

И.В. Савкин, Э.А. Кашченко, Г.В. Селедцова

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ИММУНОРЕАКТИВНОСТЬ
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОПУХОЛЕВОМ ПРОЦЕССЕ

НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)

Иммунизация организма ксеногенными тканевыми антигенами способна прерывать врожденную иммунологическую толерантность, препятствующую развитию иммунных реакций к их аутологичным аналогам. Известно, что значительная часть общих опухолеассоциированных антигенов относятся к классу дифференцировочных антигенов, и в норме экспрессируются на клетках многих органов, в том числе и яичка. Так, противораковая вакцина на основе лизированных клеток сперматогенного эпителия яичка барана обладает заметным протективным эффектом в эксперименте.

В ходе данной работы мы решили исследовать иммунологические аспекты вакцинации тестикулярным антигеном, приводящие к увеличению продолжительности жизни мышей-опухоленосителей. В результате работы было установлено, что вакцинация мышей-опухоленосителей тестикулярным антигеном помимо увеличения продолжительности жизни вызывает заметный прирост субпопуляций хелперных и регуляторных клеток памяти, стимулирует выход нейтрофилов в кровоток и усиливает нейтрофильный инфильтрат опухоли.

Ключевые слова: опухоль, вакцина, клетки памяти, нейтрофилы

SPECIFIC AND NONSPECIFIC IMMUNOREACTIVITY
AT THE EXPERIMENTAL TUMOR PROCESS

I.V. Savkin, E.A. Kaschenko, G.V. Seledtsova

Research Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk

Immunization with xenogeneous tissue antigens is able to interrupt innate immune tolerance interfering immune response to autologous analogues. The main part of the differentiation antigens is known to be normally expressed on the surface of numerous organs cells including testis. Thus, anticancer vaccine based on sheep testis spermatogenic epithelium lysed cells reveals notable protective effect in experiment.

In this work we decided to investigate immunological aspects of the vaccination resulting in tumor mice lifetime increase. Following, testicular antigen vaccination of the tumor mice is established in addition to the lifetime increase to cause substantial helper and regulatory cells subpopulation increase, to stimulate neutrophil release and to intensify tumor neutrophil infiltrate.

Key words: tumor, vaccine, memory cell, neutrophil

Многочисленными исследованиями показано, что иммунизация организма ксеногенными тканевыми антигенами способна прерывать врожденную иммунологическую толерантность, препятствующую развитию иммунных реакций к их аутологичным аналогам [4, 7, 8]. Ранее нами показано, что средняя продолжительность жизни мышей с меланомой B16, иммунизированных ксеногенной вакциной, состоящей из лизированных опухолевых клеток человеческой меланомы BRO, достоверно увеличивается по сравнению с продолжительностью жизни мышей, иммунизированных сингенной (меланома B16) вакциной [1]. Этот эффект связан с наличием на клетках опухолей опухолеассоциированных антигенов различного происхождения, на которые направлена индукция эффективного специфического противоопухолевого ответа. Известно, что значительная часть общих опухолеассоциированных антигенов (Mage, Vage и др.) относятся к классу дифференцировочных антигенов, и в норме экспрессируются на клетках многих органов, в том числе и яичка. Нами было показано, что противораковая вакцина на основе лизированных клеток сперматогенного эпителия яичка барана обла-

дает заметным протективным эффектом в эксперименте [2]. В ходе данной работы мы решили детализировать иммунологические корреляты вакцинации тестикулярным антигеном, приводящие к увеличению продолжительности жизни мышей-опухоленосителей.

Ксеновакцинам, как и многим другим полиантигенным препаратам, часто приписывают как специфические, так и неспецифические механизмы действия. Так достоверно установлен факт выработки специфических цитотоксических клеток памяти, в ответ на стимуляцию опухолевыми полиантигенами [4, 6, 9, 11]. Однако не последнюю роль в ответе на опухоль играют и нейтрофилы [3, 5, 10]. Нейтрофилы проявляют как противоопухолевые неспецифическую, опосредованную различными активными формами кислорода и азота, и цитотоксическую активность, так и иммуносупрессорную, вероятно, связанную также с продукцией активного кислорода [3, 10].

Нами выполнена экспериментальная работа, задачей которой было исследование особенностей лимфоцитарного и нейтрофильного ответов на вакцинацию тестикулярным антигеном мышей-опухоленосителей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Для индукции опухолевого роста клетки меланомы B16 (5×10^5 клеток/мышь) имплантировали под кожу передней брюшной стенки мышей. На 7–9 сутки после перевивки у всех животных был замечен опухолевый рост. Подкожную вакцинацию проводили трижды, начиная с 3-х суток после инокуляции опухоли с интервалом 7 суток. Одна доза вакцины была эквивалентна 5×10^6 клеток/мышь. Было сформировано 2 группы животных по 25 мышей в каждой. 1 группа (контроль) — мыши с опухолью, без воздействия; 2 группа — мыши с опухолью, получавшие вакцину. Забор крови и селезенки для определения концентрации цитокинов и проведения цитофлуориметрии осуществляли на 21 день после привития опухоли. Забор опухолевой массы осуществляли на 14 и 28 день после привития опухоли. Субпопуляционный состав клеток селезенки и опухолевой массы определяли по следующим маркерам: CD4(CD8)/CD44/CD62L, CD4/CD25/FoxP3 (внутриклеточный), а также по параметрам фронтального и бокового рассеяния.

Животные

Эксперименты проводили на взрослых (4–5 месяцев) апатогенных мышах линии C57BL/6 (B6, H-2^b), полученных из питомника СО РАМН (г. Новосибирск). Мыши содержались в соответствии с правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для научных целей. По окончании эксперимента животных забивали методом цервикальной дислокации с соблюдением «Правил работ с использованием экспериментальных животных», утвержденных приказом МЗ России.

Культивирование опухолевых клеток

Клетки опухолевой линии меланомы мыши B16 (H-2b) были получены из Онкологического научного центра РАМН (г. Москва). Опухолевые клетки сохраняли пассированием *in vitro* в пластиковых флаконах («Costar», США) в среде RPMI 1640, содержащей 5 mM HEPES, 2 mM L-глутамин и антибиотики (Sigma, США), а также 10% инaktivированной фетальной сыворотки крупного рогатого скота («Gibco» BRL, США) в атмосфере с 5% CO₂, при 37 °C.

Приготовление вакцины

В качестве вакцинального антигена использовали клетки сперматогенного эпителия яичка барана, подвергнутые многократному замораживанию и оттаиванию с последующей лиофилизацией (тестикулярный антиген) в вакуумной сушке (VIRTIS, USA) при $t = -80^\circ$ в течение 4–6 часов, полученный препарат далее использовали в качестве вакцины в дозе, эквивалентной 5×10^6 клеток/мышь.

Получение клеточных суспензий и проточная цитофлуориметрия

Суспензии клеток селезенки и опухолевой массы получали посредством мягкого выдавливания клеток из тканевых кусочков в охлажденную среду с использованием стеклянного гомогенизатора. После осаждения недиссоциированных клеточных

конгломератов, клетки отмывали средой RPMI 1640. Определение количества клеток в суспензии проводился в камере Горяева. Окраску клеток для цитофлуориметрии проводили стандартно с использованием меченых антител (BD Bioscience, USA), в соответствии с указаниями фирмы-производителя. В работе были использованы меченые антитела: antiCD4-FITC, antiCD8-FITC, antiCD44-PE, antiCD62L-APC, antiCD25-PE, antiFoxP3-APC.

Определение концентрации цитокинов в культуральной жидкости

Уровень цитокинов (ИФН- γ , ИЛ-4, ИЛ-10) был оценен в культуральных супернатантах спленоцитов нестимулированных и стимулированных меланомным антигеном (в течение 36 часов), которые затем хранились при температуре -18°C . Определение концентрации цитокинов проводили стандартно с помощью иммуноферментных тест-систем (BioSource, Intrenational, Inc. USA) в соответствии с указаниями фирмы-производителя.

Гистологическое исследование опухолевых образцов

Фрагменты опухоли, размером не более $5 \times 5 \times 5$ мм забирали на 21-е сутки после привития и фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина не менее 24 часов, обезживали в серии этанола возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в парафин. Для гистологического исследования срезы опухоли толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Препараты исследовали на световом микроскопе «Triton» (Seti, Бельгия) при увеличении X 600.

Статистика

Для всех выборок рассчитывали параметры среднего и ошибки среднего для нормального распределения. Сравнение выборок осуществляли на основе рангового критерия Манна — Уитни. Обработку данных по выживаемости проводили с использованием критерия Каплана-Мейера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Вакцинация меланомных мышей тестикулярным антигеном приводит к статистически значимому ($p = 0,003$) увеличению средней продолжительности жизни на 22 % по сравнению с контролем (33 и 27 суток соответственно). Эти данные указывают на то, что иммунизация препаратами низкодифференцированных ксеногенных клеток может запускать иммунологические процессы, направленные на сдерживание опухолевого роста.

В результате вакцинации (табл. 1) в клетках селезенки статистически достоверно увеличилась доля центральных хелперных Т-клеток памяти (CD4 + /CD44 + /CD62L +) до 67,7 % и периферических цитотоксических Т-клеток памяти (CD8 + /CD44 + /CD62L-) до 8,3 %, что свидетельствует о формировании долгосрочных Т-клеточных реакций, связанных с Т-клетками памяти у мышей-опухоленосителей, иммунизированных тестикулярным антигеном. В этой же системе наблюдался прирост индуцибельных (CD4 + /CD25 + /FoxP3 +) регуляторных Т-клеток. Помимо стимуляции лим-

фоцитарного звена вакцинация вызывала также значительный рост концентрации нейтрофилов в кровяном русле, что свидетельствует о комплексном ответе на вакцину, включающем как специфические, так и неспецифические звенья иммунитета.

Таблица 1
Субпопуляционная структура лимфоцитарной фракции спленоцитов опухолевых мышей, не получавших (контрольная группа) и получавших (вакцинированная группа) вакцину

Субпопуляция лимфоцитов (%)	Контрольная группа	Вакцинированная группа
CD4+	35,53 ± 1,06	23,42 ± 0,85*
CD4+/CD44+/CD62L+, (% от CD4+)	2,32 ± 1,03	67,70 ± 2,54*
CD4+/CD44+/CD62L-, (% от CD4+)	0,06 ± 0,26	8,31 ± 1,21*
CD8+	41,07 ± 2,53	25,71 ± 1,62*
CD8+/CD44+/CD62L+, (% от CD8+)	0,01 ± 0,05	2,53 ± 0,05*
CD8+/CD44+/CD62L-, (% от CD8+)	0,06 ± 0,08	24,03 ± 0,56*
CD4+	35,53 ± 1,06	23,42 ± 0,85*
CD4+/CD25+/FoxP3+, (% от CD4+)	0,00	4,61 ± 0,65*
Нейтрофилы, %	6,10 ± 1,23	17,70 ± 2,05*

Примечание: * – достоверное различие между контрольной и вакцинированной группами, уровень значимости $p < 0,05$.

Цитофлуориметрический анализ гомогената опухолевой массы по параметрам фронтального и бокового рассеяния показал динамику клеточных популяций, инфильтрирующих ткань опухоли. Обнаружено, через две недели после привития опухоли в обеих группах опытных животных опухоль заметно инфильтрирована лимфоцитами, однако к концу четвертой недели лимфоциты из опухоли практически полностью элиминируются.

Ксеновакцинация резко усиливала способность спленоцитов продуцировать ИФН-гамма

в ответ на воздействие меланомным антигеном (табл. 2).

Таблица 2
Концентрации ИФН-γ и ИЛ-10 в сыворотках крови и супернатантах, нестимулированных и стимулированных антигеном мышинной меланомы, спленоцитов опухолевых мышей, не получавших (контрольная группа) и получавших (вакцинированная группа) вакцину

Цитокины	Контрольная группа, пг/мл	Вакцинированная группа, пг/мл
ИФН-γ, супернатант, пг/мл	760 ± 78	976 ± 186
ИЛ-10, супернатант, пг/мл	79 ± 23	52 ± 20
ИФН-γ, супернатант стимулированных спленоцитов, пг/мл	21 ± 5	789 ± 46*
ИЛ-10, супернатант стимулированных спленоцитов, пг/мл	0	0

Примечание: * – достоверное отличие между контрольной и вакцинированной группами, уровень значимости $p < 0,05$.

Оптическая микроскопия (рис. 1) показала выраженную инфильтрацию опухоли нейтрофилами на поздних стадиях и практически полное отсутствие лимфоцитов, что согласуется с данными цитофлуориметрии и подтверждает активное участие в процессе нейтрофилов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из представленных в работе данных следует, что вакцинация тестикулярным антигеном достоверно увеличивает продолжительность жизни мышей-опухоленосителей. Протективность вакцины, вероятно, обеспечивается целым рядом факторов. На начальных стадиях ведущую роль играют цитотоксические лимфоциты, специфичные к перекрестным антигенам низкодифференцированных клеток. Активный специфический иммунный противоопухолевый ответ сопровождается форми-

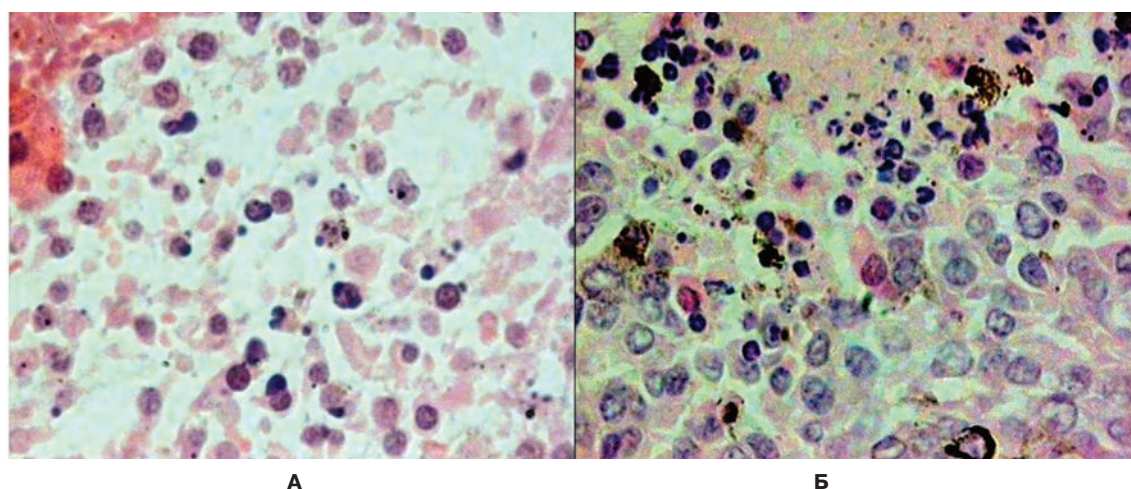


Рис. 1. А – контрольная группа, единичные лимфоциты, нейтрофилы и моноциты среди клеток опухоли. Б – вакцинированная группа, большое количество нейтрофилов и единичные лимфоциты среди клеток опухоли, признаки апоптоза в клетках меланомы.

рованием Т-клеток памяти различного фенотипа, которые, возможно, оказывают позитивную роль в поддержании долгосрочных противоопухолевых Т-клеточных реакций. В нашей экспериментальной системе мы обнаружили прирост Т-регуляторных клеток у вакцинированных мышей-опухоленосителей, что, в конечном итоге, не привело к уменьшению продолжительности жизни вакцинированных мышей.

Исследование цитокинового спектра и неспецифического звена иммунитета позволили сделать вывод о важности в противоопухолевой защите не только Т-клеточных, но и неспецифических гранулоцитарных иммунных реакций. На последних стадиях развития опухоли на передний план выступает гранулоцитарный сегмент иммунной системы, а именно нейтрофилы, не подверженный непосредственно действию регуляторных клеток. Механизмы рекрутмента нейтрофилов в опухолевый очаг нами в полной мере не изучен, однако, возможно существование нескольких механизмов. Так, на начальных стадиях, активация Т-лимфоцитов, очевидно вызывает продукцию макрофагами ИЛ-8, основного хемоаттрактанта нейтрофилов, что увеличивает локальную концентрацию нейтрофилов в очаге процесса.

На поздних стадиях, продукция ИЛ-8, уже не может служить основным механизмом привлечения нейтрофилов, так как лимфоциты в опухолевой массе практически отсутствуют. Тем не менее, нейтрофильный инфильтрат опухоли сохраняется, что возможно является следствием В-клеточного ответа на опухоль. Нейтрофилы, имея рецепторы к Fc-фрагменту иммуноглобулинов, очевидно, обладают повышенной тропностью к тканям, связывающим сывороточные иммуноглобулины. Следовательно, на поздних стадиях процесса, акцент смещается с ИЛ-8-опосредованного хемотаксиса на антигелозависимую цитотоксичность. Косвенным подтверждением наличия В-клеточного ответа на опухоль может служить как раз повышение концентрации нейтрофилов в кровотоке. Активация В-клеточного звена всегда сопровождается усиленным созреванием и выходом в кровоток большого числа нейтрофилов.

В итоге можно сказать, что вакцинация мышей-опухоленосителей тестикулярным антигеном барана приводит к существенному увеличению продолжительности жизни. Что в свою очередь обусловлено как непосредственно специфическим ответом на перекрестные антигены, так и локальной активацией нейтрофилов.

Сведения об авторах

Савкин Иван Владимирович – научный сотрудник лаборатории клеточных биотехнологий ФГБУ «НИИ Клинической иммунологии» СО РАМН (630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14)

Кащенко Эрика Александровна – ФГБУ НИИ Клинической Иммунологии СО РАМН (630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14)

Селедцова Галина Викторовна – заведующая лабораторией клеточных биотехнологий ФГБУ «НИИ клинической иммунологии СО РАМН», доктор медицинских наук (630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14)

ЛИТЕРАТУРА

1. Кащенко Э.А., Белогородцев С.Н., Селедцова Г.В. и др. Ксеновакциноterapia меланомы в эксперименте // Сибир. онколог. журн. — 2009. — № 1. — С. 28–31.
2. Кащенко Э.А., Савкин И.В., Белогородцев С.Н., Селедцов Д.В. Влияние вакцины на основе ксеногенных дифференцировочных антигенов на иммунологические показатели и выживаемость мышей-носителей меланомы. // Вестн. Уральской мед. академ. науки: темат. вып. по аллергологии и иммунологии. — 2011. — № 2/2. — С. 31–32.
3. Мальцева В.Н., Сафронова В.Г. Неоднозначность роли нейтрофила в генезе опухоли // Цитология. — 2009. — Т. 51, № 6. — С. 467–474.
4. Москалева Е.Ю., Родина А.В., Гукасова Н.В. Индукция меланомспецифического клеточного иммунного ответа у мышей после ксеногенной вакцинации клетками меланомы человека, введенными в предварительно имплантированный под кожу полиакриламидный гель // Иммунология. — 2006. — № 6. — С. 329–336.
5. Побезинский Л.А., Побезинская Е.Л., Звездова Е.С. Накопление нейтрофилов в селезенке мышей, иммунизированных клетками аллогенных опухолей // Докл. АН. — 2005. — Т. 402, № 3. — С. 421–426.
6. Побезинская Е.Л., Побезинский Л.А., Силаева Ю.Ю. Кросс-реактивность Т-клеточного рецептора клон клеток памяти CD8⁺, полученного в ответе на иммунизацию клетками аллогенной опухоли // Бюл. эксперимент. биологии и медицины. — 2004. — Т. 137, № 5. — С. 563–568.
7. Селедцов В.И., Фельде М.А., Самарин Д.М. Иммунологические и клинические аспекты применения ксеновакцинотерапии в лечении меланомы // Рос. онколог. журн. — 2006. — № 4. — С. 23–29.
8. Фельде М.А., Самарин Д.М., Ницца Н.А. Оценка клеточной иммунореактивности при ксеновакцинотерапии пациентов с IV стадией колоректального рака // Мед. иммунология. — 2006. — № 1. — С. 67–72.
9. Graf N., Adam C., Mocikat R. Persistence of xenogenized vaccine cells in vivo // International journal of cancer. — 2003. — Vol. 105. — P. 217–220.
10. Gregory A.D., McGarry Houghton A. Tumor-associated neutrophils: new target for cancer therapy // Cancer research. — 2011. — Vol. 71, N 7. — P. 1–6.
11. Luo F., Wei Y., Kan B. Anti-tumor immune response against mouse melanoma to xenogeneic vaccination // Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. — 2001. — Vol. 23. — P. 118–121.