

НИКИТИН
Кирилл Дмитриевич

**ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ВАКЦИН МЕТОДОМ ELISpot**

Специальность: **14.01.12 – онкология**

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Москва - 2011

Работа выполнена в Учреждении Российской академии медицинских наук
Российский онкологический научный центр имени Н.Н.Блохина РАМН
(директор – академик РАН и РАМН, профессор М.И. Давыдов).

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Барышников Анатолий Юрьевич

кандидат медицинских наук,

Михайлова Ирина Николаевна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор

Бухман Владимир Михайлович

доктор медицинских наук, профессор

Голенков Анатолий Константинович

Ведущая организация:

ФГУ МНИОИ им. П.А. Герцена Минздравсоцразвития России

Защита состоится «_____» _____ 2011 г. в _____ часов

на заседании диссертационного совета Д. 001.017.02 РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН
по адресу: 115478 Москва, Каширское шоссе, д. 23.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке

РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН

Автореферат разослан «___» _____ 2011 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Ю.А.Барсуков

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Многочисленные исследования биологии опухолей и взаимодействий между злокачественными новообразованиями и организмом в целом показали, что опухоли иммуногенны, но антигенный состав каждой конкретной опухоли уникален и индивидуален. Это свойство злокачественных новообразований легло в основу специального метода терапии — иммунотерапии. Иммунотерапия в онкологии изучает возможность лечения злокачественных новообразований за счет активизации и/или усиления противоопухолевого иммунного ответа в организме больного.

Среди современных методов иммунотерапии значительное внимание уделяется применению дендритных клеток (ДК) и препаратов на их основе. Пилотные клинические исследования показали, что ДК, нагруженные опухолевыми антигенами, вызывают развитие иммунного ответа, специфичного против опухолеассоциированных антигенов (ОАА). Для нагрузки ДК опухолевыми антигенами разработаны различные методы, включая нагрузку синтетическими пептидами, опухолевыми лизатами, опухолевой РНК (Mayordomo J. et al., 1995; Celluzzi C. et al., 1996; Hsu F. et al., 1996; J. et al., 1997; Nestle F. et al., 1998; Koido S. et al., 2000; Paglia P. et al., 2000; Russo V. et al., 2000).

Принципиальным преимуществом иммунотерапии с применением ДК является теоретическая возможность индукции противоопухолевого ответа против всех антигенов, имеющихся в опухоли, без необходимости их идентификации. Тем не менее, остается ряд нерешенных вопросов. Так, традиционные критерии оценки эффективности терапии (опухолевый ответ, выживаемость и др.), применяющиеся при исследовании лучевых, хирургических и химиотерапевтических методов лечения, недостаточно чувствительны для оценки эффективности иммунотерапевтических препаратов (Hoos et al., 2010). Кроме того, исследования новых противоопухолевых препаратов проводятся в первую очередь у больных с поздними стадиями онкологических заболеваний, после того, как остальные методы лечения себя исчерпали, — то есть у людей с высокой вероятностью иммунологических нарушений.

В связи с этим приобретает особую важность разработка новых методов для оценки эффективности иммунотерапии онкологических заболеваний.

Предложено несколько методов оценки иммунного ответа у онкологических больных — исследование иммунного статуса, пролиферативные и цитотоксические тесты с лимфоцитами, тетрамерный анализ. Одним из наиболее удобных в практическом отношении и при этом высокоточным методом представляется реакция ELISpot — Enzyme-Linked ImmunoSpot — твердофазная модификация метода иммуноферментного анализа, позволяющая идентифицировать изменения иммунореактивности организма на уровне отдельных клеток. Метод ELISpot изначально предложен для выявления В-лимфоцитов, продуцирующих специфические антитела, и широко используется для оценки вакцин для профилактики инфекционных заболеваний. Применение метода ELISpot для исследования противоопухолевых вакцин остается недостаточно изученным.

Цель исследования

Оценить с помощью метода ELISpot иммунный ответ у больных онкологическими заболеваниями при использовании терапевтических противоопухолевых вакцин.

Задачи исследования

- адаптировать метод ELISpot для оценки иммунного ответа у больных, получавших противоопухолевую иммунотерапию вакцинами на основе аутологичных дендритных клеток (аутоДК), нагруженных опухолевым лизатом, или аллогенных генно-модифицированных опухолевых клеток (гм-ОпК — вакцина «Мелавак»);
- изучить *in vitro* активацию лимфоцитов (увеличение числа интерферон [ИФН]- γ -продуцирующих лимфоцитов) в ответ на стимуляцию аутологичными ДК, нагруженными опухолевыми антигенами;
- предложить критерии оценки иммунного ответа у больных злокачественными новообразованиями и оценить на их основе активацию лимфоцитов больных меланомой кожи, получающих противоопухолевые вакцины на основе аутоДК или гм-ОпК в рамках клинического исследования;
- оценить связь между иммунным ответом на вакцинотерапию и другими клиническими и иммунологическими показателями.

Научная новизна работы

Впервые адаптирован метод ELISpot для исследования иммунных реакций у больных, получающих противоопухолевые вакцины на основе аутоДК и гм-ОпК.

Впервые с помощью метода ELISpot проведено исследование активации лимфоцитов *in vitro* в ответ на применение противоопухолевых вакцин на основе аутоДК

Впервые предложены критерии оценки иммунологических изменений, выявляемых методом ELISpot у больных, получающих вакцинацию противоопухолевыми вакцинами на основе аутоДК и гм-ОпК.

Впервые оценен иммунный ответ у больных меланомой, получавших вакцины на основе аутоДК или гм-ОпК, в рамках клинического исследования.

Впервые исследована связь иммунного ответа с рядом клинических и иммунологических показателей.

Научно-практическая значимость работы

Результаты работы свидетельствуют о перспективности исследования новых иммунотерапевтических препаратов с помощью метода ELISpot. Получены важные сведения об исследованных вакцинах, показана целесообразность проведения клинического исследования противоопухолевой вакцины на основе ДК, слитых с опухолевыми клетками (дендритом).

Апробация работы

Апробация диссертационной работы состоялась 12 июля 2010 г. на совместной научной конференции лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей, лаборатории клеточного иммунитета, лаборатории радиоизотопных методов исследования, лаборатории разработки лекарственных форм, лаборатории фармакологии и токсикологии, лаборатории лучевых методов лечения опухолей, лаборатории медицинской биотехнологии НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН и отделения биотерапии опухолей НИИ клинической онкологии РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН.

По материалам диссертации опубликовано 10 работ: 4 оригинальные статьи, 3 литературных обзора и 3 тезиса докладов.

Структура работы

Диссертация изложена на 126 страницах машинописного текста, включая библиографию и иллюстрации. Состоит из введения, литературного обзора, общей характеристики материалов и методов исследования, двух глав описания собственных исследований, главы обсуждения результатов и выводов. Список литературы включает 162 источника, в том числе 146 публикаций зарубежных авторов. Диссертация иллюстрирована 14 рисунками и сопровождается 20 таблицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведенная работа может быть разделена на две основные части: 1) адаптация метода ELISpot и сравнительное исследование *in vitro* иммуногенности различных вариантов противоопухолевых вакцин на основе ДК, и 2) исследование иммунного ответа в клиническом исследовании у больных меланомой, получающих вакцины на основе аутоДК, нагруженных лизатом опухолевых клеток (ОпК) линии mel Kor, и на основе клеток линии mel Kor, модифицированных геном GM-CSF.

Метод ELISpot

Метод ELISpot широко применяется для оценки иммунного ответа у людей и животных. Метод разработан С. Czerkinsky в 1983. ELISpot представляет собой модифицированную версию метода иммуноферментного анализа ELISA. Изначально ELISpot был разработан для подсчета В-лимфоцитов, продуцирующих специфические антитела, а затем был адаптирован для разных задач, в особенности для идентификации и подсчета цитокин-продуцирующих клеток с точностью вплоть до отдельных клеток. ELISpot позволяет визуализировать вещество, продуцируемое отдельными активированными клетками. Чувствительность метода — менее 1 клетки на 100 000. Для учета результатов реакции используют автоматизированные системы — ELISpot-ридеры, с высокой точностью фотографирующие результат реакции и анализирующие полученную картину. Метод ELISpot широко применяется в разработке противовирусных вакцин, но также нашел применение и в онкоиммунологии (Hoos A et al., 2007; Janetzki S et al., 2008).

Исследование изменений числа ИФН- γ -продуцирующих лимфоцитов в ответ на стимуляцию ДК-вакцинами *in vitro*

Иммуногенность различных вариантов противоопухолевых вакцин на основе ДК (незрелые ДК, зрелые ДК, ДК, нагруженные опухолевым лизатом, и ДК, слитые с ОпК) оценивалась методом ELISpot на основании изменений числа ИФН- γ -продуцирующих лимфоцитов в ответ на стимуляцию ДК *in vitro*. Схема эксперимента представлена на рис. 1. Незрелые ДК получали путем культивации адгезивных моноцитов периферической крови здоровых доноров. Неадгезивные лейкоциты (обогащенную лимфоцитарную фракцию) замораживали для последующих экспериментов. Незрелые ДК разделяли на несколько частей. Первую часть клеток оставляли незрелыми, без дополнительных воздействий. Индукцию терминальной дифференцировки второй части ДК вызывали с помощью инкубации в присутствии цитокинового коктейля. Третью часть незрелых ДК нагружали опухолевым лизатом, полученных из опухолевых клеток меланомы линии mel Kor. Наконец, последнюю часть незрелых ДК сливали с облученными опухолевыми клетками меланомы линии mel Kor. Эффективность слияния клеток оценивали с помощью проточной цитометрии.

После получения незрелых, зрелых и нагруженных ДК и дендритом их использовали для активации лимфоцитов. Для этого лимфоциты, полученные от того же донора (аутологичные лимфоциты), размораживали и помещали в лунки 6-луночного планшета и смешивали со стимуляторами (незрелыми, зрелыми и нагруженными ДК или дендритомами) в нужном соотношении, подобранном в ходе предварительных опытов. После смешивания со стимуляторами планшеты с лимфоцитами инкубировали в течение 7 дней при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Через 7 дней лимфоциты снимали с планшета и подсчитывали. Необходимое количество клеток отбирали и использовали для постановки реакции ELISpot.

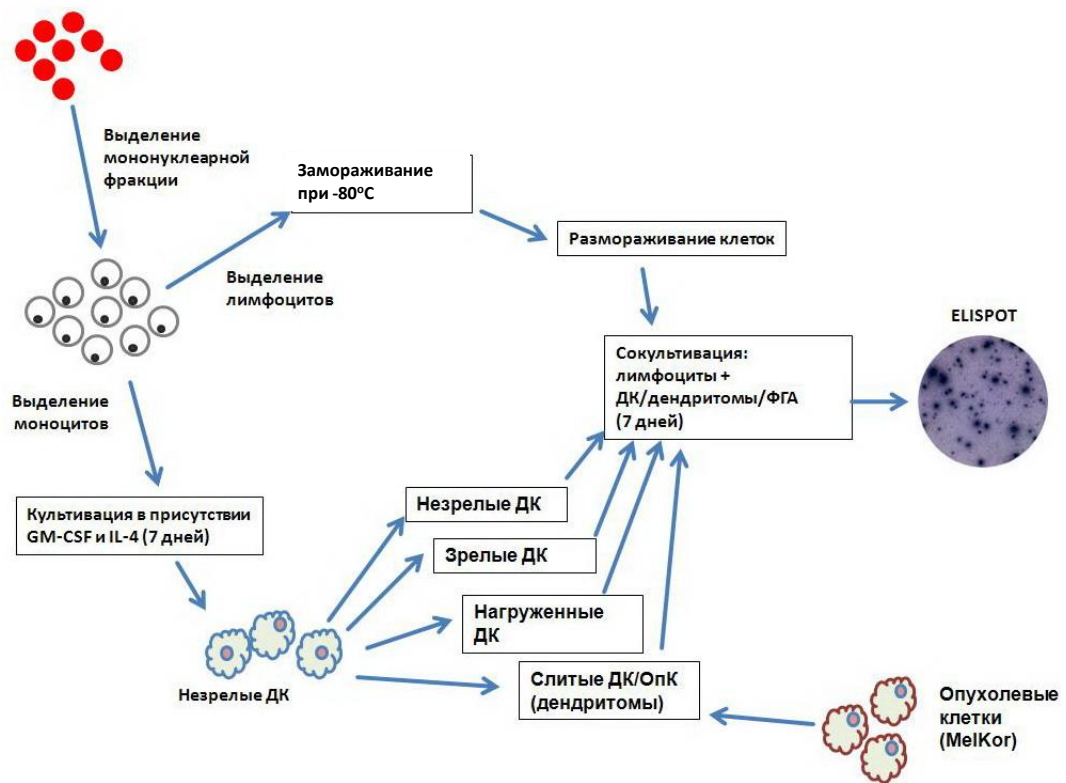


Рисунок 1. Схема эксперимента для оценки изменений числа ИФН- γ -продуцирующих лимфоцитов в ответ на стимуляцию ДК *in vitro*. ДК — дендритные клетки, ОпК — опухолевые клетки, ФГА — фитогемагглютинин.

Исследование иммунного ответа методом ELISpot у больных меланомой, получающих противоопухолевые вакцины

Метод ELISpot был использован для оценки иммунного ответа у больных меланомой, получающих противоопухолевые вакцины на основе аутологичных ДК, нагруженных аллогенным опухолевым лизатом, или на основе аллогенных опухолевых клеток, трансфицированных геном GM-CSF. Больные получали противоопухолевую вакцину в адьювантном режиме внутривенно в дозе 1×10^6 клеток. Интервалы между введениями составляли 2 недели. Вакцинация продолжалась вплоть до развития прогрессирования. По своей организации исследование было открытым и одноцентровым, проводилось в соответствии со стандартами GCP. У больных перед 1-й, 3-й, 5-й и 10-й вакцинациями производился забор образцов периферической крови (4–10 мл) — точки 0, 1, 2 и 3, соответственно (рис. 2). Образцы крови набирались в пробирку Vacutainer (Becton Dickinson, США) с антикоагулянтом и отправлялись в лабораторию, где в течение суток из них выделялись и замораживались лейкоциты.

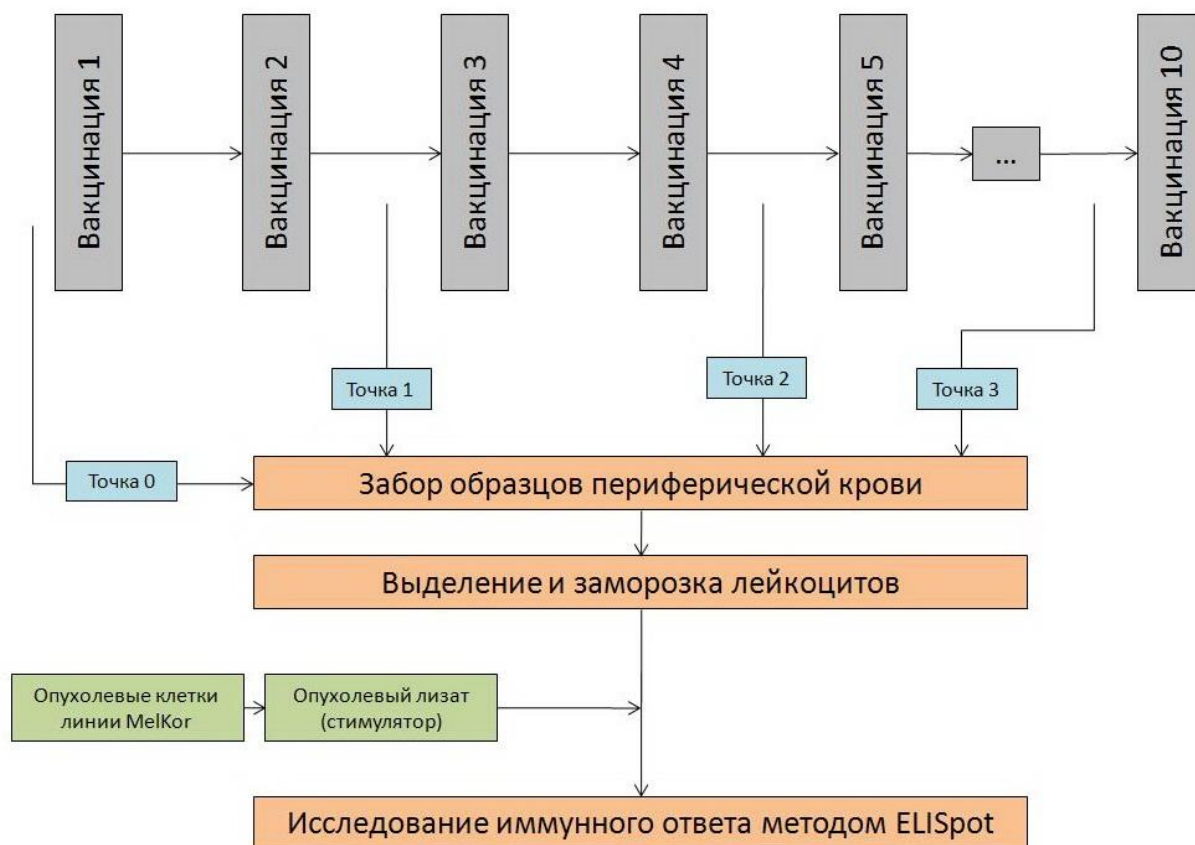


Рисунок 2. Схема исследования иммунного ответа. Больные диссеминированной меланомой кожи получают противоопухолевую вакцинацию аутологичными дендритными клетками, нагруженными аллогенным опухолевым лизатом, или аллогенных опухолевыми клетками, трансфицированными геном GM-CSF.

После завершения вакцинотерапии образцы лейкоцитов, взятые у больного, размораживались, и оценивалось число лейкоцитов, активирующихся в ответ на стимуляцию лизатом аллогенных опухолевых клеток линии mel Kor. Активация оценивалась по продукции ИФН- γ лейкоцитами с помощью метода ELISpot.

В качестве отрицательного контроля оценивалась фоновая секреция ИФН- γ нестимулированными лейкоцитами. Положительным контролем служили лейкоциты, активированные неспецифическим стимулятором фитогемагглютинином (ФГА). Положительный контроль служил индикатором успешной постановки реакции. Для повышения точности исследования и исключения воздействия случайных факторов анализ каждой пробы (не стимулированные лимфоциты, лимфоциты + лизат и лимфоциты + ФГА) в каждой точке (0, 1, 2 или 3) повторялся по возможности 6 раз, но не менее 3 раз. В зависимости от доступного количества лимфоцитов максимальное число повторов доходило у некоторых больных до 12.

Методы статистического анализа результатов работы

Результаты, полученные *in vitro* при сравнении разных противоопухолевых вакцин методом ELISpot, анализировали с помощью статистической программы BIOSTAT с использованием критериев Крускала—Уоллиса и Данна.

Изменения в числе клеток, активирующихся в ответ на стимуляцию опухолевым антигеном у больных, получавших вакцинацию ДК-вакциной, анализировались с помощью программы SPSS Statistics v.17.0 с использованием теста Фридмана.

Связь между наличием иммунного ответа и реакцией ГЗТ и прогрессированием заболевания у больных, получавших противоопухолевые вакцины, анализировали с помощью программы SPSS Statistics v.17.0 с использованием метода χ^2 .

Время до прогрессирования у больных, у которых был или не был выявлен иммунный ответ, оценивалось методом Каплана-Майера с помощью программы SPSS Statistics v.17.0 с использованием лог-рангового критерия.

Значимость изменений в уровне маркера S100 у больных меланомой в процессе вакцинации оценивалась с помощью программы SPSS Statistics v.17.0 с использованием критерия Вилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наше исследование было посвящено возможностям метода ELISPot для оценки иммунного ответа в ответ на вакцинацию различными противоопухолевыми вакцинами на основе ДК и генетически модифицированных ОпК. Этот вопрос представляет определенную научную проблему. Во-первых, все чаще высказываются мнения о неприменимости традиционных критериев оценки эффективности противоопухолевой терапии к методам иммунотерапии. Во-вторых, исследования новых противоопухолевых препаратов по этическим соображениям проводятся в первую очередь у больных с поздними стадиями онкологических заболеваний, у которых все другие методы лечения исчерпали свою эффективность. Ожидать высокой эффективности нового препарата у таких больных в большинстве случаев не приходится. Поэтому важно зарегистрировать любые, даже самые минимальные изменения на клеточном и молекулярном уровне, происходящие в ответ на экспериментальное лечение, чтобы определить его перспективы и пути усовершенствования.

Адаптация метода ELISPot

Проведенная работа свидетельствует, что метод ELISPot — удобный и надежный способ оценки иммунного ответа. Нами выполнено более 70 тестов на образцах крови 22 больных меланомой и 4 здоровых доноров. Один тест может быть выполнен 1 исследователем за 2 дня, результаты хорошо воспроизводятся и отличаются значительной объективностью. Опыт показал дополнительное достоинство метода, чрезвычайно важное в клиническом исследовании: для его выполнения требуется минимальное количество клеток. При использовании выбранной нами схемы эксперимента для оценки иммунного ответа в каждой точке достаточно порядка 1–1,5 млн мононуклеарных клеток периферической крови, в то время как для проведения, например, любого цитофлюориметрического исследования требуются количества клеток порядка нескольких миллионов. Удобство метода подтверждается тем, что ни один тест не был сорван из-за нехватки клеток. Иногда получение достаточного объема крови у больных с поздними стадиями злокачественных новообразований может быть затруднено или противопоказано; для оценки иммунного ответа методом ELISpot может быть достаточно 4–5 мл периферической крови.

Точность метода позволяет оценивать изменения на уровне отдельных клеток. В результате проведенных экспериментов мы выбрали оптимальное число клеток в одной пробе — 100 тыс. клеток на лунку (это или сходное количество клеток использовалось и в большинстве аналогичных исследований других авторов), при этом наблюдавшееся число клеток, продуцирующих ИФН- γ в ответ на стимуляцию опухолевым лизатом, в большинстве случаев составляло от 0 до 10. Возможно, использование большего количества клеток в пробе (например, 1 млн. клеток на лунку) позволило бы повысить точность метода, но и соответствующим образом увеличило бы расход клеток.

Сравнительное исследование иммуногенности ДК-вакцин

В экспериментальной части работы мы сравнили активацию лимфоцитов в ответ на стимуляцию различными вариантами противоопухолевых вакцин на основе ДК, применение которых описывается в литературе: незрелые ДК, ДК, нагруженные опухолевым лизатом, и ДК, слитые с опухолевыми клетками (дендритомы). В клинических исследованиях показано, что незрелые ДК скорее вызывают иммунную толерантность, чем активацию противоопухолевого ответа (Roncarolo MG. et al., 2001;

Jonuleit H. et al., 2000), в то время как нагрузка ДК опухолевым лизатом может повышать терапевтический эффект (Nestle FO, et al., 1998; Höltl L, et al., 2002; Chang AE. et al., 2002).

В Лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН разработана методика слияния опухолевых и дендритных клеток с получением гибридных клеток — дендритом (по аналогии с гибридами, т.к. для слияния клеток используется соответствующим образом модифицированная гибридная технология). Предполагается, что при слиянии опухолевой клетки с дендритной весь спектр опухолевых антигенов, в том числе и пока что не идентифицированных, становится доступным для процессирования соответствующими внутриклеточными аппаратами дендритной клетки, и презентуется в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости I и II классов. Презентация антигена Т-лимфоцитам при этом происходит в сочетании со всем широким спектром костимулирующих молекул, синтезируемых и секретируемых дендритными клетками (Gong J. et al., 1998; Gong J. et al., 2000; Koido S. et al., 2002).

Эффективность слияния дендритных клеток с опухолевыми обычно не превышает 50% и в среднем колеблется в пределах 25–30% (Koido S. et al., 2007; Koido S. et al., 2002). Согласно нашим данным, после слияния ДК и ОпК с помощью полиэтиленгликоля образуется смесь клеток, содержащая приблизительно 38% слитых клеток (дендритом), 28% не слившихся ДК и 25% не слившихся облученных ОпК. На рис. 3 показаны результаты исследования эффективности слияния дендритных и опухолевых клеток. До слияния облученные опухолевые клетки (ОпК) окрашивали витальным красителем РКН 26, флуоресцирующим зеленым цветом. Облученные ОпК сливали с ДК с помощью обработки ПЭГ. После слияния суспензию клеток окрашивали моноклональными АТ к CD11c, конъюгированными с фикоэритрином (PE, красная флуоресценция). В итоге после слияния и окраски ДК и ОпК образуется суспензия клеток, содержащая смесь окрашенных зеленым красителем ОпК, окрашенных красным красителем ДК и слитых клеток, несущих две метки — красную и зеленую. Число окрашенных клеток оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии.

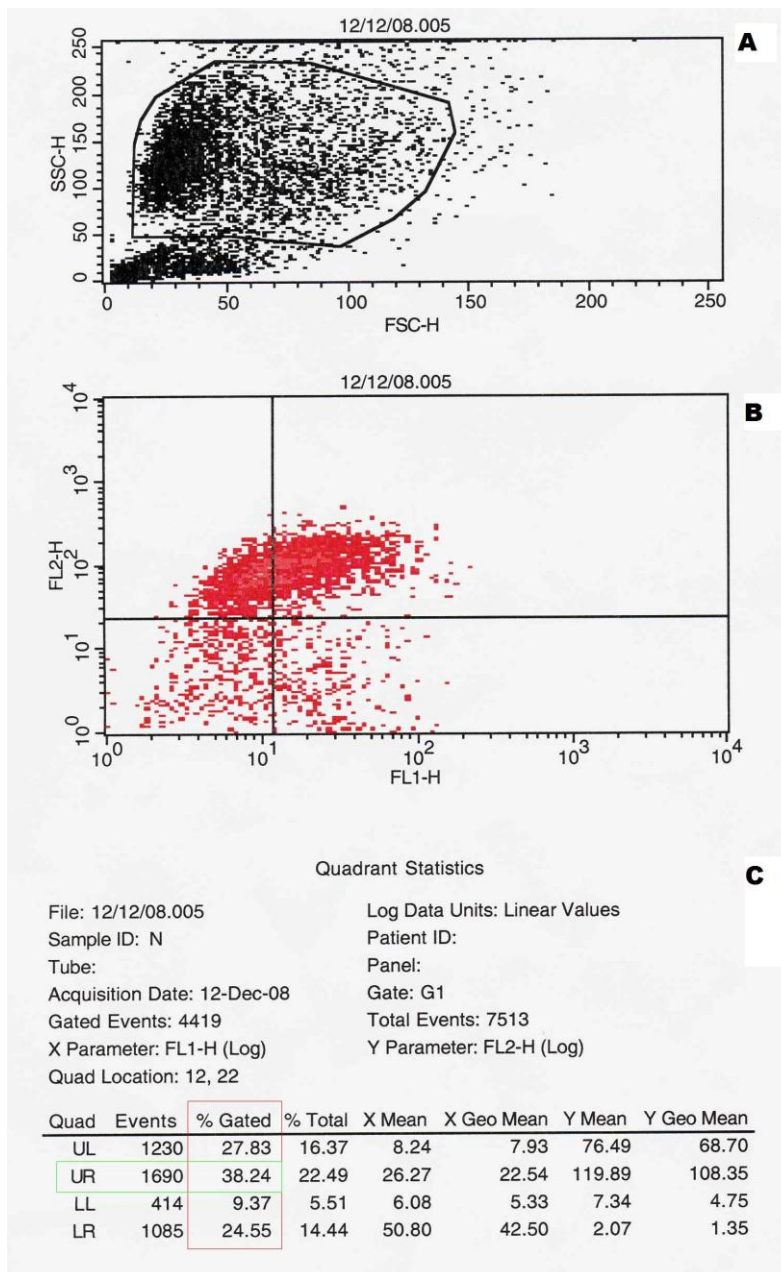


Рисунок 3. Результаты проточной цитофлуориметрии. А — выбор гейта (субпопуляции клеток, чьи размер и плотность соответствуют исследуемым клеткам); В — оценка флуоресценции; С — данные о процентном соотношении клеток. LL, нижний левый квадрант — неокрашенные клетки; UL, верхний левый квадрант — дендритные клетки, окрашенные моноклональными антителами к CD11с, конъюгированными с фикоэритрином (красная флуоресценция); LR, нижний правый квадрант — опухолевые клетки, окрашенные витальным красителем PKH 26 (зеленая флуоресценция); UR, верхний правый квадрант — клетки, несущие двойную метку.

Мы показали, что *in vitro* зрелые ДК, нагруженные опухолевым лизатом, и дендритомы вызывают статистически значимую активацию лимфоцитов, причем отмечена тенденция к повышению активности дендритом по сравнению со всеми другими вариантами ДК-вакцин (рис. 4). Сравнивалось количество лимфоцитов, активирующихся в ответ на стимуляцию незрелыми дендритными клетками (ДК), цитокин-активированными ДК, дендритными клетками, нагруженными лизатом *mel* *Kog* и в ответ на стимуляцию дендритомами, полученными слиянием ДК с опухолевыми клетками линии *mel* *Kog*. Активация лимфоцитов оценивалась по продукции ими $IFN\gamma$ и выявлялась с помощью реакции ELISpot.

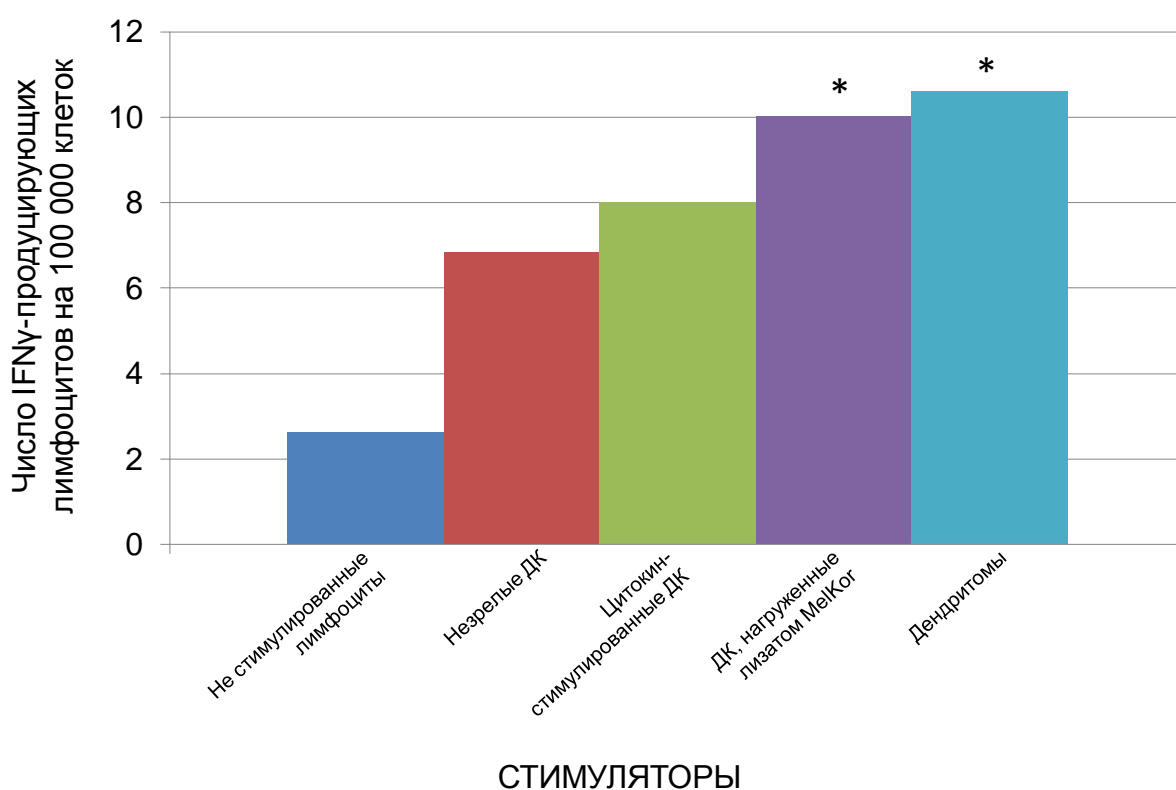


Рисунок 4. Результаты исследования активации донорских лимфоцитов в ответ на стимуляцию различными противоопухолевыми вакцинами. ДК — дендритные клетки.

* — группы, статистически достоверно отличающиеся по сравнению с негативным контролем ($p < 0,05$, критерии Крускала—Уоллиса и Данна).

Результаты нашего исследования свидетельствуют о перспективности проведения клинических исследований вакцины на основе дендритом и об удобстве метода ELISpot для экспериментальных исследований.

Далее, метод ELISpot был применен для оценки иммунного ответа в клиническом исследовании у больных меланомой, получающих вакцины на основе аутологичных ДК, нагруженных лизатом ОпК линии mel Koc, и на основе клеток линии mel Koc, модифицированных геном GM-CSF («Мелавак»). Всего в анализ включено 15 больных, получавших вакцину на основе аутологичных ДК (8 мужчин и 7 женщин, средний возраст 53 года), и 7 больных, получавших вакцину «Мелавак» (2 женщины, 5 мужчин).

Критерии оценки иммунного ответа у больных

Нами были разработаны критерии оценки иммунного ответа у больных, получавших вакцинотерапию. Для исключения неспецифической (фоновой) активации, не связанной со стимуляцией клеток лизатом, была рассчитана разница (D) между средним числом клеток на 100 000 лейкоцитов, активирующихся в ответ на стимуляцию лизатом ($N_{\text{лиз}}$), и числом клеток, продуцирующих ИФН- γ в отсутствие стимуляции ($N_{\text{н/ст}}$):

$$D = N_{\text{лиз}} - N_{\text{н/ст}}$$

Критерием наличия иммунного ответа на вакцинацию мы приняли увеличение разницы (D) между средним числом клеток на 100 000 лейкоцитов, активирующихся в ответ на стимуляцию лизатом ($N_{\text{лиз}}$), и числом клеток, продуцирующих ИФН- γ в отсутствие стимуляции ($N_{\text{н/ст}}$), в процессе вакцинации. Иными словами, иммунный ответ констатировался у больных, у которых D хотя бы в одной из точек в процессе вакцинации (D_1 , D_2 или D_3) оказалось больше, чем D до вакцинации (D_0).

Оценка иммунного ответа у больных, получавших вакцинотерапию

Результаты исследования иммунного ответа позволяют помочь в разрешении многих вопросов, остающихся открытыми. Так, по-прежнему нет единого мнения о том, какие именно ДК — зрелые или незрелые — более эффективны для терапевтического применения. Есть сведения, что незрелые ДК могут скорее вызывать анергию иммунной системы, чем иммунный ответ против опухоли, в то время как зрелые ДК, несущие большое количество молекул главного комплекса гистосовместимости и других костимулирующих факторов, вызывают и поддерживают специфический иммунный ответ (Dhodarkar MV. et al., 2002; Butterfield LH. et al., 2006) Эти сведения отчасти подтверждаются нашим экспериментальным исследованием — зрелые ДК значительно сильнее стимулируют активацию лимфоцитов, чем незрелые (хотя наши результаты и не дают сведений о других эффектах ДК, как, например, развитие анергии при

использовании незрелых ДК). В связи с этим в клиническом исследовании мы использовали ДК, чья терминальная дифференцировка была индуцирована цитокиновым коктейлем, включающим фактор некроза опухолей α — такая обработка ведет к образованию зрелых ДК с высокой экспрессией CD83.

Остается нерешенным вопрос оптимального источника антигенов для нагрузки ДК, напрямую связанный с методом оценки иммунного ответа на них. Идентифицировано большое число белков, в той или иной степени ассоциированных с клетками меланомы, хотя ни один из них не специфичен. Исследования продолжаются, но уже можно предположить, что у человека не будет найдено антигенов, специфичных для злокачественных опухолей вообще или для какой-то отдельно опухоли в частности. В связи с этим перспективным будет поиск комбинированных схем терапии, как это происходит в области исследований низкомолекулярных ингибиторов опухолевых тирозинкиназ (сочетание нескольких таргетных препаратов против разных сигнальных путей, вовлеченных в канцерогенез, синергично повышает их эффективность) или разработка «политаргетных» иммунопрепаратов — терапевтических вакцин, направленных сразу против множества опухолеассоциированных антигенов (ОАА).

Примером такого препарата может служить исследованная нами вакцина на основе ДК, нагруженных опухолевым лизатом. Преимущество подобного подхода заключается в том, что ДК, нагруженные цельным белком, могут быть более эффективны для индукции антиген-специфического иммунного ответа, за счет активации как CD4+ хелперов, так и CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов. Этот иммунный ответ может быть направлен против широкого спектра антигенов, независимо от аллеля HLA. Активация и CD4+ хелперов, и CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов представляется необходимой для развития эффективного иммунного ответа (Schumacher L. et al., 2004), а выработка Т-лимфоцитов против множества антигенов снижает вероятность ухода опухоли от иммунного ответа с помощью снижения экспрессии какого-то одного антигена.

В своей работе мы использовали клетки меланомы линии mel Kog, выведенной в нашей лаборатории. Клетки этой линии экспрессируют широкий спектр ОАА и удобны в использовании: быстрый рост клеток *in vitro* позволяет получать их в большом количестве. Таким образом, выбор этой линии был связан в первую очередь с практическими соображениями, и любая другая линия могла бы быть выбрана с равной вероятностью. От применения аутологичного опухолевого лизата решено было отказаться в связи со сложностью и непредсказуемостью его получения и возможными различиями в

экспрессии антигенов между больными, не позволяющими получить стандартизованный продукт и ограничивающими исследование Т-клеточного ответа. Исследования других авторов подтверждают недостаточную эффективность применения HLA-рестрицированных пептидов, возможно, в связи с нехваткой активации CD4+ Т-лимфоцитов (Butterfield LH. et al., 2006), и развитие клинического ответа — при использовании цельноклеточного лизата (Palmer DH. et al., 2009). Некоторыми исследователями высказывается опасение, что применение цельноклеточного лизата может повышать вероятность аутоиммунных осложнений лечения, однако нам не удалось найти исследований, в которых сообщалось бы о случаях серьезных аутоиммунных нарушений. Могут повышаться титры аутоантител, описаны отдельные случаи развития витилиго (в том числе и в исследовании, проводившемся нами).

Для стимуляции клеток в реакции ELISpot мы использовали тот же антиген, что и для нагрузки ДК — лизат клеток mel Cor. Такой подход имеет те же преимущества, что и использование этого лизата для вакцинации: имеется теоретическая возможность выявления иммунных клеток, активирующихся в ответ на широкий спектр опухолеассоциированных антигенов, которые экспрессирует данная клеточная линия, вне зависимости от экспрессии аллеля HLA, в контексте которого презентруется тот или иной эпитоп. В то же время, такой подход не позволяет выявить клетки, реактивные по отношению к тому или иному антигену. В будущих исследованиях представляет интерес использование отдельных антигенных пептидов для стимуляции иммунных клеток в реакции ELISpot.

К сожалению, не существует единых стандартов исследования иммунного ответа с помощью метода ELISpot (Hoos et al., 2010). Каждая исследовательская группа использует свою модификацию теста, и если материалы и условия проведения в большинстве исследований относительно однородны, то критерии оценки ответа используются самые разнообразные. Помимо этого, прямые сравнения результатов исследований невозможны в связи с отличиями самих исследуемых препаратов. Большинство исследований выполнено на малых группах больных, а изучавшиеся вакцины и антигены, применявшиеся для стимуляции лимфоцитов в реакции ELISpot, принципиально отличались от использовавшихся в нашем исследовании (Matsumoto A. et al., 2007; Kim JH. et al., 2007; Hirschowitz EA. et al., 2007; Butterfield LH, et al., 2008, Wheeler C.J. et al., 2008).

Согласно литературным данным, иммунный ответ методом ELISpot выявляется у 30–70% больных, получавших иммунотерапию противоопухолевыми вакцинами на основе ДК (Butterfield LH, et al., 2008; Palmer DH. et al., 2009). Такой значительный разброс связан с небольшим числом больных в большинстве исследований и различными, зачастую принципиально отличными вариантами противоопухолевых вакцин, оценивавшихся в исследованиях. Тем не менее, результаты нашего исследования иммунного ответа у больных, получавших иммунотерапию, в общем и в целом сопоставимы с результатами других сходных исследований: выявлено увеличение числа клеток, активирующихся в ответ на стимуляцию опухолевыми антигенами в процессе иммунизации вакцинами на основе аутологичных ДК и гм-ОпК, наблюдалось приблизительно у трети больных с поздними стадиями меланомы (у 5 из 15 больных, получавших вакцину на основе аутологичных ДК, и у 3 из 8, получавших вакцину на основе гм-ОпК).

Иммунный ответ и реакция ГЗТ

У части больных, получавших иммунотерапию противоопухолевой вакциной на основе аутологичных ДК, нагруженных лизатом ОпК, наблюдалось развитие реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), проявлявшейся преимущественно изменениями в месте введения вакцины — покраснение, отек, зуд, жжение. В частности, ГЗТ наблюдалось у 6 (40%) из 15 больных, у которых был оценен иммунный ответ по данным реакции ELISpot. При анализе данных с помощью метода χ^2 установлено, что реакция ГЗТ наблюдалась достоверно чаще у больных с иммунным ответом ($p < 0,05$). В целом, реакция ГЗТ часто встречается у больных, получающих вакцины на основе ДК (Escobar A. et al., 2005; Lopez MN. et al., 2009). Однозначно трактовать этот феномен сложно в связи с неспецифичностью реакции ГЗТ. Возможно, это является проявлением повышенной иммунореактивности отдельных больных.

Прогрессирование заболевания и иммунный ответ

Средняя продолжительность наблюдения за 15 больными, получавшими вакцину на основе аутологичных ДК, составила $8,4 \pm 4$ мес (медиана 8,5, от 3 до 18 мес).

Прогрессирование заболевания за время наблюдения у больных, получавших вакцину на основе аутологичных ДК, наступило у 10 из 15 человек. Отмечена тенденция к увеличению времени до прогрессирования среди больных с выявленным иммунным

ответом, однако статистической значимости эти различия не достигли (рис. 5), что, впрочем, не удивительно с учетом поздней стадии заболевания у включенных в исследование больных. Отсутствие связи между иммунологической эффективностью вакцинотерапии и клиническими изменениями отмечают и некоторые зарубежные исследователи (Butterfield LH, et al., 2008; Romero P. et al. 2004).

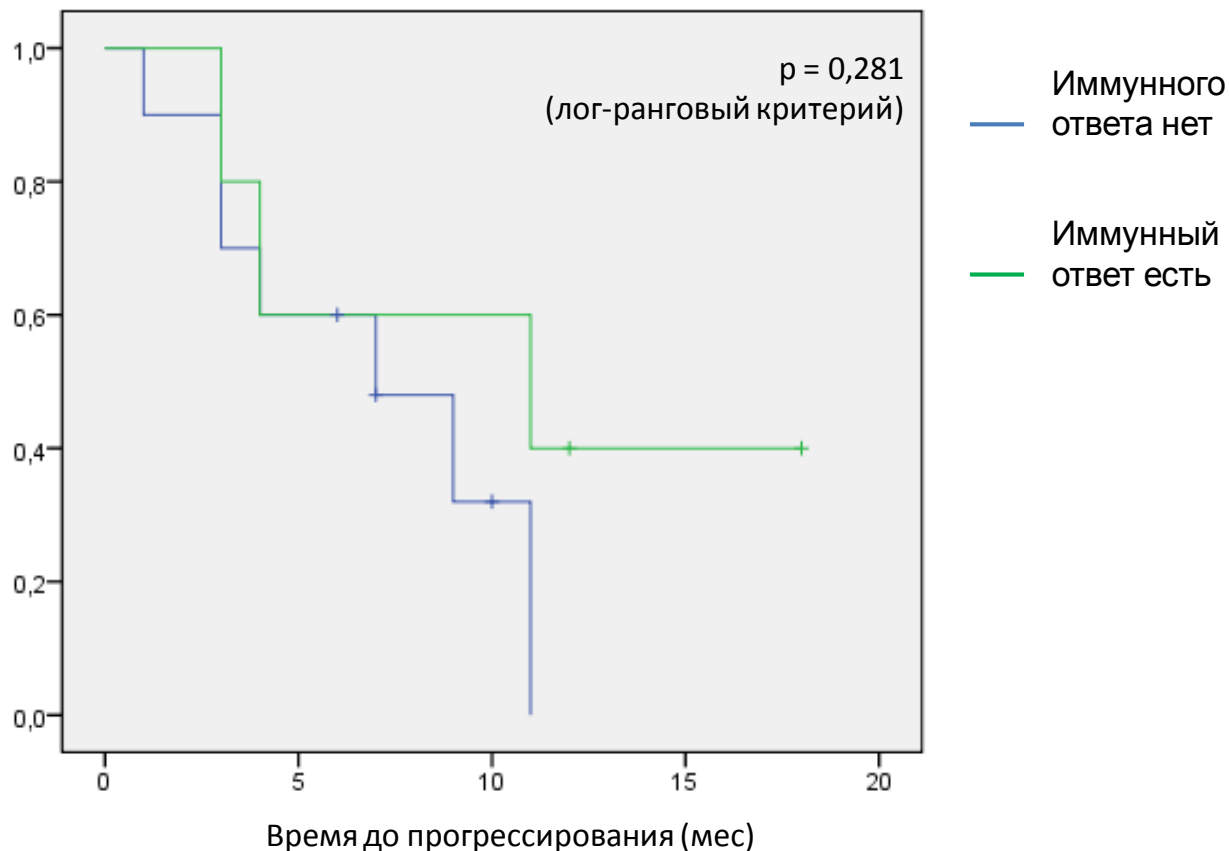


Рисунок 5. Время до прогрессирования у больных меланомой, получавших противоопухолевую вакцину на основе аутологичных дендритных клеток, нагруженных опухолевым лизатом (n=15).

Уровень S100 и иммунный ответ

У больных был исследован уровень опухолевого маркера S100. Белок S-100 (S-100A1B и S-100BB формы) определяли в сыворотке крови с помощью диагностической тест-системы CanAg Diagnostics (Швеция). Уровень маркера исследовали 2 раза: до вакцинации и во время нее (3-я точка во время вакцинации). Уровень S100 по данным производителя тест-системы у здоровых лиц составляет в среднем 54 нг/л, по данным обследования здоровых добровольцев, проведенных в ГУП “МНКЦ “Интермедбиофизхим” — $69,4 \pm 38,13$ нг/л (Парсункова К.А., 2009).

Значительный объем опухолевой ткани, прогрессирование заболевания и неблагоприятный прогноз у больных, включенных в исследование, подтверждаются изменением уровня опухолевого маркера S100: уровень этого маркера был исходно высоким у большинства участников исследования и увеличивался на фоне вакцинации (рис. 6, 7).

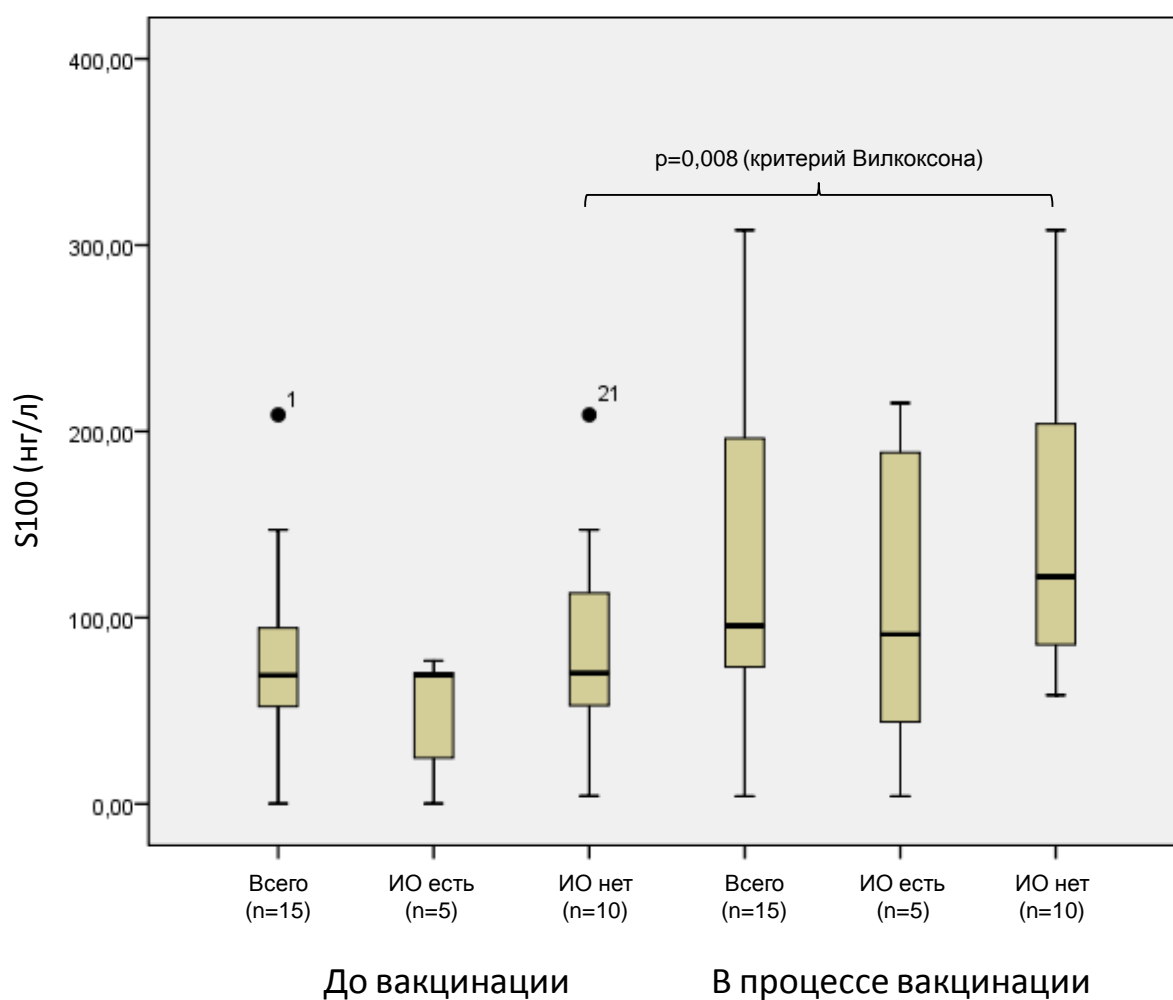


Рисунок 6. Изменение уровня маркера S100 в процессе вакцинации в зависимости от наличия иммунного ответа по данным реакции ELISpot. Больные, получавшие аутологичные дендритные клетки, нагруженные опухолевым лизатом клеток линии mel Kog (n=15). ИО — иммунный ответ.

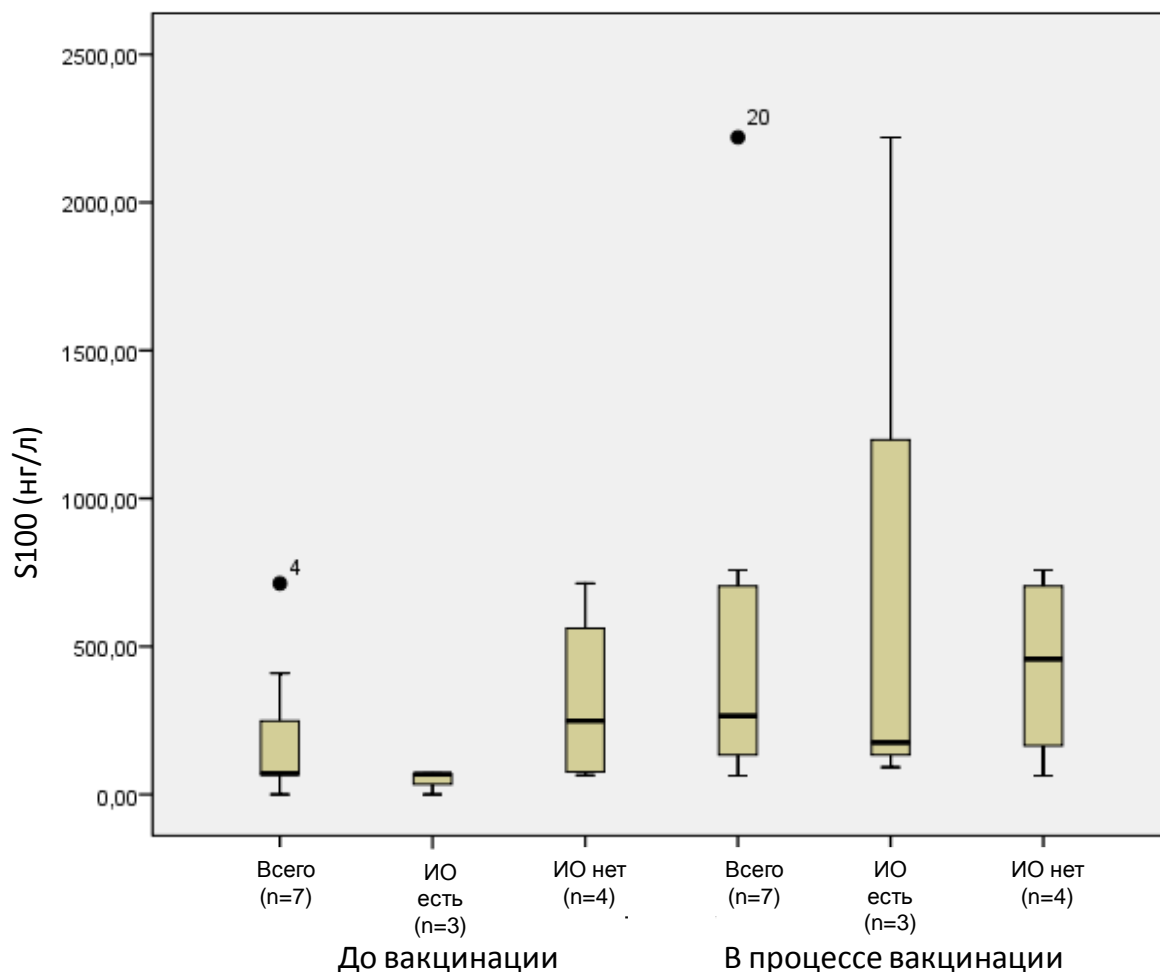


Рисунок 7. Изменение уровня маркера S100 в процессе вакцинации в зависимости от наличия иммунного ответа по данным реакции ELISpot. Больные, получавшие опухолевые клетки линии mel Kog, трансфицированные геном GM-CSF (вакцина «Мелавак», n=7). ИО — иммунный ответ.

У больных, получавших вакцину на основе аутологичных ДК, можно отметить достаточно закономерное явление: частота иммунных ответов была несколько выше среди больных с исходно низким уровнем маркера S100, то есть можно предположить, что вакцинотерапия более эффективна у больных с исходно низкой активностью заболевания. Это наблюдение может иметь большое значение для дальнейших исследований иммунотерапевтических препаратов. Во-первых, этот факт свидетельствует о перспективности исследования методов иммунотерапии в адьювантном режиме и у больных на ранних стадиях злокачественных новообразований. Во-вторых, уровень белка S100 может использоваться как возможный фактор, предсказывающий эффективность иммунотерапии.

Заключение

В заключение можно отметить, что метод ELISpot — удобный способ оценки иммунного ответа у онкологических больных, получающих иммунотерапевтические препараты. Даже у больных с поздними стадиями злокачественных новообразований он позволяет выявить изменения в числе иммунореактивных клеток. Результаты исследования согласуются с другими иммунологическими показателями, отражающими общую иммунореактивность организма и опухолевую нагрузку, но, в отличие от них, дают также представление о развитии опухолеспецифических реакций.

Отличительной особенностью метода является его относительная простота, объективность, позволяющая получать воспроизводимые результаты, и удобство применения в рамках клинических исследований, когда количество исследуемого материала ограничено.

Значительной проблемой остается отсутствие единых стандартов проведения исследований с помощью метода ELISpot, не позволяющее сравнивать между собой результаты разных авторов. В клинических исследованиях противоопухолевых вакцин на основе ДК и гм-ОПК метод ELISpot является ценным инструментом оценки даже самых минимальных изменений в числе и функциональной активности опухолеспецифических иммунных клеток.

ВЫВОДЫ

1. В результате проведенной работы метод ELISpot был успешно адаптирована и внедрена для оценки иммунного ответа у больных, получающих противоопухолевую вакцинотерапию.
2. Исследование *in vitro* показало статистически значимую активацию мононуклеарных клеток периферической крови (увеличение числа ИФН- γ -продуцирующих лейкоцитов) в ответ на стимуляцию аутологичными дендритными клетками, нагруженными опухолевым лизатом, и дендритомами.
3. Исследование иммунного ответа методом ELISpot у больных меланомой кожи, получавших противоопухолевую вакцинотерапию, выявило активацию мононуклеарных клеток периферической крови у 30–40% больных (в зависимости от типа вакцины).
4. Связи между развитием иммунного ответа и временем до прогрессирования не выявлено; однако, отмечена статистически значимая связь между иммунным ответом и реакцией гиперчувствительности замедленного типа.
5. Выявлено увеличение частоты иммунного ответа у больных с низким уровнем опухолевого маркера S100 (то есть с наименьшей опухолевой нагрузкой) и значительное увеличение уровня S100 на протяжении вакцинации у больных без иммунного ответа, что может служить критерием для отбора кандидатов на проведение иммунотерапии.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Смирнова, А.В. Исследование роли экспрессии молекул HLA I и II классов в активации лимфоцитов / А.В. Смирнова, М.И. Лукашина, И.Н. Михайлова, Л.В. Демидов, Е.В. Огородникова, Л.Ю. Арустумян, К.Д. Никитин, А.Ю. Барышников // Российский биотерапевтический журнал. — 2006. — № 4. — С. 8–14.
2. Никитин, К.Д. Комбинированная терапия меланомы с использованием дендритноклеточных вакцин и гипертермии / К.Д. Никитин // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. — 2006. — Т. 5, №4. — С. 16.
3. Никитин, К.Д. Комбинация противоопухолевой вакцины на основе дендритных клеток и локальной гипертермии для терапии злокачественных новообразований / К.Д. Никитин, А.М. Козлов, М.И. Лукашина, А.В. Смирнова, А.Ю. Барышников // Российский биотерапевтический журнал. — 2007, № 1. — С. 61.
4. Никитин, К.Д. Противоопухолевые вакцины на основе белков теплового шока (обзор литературы) / К.Д. Никитин, А.Ю. Барышников // Российский биотерапевтический журнал. — 2007, № 2. — С. 3–12.
5. Nikitin, K.D. Study of hyperthermia-induced changes in dendritic cells immunophenotype (preliminary results) / K.D. Nikitin // Materials of IX international conference of young oncologists “Current problems of experimental and clinical oncology”, Kiev, Ukraine. — 2008. — P. 122.
6. Никитин, К.Д. Белки теплового шока — биологические функции и перспективы применения / К.Д. Никитин // Клиническая онкогематология. — 2008. — Т. 1, №2. — С. 125–130.
7. Барышников, А.Ю. Сравнительное исследование иммуногенности противоопухолевых вакцин на основе дендритных клеток и дендритом *in vitro* / А.Ю. Барышников, К.Д. Никитин, А.Н. Никифорова, М.В. Рубцова // Аллергология и иммунология. — 2009. — Т. 10, №3. — С. 361–363.
8. Бармашов, А.Е. Оценка специфического противоопухолевого иммунитета методом ELISpot у больных, получающих вакцину «Мелавак» / А.Е. Бармашов, К.Д. Никитин, И.Н. Михайлова, Л.Ф. Морозова, А.Н. Иншаков, К.А. Барышников, Л.В. Демидов, А.Ю. Барышников // Российский биотерапевтический журнал. — 2010. — №3(9). — С. 37–40.
9. Никитин, К.Д. Метод ELISpot для оценки иммунного ответа у больных, получающих противоопухолевую вакцину на основе дендритных клеток /

К.Д. Никитин, И.Н. Михайлова, Н.Н. Петенко, И.А. Утяшев, К. А. Парсункова, М.А. Рубцова, Г.З. Чкадуа, К.А. Барышников, Л.В. Демидов, А.Ю. Барышников // Российский биотерапевтический журнал. — 2010, №4. — С.55–60.

10. Никитин, К.Д. Противоопухолевые вакцины на основе дендритом / К.Д. Никитин, М.А. Рубцова, И.А. Утяшев, А.Ю. Барышников // Российский Онкологический журнал. — 2010, №2. — С. 48–53.