

Для цитирования: Фатева, Е.А. Опыт оценки безопасности применения клеточной иммунотерапии на основе ЛАК для лечения онкологических заболеваний собак/Е.А. Фатева, Е.А. Корнюшенков, Д.Е. Митрушкин, Д.В. Гаранин, А.Л. Кузнецова, М.В. Родионов, М.В. Киселевский, Н.Ю. Анисимова // Российский ветеринарный журнал. — 2019. — № 3. — С. 13–23. DOI:10.32416/article_5d10c406226e76.51462383

For citation: Fateeva E. A., Korniyushenkov E. A., Mitrushkin D. E., Garanin D. V., Kuznetsova A. L., Rodionov M. V., Kiselevskiy M. V., Anisimova N. Y., Experience of the safety evaluation of the cellular immunotherapy application on basis LAC for canine oncological diseases treatment, Russian veterinary journal (Rossijskij veterinarnyj zhurnal), 2019, No. 3, pp. 13–23. DOI: 10.32416/article_5d10c406226e76.51462383

УДК 619: 616-006: 615.37

Опыт оценки безопасности применения клеточной иммунотерапии на основе ЛАК для лечения онкологических заболеваний собак

Е.А. Фатева^{1,2}, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник Клиники экспериментальной терапии, руководитель отделения реабилитации ветеринарной клиники «Биоконтроль» (katarina-vet@mail.ru), **Е.А. Корнюшенков**^{1,2}, кандидат биологических наук, заведующий Клиникой экспериментальной терапии, главный врач ветеринарной клиники «Биоконтроль» (evg-korniyushenkov@yandex.ru), **Д.Е. Митрушкин**^{1,2}, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Клиники экспериментальной терапии, врач-патоморфолог ветеринарной клиники «Биоконтроль» (89035718861@mail.ru), **Д.В. Гаранин**², кандидат биологических наук, ведущий хирург ветеринарной клиники «Биоконтроль» (dmi-garanin@yandex.ru), **А.Л. Кузнецова**^{1,2}, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Клиники экспериментальной терапии, врач-онколог ветеринарной клиники «Биоконтроль» (kuzma22@list.ru), **М.В. Родионов**^{1,2}, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник Клиники экспериментальной терапии, врач-радиолог ветеринарной клиники «Биоконтроль» (mvrodionov@inbox.ru), **М.В. Киселевский**³, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией клеточного иммунитета НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (kisele@inbox.ru), **Н.Ю. Анисимова**³, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточного иммунитета НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (n.u.anisimova@gmail.com).

¹ Клиника экспериментальной терапии НИИ клинической онкологии Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (115478 Москва, Каширское шоссе, д. 23).

² Ветеринарная клиника «Биоконтроль» (115478 Москва, Каширское шоссе, д. 24, стр. 10).

³ Лаборатория клеточного иммунитета НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (115478 Москва, Каширское шоссе, д. 23).

Цель исследования. Оценить влияние инфузии суспензии ЛАК (моноклеарных лейкоцитов крови, активированных ИЛ-2 ex vivo) на клинические, биохимические, гематологические и иммунологические показатели здоровой собаки породы бигль, чтобы сделать вывод о безопасности применения данного продукта клеточных технологий.

Материалы и методы. Объект исследования — собака породы бигль, самец, возраст 6 лет. Суспензию ЛАК в растворе Хенкса в дозе 25 млн клеток в объеме 5 мл вводили внутривенно с малой скоростью. Исследовали аутологичную культуру ЛАК, генерированную из венозной крови собаки. Генерацию культуры и оценку морфологии, фенотипа, активности целевых ЛАК выполняли на базе лаборатории клеточного иммунитета НИИЭДуТО.

Результаты. Анализ гематологических и иммунологических параметров животного в сочетании с результатами рентгенологического исследования не выявил признаков развития каких-либо патологических процессов в организме животного после введения активированных клеток, можно сделать вывод об отсутствии местного или системного токсического воздействия ЛАК в данном количестве.

Выводы. Полученные в ходе проведенного исследования данные представляют интерес и для медицины человека и для ветеринарной медицины, поскольку могут рассматриваться как часть доклинических испытаний готового продукта — суспензии ЛАК, эффективность которой в клинической онкологии человека уже была подтверждена, и как пример оценки безопасности более сложных конструкторов на основе активированных иммунокомпетентных клеток, еще находящихся в стадии разработки. Проведенные исследования могут послужить основой для разработки моделей изучения токсичности средств клеточной противоопухолевой иммунотерапии на основе активированных лейкоцитов (ЛАК, иммунные "checkpointmolecules" и CAR), а также рассматриваться как часть доклинических исследований токсичности ЛАК.

Ключевые слова: собака, ЛАК, иммунотерапия, онкологические заболевания, иммунный ответ.

Experience of the safety evaluation of the cellular immunotherapy application on basis LAC for canine oncological diseases treatment

Е.А. Fateeva^{1,2}, PhD in Veterinary Sc., senior researcher of the Clinic of Experimental Therapy by FBSI "N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology" under the Ministry of Health of the Russian Federation; head of Rehabilitation Department of the veterinary clinic "Biocontrol" (katarina-vet@mail.ru), **Е.А. Korniyushenkov**^{1,2}, PhD in Biology Sc., head of the Clinic of Experimental Therapy by FBSI "N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology" under the Ministry of Health

of the Russian Federation; Head Physician of the veterinary clinic "Biocontrol" (evg-kornyushenkov@yandex.ru),
D.E. Mitrushkin^{1,2}, PhD in Biology Sc., senior researcher of the Clinic of Experimental Therapy by FBSI "N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology" under the Ministry of Health of the Russian Federation; pathologist of the veterinary clinic "Biocontrol" (89035718861@mail.ru), **D.V. Garanin**², PhD in Biology Sc., leading surgeon of the veterinary clinic "Biocontrol" (dmi-garanin@yandex.ru), **A.L. Kuznetsova**^{1,2}, PhD in Biology Sc., senior researcher of the Clinic of Experimental Therapy by FBSI "N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology" under the Ministry of Health of the Russian Federation; oncologist of the veterinary clinic "Biocontrol" (kuzma22@list.ru), **M.V. Rodionov**^{1,2}, PhD in Medical Sc., senior researcher of the Clinic of Experimental Therapy by FBSI "N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology" under the Ministry of Health of the Russian Federation; radiation oncologist of the veterinary clinic "Biocontrol" (mvrodionov@inbox.ru), **M.V. Kiselevskiy**³, D. Sc., PhD in Biology Sc., Professor, head of the Laboratory of Cell Immunity by FBSI "N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology" under the Ministry of Health of the Russian Federation (kisele@inbox.ru), **N.Y. Anisimova**³, D. Sc., PhD in Biology Sc., leading researcher of the Laboratory of Cell Immunity by FBSI "N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology" under the Ministry of Health of the Russian Federation (n.u.anisimova@gmail.com)

¹ Clinic of Experimental Therapy by FBSI "N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology" under the Ministry of Health of the Russian Federation (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478).

² Veterinary Clinic "Biocontrol" (24/10, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478).

³ Laboratory of Cell Immunity by FBSI "N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology" under the Ministry of Health of the Russian Federation (24, Kashirskoye sh., Moscow, 115478).

Purpose of research. To evaluate the effect of LAC (mononuclear blood leukocytes activated by IL-2 ex vivo) suspension infusion on clinical, biochemical, hematological and immunological characteristics of a healthy Beagle dog to assess the safety of the product's application.

Materials and methods. The research object is a 6-year Beagle dog male. The LAC suspension in Hank's solution has been infused intravenously with a low rate of administration; the dose used was 25 m cells in 5 ml. An autologous culture of LAC has been generated from canine blood, evaluated by morphology, phenotype, and target activity in Laboratory of Cell Immunity by FBSI "N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology".

Results. The analysis of hematological, immunological and radiological characteristics of the object has identified no signs of any pathology development. That turns to conclusion that the given LAC medication dose's local, hematological and systemic toxicity is low or absent.

Conclusions. Data received within the research may be of interest to human medicine as well as to veterinary medicine as it could be considered a part of pre-clinical trials of the LAC suspension, which effectiveness has already been confirmed in human clinical oncology, and also as a safety assessment of even more complex constructs based on activated immunocompetent cells that are still under development. The study can serve as a basis for the development of activated leukocytes-based cellular anticancer immunotherapy (LAC, immune checkpoint molecules and SAR), primarily its toxicity studying models, and also be a part of pre-clinical studies of LAC toxicity.

Keywords: dog, LAC, immunotherapy, oncologic diseases, immune response.

Сокращения: ДК — дендритные клетки, ИЛ — интерлейкин, ЛАК — лимфокинактированные киллеры, НК — натуральные киллеры, ППС — полная питательная среда, Т — температура тела, ЧСС — частота сердечных сокращений, ЧД — частота дыхания, МТТ — 3- (4,5-диметилтиазол-2) — 2,5-дифинилтетразолиум бромид.

Введение

В настоящее время клеточная иммунотерапия все чаще используется в клинической практике лечения пациентов с онкологическими заболеваниями. В основе данного подхода лежит выделение из организма донора или самого больного иммунокомпетентных клеток, их культивация ex vivo с целью пролиферации, активации различными биоактивными агентами экзо- и эндогенного происхождения, и, наконец, последующего введения в организм больного. Использование данного подхода позволяет получать различные продукты клеточных технологий; некоторые такие продукты были успешно апробированы в клинической онкологии человека. В частности, для лечения фолликулярной и диффузной неходжкинских лимфом применяют препарат ритуксимаб, который представляет собой химерные моноклональные антитела, специфичные к CD20 — антигену, обнаруживаемому на мембране В-лимфоцитов [1]. В составе комплексного лечения пациентов с меланомой, как в медицине человека, так и в ветеринарной практике, применяется вакцина на основе дендритных клеток, индуцирующая активацию иммунного ответа,

опосредуемого Т-лимфоцитами [2]. Как было показано в серии исследований in vitro и in vivo, ДК способны активировать в организме как неспецифический, опосредуемый НК, так и специфический противоопухолевый иммунный ответ, опосредованный Т-лимфоцитами [3]. В последнее время большие надежды в борьбе с онкологическими заболеваниями связаны с применением специфических антител, таких как PD-1 (от англ. programmed cell death protein 1) и CTLA-1 (от англ. cytotoxic T-lymphocyte — associated antigen 4). Было показано, что применение указанных специфических антител блокирует PD-1 и CTLA-1 — опосредованные сигнальные пути в Т-лимфоцитах, активируя специфический иммунный ответ, обусловленный цитотоксической реактивностью, антиген-презентирующей и цитокин-индуцирующей функциями [4, 5].

Важно помнить, что иммунотерапия наиболее эффективна после процедуры циторедукции и, кроме того, ее успех во многом зависит от качества оперативного вмешательства и/или лучевой терапии. Следует отметить, что применение продуктов клеточных технологий рассматривается как эффективный инновационный подход для лечения в аддитивном режиме пациентов со злокачественными опухолями, осложненными развитием опухолевых серозитов [6]. В частности, имеется значительное число публикаций о положительном опыте применения в клинической практике ЛАК против опухолевых асцитов, плевритов, перикардитов [7].

Вышеизложенное справедливо и для ветеринарной медицины, где высока потребность в новых эффективных иммуностимулирующих средствах борьбы с онкологическими заболеваниями. Известно, что только в США каждый год у 6 миллионов собак регистрируют онкологические заболевания [8, 9]. Однако в настоящее время число публикаций о разработке и оценке новых средств клеточной иммунотерапии с противоопухолевой активностью остается небольшим. При этом обоснованность большинства из предложенных методов противоопухолевой иммунотерапии базируется на экстраполяции результатов, полученных специалистами медицины человека [10]. Было отмечено, что средств иммунотерапии, созданных с помощью клеточных технологий, разработанных и апробированных специально для лечения собак и кошек, пока очень мало. В основном, немногочисленные данные об эффективности применения рассматриваемых инновационных продуктов были получены в ходе тестирования на этих животных разработок, предназначенных для медицины человека. В частности, на собаках были протестированы противоопухолевые вакцины и один из типов генетически модифицированных антигенспецифических Т-клеток [11, 12]. Однако вопросам оценки безопасности для собак разрабатываемых клеточных продуктов внимания было уделено в объеме, недостаточном для формирования картины развития возможных осложнений.

Цель исследования

Оценить влияние инфузии суспензии ЛАК (моноклеарных лейкоцитов крови, активированных ИЛ-2 *ex vivo*) на клинические, биохимические, гематологические и иммунологические показатели здоровой собаки породы бигль, чтобы сделать вывод о безопасности применения данного продукта клеточных технологий, а также о путях коррекции стратегии его применения в клинической ветеринарной практике. Методы генерации и идентификации ЛАК, режим введения и дозировка клеток были определены на основе предварительных исследований [13].

Материалы и методы

Объект исследования — собака породы бигль, самец, возраст 6 лет (рис. 1). Непосредственно перед началом, а также в процессе эксперимента собака содержалась в условиях стационара клиники экспериментальной терапии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России на стандартном рационе, при свободном доступе к воде. Перед началом эксперимента было проведено комплексное исследование физиологических, биохимических и гематологических параметров собаки, которое показало, что животное на момент начала эксперимента находится в удовлетворительном состоянии, все биохимические и гематологические показатели в пределах физиологических норм. У животного были измерены ЧСС, ЧД, Т, систолическое и диастолическое давление, также были оценены показатели клеточного иммунитета (иммунофенотип лейкоцитов крови, НК-активность, фагоцитарная активность клеток крови). Также было проведено рентгенологическое исследование легких. Это позволило установить исходный (базовый) уровень изучаемых параметров.

Суспензию ЛАК в растворе Хенкса в дозе 25 млн клеток в объеме 5 мл вводили внутривенно с малой скоростью. За период введения не было отмечено признаков изменения реактивности, озноба, тремора, саливации, нарушений дыхания, объективных признаков боли, гиперемии конъюнктивы и слизистых покровов полости рта и носа. Затем в течение 5 суток проводили мониторинг физиологических параметров (первые 3 ч — каждые 15 минут, далее — каждые 12...24 часа), иммунологических и гематологических параметров (через 4 ч после введения ЛАК и через 48 ч). Динамику иммунологических параметров животного оценивали на базе лаборатории клеточного иммунитета НИИЭДиТО.

Исследовали аутологичную культуру ЛАК, генерированную из венозной крови собаки. Генерацию культуры и оценку морфологии, фенотипа, активности целевых ЛАК выполняли на базе лаборатории клеточного иммунитета НИИЭДиТО.



Рис. 1. Собака Купер породы бигль, послужившая биологическим объектом данного экспериментального исследования

Fig. 1. The Beagle dog — a biological object of the research

Венозную кровь собаки стабилизировали 3,8%-м раствором цитрата натрия (1,1 мл раствора на 9 мл крови), смешивали с раствором Хенкса (ПанЭко, РФ) 1:1, наслаивали на градиент фикола (плотность 1,077) и центрифугировали 20 мин при 1500 мин⁻¹, 20 °С. Затем собирали клетки на границе фаз и двукратно отмывали их средой RPMI-1640 (ПанЭко, РФ), центрифугируя пробирки при 300g в течение 5 мин. Выделенные лейкоциты суспендировали в ППС на основе RPMI-1640, содержащей 5% фетальной бычьей сыворотки (HyClone Laboratories, Thermo), 2 мМ L-глутамин, 100 мкг/мл пенициллина и 100 мкг/мл сульфата стрептомицина (ПанЭко, Россия).

Морфологию клеток оценивали с помощью световой микроскопии. Клетки подсчитывали в камере Горяева после окрашивания трипановым синим (ПанЭко, РФ). Клеточную суспензию разливали в 3 флакона Nung по 10 мл. В два флакона для генерации ЛАК добавляли препарат рекомбинантного ронколейкина (500 МЕ/мл), третий оставляли без дополнительных добавок в качестве контроля лейкоцитов. Флаконы с клетками культивировали в течение 3 суток в CO₂-инкубаторе NUAir при 37 °С, 5% CO₂.

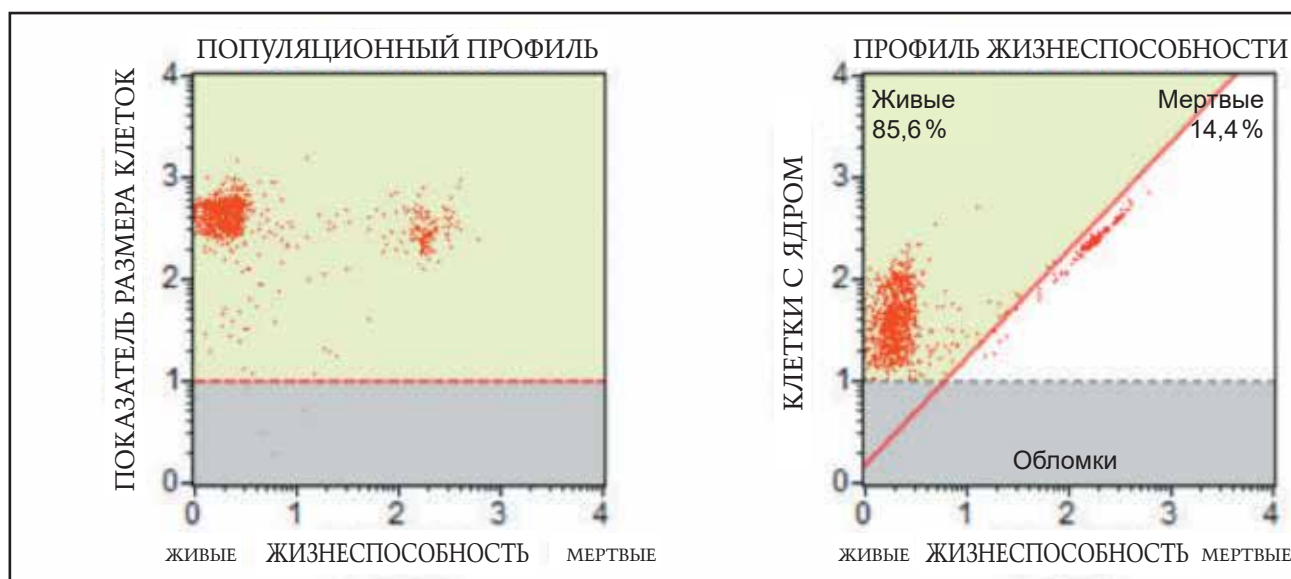


Рис. 2. Результаты определения концентрации живых клеток в культуре лейкоцитов крови через 3 суток после начала инкубации в среде с ИЛ-2.
Fig. 2. Living cells concentration in leukocyte culture after 3 days of incubation in IL-2 environment

По окончании срока инкубации клетки отмывали от ростовой среды центрифугированием в течение 5 минут при 300g. Осадок ресуспендировали в растворе Хенкса. Затем на клеточном анализаторе MuseMillipore определяли количество живых клеток (рис. 2).

Согласно полученным данным, концентрация целевых клеток в культуре соответствовала $3,77 \times 10^6$ в 1 мл. Жизнеспособность ЛАК соответствовала 85,6%. Следовательно, концентрация живых клеток соответствовала $3,23 \times 10^6$ в 1 мл. Общий объем составил 10 мл. Подготовленная клеточная суспензия была использована для характеристики свойств ЛАК конечной генерации и для введения собаке.

Для морфологических и цитологических исследований посредством световой микроскопии использовали приборы AxioPlan 2 CarlZeiss и Axiovert 40 CFL CarlZeiss. Концентрацию клеток определяли при рутинном подсчете в камере Горяева после окрашивания трипановым синим (ПанЭко, РФ). Иммунофенотип клеток оценивали по экспрессии ряда поверхностных маркеров с помощью моноклональных антител, конъюгированных с флуорохромами, на цитофлуориметре BD Canto II (Becton Dickinson, USA). В качестве контроля использовали неиммунные, меченые FITC и ремоноклональные антитела того же изотипа, что и антитела против исследуемого маркера. В каждом образце анализировали не менее 10000 клеток. Оценивали относительное количество клеток, экспрессирующих целевые маркеры, а также интенсивность свечения (MFI) меченных клеточных популяций. Результаты проточной цитометрии анализировали в программе FACSDiva version 3.1.0. Для подсчета количества живых и мертвых клеток использовали клеточный анализатор MuseMillipore и набор реактивов для него. Полученные с этого прибора результаты анализировали в программе Muse 1.4 Analysis. НК-активность клеток — эффекторов (ЛАК и контрольных лейкоцитов) оценивали с помощью МТТ теста. В качестве клеток-мишеней использо-

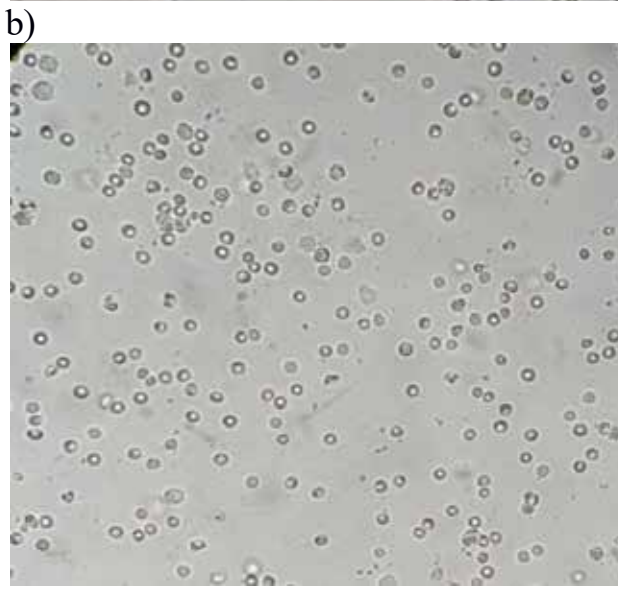
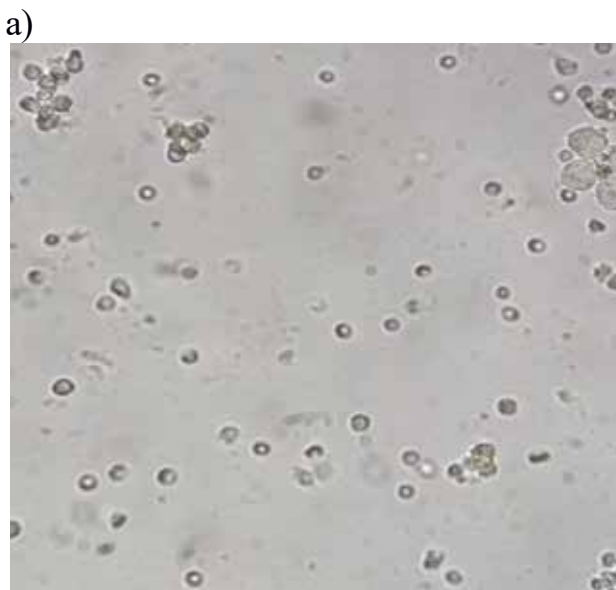
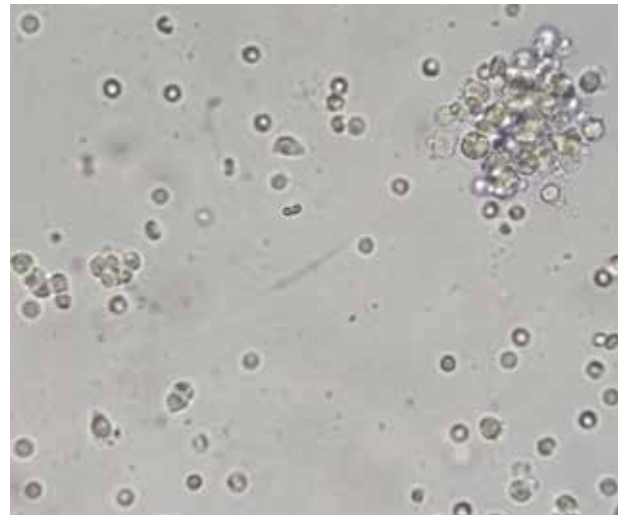
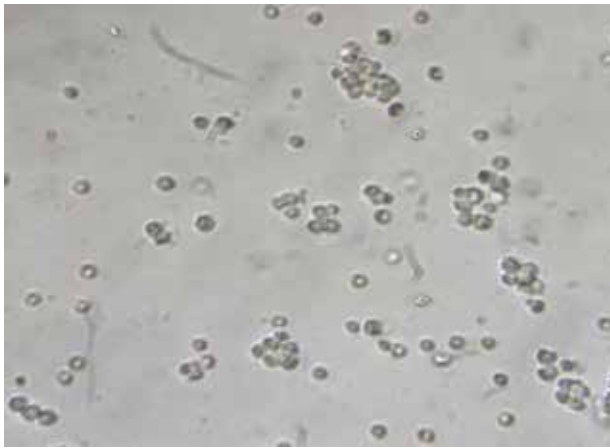
вали клетки миелоидного лейкоза человека линии K-562. Соотношение клеток-эффекторов и клеток-мишеней — 3/1. Длительность коинкубации — 48 ч. Результаты анализировали на планшетном ридере LabSystem MultiscanMS, ThermoSc., Finland.

Первичные данные обрабатывали с использованием модуля «Базовая статистика», «Множественная регрессия» и «Непараметрическая статистика» пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft). В качестве характеристик полученных выборок использовали среднее (\bar{x}), стандартное отклонение среднего (SD). Сравнительный анализ данных проводили с использованием t-критерия. Отличия считали достоверными при $p < 0,05$.

Пролиферацию лейкоцитов крови оценивали на 3-и сутки культивирования клеток с использованием световой инвертированной микроскопии нативной культуры (рис. 3).

Продемонстрировано, что на момент регистрации результатов в культуре ЛАК отмечали наличие отдельных небольших клеточных конгломератов — 4...7 в поле зрения (увеличение $\times 200$). В контрольном флаконе, где изолированные из крови лейкоциты инкубировали в среде без добавления ИЛ-2 формирование подобных пролифератов было отмечено в незначительном количестве — 0...1 в поле зрения, что свидетельствует о усилении пролиферативной активности лейкоцитарных клеток крови собак под воздействием ИЛ-2.

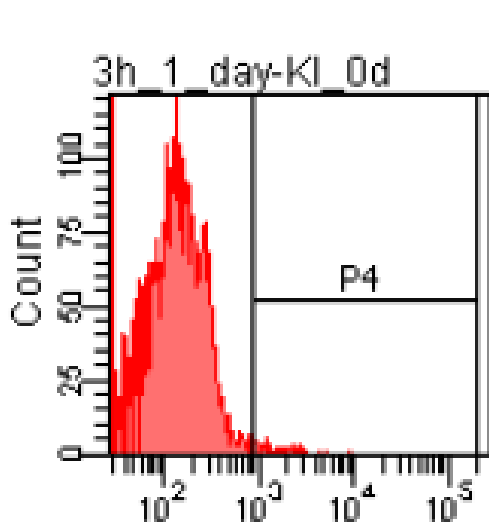
Чтобы оценить пролиферативную активность, исследовали динамику концентрации Ki67+ клеток в культуре ЛАК (3-и сутки инкубации) в сравнении с исходным уровнем (сразу после выделения лейкоцитов из крови собаки). Исследовали посредством проточной цитометрии на цитофлуориметре BDCantoII. Результат эксперимента рассчитывали, вычисляя среднее значение измерений в триплетах. Полученные данные указывают на достоверное увеличение пролиферации лейкоцитарных клеток под воздействием ИЛ-2: на 3-и сутки инкубации концентрация Ki67+ клеток возросла в среднем 5,6 раз, $p = 0,016$ (рис. 4).



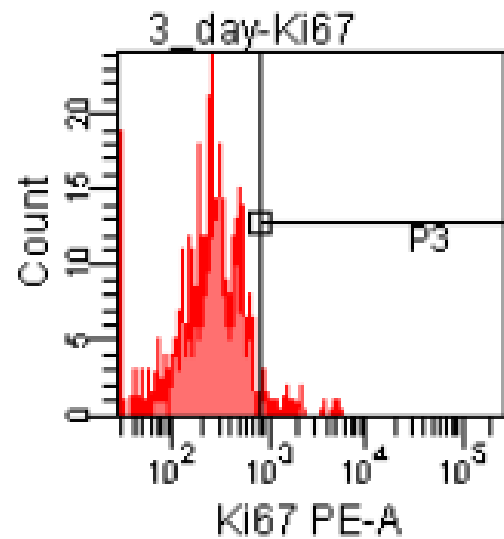
a)

b)

Рис. 3. Пролиферация лейкоцитарных клеток крови собаки под воздействием ИЛ-2 (a...c) в сравнении с контролем (d). $\times 200$
Fig. 3. Leukocyte cells proliferation under IL-2 influence (a...c) and in the control group (d). $\times 200$



a)



b)

Рис. 4. Гистограммы, демонстрирующие нарастание концентрации Ki67+ клеток в культуре ЛАК собаки после 3 суток инкубации:
a — исходный уровень; b — через 3 суток инкубации в среде с ИЛ-2
Fig. 4. Histograms showing increase of Ki67+ cells concentration in the canine LAC culture after 3 days of incubation in the IL-2 environment.

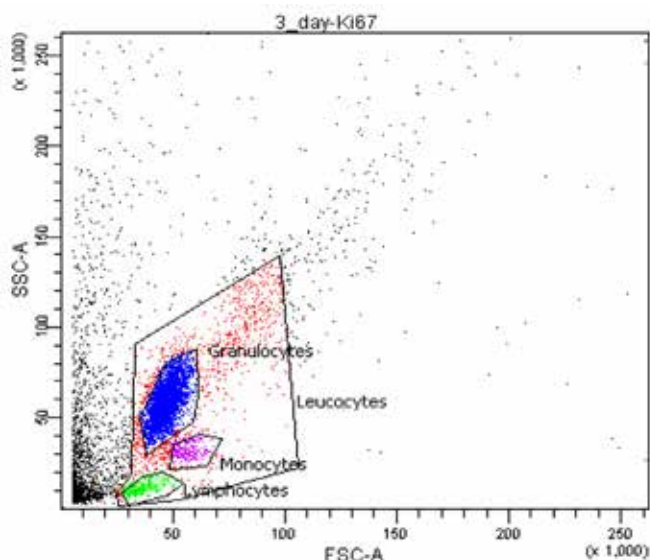


Рис. 5. Выделение гейтов субпопуляций лейкоцитов крови собаки по соотношению прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеивания
Fig. 5. Selection of canine leukocyte subpopulation gates based on FSC and SSC proportion

Фенотип ЛАК исследовали посредством проточной цитометрии на цитофлуориметре VDCantoII. На первом этапе по соотношению прямого и бокового светорассеивания были выделены гейты, соответствующие отдельным субпопуляциям лейкоцитов — лимфоцитам, моноцитам, гранулоцитам (рис. 5). Использование такого подхода позволило оценить не только суммарное изменение уровня экспрессии маркеров на всех клетках культуры, но и вклад в него отдельных субпопуляций.

В процессе инкубации исследовали динамику экспрессии на клетках культуры молекул CD5 (маркер лимфоцитов), CD4 (маркер Т-хелперов, у собак экспрессируется также на гранулоцитах и моноцитах), CD8 (маркер Т-киллеров), CD25 (рецептор к ИЛ-2), CD34 (маркер низкодифференцированных гемопоэтических клеток).

В процессе инкубации лейкоцитов в среде с ИЛ-2 наблюдали значительное увеличение концентрации лимфоцитов (количество CD5+ клеток увеличилось в 11 раз) на фоне относительного снижения количества CD4+ клеток с 81,4% до 24,5% и возрастания уровня CD8a+ клеток с 0,85 до 8% (табл. 1).

Измерение неспецифической противоопухолевой реактивности клеток, реализуемое за счет активности НК, после генерации в среде с ИЛ-2 оценивали в сравнении с эффективностью лейкоцитов в контроле, где клетки культивировали в ППС без ИЛ-2 в условиях аналогичных ЛАК. Исследовали с использованием МТТ-колориметрического метода, оптическую плот-

ность раствора формазана измеряли в триплетах на планшетном ридере MSMultiscan при 540 нм.

На рисунке 6 приведены фотографии морфологии клеток, полученные с использованием световой микроскопии после окраски МТТ.

Было обнаружено достоверное ($p < 0,05$) увеличение НК-активности ЛАК в сравнении с реактивностью контрольных лейкоцитов, культивируемых в отсутствии ИЛ-2 (рис. 7). При сравнении средних значений установлено, что неспецифическая противоопухолевая активность ЛАК превышала эффективность нестимулированных клеток более чем в 2 раза.

Результаты и обсуждение

В процессе наблюдения за животным колебания оцениваемых параметров происходили в пределах нормативных показателей. Тем не менее, продемонстрирована тенденция относительно кратковременного периода (около 1 ч) колебания оцениваемых параметров, наблюдаемого в течение 45...105 минут после введения активированных клеток. В частности, через 45 минут после введения наблюдали тенденцию нарастания Т, ЧД, ЧСС, снижения систолического давления. После 120 мин наблюдали постепенную нормализацию этих показателей (табл. 2).

Аппетит и когнитивная реактивность животного не претерпели изменений в период наблюдения после введения ЛАК. Не отмечали признаков саливации, патологической жажды, отсутствия или извращения аппетита. Не отмечены какие-либо признаки местных или системных патологических реакций, свидетельствующих о развитии органной недостаточности.

Рентгенологическое исследование области грудной клетки собаки не показало формирования признаков развития патологических изменений тканей легких. В частности, не выявлено признаков диффузного уплотнения легочной ткани, наличия экссудата или трансудата в перикардальной и плевральной полостях.

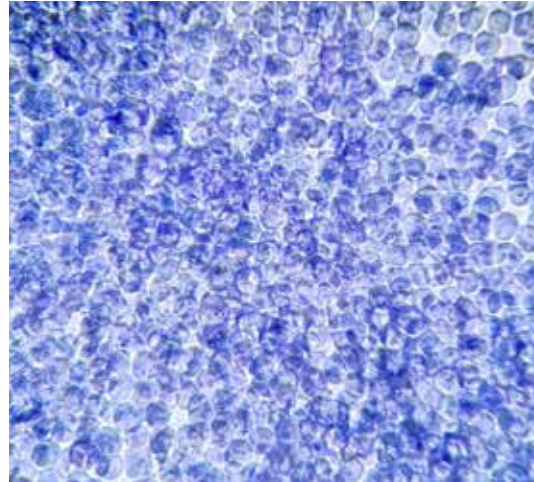
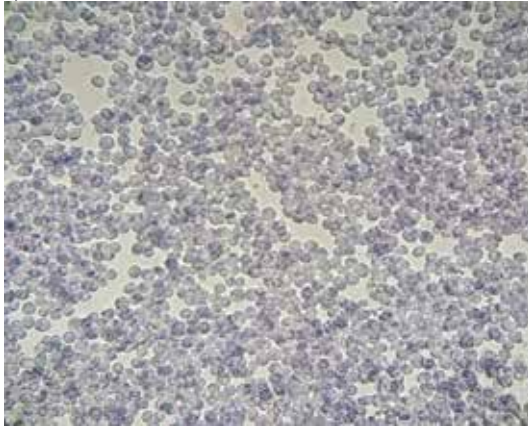
Контроль гематологических показателей был проведен на анализаторе IDEXXProCyteDx, откалиброванного для оценки клеток крови собак через 4 и 48 ч после введения ЛАК (табл. 3).

Приведенные данные показывают, что за период наблюдения, оцениваемые гематологические показатели животного колебались в пределах нормы. Была отмечена тенденция нарастания концентрации эритроцитов и гемоглобина через 48 ч после введения ЛАК (рис. 3). Через 4 ч после введения активированных клеток наблюдали незначительный подъем относительного содержания нейтрофилов в крови, что не отразилось в изменении абсолютного количества этих клеток в кровотоке.

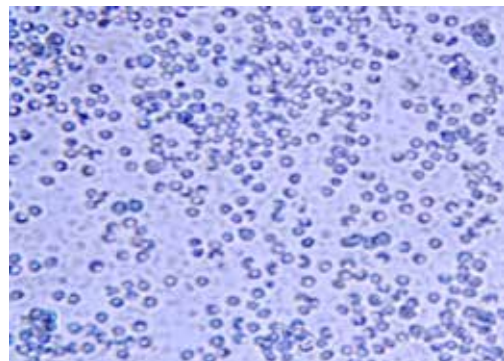
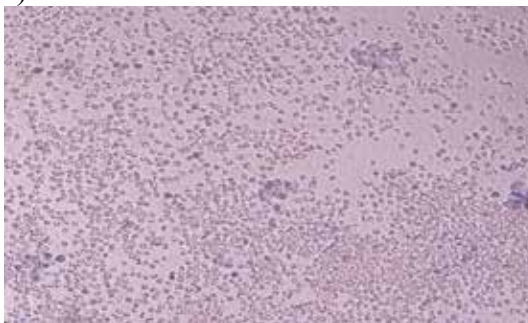
1. Динамика мембран-ассоциированных маркеров, %, на клетках культуры ЛАК собаки 1. Membrane-associated markers', % dynamics on the canine LAC cell culture

Срок исследования	CD4	CD8	CD5	CD34	CD25
Исходный уровень	81,4	0,8	3,5	0,5	0,6
В процессе инкубации:					
1-е сутки	13,8	2,9	15,1	1,8	1,2
3-и сутки	24,5	8	37,9	1,2	0,8

a)



b)



c)

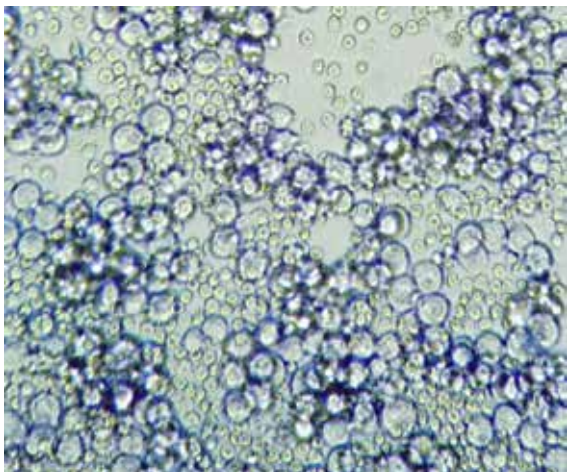
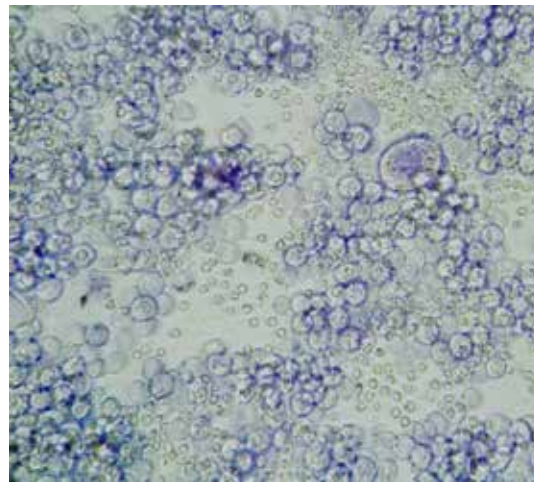
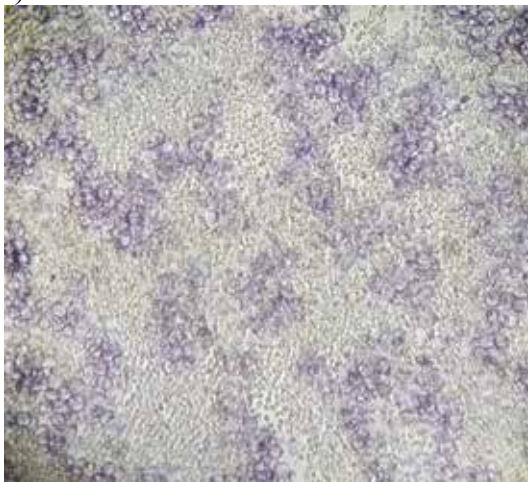


Рис. 6. Противоопухолевая реактивность ЛАК, окраска МТТ: а — контроль клеток-мишеней; б — контроль клеток-эффекторов, с — киллинг опухолевых клеток. $\times 200$ (слева); $\times 400$ (справа)

Fig. 6. LAC antineoplastic reactivity. MTT staining. a — target cells control, b — effector cells control, c — tumor cells killing. $\times 200$ (left), $\times 400$ (right)

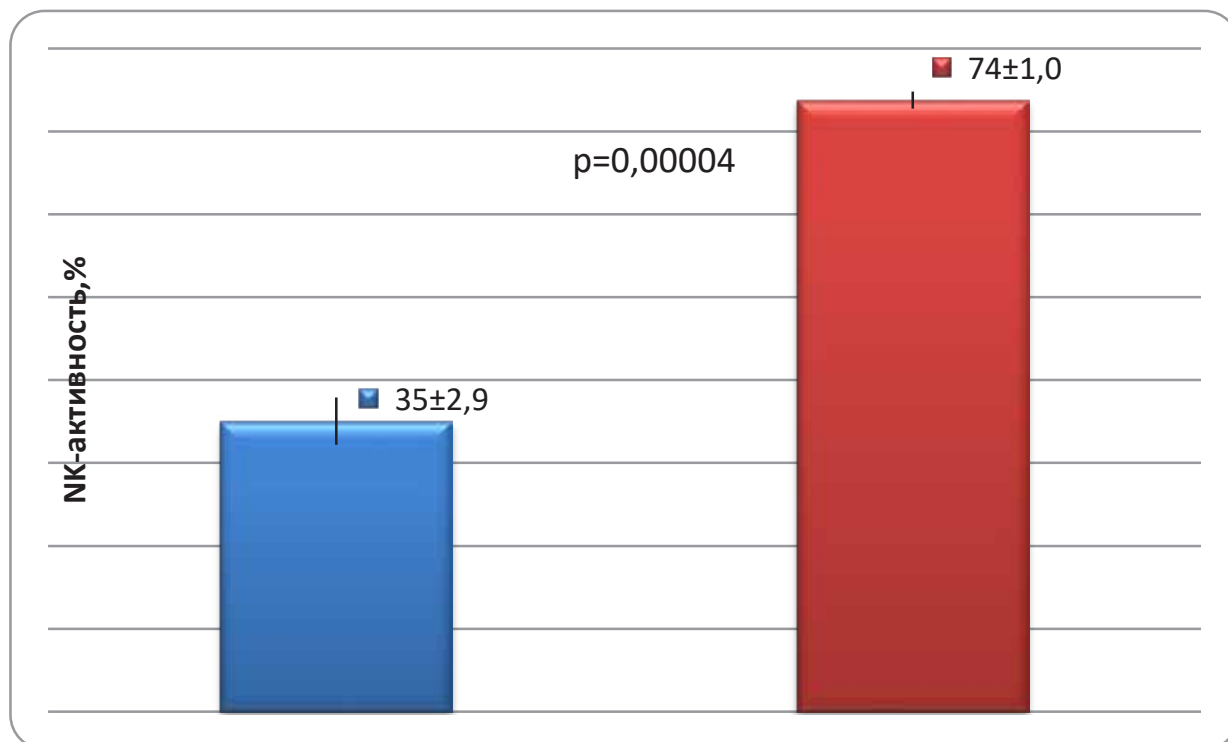


Рис. 7. Сравнительная НК-активность ЛАК и контрольных лейкоцитов
Fig.7 Comparative NK-activity of LAC and control leukocytes

2. Динамика параметров физиологического состояния животных после введения ЛАК 2. Animal physiological parameters' dynamics after infusing LAC

Время после введения ЛАК		Т, °С	ЧСС, уд/мин	ЧД, дых/мин	Кровяное давление, мм рт. ст.	
сутки	минуты				систолическое	диастолическое
1	0	37,9	115	24	189	79
	15	38,1	104	28	232	104
	30	38,1	95	24	190	84
	45	38,8	121	36	137	119
	60	38,7	115	44	190	110
	75	38,7	118	46	202	117
	90	38,5	95	36	206	91
	105	38,5	102	60	210	84
	120	37,9	118	28	215	105
	135	38	100	28	215	105
	150	38	102	28	205	100
	120	37,9	118	28	215	105
	135	38	100	28	215	105
	150	38	102	28	205	100
	330	38	100	32	205	120
2	1440	38,3	104	24	175	96
3	2880	38,5	91	24	189	104
5	5760	38,3	67	26	149	56

3. Гематологические показатели собаки после введения ЛАК в сравнении с исходным уровнем
3. Hematological parameters of the dog after LAC infusion compared to the initial level

Параметр	Время после введения ЛАК, ч		
	0	4	48
Эритроциты, $10^{12}/L$	7,99	8,08	8,32
Гемоглобин, g/dL	18,4	18,7	19,5
Тромбоциты, μL	274	263	195
Нейтрофилы, %	62,9	70,6	59,2
Лимфоциты, %	21,8	17,8	25,2
Моноциты, %	7,1	5,4	7,8
Эозинофилы, %	7,9	5,8	7,6
Базофилы, %	0,3	0,4	0,2
Лейкоциты, $10^9/L$	15,21	13,83	12,87
Нейтрофилы, $10^9/L$	9,57	9,76	7,62
Лимфоциты, $10^9/L$	3,32	2,46	3,24
Моноциты, $10^9/L$	1,08	0,75	1,01
Эозинофилы, $10^9/L$	1,2	0,8	0,98
Базофилы, $10^9/L$	0,04	0,06	0,02

В целом, следует отметить, что поскольку не было отмечено нарастания лейкоцитоза, введение ЛАК в использованной концентрации не вызвало развития системных реакций воспаления или отторжения. Это позволяет сделать вывод об отсутствии у ЛАК гематологической токсичности.

Анализ иммунологических параметров клеток крови собаки проводили параллельно с оценкой гематологических показателей, сравнивая полученные данные с исходным уровнем. Были изучены иммунофенотип клеток крови собаки и активность иммунокомпетентных клеток — неспецифическая противоопухолевая

НК-активность и фагоцитарная активность гранулоцитов крови (рис. 8).

Сравнительный анализ показал отсутствие статистически достоверных различий реактивности НК собаки через 4 и 48 ч после введения ЛАК в сравнении с исходным уровнем.

Фагоцитарную активность гранулоцитов собаки оценивали по способности поглощать бактерии *E. coli* с использованием проточной цитометрии. Изменений фагоцитарной активности гранулоцитов после введения ЛАК зафиксировано не было (рис. 9).



Рис. 8. НК-активность лейкоцитов крови собаки после введения ЛАК в сравнении с исходным уровнем
Fig. 8 NK-activity of canine leukocytes after LAC infusion compared to the initial level.

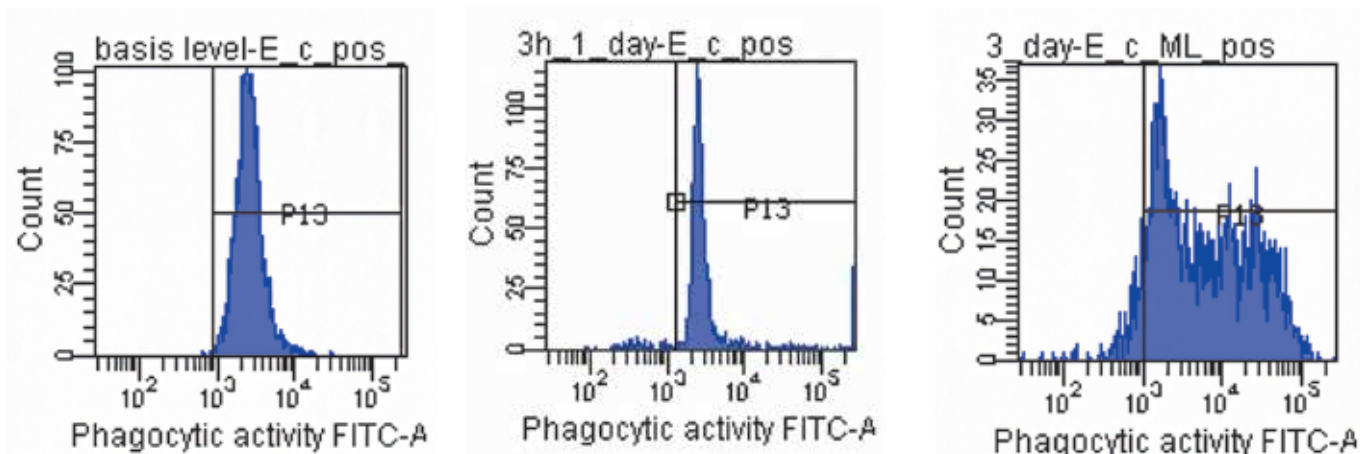


Рис. 9. Фагоцитарная активность лейкоцитов крови собаки: исходный уровень (а), через 4 ч (б) и 48 ч (с) после введения ЛАК
Fig. 9. Phagocytic activity of canine leukocytes: baseline (a), 4 hours (b), and 48 hours (c) after LAC infusion

Фенотип лейкоцитов крови изучали после лизиса эритроцитов с использованием реагента OptiLyse согласно инструкции производителя. На точечном графике, показывающем зависимость прямого светорассеивания от бокового, выделяли гейты субпопуляций лейкоцитов (рис. 10).

Было показано, что уже через 4 ч после введения ЛАК изменяется соотношение CD4/CD8 субпопуляций лимфоцитов в сторону снижения индекса. Указанный дисбаланс может быть до некоторой степени обусловлен относительно повышенной экспрессией маркера CD8 на мембранах ЛАК, циркулирующих в кровотоке после введения. Уже через 2 суток данный показатель нормализовался. Снижение содержания в крови CD25 лимфоцитов может быть обусловлено относительным уменьшением их концентрации на фоне кратковременного возрастания количества гранулоцитов (см. данные изучения гематологических параметров). Через 48 ч после введения значение этого показателя возросло с 2,8% до 4,9%, что незначительно превышало показателя исходного уровня.

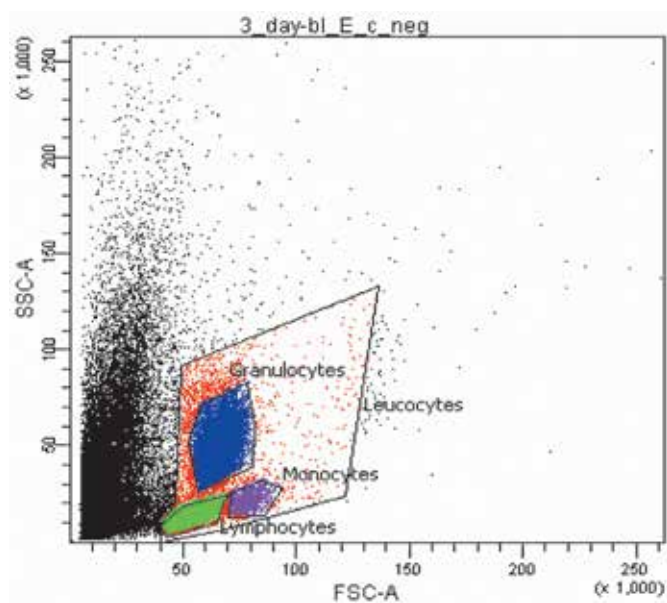


Рис. 10. Гейтирование лейкоцитов различных субпопуляций крови собаки после лизиса эритроцитов
Fig. 10. Various subpopulations of canine leukocytes gating after erythrocytolysis

Таким образом, в ходе исследования была проведена генерация культуры ЛАК собаки: количество живых клеток составило 323×10^6 /мл. Клетки были идентифицированы по нарастанию пролиферации Ki67+ клеток, количества CD5+ клеток (Т- и В-лимфоцитов), концентрации Т-киллеров (CD8+ клеток) и активированных клеток (CD25+ клеток), усилению их неспецифической противоопухолевой активности (НК-активности). Полученная аутологичная культура была введена внутривенно, болюсно, медленно собаке породы бигль в количестве 25 млн клеток. Мониторинг физиологических показателей животного продемонстрировал кратковременные колебания в пределах границ нормы температуры тела, усиления ЧСС и ЧД, снижение кровяного давления через 45 минут после введения клеток длительностью 1 ч. В дальнейшем описанные показатели вернулись к исходному уровню. Поскольку анализ гематологических и иммунологических параметров животного в сочетании с результатами рентгенологического исследования не выявил признаков развития каких-либо патологических процессов в организме животного после введения активированных клеток, можно сделать вывод об отсутствии местного или системного токсического воздействия ЛАК в данном количестве.

Выводы

Полученные в ходе проведенного исследования данные представляют интерес и для медицины человека и для ветеринарной медицины, поскольку могут рассматриваться как часть доклинических испытаний готового продукта — суспензии ЛАК, эффективность которой в клинической онкологии человека уже была подтверждена, и как пример оценки безопасности более сложных конструкторов на основе активированных иммунокомпетентных клеток, еще находящихся в стадии разработки.

Проведенные исследования могут послужить основой для разработки моделей изучения токсичности средств клеточной противоопухолевой иммунотерапии на основе активированных лейкоцитов (ЛАК, иммунные "checkpointmolecules" и CAR), а также рассматриваться как часть доклинических исследований токсичности ЛАК.

Однако есть сведения о развитии у части пациентов в течение и после инфузии иммунного препарата

симптомов «цитокинового шторма» — повышение Т, озноба, нарушения работы дыхательной и сердечно-сосудистой систем. Поэтому оценке эффективности и применению методов иммунотерапии, как и других терапевтических средств должны предшествовать токсикологические исследования для выяснения доз, режимов и способов введения препаратов.

Конфликт интересов

Авторы не получали спонсорской помощи от производителей препаратов, указанных в данной работе, или их поставщиков.

References

1. Firas B., Hayslip J., Rituximab in the treatment of B-cell non-Hodgkin lymphoma, focus on outcomes and comparative effectiveness, *Clinicoecon Outcomes Res*, 2010, No. 2, pp. 37–45.
2. Boudewijns S., Bloemendal M., Gerritsen W. R., De Vries I. J., Schreiber G., Dendritic cell vaccination in melanoma patients: From promising results to future perspectives, *Hum Vaccin Immunother.*, 2016, Oct. 2, No. 12 (10), pp. 2523–2528.
3. Anisimova N. Yu., Vlasenko R. Ya., Kiselevsky M. V., Kozyreva O. V., Tsvetkov Yu. E., Khatuntseva E. A., Nifantiev N. E., Stepanenko R. N. Dendritic cells as an adjuvant the induction of the immune response to a synthetic protein-conjugated carbohydrate fragment., *Immunology*, 2012, Vol. 33, No. 3, pp. 123–128. (In russ.)
4. Seidel Judith A., Otsuka Atsushi, Kabashima Kenji, Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations, *Frontiers in Oncology*, March 2018, Vol. 8, Art. 86, pp. 1–14.
5. Pardoll D. M., The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy, *Nature Reviews Cancer*, 2012, No. 12, pp. 252–264.
6. Shubina I. Z., Chikileva I. O., Kiselevsky M. V., Titov K. S., Demidov L. V., *Adaptive immunotherapy of malignant effusions*, In Malignant effusions: pleuritis, ascites, pericardites, Ed by Kiselevsky M. V., Springer Netherlands, 2012, 152 p.
7. Titov K. S., Volkov S. M., Shubina I. J., Anisimova N. Y., Selchuk V. Y., Kiselevsky M. V. (N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow), Possibilities of intrapericardial immunotherapy with the use of interleukin-2 and allogenic LAK-cells in malignant pericardial effusions in the patients with breast and ovarian cancer, *Siberian medical journal*, 2011, Vol. 104, No. 5, pp. 47–52.
8. LeBlanc A. K., Mazcko C. N., Khanna C., Defining the Value of a Comparative Approach to Cancer Drug Development, *Clin Cancer Res.*, 2016, May 1, No. 22 (9), pp. 2133–2138.
9. Gordon I., Paoloni M., Mazcko M., Khanna C., The Comparative Oncology Trials Consortium: using spontaneously occurring cancers in dogs to inform the cancer drug development pathway, *PLoS Med.*, 2009 Oct., No. 6 (10), pp. 1–6.
10. Kliggermann H., Immunotherapy for Dogs: Running Behind Humans, *Front. Immunol.*, 2018, No. 9, Article 133, pp. 1–6.
11. Bergman P. J., McKnight J., Novosad A., Charney S., Farrelly J., Craft D., Wulderk M., Jeffers Y., Sadelain M., Hohenhaus A. E., Segal N., Gregor P., Engelhorn M., Riviere I., Houghton A. N., Wolchok J. D., Long-term survival of dogs with advanced malignant melanoma after DNA vaccination with xenogeneic human tyrosinase: a phase I trial, *Clin Cancer Res.*, 2003, Apr, No. 9 (4), pp. 1284–1290.
12. Sorenmo K. U., Krick E., Coughlin C. M., Overley B., Gregor T. P., Vonderheide R. H., Mason N. J., CD40-activated B cell cancer vaccine improves second clinical remission and survival in privately owned dogs with non-Hodgkin's lymphoma, *PLoSOne.*, 2011, No. 6 (8), e24167.
13. Chikileva I. O., Anisimov N. Yu., Vereskova N. In. Kiselevskiy M. V., The patent for invention RUS 2414915 12.03.2009., *The method of obtaining activated leukocytes adjuvant for adaptive immunotherapy of malignant tumors.* (In russ.)



RAVC
RUSSIAN AMERICAN
VETERINARY
CONFERENCE

СОЧИ 2019

Education
and
Vacation

**12-14 июля
2019**

Место:
Краснодарский край, город
Сочи, Хостинский район, ул.
Звездная, д.14

www.myravc.ru

Организаторы



ELLatin

Спонсоры

