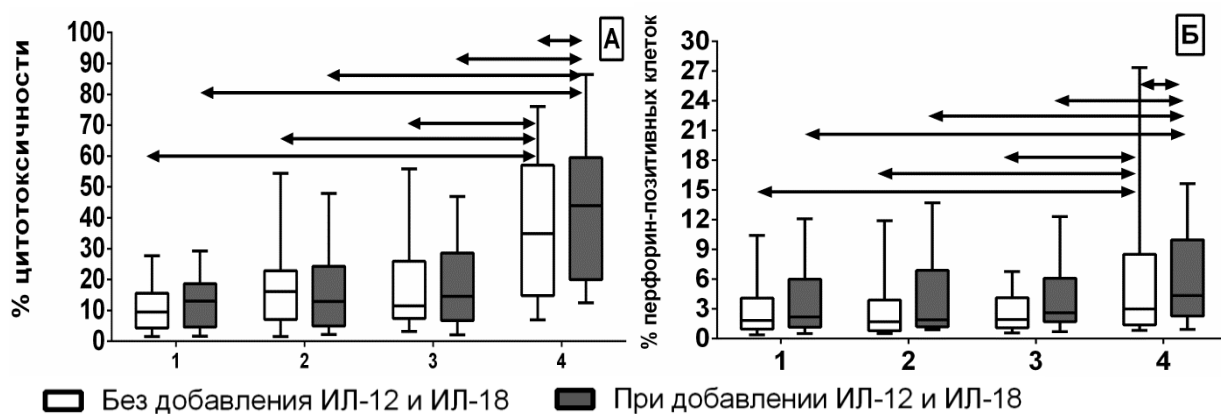


Рисунок 2 Цитотоксический эффект мононуклеарных клеток больных раком молочной железы, сокультивированных с трансфицированными дендритными клетками, против аутологичных опухолевых клеток: А) Цитотоксический тест против аутологичных опухолевых клеток (N=38) Б) Количество перфорин-позитивных клеток (N=40)

*Примечание: 1. МНК – контрольная культура МНК; 2. МНК+ДК(0) –совместная культура МНК и ДК без трансфекции; 3. МНК+ДК (p5) – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных контрольной плазмидой pDNA5-BC-C;; 4. МНК+ДК (А) – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных смеси ДНК-конструкций, кодирующих поли-ЦТЛ-эпитопный иммуногены, содержащие HLA-A*02:01-специфичные антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов.*

При исследовании одного из возможных механизмов цитотоксической активности в культуре МНК нами отмечено достоверное увеличение перфорин-позитивных клеток в ответ на сокультивирование МНК и дендритными клетками, трансфицированными плазмидой А вне зависимости от добавления цитокинов по сравнению со всеми контрольными группами (МНК, МНК+ДК(0), МНК+ДК(p5)) (Рис. 2Б). Добавление ИЛ-12 и ИЛ-18 оказывает значимое влияние на количество перфорин-содержащих клеток. Полученное нами влияние иммунорегуляторных цитокинов ИЛ-12 и ИЛ-18 на развитие клеточно-опосредованных механизмов цитотоксичности согласуется с данными литературы о роли цитокинов в развитии ЦТЛ *in vivo* [Schmidt CS, 2002]. Низкое значение количества перфорин-позитивных клеток, помимо озвученных ранее, может быть связано с ранее происходящими цитотоксическими процессами в организме больного и соответствующей дергануляцией клеток. Кроме того, активная наработка внутриклеточных гранул перфорина происходит при непосредственном клеточном контакте клеток-эффекторов и клеток-мишеней, а в ходе нашего протокола оценка количества перфорин-позитивных клеток происходит вне такого контакта.

Таким образом, совместное культивирование зрелых дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A*02:01-специфичные антигенные детерминанты ОАА и неприлипающей фракции моноклеарных клеток приводит к достоверному повышению содержания перфориновых гранул с потенциальной цитотоксической активностью. Добавление иммунорегуляторных цитокинов, ИЛ-12 и ИЛ-18 оказывает достоверное влияние на уровень цитотоксической активности МНК.

Влияние дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A*02:01-специфичные антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов, на цитотоксический потенциал моноклеарных клеток больных раком молочной железы в зависимости от наличия генотипа HLA-A*02

Известно, что для реализации своей функции цитотоксическим CD8⁺ лимфоцитам необходима презентация антигена в комплексе с HLA молекулами I класса. Группа больных РМЖ делилась в зависимости от наличия HLA-A*02 гаплотипа. В каждой отдельной выборке пациентов оценивался цитотоксический потенциал МНК, праймированных дендритными клетками, которые были трансфицированы ДНК-конструкциями, кодирующими HLA-A*02:01-специфичные эпитопы ОАА. Был проведен анализ возможности модуляции цитотоксического иммунного ответа при сокультивировании МНК больных РМЖ и трансфицированных ДК в зависимости от гаплотипа больного.

В группе HLA-A*02 позитивных больных (Рис.3А), дендритные клетки, трансфицированные плазмидой А, достоверно стимулируют цитотоксический ответ МНК при добавлении и без ИЛ-12 и ИЛ-18 по сравнению со всеми группами контроля (МНК, МНК+ДК(0) и МНК+ДК(p5)) против аутологичных опухолевых клеток.

В группе HLA-A*02 позитивных больных, достоверная стимуляция перфорин – продуцирующей функции МНК в сравнении со всеми группами контроля (МНК, МНК+ДК(0), МНК+ДК (p5)) получена при совместном культивировании с ДК, трансфицированными аллель-специфичными ДНК-конструкциями в культурах клеток при добавлении и без ИЛ-12 и ИЛ-18 (Рис.3Б). При использовании цитокинов, наблюдается достоверное увеличение образования клеток, несущих гранулы перфорина при сокультивировании МНК с трансфицированными аллель-специфичными ДНК-конструкциями ДК по сравнению с аналогичной культурой клеток без добавления цитокинов.

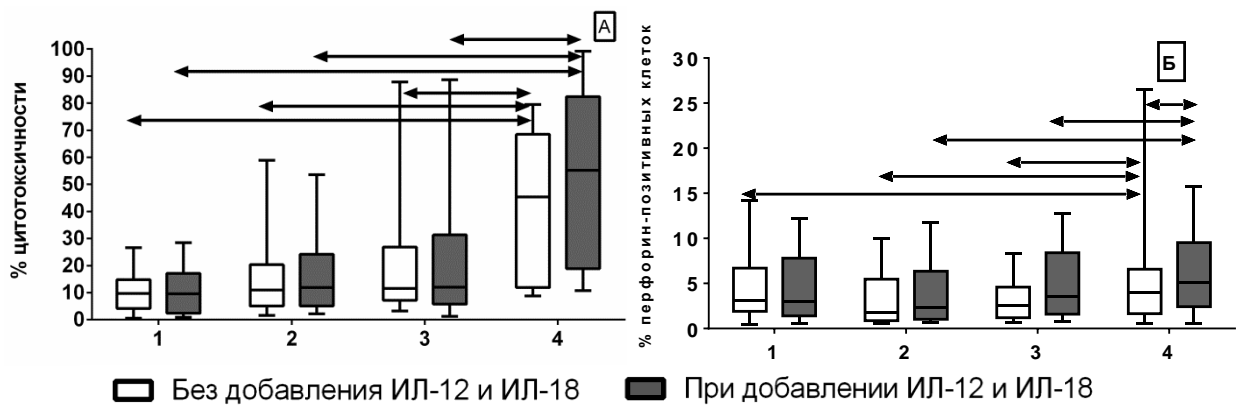


Рисунок 3. Цитотоксический эффект совместной культуры мононуклеарных клеток HLA-A*02-положительных больных раком молочной железы и трансфицированных дендритных клеток. А) Цитотоксический тест (N=19) Б) Процент перфорин-положительных клеток (N=20).

*Примечание: 1. МНК – контрольная культура МНК; 2. МНК+ДК(0) – совместная культура МНК и ДК без трансфекции; 3. МНК+ДК (p5) – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных контрольной плазмидой pDNA5-BC-C;; 4. МНК+ДК (A) – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных смесью ДНК-конструкций, кодирующих поли-ЦТЛ-эпитопный иммуногены, содержащие HLA-A*02:01-специфичные антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов.*

В группе HLA-A*02 негативных больных РМЖ (Рис. 4А), культивирование МНК и трансфицированных ДК без добавления ИЛ-12 и ИЛ-18 выявило различия только с нативной популяцией МНК. Однако при добавлении ИЛ-12 и ИЛ-18 достигается достоверное увеличение цитотоксического потенциала совместной культуры МНК и ДК, трансфицированных аллель-специфичными ДНК-конструкциями при сравнении со всеми группами контроля. В данной группе показано достоверное влияние сокультивирования МНК с ДК, трансфицированными HLA-A*02:01-специфичными плазмидами на количество перфорин-положительных клеток при добавлении и без ИЛ-12 и ИЛ-18. Стоит отметить, что цитокины оказывают достоверное стимулирующее влияние на накопление перфориновых гранул (Рис.4Б).

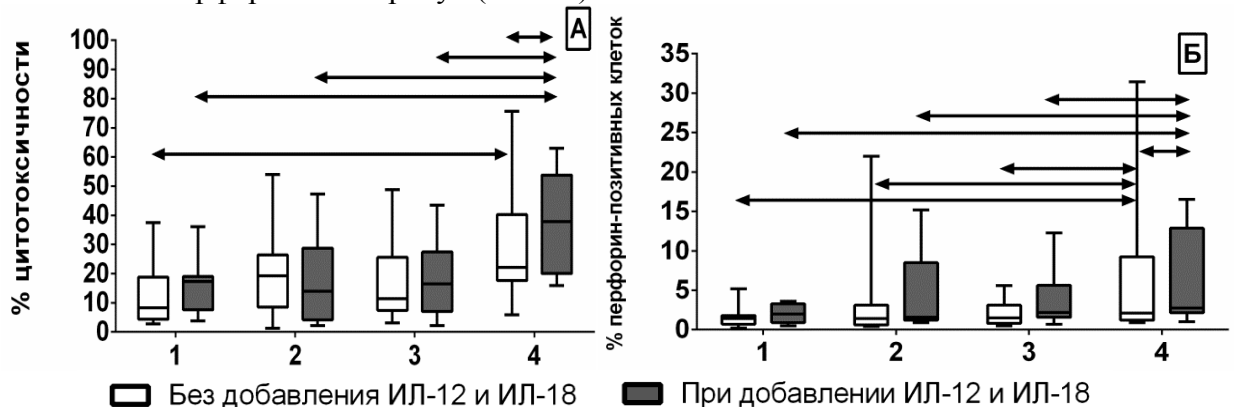


Рисунок 4. Цитотоксический эффект совместной культуры мононуклеарных клеток HLA-A*02-негативных больных раком молочной железы и трансфицированных дендритных клеток. А) Цитотоксический тест (N=19). Б) Процент перфорин-положительных клеток (N=20).

*Примечание: 1. МНК – контрольная культура МНК; 2. МНК+ДК(0) – совместная культура МНК и ДК без трансфекции; 3. МНК+ДК (p5) – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных контрольной плазмидой pDNA5-BC-C;; 4. МНК+ДК (A) – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных смесью ДНК-конструкций, кодирующих поли-ЦТЛ-эпитопный иммуногены, содержащие HLA-A*02:01-специфичные антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов.*

Анализ полученных результатов показал, что независимо от наличия гаплотипа HLA-A*02 у больных РМЖ, дендритные клетки, трансфицированные ДНК-

конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A*02:01-специфические антигенные детерминанты ОАА, в присутствии ИЛ-12 и ИЛ-18 оказывает значимое влияние на цитотоксический потенциал культуры МНК. Это подтверждается увеличением цитотоксического ответа культуры МНК против аутологичных опухолевых клеток за счет увеличения количества перфорин-позитивных клеток. Если полученный эффект аллель-специфичных ДНК-конструкций в группе HLA-A*02:01-позитивных больных РМЖ был ожидаемым результатом, то полученный эффект в группе HLA-A*02-негативных больных может быть объяснен рядом причин. Во-первых, существует так называемое перекрестное сродство аллель-специфичных иммуногенных эпитопов к другим вариантам гаплотипа HLA-A. Во-вторых, при использовании разработанной смеси ДНК-конструкций, за счет большого числа презентируемых иммуногенных эпитопов, происходит презентация дендритными клетками такого количества антигенных эпитопов мононуклеарным клеткам, что суммарное количество развивающихся антиген-специфических клонов способствуют развитию эффективного цитотоксического иммунного ответа даже в отсутствие HLA-A*02 гаплотипа. В-третьих, без использования ИЛ-12 и ИЛ-18 только в группе HLA-A*02-позитивных больных ДК, трансфицированные полиэпитопными аллель-специфичными ДНК-конструкциями, оказывает стимулирующее влияние на цитотоксический потенциал культуры МНК, что согласуется с представлениями об аффинности выбранных иммуногенных эпитопов, входящих в ДНК-конструкции. Таким образом, полученный эффект в группе HLA-A*02-негативных больных РМЖ связан с дополнительным стимулирующим влиянием ИЛ-12 и ИЛ-18, который они оказывают на эффекторные функции иммунокомпетентных клеток. Несмотря на показанный эффект в группе HLA-A*02-негативных больных РМЖ при добавлении ИЛ-12 и ИЛ-18, обращает на себя внимание присутствие выраженной тенденции к формированию более эффективного противоопухолевого иммунного ответа МНК при сокультивировании с дендритными клетками, трансфицированными плазмидой А, в группе HLA-A*02-позитивных больных РМЖ, вне зависимости от добавления ИЛ-12 и ИЛ-18 (Рис.3А и 4А), что дополнительно подтверждает аффинность выбранных иммуногенных эпитопов. Исходя из этого, можно предположить, что использование в качестве источника антигенов ДНК-конструкций, кодирующих большое число иммуногенных эпитопов различных ОАА совместно с цитокинами ИЛ-12 и ИЛ-18, позволяет преодолевать HLA-специфичную стимуляцию цитотоксических Т-лимфоцитов за счет генерации большого числа эффекторных клонов, но, несмотря на это, более выраженный уровень клеточно-опосредованного цитолиза МНК развивается только при совпадении HLA гаплотипа больного и HLA-специфичности иммуногенных эпитопов, входящих в ДНК-конструкцию.

Таким образом, нами показана эффективная стимуляция цитотоксического потенциала культуры мононуклеарных клеток при использовании дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A*02:01-специфические антигенные детерминанты ОАА как у HLA-A*02-позитивных, так и у HLA-A*02-негативных больных РМЖ при добавлении иммунорегуляторных цитокинов ИЛ-12 и ИЛ-18. При исследовании одного из возможных механизмов развития цитотоксического эффекта МНК, нами показано увеличение количества перфорин-позитивных клеток в совместных культурах МНК с трансфицированными полиэпитопными ДНК-конструкциями дендритными клетками и ИЛ-12 и ИЛ-18.

Влияние лизат-активированных дендритных клеток на цитотоксический потенциал мононуклеарными клетками больных раком молочной железы

В качестве дополнительного контроля эффективности формирования поликлонального цитотоксического ответа при сокультивировании МНК с трансфицированными ДК, было исследовано влияние ДК, нагруженных антигенами лизата аутологичных опухолевых клеток, на культуру МНК больных РМЖ. Лизат

опухолевых клеток представляет более широкий и индивидуальный набор опухолевых антигенов, который способствует развитию наибольшего числа Т-клеточных клонов, имеющих специфичность к разным иммуногенным эпитопам ОАА, характерных для данной опухоли. Однако существенным минусом является иммуносупрессивная и аутоиммунная активность лизата, в связи с гетерогенностью клеточного состава опухолевого материала. Также, иммуногенность антигенов лизата опухолевых клеток позволяет сформировать иммунный ответ против определенной ткани опухоли, и не перекрывает возможную изменчивость антигенного профиля опухолевых клеток в ходе прогрессирования и лечения онкологического заболевания. Праймирование дендритных клеток антигенами лизата аутологичных опухолевых клеток является наиболее распространенным способом специфичной активации цитотоксического ответа МНК [Курилин В.В., 2012; Obleukhova I.A., 2014]. Считается, что использование дендритных клеток, нагруженных антигенами опухолевого лизата, позволяет стимулировать цитотоксический Т-клеточный ответ как CD8⁺, так и CD4⁺ Th1-лимфоцитами. Для проверки эффективности разработанной в качестве источника антигенов полиэпитопной ДНК-конструкции, было решено сравнить цитотоксическую активацию МНК трансфицированными и классическими лизат-активированными дендритными клетками.

При оценке цитотоксической активности совместной культуры МНК и лизат – активированных зрелых дендритных клеток против аутологичных опухолевых клеток, была показана достоверная стимуляция противоопухолевого ответа по сравнению со всеми группами контроля при добавлении ИЛ-12 и ИЛ-18, а также с клетками, культивированными в отсутствие ИЛ-12 и ИЛ-18 (Рис. 5А). При сокультивировании МНК и дендритных клеток, нагруженных антигенами лизата опухолевых клеток, получено достоверное увеличение перфорин-позитивных клеток в присутствии рчИЛ-12 и рчИЛ-18 при сравнении со всеми группами контроля (МНК, МНК+ДК(0)) (Рис.5Б), а также со спонтанной культурой клеток. Таким образом, нами показано, что использование дендритных клеток, активируемых антигенами лизата опухолевых клеток, стимулирует цитотоксический ответ культуры МНК, выраженный в увеличение цитотоксической активности МНК против аутологичных клеток, количеством перфорин-позитивных клеток в общей выборке пациентов только при стимулирующем влиянии ИЛ-12 и ИЛ-18, в отличие от трансфицированных плазмидой А дендритных клеток.

В данных условиях культивирования только при добавлении ИЛ-12 и ИЛ-18, можно говорить о сопоставимом эффекте при использовании двух типов ДК, а именно: дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A*0201-специфические антигенные детерминанты ОАА, и дендритных клеток, праймированных антигенами лизата аутологичных опухолевых клеток (Рис.2А и5А). В отсутствие цитокинов праймированные лизатом дендритные клетки, в отличие от трансфицированных ДНК-конструкциями ДК, оказались не способны значимо стимулировать цитотоксический потенциал культуры МНК при сравнении с контрольными группами клеток.

Суммируя все преимущества использования ДНК-конструкций и недостатки антигенов лизата, а именно: включение большого числа различных иммуногенных эпитопов, обладающих заданной HLA-специфичностью, возможность исключения из состава конструкции аутоиммунных и иммуносупрессивных эпитопов, а также отсутствие эффекта лизат-активированных ДК без цитокинов и сопоставимый уровень формирования цитотоксического ответа МНК при добавлении ИЛ-12 и ИЛ-18, можно заключить, что использования смеси данных полиэпитопных HLA-A*02:01-специфичных ДНК-конструкций, является перспективным методом модуляции противоопухолевого иммунного ответа мононуклеарных клеток периферической крови больных РМЖ. В будущем представляется возможным использование таких трансфицированных дендритных клеток в качестве перспективного подхода для разработки новых методов клеточной иммунотерапии больных раком молочной железы.

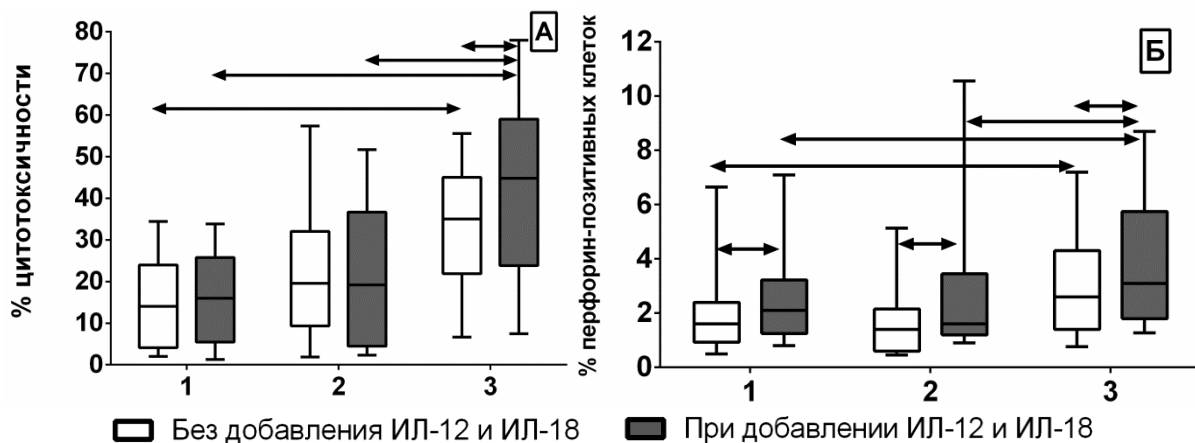


Рисунок 5 Цитотоксический эффект совместной культуры МНК и аутологичных дендритных клеток, нагруженных антигенами лизата аутологичных опухолевых клеток: А) Цитотоксический тест (N=25) Б) Процент перфорин-позитивных клеток (N=22).

Примечание: 1. МНК – контрольная культура МНК; 2. МНК+ДК(0) – совместная культура МНК и ДК без добавление опухолевого антигена; 3. МНК+ДК(Лизат) - совместная культура МНК и ДК, нагруженных лизатом аутологичных опухолевых клеток.

Из всего вышеописанного можно заключить, что использование дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкцией, кодирующей поли-ЦТЛ-эпитопный иммуноген, содержащий HLA-A*02:01-специфические антигенные детерминанты HER2-neu, позволяет формировать эффективный клеточно-опосредованный иммунный ответ МНК против опухолевых клеток линии MCF-7 по сравнению с дендритными клетками, трансфицированными ДНК-конструкцией, кодирующей полноразмерный белок ERBB2. Дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A*02:01-специфичные антигенные детерминанты ОАА, способны оказывать потенцирующее влияние на цитотоксическую активность и количество перфорин-позитивных клеток в культуре мононуклеарных клеток периферической крови больных РМЖ вне зависимости от добавления ИЛ-12 и ИЛ-18. Хотя уровень развивающихся цитотоксических реакций мононуклеарных клеток больных РМЖ сопоставим при представлении антигенов дендритными клетками как трансфицированными ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A*02:01-специфичные антигенные детерминанты ОАА, так и праймированными антигенами лизатов аутологичных опухолевых клеток только при добавлении ИЛ-12 и ИЛ-18, без добавления цитокинов достоверное специфическое влияние на культуру МНК было выявлено только при использовании трансфицированных дендритных клеток. Таким образом, для развития эффективного цитотоксического ответа МНК при сокультивировании с дендритными клетками, праймированными антигенами лизата аутологичных опухолевых клеток, дополнительная стимуляция цитокинами является обязательным фактором. Для дендритных клеток, трансфицированных полиэпитопными аллель-специфичными ДНК-конструкциями, добавление ИЛ-12 и ИЛ-18 оказывает значимое потенцирующее влияние на развивающиеся клеточные противоопухолевые реакции, однако формирование цитотоксического ответа культуры МНК происходит вне зависимости от добавления цитокинов. Кроме того, совместное использование дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A*02:01-специфичные антигенные детерминанты ОАА, и данных цитокинов способствует формированию такого количества антиген-специфических клонов, которое позволяет преодолевать зависимость эффекторных клеток от выбранного гаплотипа HLA,

способствуя развитию эффективных цитотоксических реакций культуры МНК у HLA-A*02-негативных больных РМЖ. Таким образом, использование дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующих поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A*02:01-специфичные антигенные детерминанты ОАА позволяет формировать цитотоксический противоопухолевый клеточно-опосредованный ответ в культуре мононуклеарных клеток больных РМЖ.

Таким образом, по итогам проделанной экспериментальной работы можно утверждать, что подход с использованием дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A*02:01-специфичные антигенные детерминанты ОАА, способствует индукции противоопухолевого иммунного ответа в культуре мононуклеарных клеток больных раком молочной железы.

Выводы

1. ДНК-конструкция, кодирующая поли-ЦТЛ-эпитопный иммуноген, содержащий HLA-A*02:01-специфичные антигенные детерминанты белка HER2-neu, в отличие ДНК-конструкции, кодирующей полноразмерный белок ERBB2, обеспечивает увеличение цитотоксического ответа культуры мононуклеарных клеток против клеточной линии рака молочной железы человека MCF-7 и количества перфорин-позитивных клеток, что свидетельствует о более эффективном формировании клеточно-опосредованного иммунного ответа.
2. У больных раком молочной железы, дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A*02:01-специфичные антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов, способствуют увеличению цитотоксической активности мононуклеарных клеток против аутологичных опухолевых клеток и количества перфорин-позитивных клеток, что свидетельствует об индукции противоопухолевого цитотоксического иммунного ответа.
3. В группе HLA-A*02:01-позитивных больных раком молочной железы дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A*02:01-специфичные антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов, в отличие от группы HLA-A*02-негативных больных раком молочной железы индуцируют формирование эффективного клеточно-опосредованного цитотоксического ответа, что подтверждает HLA-специфичность выбранных эпитопов.
4. В группе HLA-A*02:01-негативных больных раком молочной железы, дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A*02:01-специфичные антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов, только в присутствии цитокинов ИЛ-12 и ИЛ-18 способствуют увеличению цитотоксического ответа культуры мононуклеарных клеток и увеличению клеток, содержащих гранулы перфорина, что свидетельствует о возможности усиления антиген-специфических клеточных реакций с помощью иммунорегуляторных цитокинов.
5. Дендритные клетки, праймированные антигенами лизата аутологичных опухолевых клеток, в отличие от дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A*02:01-специфичные антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов, только при добавлении цитокинов ИЛ-12 и ИЛ-18, эффективно способствуют формированию клеточного цитотоксического противоопухолевого иммунного ответа в культуре мононуклеарных клеток больных раком молочной железы.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Курилин В.В., Облеухова И.А., Куликова Е.В., Рябкова Ю.Н., Якушенко Е.В.,

Лопатникова Ю.А., Якушенко В.К., Сенников С.В. Использование дендритных клеток для стимуляции цитотоксического противоопухолевого ответа в культуре мононуклеарных клеток. // «Иммунопатогенез и иммунотерапия основных заболеваний человека: от эксперимента к клинике». Под ред. В.А. Козлова и С.В. Сенникова, Новосибирск. - 2011г.- С.77-78.

2. **Хантакова Ю.Н.**, Лопатникова Ю.А., Шевченко Ю.А., Курилин В.В., Гаврилова Е.В., Максюттов Р.А., Куликова Е.В., Зайцев С.А., Максюттов А.З., Сенников С.В. Влияние трансфекции дендритных клеток полиэпитопными конструкциями HER2/ERBB2 на стимуляцию цитотоксического ответа в культуре мононуклеарных клеток. // Сибирский онкологический журнал. - 2012.- Приложение 1.- С.166-167.

3. **Хантакова Ю.Н.**, Курилин В.В., Шевченко Ю.А., Лопатникова Ю.А., Сидоров С.В., Максюттов А.З., Максюттов Р.А., Гаврилова Е.В., Зайцев С.А., Сенников С.В. Стимуляция цитотоксического ответа в культуре мононуклеарных клеток больных раком молочной железы с помощью дендритных клеток, трансфицированных полиэпитопной ДНК-конструкцией. // Медицинский академический журнал. - 2012.- Т.12.- №3.- С.98-99.

4. Sennikov S.V., **Khantakova J.N.**, Kurilin V.V., Shevchenko J.A., Lopatnikova J.A., Sidorov S.V., Maksyutov A.Z., Maksyutov R.A., Gavrilova E.V., Zaytzev S.A. Dendritic cells transfected with polyepitope DNA-constructs stimulate cytotoxic response mononuclear cells of breast cancer patients in vitro. // CFCD Annual Meeting «Diversity and plasticity of dendritic cells», France. – 2012. – P.70.

5. **Хантакова Ю.Н.**, Лопатникова Ю.А., Шевченко Ю.А., Курилин В.В., Сидоров С.В., Христин А.А., Сенников С.В. Использование дендритных клеток, нагруженных лизатом аутологичных опухолевых клеток, для модуляции цитотоксического иммунного ответа в культуре мононуклеарных клеток. // «Дни иммунологии в Сибири». Материалы тезисов Всероссийской научно-практической конференции, Кызыл. - 2013г.- С.46-47.

6. Курилин В.В., Куликова Е.В., Облеухова И.А., **Хантакова Ю.Н.**, Шевченко Ю.А., Соколов А.В. Влияние различных способов доставки опухолевых антигенов на эффективность стимуляции цитотоксической клеточной реакции против аутологичных опухолевых клеток. // Российский иммунологический журнал. Материалы объединенного иммунологического форума, Нижний Новгород, 30июня-5 июля. - 2013.- Т.7(16).- №2-3.- С.343.

7. Шевченко Ю.А., Курилин В.В., **Хантакова Ю.Н.**, Максюттов А.З., Зайцев С.А., Сидоров С.В. Стимуляция цитотоксического ответа в культуре мононуклеарных клеток больных раком молочной железы с помощью дендритных клеток, трансфицированных полиэпитопной аллель-специфической ДНК-конструкцией. // Российский иммунологический журнал. Материалы объединенного иммунологического форума, Нижний Новгород, 30июня-5 июля.- 2013.- Т.7(16).- №2-3.- С.348.

8. Kurilin V.V., Kulikova E.V., Obleuchova I.A., **Khantakova J.N.**, Shevchenko J.A., Lopatnikova J.A., Sokolov A.V., Sidorov S.V., Sennikov S.V. Using different approaches delivery of tumor antigens to dendritic cells to stimulate a cytotoxic cell response. //Сборник тезисов 18th NAT Conference «Common perspectives in transplant and tumor immunology». – 2013. - P.34.

9. Shevchenko Y.A., Sennikov S.V., **Khantakova Y.N.**, Kurilin V.V., Lopatnikova Y.A., Sidorov S.V., Maksyutov A.Z., Maksyutov R.A., Gavrilova E.V., Zaytsev S.A. Dendritic cells transfected with allele-specific polyepitope DNA-constructs stimulate cytotoxic response mononuclear cells of breast cancer patients in vitro. // Front. Immunol. Сборник материалов 15th International Congress of Immunology. - 2013. – p.946

10. Kurilin V.V., Obleuhova I.A., Kulikova E.V., **Khantakova J.N.**, Shevchenko J.A., Yakushenko V.K., Sokolov A.V., Sidorov S.V., Sennikov S.V. Receiving mature dendritic cells in vitro in patients with tumors of different localization. // Front. Immunol. Сборник материалов 15th International Congress of Immunology. - 2013. – p.946

11. 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 больных раком молочной железы дендритными клетками, нагруженными антигенами опухолевых лизатов. // **Иммунология.**- 2013.- Т.134.- №6.- С.327-330.

12. Курилин В.В., **Хантакова Ю.Н.**, Облеухова И.А., Шевченко Ю.А., Куликова Е.В., Якушенко В.К., Соколов А.В., Сенников С.В. Стимуляция дендритными клетками *in vitro* противоопухолевой цитотоксической активности мононуклеарных клеток больных колоректальным раком. // **Медицинская иммунология.**- 2013.- Т.15.- №3.- С.235-246.

13. Максютов А.З., Лопатникова Ю.А., Курилин В.В., Шевченко Ю.А., **Хантакова Ю.Н.**, Гаврилова Е.В., Максютов Р.А., Перегудов А.Г., Зайцев С.А., Козлов В.А., Сенников С.В. Исследование эффективности индукции цитотоксического иммунного ответа мононуклеарными клетками с помощью дендритных клеток, трансфицированных полиэпитопными конструкциями HER2/ErbB2. // **Медицинская иммунология** – 2014. - Т. 16. № 5. - стр. 417-424

14. Курилин В.В., Шевченко Ю.А., Христин А.А., Облеухова И.А., Куликова Е.В., **Хантакова Ю.Н.**, Сидоров С.В., Сенников С.В. Использование различных способов доставки антигенного материала в дендритные клетки для стимуляции цитотоксической противоопухолевой реакции в культуре мононуклеарных клеток больных раком молочной железы. // Российский иммунологический журнал.- 2015.- Том 9(18).- №2 (1).- С.497-499.

15. Sennikov S.V, Shevchenko J.A., Kurilin V.V., **Khantakova J.N.**, Lopatnikova J.A., Gavrilova E.V., Maksyutov R.A., Bakulina A.Y., Sidorov S.V., Khristin A.A., Maksyutov A.Z. Induction of an antitumor response using dendritic cells transfected with DNA constructs encoding the HLA-A*02:01-restricted epitopes of tumor-associated antigens in culture of mononuclear cells of breast cancer patients. // **Immunologic Research.** – 2016. – Vol. 64(1). – p.171-80.

16. Пат. 2521506 Российская Федерация, МПК C12N5/0783, 5/0784, A61K48/00, A61P35/00. Способ генерации антиген-специфических цитотоксических клеток с противоопухолевой активностью при раке молочной железы. / Сенников С.В., Шевченко Ю.А., **Хантакова Ю.Н.**, Курилин В.В., Лопатникова Ю.А., Сидоров С.В., Волгушев С.А., Оглоблин В.П., Ефимова Л.В., Теплова Н.В. - №2013114856/10, заявл. 01.04.2013г., опубл. 27.06.2014г., Бюл.18 – С.11.

Список сокращений:

МНК - мононуклеарные клетки

ДК – дендритные клетки

РМЖ – рак молочной железы

ОАА-опухоль-ассоциированный антиген