

Винахід відноситься до експериментальної медицини, а саме до імунології.

Дендритні клітини (ДК) представляють собою єдину систему морфологічно та функціонально відмінних клітинних популяцій, що формуються з різних гемопоетичних попередників та локалізуються в ряді органів і тканин. ДК вважаються ключовими індукторами в розвитку протипухлинного імунітету, тому що вони є найефективнішими, з відомих на сьогоднішній день, антигенпрезентуючими клітинами, що здатні надавати імунотенну форму пухлинним антигенам, які самі не здатні викликати розвиток імунної відповіді. Їх унікальною функцією є здатність спрямовано мігрувати в лімфоїдну тканину і індукувати розвиток первинної та вторинної імунної відповіді, підтримувати життєдіяльність та диференціювання Т-лімфоцитів і, що дуже важливо, відмінити їх пухлиноспецифічну супресію (1,2). Тому, специфічна протипухлинна імунотерапія на основі ДК (ДК - вакцинотерапія) є надзвичайно перспективним методом лікування хворих на злоякісні новоутворення.

ДК отримують або з малочисельних CD34⁺ — попередників за допомогою стимуляції їх проліферації цитокінами ГМ-КСФ та ФНО- α або з непроліферуючих попередників CD14⁺ — клітин (моноцитів/макрофагів) периферійної крові при їх стимуляції за допомогою комбінації цитокінів ГМ-КСФ та ІЛ-4 (3,4,5).

Прототипом поданої заявки є робота, в якій автори пропонують метод отримання великої кількості ДК *in vitro* з моноклеарних клітин периферійної крові (Gohe B., Latour N., Chokri M. Simplified method to generate large quantities of dendritic cells suitable for clinical applications. // Immunol. Invest. — 2000. — 29. — № 3. — P. 319-336). За джерело ДК використовуються моноклеарні клітини, виділені з периферійної крові здорових індивідумів методом лейкофезу з наступним збагаченням в градієнті щільності.

Позитивними характеристиками прототипу є:

- використання моноклеарів периферійної крові в якості джерела ДК;
- збагачення отриманих суспензій моноклеарів в градієнті щільності;
- використання безсироваткових живильних середовищ для культивування клітин;
- отримання великої кількості зрілих ДК.

До недоліків прототипу можна віднести:

- використання в якості джерела ДК алогенних моноклеарів периферійної крові;
- використання лейкофезу, який вважається складною процедурою, з метою отримання великої кількості цих клітин;
- відсутність аналізу функціональної активності отриманих зрілих ДК.

В основі винаходу поставлена задача розробити спосіб отримання зрілих ДК шляхом застосування в якості їх джерела післяопераційного ексудату хворих на розповсюджений гінекологічний рак, що забезпечить можливість створення специфічної протипухлинної ДК-вакцини для даної групи хворих.

Поставлена задача вирішується наступним чином. Всі маніпуляції проводяться з дотриманням правил асептики. За допомогою дренажної системи отримують післяопераційний ексудат, накопичений протягом 15 годин в черевній порожнині хворих, прооперованих з приводу гінекологічного рака. Надалі, виділення та культивування клітин проводять за загальноприйнятими методами (7). Лейкоцити виділяють шляхом їх осаду центрифугуванням в поліпропіленових пробірках ($V=50$ мл) при 200g протягом 10хв. з наступним гемолізом еритроцитів гемолітичною рідиною (співвідношення осаду клітин: гемолітична рідина — 1:5) протягом 6хв. при t 20-25°C. і дворазовим відмиванням забуференим фізіологічним розчином шляхом центрифугування при 200g протягом 10 хв. З метою попередження створення згустків фібрину перед початком всіх маніпуляцій в ексудат додавали 25Од/мл гепарину ("Біохемі"), Гемолітичну рідину готували таким чином: до 1л дист. води додавали 830мг МНдСІ та 40мл ЕДТА, рН розчину доводили 7% бікарбонатом натрію до 7,2). Клітини ресуспендували в середовищі культивування (середовище RPMI ("Sigma") з 2мМ L-Gly, 100мкг/мл стрептомицину та 100Од/мл пеніциліну) та інкубували в пластиковому флаконі Т25 при 37°C, 5% CO₂ протягом 2-3 годин. Надалі клітини м'яко струнували та видалляли ті, що не прикріпилися, шляхом їх змивання середовищем RPMI (37°C). Концентрацію клітин, що прикріпилися, доводили до $0,5 \times 10^6$ /мл середовищем культивування та додавали 5% аутологічної сироватки, 100ng/ml GM-CSF ("Лейкомакс", "Novartis"). Клітини культивували при 37°C, 5% O₂ протягом 6 діб. На 6 добу культивування додавали лізат аутологічних пухлинних клітин (1mg/ml) у співвідношенні 3:1 (пухлинна клітина : ДК). Після 24 годин інкубації для повного дозрівання ДК додавали 50ng/ml фактору некрозу пухлин а ("Ріфнамін").

Лізат пухлинних клітин отримували наступним чином. Отримували суспензію клітин видаленої оперативним шляхом пухлини, для чого її подрібнювали за допомогою Medimachine, "Becton Dickinson", USA та фільтрували крізь капроновий фільтр. Доводили концентрацію отриманих клітин до 5×10^6 клітин/мл середовищем RPMI ("Sigma") та піддавали 5 циклам заморожування / відтаювання (- 20°C / 37°C). Отриманий лізат центрифугували при 5000g протягом 15хв. Супернатант пропускали крізь стерилізуючий фільтр з діаметром пор 0,2 μ m та зберігали при - 20°C (8).

Отримані ДК клітини підраховували у 0,1% трипановому синьому та фенотипували за допомогою моноклональних антитіл анти CD3, CD20, CD 16, HLA-DR, CD86 з використанням протокового цитофлюориметра FACScan ("Becton Dickinson", USA), що обладнаний аргонним лазером з довжиною хвилі 488нм, з використанням програми Cell Quest для Mac для отримання та аналізу даних. Функціональну активність ДК оцінювали за здатністю самих клітин та їх супернатанта стимулювати проліферацію аутологічних та алогенних лімфоцитів. Для цього 1×10^6 /мл аутологічних лімфоцитів периферійної крові або лімфоцитів здорових донорів, отриманих шляхом центрифугування на градієнті щільності фіколла ($\rho = 1,077$ г/см³), інкубували з ДК у співвідношенні ДК: лімфоцит — 1:100; 1:300; 1:600, або з 0,1 чи 0,01мл супернатанта ДК протягом 3 діб при 37°C в середовищі RPMI ("Sigma") з додаванням 7% фетальної телячої сироватки. За допомогою протокового цитофлюориметра підраховували кількість лімфоцитів, що знаходяться в S + G₂ + M — фазах мітотичного циклу. Для чого лімфоцити фарбували протягом 30 хв. при

22-25°C за допомогою флюорохромного барвника пропідія йодид (5 μm/ml) в 1мл гіпотонічного лізуючого буфера (0,1% цитрат натрію, 0,1% Triton X-100, "Sigma Chemical Co", USA) (9).

Приклади конкретного виконання.

Приклад 1. Хвора О.Г., 39 років. Історія хвороби № 862 від 4.02.03 р. Діагноз: Рак яєчників після комбінованого лікування ст. IV кл. гр. II 5.02.03 р. виконана операція аднексектомія зліва, резекція чепця, протокол № 46.

ПГЗ N2655-9/03 від 24.02.03 р. залозистий рак яєчника після поліхіміотерапії. В досліджених ділянках чепця обширні розростання аналогічної пухлини. ДК отримували з 40мл післяопераційного ексудату з черевної порожнини, отриманого через 15 годин після операції. Всі маніпуляції проводилися з дотриманням правил асептики. Для цього, з ексудату виділяли лейкоцити шляхом їх осаду центрифугуванням в поліпропіленових пробірках (V=50мл) при 200g протягом 10хв. з наступним гемолізом еритроцитів гемолітичною рідиною (співвідношення осаду клітин: гемолітична рідина — 1:5) протягом 6хв. при t 20-25°C і дворазовим відмиванням забуференим фізіологічним розчином шляхом центрифугування при 200g протягом 10хв.

З метою попередження створення згустків фібрину перед початком всіх маніпуляцій в ексудат додавали 250д/мл гепарину ("Біохемі"). Гемолітичну рідину готували таким чином: до 1л дист.води додавали 830мг NHuCl та 40мл EDTA, рН розчину доводили 7% бікарбонатом натрію до 7,2). Клітини ресуспендували в середовищі культивування (середовище RPMI ("Sigma") з 2мМ L-Gly, 100мкг/мл стрептомицину та 1000д/мл пеніциліна) та інкубували в пластиковому флаконі T25 при 37°C, 5% CO₂ протягом 2-3 годин. Надалі клітини м'яко струшували та видаляли ті, що не прикріпилися, шляхом їх змивання середовищем RPMI (37°C). Концентрацію клітин доводили до 0,5x10⁶/мл середовищем культивування та додавали 5% аутологічної сироватки, 100 ng/ml GM-CSF. Клітини культивували при 37°C, 5% CO₂ протягом 6 діб. На 6 добу культивування додавали лізат аутологічних пухлинних клітин (1mg/ml) у співвідношенні 3:1 (пухлинна клітина : ДК). Після 24 годин інкубації для повного дозрівання ДК додавали 50ng/ml фактору некрозу пухлин α ("Ріфнамін").

Лізат пухлинних клітин отримували наступним чином. Отримували суспензію клітини видаленої оперативним шляхом пухлини, для чого її подрібнювали за допомогою Medimachine™, "Becton Dickinson", USA та фільтрували крізь капроновий фільтр. Доводили концентрацію отриманих клітин до 5x10⁶ клітин/мл середовищем RPMI ("Sigma") та піддавали 5 циклам заморожування / відтаювання (-20°C/37°C). Отриманий лізат центрифугували при 5000g протягом 15хв. Супернатант пропускали крізь стерилізуючий фільтр з діаметром пор 0,2 μm та зберігали при -20°C.

Отримані ДК клітини підраховували у 0,1% трипановому синьому та фенотипували за допомогою моноклональних антитіл анти CD3, CD20, CD 16, HLA-DR, CD86 з використанням протокового цитофлюориметра FACScan ("Becton Dickinson", USA), що обладнаний аргонним лазером з довжиною хвилі 488нм, з використанням програми Cell Quest для Мас для отримання та аналізу даних. Функціональну активність ДК оцінювали за здатністю самих клітин та їх супернатанта стимулювати проліферацію аутологічних та алогенних лімфоцитів. Для цього 1x10⁶/мл аутологічних лімфоцитів периферійної крові або лімфоцитів здорових донорів, отриманих шляхом центрифугування на градієнті щільності фіколла (ρ = 1,077 г/см³), інкубували з ДК у співвідношенні ДК: лімфоцит — 1:100; 1:300; 1:600, або з 0,1 чи 0,01мл супернатанта ДК протягом 3 діб при 37°C в середовищі RPMI ("Sigma") з додаванням 7% фетальної телячої сироватки. За допомогою протокового цитофлюориметра підраховували кількість лімфоцитів, що знаходяться в S + G₂ + M — фазах мітотичного циклу. Для чого лімфоцити фарбували протягом 30хв. при 22-25°C за допомогою флюорохромного барвника пропідія йодид (5 цп/ті) в 1 мл гіпотонічного лізуючого буфера (0,1% цитрат натрію, 0,1% Triton X-100, "Sigma Chemical Co", USA).

Із 40мл післяопераційного ексудату було отримано 2x10⁷ лейкоцитів. Загальний вихід зрілих функціонально активних ДК, що експресують високі рівні HLA-DR та CD86 та стимулюють проліферацію аутологічних та алогенних лімфоцитів, склав 11,2x10⁶.

Приклад 2. Хвора Г.Н., 49 років. Історія хвороби N 1133 від 14.02.03 р. Діагноз: Рак яєчників після комплексного лікування ст. III кл. р. II.

Прогресування захворювання

24.02.03 р. виконана операція лапаротомія, роз'єднання спайок, відкрита біопсія пухлини, протокол N 114. ПГЗ N 4217-18/2003 від 28.02.03 р. в дослідженому матеріалі розростання залозисто-папілярного раку з наявністю псаммомних тілець.

ДК отримували з 200мл післяопераційного ексудату з черевної порожнини, отриманого через 15 годин після операції. Всі маніпуляції проводилися з дотриманням правил асептики. Для цього, з ексудату виділяли лейкоцити шляхом їх осаду центрифугуванням в поліпропіленових пробірках (V=50мл) при 200g протягом 10хв. з наступним гемолізом еритроцитів гемолітичною рідиною (співвідношення осаду клітин: гемолітична рідина — 1:5) протягом 6хв. при t 20-25°C. і дворазовим відмиванням забуференим фізіологічним розчином шляхом центрифугування при 200 g протягом 10 хв.

З метою попередження створення згустків фібрину перед початком всіх маніпуляцій в ексудат додавали 250д/мл гепарину ("Біохемі"). Гемолітичну рідину готували таким чином: до 1л дист. води додавали 830мг NHuCl та 40мл EDTA, рН розчину доводили 7% бікарбонатом натрію до 7,2). Клітини ресуспендували в середовищі культивування (середовище RPMI ("Sigma") з 2мМ L-Gly, 100мкг/мл стрептомицину та 1000д/мл пеніциліна) та інкубували в пластиковому флаконі T25 при 37°C, 5 % CO₂ протягом 2-3 годин. Надалі клітини м'яко струшували та видаляли ті, що не прикріпилися, шляхом їх змивання середовищем RPMI (37°C). Концентрацію клітин доводили до 0,5x10⁶/мл середовищем культивування та додавали 5% аутологічної сироватки, 100ng/ml GM-CSF. Клітини культивували при 37°C, 5% CO₂ протягом 6 діб. На 6 добу культивування додавали лізат аутологічних пухлинних клітин (1mg/ml) у співвідношенні 3:1 (пухлинна клітина : ДК).

Після 24 годин інкубації для повного дозрівання ДК додавали 50ng/ml фактору некрозу пухлин α ("Ріфнамін").

Лізат пухлинних клітин отримували наступним чином. Отримували суспензію клітини видаленої оперативним шляхом пухлини, для чого її подрібнювали за допомогою Medimachine™, "Becton Dickinson" USA та фільтрували крізь капроновий фільтр. Доводили концентрацію отриманих клітин до 5×10^6 клітин/мл середовищем RPMI ("Sigma") та піддавали 5 циклам заморожування / відтаювання ($-20^\circ\text{C}/37^\circ\text{C}$). Отриманий лізат центрифугували при 5000g протягом 15хв. Супернатант пропускали крізь стерилізуючий фільтр з діаметром пор 0,2 μm та зберігали при -20°C .

Отримані ДК клітини підраховували у 0,1% трипановому синьому та фенотипували за допомогою моноклональних антитіл анти CD3, CD20, CD 16, HLA-DR, CD86 з використанням протокового цитофлюориметра FACScan ("Becton Dickinson", USA), що обладнаний аргонним лазером з довжиною хвилі 488 нм, з використанням програми Cell Quest для Mac для отримання та аналізу даних. Функціональну активність ДК оцінювали за здатністю самих клітин та їх супернатанта стимулювати проліферацію аутологічних та алогенних лімфоцитів. Для цього 1×10^6 /мл аутологічних лімфоцитів периферійної крові або лімфоцитів здорових донорів, отриманих шляхом центрифугування на градієнті щільності фіколла ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$), інкубували з ДК у співвідношенні ДК: лімфоцит — 1:100; 1:300-1:600, або з 0,1 чи 0,01мл супернатанта ДК протягом 3 діб при 37°C в середовищі RPMI ("Sigma") з додаванням 7% фетальної телячої сироватки. За допомогою цитофлюориметра підраховували кількість лімфоцитів, що знаходяться в S+G₂+M — фазах мітотичного циклу. Для чого лімфоцити фарбували протягом 30хв. при $22-25^\circ\text{C}$ за допомогою флюорохромного барвника пропідія йодид ($5 \mu\text{m}/\text{ml}$) в 1мл гіпотонічного лізуючого буфера (0,1% цитрат натрію, 0,1% Triton X-100, "Sigma Chemical Co", USA).

Із 200мл післяопераційного ексудату було отримано 2×10^7 клітин. Загальний вихід зрілих функціонально активних ДК, що експресують високі рівні HLA-DR та CD86 та стимулюють проліферацію аутологічних та алогенних лімфоцитів, склав 10×10^6 .

Післяопераційний ексудат містить велику кількість моноцитів/макрофагів, які є попередниками ДК. Тому, запропонований спосіб отримання зрілих функціонально активних ДК є доступніший та більш дешевший, ніж існуючі. До того ж, даний спосіб дозволяє уникнути складної процедури лейкофезу, яка має ряд вагомих протипоказань у онкологічних хворих.

Джерела інформації

1. Gacgues Banchereau and Ralph M. Steinman. Dendritic cells and the control of immunity. //Nature. — 1988. — № 392. — P. 245-252.
2. Mailliard R.B., Lotze M.T. Dendritic cells prolong tumor-specific T-cell survival and effector function after interaction with tumor targets. // Clin Cancer Res. — 2001. — 7(3 Suppl.). — P. 980-988.
3. Pullarkat V., Lau R., Lee SM, Bender JG., Weber JS. Large-scale monocyte enrichment coupled with a closed culture system for the generation of human dendritic cells. //J Immunol Methods. — 2002. — 267(2). — P. 173 — 183.
4. Yoshida S., Morii K., Watanabe M., Saito T., Yamamoto K., Tanaka R. The 'generation of anti-tumoral cells using dendritic cells from the peripheral blood of patients with malignant brain tumors. //Cancer Immunol Immunother. — 2001. — 50(6). — P.321-327.
5. Ferrero E., Bondanza A., Leone BE., Manici S., Poggi A., Zocchi MR. CD14⁺ CD34⁺ peripheral blood mononuclear cells migrate across endothelium and give rise to immunostimulatory dendritic cells. //J Immunol.-1998.-160,N6.-P.2675-2683.
6. Goxe B., Latour N., Chokri M. Simplified method to generate large quantities of dendritic cells suitable for clinical applications. // Immunol. Invest. — 2000. — 29. — №3. — P. 319 - 336 (прототип).
7. Лимфоциты. Методы. Под ред. Клауса Дж. — Москва:Мир. — 1990. — 393 с.
8. Toshiro Kurokawa, Mathias Oeike and Andreas Machensen. Induction and clonal expansion of tumor-specific cytotoxic T - lymphocytes from renal cell carcinoma patients after stimulation with autologous dendritic cells loaded with tumor cells. // Int. Journal of Cancer. — 2001. — V.9L — N 6. — P. 749 — 756.
9. I.Nicoletti, G.Migliorati, M.C.Pagliacci, F.Grignani and C.Riccardi. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. // J. of Immunological Methods. — 1991. — 139. — P. 271-279.