

# ПЕРСПЕКТИВНЫЕ СПОСОБЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ИММУНОТЕРАПИИ НА ОСНОВЕ РЕАКЦИИ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЗАМЕДЛЕННОГО ТИПА

**В.И. Карасева, Т.В. Осипова, Ю.М. Букреев**

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

**Контакты:** Валентина Ивановна Карасева [valent.karaseva43@yandex.ru](mailto:valent.karaseva43@yandex.ru)

**Введение.** Среди многообразных форм воспаления, многие из которых способствуют росту опухолей, классическая реакция воспаления — гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) — способна их элиминировать. Искусственно индуцированная интратуморально, она может быть успешно применена в иммунотерапии. Известно, что уровень противоопухолевого иммунитета коррелирует с интенсивностью реакции, поэтому мы использовали результаты собственных предварительных исследований, которые позволили повысить уровень ГЗТ в несколько раз. Ранее нами был выявлен парадоксальный механизм разнонаправленного контроля реакции ГЗТ на разных стадиях антигенами II класса МНС-I-A-молекулами, экспрессированными на поверхности антигенпрезентирующих клеток. Этот факт необходимо строго учитывать при разработке схем иммунотерапии.

**Цель исследования** — разработка эффективных способов экспериментальной иммунотерапии на основе ГЗТ с использованием средств и способов ее регуляции.

**Материалы и методы.** Описанный выше феномен использован в разработке 2 способов экспериментальной иммунотерапии карциномы легкого Льюиса у мышей BDF1. ГЗТ к лабораторному антигену овальбумину индуцировали интратуморально и стимулировали точно с учетом разнонаправленности развития реакции либо аспирином (опосредованно повышающим экспрессию I-A-антигенов) в стадии индукции, либо никотинамидом (подавляющим ее) в эффекторной фазе реакции.

**Результаты.** Показано, что ГЗТ к овальбумину, индуцированная интратуморально и стимулированная аспирином или никотинамидом, обеспечивает торможение роста опухоли соответственно на 81,5 и 86,5 % по сравнению с контролем.

**Заключение.** Показано 2 способа экспериментальной иммунотерапии опухоли на основе ГЗТ со строгим учетом разнонаправленности контроля реакции I-A-антигенами. Согласно данным литературы в числе агентов, способных изменять экспрессию I-A-молекул, кроме аспирина и никотинамида есть много известных, широко применяемых в клинике препаратов. Несоблюдение правил разнонаправленности развития ГЗТ при их назначении не только приводит к слабому терапевтическому эффекту, но и может вызвать стимуляцию роста опухоли. Вероятно, в этом кроется причина наблюдаемой непредсказуемости в иммунотерапии. Очевидно, что для разработки адекватных схем лечения необходимо осторожное, точечное вмешательство в ход конкретной защитной иммунной реакции в соответствии с молекулярным механизмом ее регуляции. Полученные результаты могут стать основанием для апробирования подобных методических подходов в клинике.

**Ключевые слова:** гиперчувствительность замедленного типа, экспериментальная иммунотерапия опухоли, карцинома легкого Льюиса

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-59-64

## ADVANCED METHODS OF EXPERIMENTAL CANCER IMMUNOTHERAPY BASED ON THE DELAYED-TYPE HYPERSENSITIVITY

**V.I. Karaseva, T.V. Osipova, Yu.M. Bukreev**

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

**Introduction.** Among the variety forms of inflammation, many of which contribute to the growth of tumors, classical inflammation reaction — delayed type hypersensitivity is able to eliminate. Artificially induced intratumoral it can be used successfully in immunotherapy. As the level of antitumor immunity correlates with the intensity of the reaction, we used the results of our preliminary research, which helped to increase the level of delayed type hypersensitivity several times. Our earlier experiments indicated a paradoxical mechanism of bi-directional control of delayed type hypersensitivity reactions at various stages by antigens class II MHC I-A-molecules, expressed on the surface of antigen-presenting cells. This fact must be strictly taken into account when designing schemes of immunotherapy.

**The purpose of the research** is development of effective methods for experimental immunotherapy on the basis of delayed type hypersensitivity with the use of means and methods of its regulation.

**Materials and methods.** The above-described phenomenon was used in the development of 2 methods experimental immunotherapy of carcinoma Lewis in mice BDF1. Delayed type hypersensitivity to laboratory antigen ovalbumin induced intratumoral and stimulated point based bi-directional development of reaction or aspirin in the induction stage (indirectly increasing the expression of I-A-antigens), or (overpowering her) nicotinamide in the effector phase of the reaction.

**Results.** It is shown that delayed type hypersensitivity to ovalbumin induced intratumoral and stimulated by aspirin or nicotinamide, provides inhibition of tumor growth at 81.5 % and 86.5 % compared with the control, respectively.

**Conclusion.** It is demonstrated 2 ways of experimental immunotherapy of tumors based on delayed type hypersensitivity, with strict regard to bi-directional control reaction by I-a-antigens. According to the literature in a number of agents capable of altering the expression of I-A-molecules, in addition to aspirin and nicotinamide are a well known, widely used in the clinic drugs. The irregularity of bi-directional development of delayed type hypersensitivity during their appointment subsequently leads not only to the weak therapeutic effect, but may cause increased tumor growth. Probably this is the reason for the observed unpredictability in immunotherapy. Obviously, to develop appropriate treatment regimens need careful, targeted intervention in the specific protective immune response in accordance with its molecular mechanism of regulation. In summary, the results presented here can be the basis for the testing of these methodological approaches in the clinic.

**Key words:** delayed-type hypersensitivity, experimental immunotherapy, Lewis lung carcinoma

## Введение

Известно, что воспаление и развитие злокачественных опухолей связаны друг с другом самым тесным образом, и многие опухоли человека возникают и прогрессируют в местах хронического воспаления [1–4]. Среди разнообразных форм воспаления одни способствуют росту, другие элиминируют уже сформировавшиеся опухоли [5]. К последним относится классическая воспалительная реакция гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Клетки-эффекторы этой строго специфической иммунной реакции продуцируют неспецифический фактор, ингибирующий миграцию (ФИМ) фагоцитирующих клеток, в том числе макрофагов, в очаге воспаления. ФИМ в синергии с фактором некроза опухоли индуцирует выработку нитроксидных радикалов. Благодаря этому механизму искусственно индуцированная интратуморально реакция ГЗТ вызывает инфильтрацию опухоли с последующей ее элиминацией. Этот эффект можно использовать в иммунотерапии.

В норме ГЗТ является природной защитной реакцией. При высокой интенсивности она проявляет повреждающие свойства, которые можно направить против опухоли. Уровень противоопухолевого иммунитета коррелирует с интенсивностью ГЗТ. Ранее с целью поиска средств и способов управления ГЗТ мы исследовали роль I-A-антигенов (I-A-a), экспрессированных на поверхности антигенпрезентирующих клеток. Эксперименты проводились *in vivo* и *in vitro* на разных стадиях ГЗТ к овальбумину (ОА) – индуктивной и эффекторной [6]. В фундаментальной иммунологии давно установлен тот факт, что средством клеточного взаимодействия всех видов иммунного ответа являются антигены II класса главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС) на антигенпрезентирующих клетках. Их количество свидетельствует о степени активности иммунной

системы. Влияя на уровень экспрессии I-A-молекул, можно управлять реакцией ГЗТ.

Результаты наших прежних исследований только в индуктивной фазе ГЗТ подтвердили общепринятое положение о главенствующей роли экспрессии I-A-a на антигенпрезентирующих клетках. В эффекторной стадии было обнаружено иммуносупрессирующее влияние их присутствия. Мы высказали гипотезу о разнонаправленном механизме контроля реакции ГЗТ I-A-молекулами, с помощью которого, вероятно, в организме поддерживается иммуногемеостаз. Этот механизм необходимо учитывать при разработке способов иммунотерапии. Было исследовано влияние на интенсивность ГЗТ различных агентов, которые (по данным литературы) способны повышать или подавлять экспрессию антигенов II класса МНС [7–9]. Показано, что препараты, повышающие уровень экспрессии, такие как аспирин, стимулируют ГЗТ к ОА только в индуктивной фазе, но ингибируют ее в эффекторной, в то время как никотинамид, подавляющий экспрессию I-A-молекул, ингибирует реакцию в ее начальной стадии, но стимулирует в эффекторной. Цель исследования – изучение возможности подавления опухолевого роста у мышей с карциномой легкого Льюиса под влиянием ГЗТ к ОА высокой интенсивности, индуцированной внутри опухоли.

## Материалы и методы

В опытах использовали мышей линий Balb/c, C57Bl/6 и гибридов первого поколения BDF1 (C57Bl/6 x DBA2) массой 20–22 г. Животных получали из питомника «Столбовая» и содержали в конвенциональных условиях на брикетированном рационе кормления [10].

**Изучение влияния аспирина и никотинамида на интенсивность реакции ГЗТ к ОА на разных стадиях.** Исследования проводили на мышях Balb/c согласно

детально разработанному методу [6, 11]. В качестве антигена использовали ОА («Sigma»), в качестве адъюванта – синий Эванса (Sigma).

Для иммунизации животным в 1-й день эксперимента вводили подкожно в межлопаточную область 10 мкг ОА и 250 мкг синего Эванса в общем объеме 0,2 мл физиологического раствора вместе с одним из испытуемых препаратов – аспирином в дозе 0,2 мг в 0,1 мл в стадии индукции или никотиномидом (Sigma) 0,15 мг в 0,2 мл физиологического раствора – для изучения их влияния на уровень ГЗТ в эффекторной стадии. На 5-й день делали активирующую инъекцию 25 мкг ОА в 0,02 мл физиологического раствора вместе с 0,04 мг аспирина или 0,015 мг никотиномада в подушечку правой задней лапы животного для исследования их влияния в эффекторной фазе реакции. В контрольную лапу вводили физиологический раствор. Местную воспалительную реакцию оценивали через 24 ч по разнице масс подопытной (Р<sub>о</sub>) и контрольной (Р<sub>к</sub>) лап мышей. Индекс реакции (ИР) определяли по формуле:

$$\text{ИР} = (\text{Р}_o - \text{Р}_k) / \text{Р}_k \times 100 \%$$

**Изучение противоопухолевой активности реакции ГЗТ к ОА, индуцированной внутри опухоли и стимулированной аспирином или никотиномидом.** Работа выполнена на мышцах-самцах С57В1/6 и ВDF1 на модели эпидермоидной карциномы легкого Льюиса, полученной из банка опухолевых штаммов ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, согласно разработанному методу [12].

Модифицированную нами лабораторную модель ГЗТ к ОА [6] мы перенесли в условия эксперимента с перевиваемой опухолью, точно стимулируя реакцию аспирином или никотиномидом для большей выраженности. Схема постановки эксперимента представлена на рисунке.

Сенсибилизацию мышей ВDF1 проводили путем подкожного введения в межлопаточную область 10 мкг ОА и 250 мкг синего Эванса в 0,2 мл физиологического раствора в 1-й день иммунотерапии. На 5-й день эксперимента (в эффекторной стадии ГЗТ) вводили разрешающую дозу антигена 500 мкг ОА в 0,6 мл физиологического раствора в область планируемого роста опухоли или в уже развившуюся опухоль.

В 1-м способе стимуляции ГЗТ подкожно вводили 400 мкг аспирина в 0,2 мл физиологического раствора на стадии индукции реакции. Во 2-м способе 5 мг никотиномада вводили в опухоль на эффекторной стадии. Прививку карциномы легкого Льюиса осуществляли на 6-й день иммунотерапии, чтобы совместить ее с началом продукции ФИМ. Эффект оценивали на 10-й день после прививки

опухоли, что соответствовало 16-му дню иммунотерапии. Сенсибилизацию осуществляли на 1, 7 и 10-й дни лечения, а активацию реакции – на 5, 11 и 14-й дни, для того чтобы количества продуцируемого ФИМ хватило на весь период иммунотерапии.

Противоопухолевый эффект оценивали по критериям торможения роста опухоли и увеличения продолжительности жизни (в процентах). Минимальными критериями активности считали показатели более 50 и 25 % соответственно. Полученные данные обрабатывали статистически по стандартному методу Стьюдента. Достоверно значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

При сравнительном исследовании влияния аспирина и никотиномада на разных стадиях ГЗТ к ОА наглядно проявился разнонаправленный характер их действия. Полученные результаты представлены в табл. 1. Как видно, в группе 1 исходный индекс реакции равнялся  $18,9 \pm 1,4 \%$ . Введение аспирина мышам на стадии индукции (группа 2) стимулировало реакцию в 2 раза по сравнению с контролем К-1, повышая ее уровень с  $18,9 \pm 1,7$  до  $35,5 \pm 0,7 \%$  ( $p < 0,001$ ), тогда как введение аспирина в эффекторной фазе (группа 4) приводило к достоверному снижению ее интенсивности до  $7,7 \pm 1,5 \%$  ( $p < 0,02$ ). Введение никотиномада (группа 6) снижало интенсивность ГЗТ с  $18,9 \pm 1,7$  до  $6,4 \pm 2,2 \%$  ( $p < 0,001$ ) в индуктивной стадии, но повышало в эффекторной – до  $30,6 \pm 2,3 \%$  ( $p < 0,001$ ) (группа 8). В группах 3, 5, 7, 9 отрицательного контроля без введения ОА сами по себе аспирин и никотиномид не вызывали распухания лапки. Индексы реакции в этих группах составили  $3,2 \pm 1,6$ ;  $3,5 \pm 2,4$ ;  $2,9 \pm 0,8$ ;  $2,5 \pm 2,3 \%$  соответственно.

Результаты изучения противоопухолевой эффективности ГЗТ представлены в табл. 2. Показано, что стимуляция реакции аспирином приводит к торможению роста опухоли на  $81,5 \pm 4,6 \%$  ( $p < 0,05$ ), никотиномидом – на  $86,5 \pm 2,2 \%$  ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. Наблюдали статистически значимое увеличение продолжительности жизни опытных мышей по сравнению с контрольными на 31 и 27 %.

В данном сообщении представлено 2 способа подавления роста опухоли с помощью ГЗТ высокой интенсивности. Разнонаправленный механизм регуляции ГЗТ I-A-а диктует необходимость придерживаться особо четкой стратегии иммунотерапии для достижения высокого уровня иммунного ответа. Если этим пренебречь, вместо торможения наблюдается стимуляция роста опухоли (неопубликованные данные). Многие уже известные и хорошо изученные препараты, используемые в клинике, также способны влиять

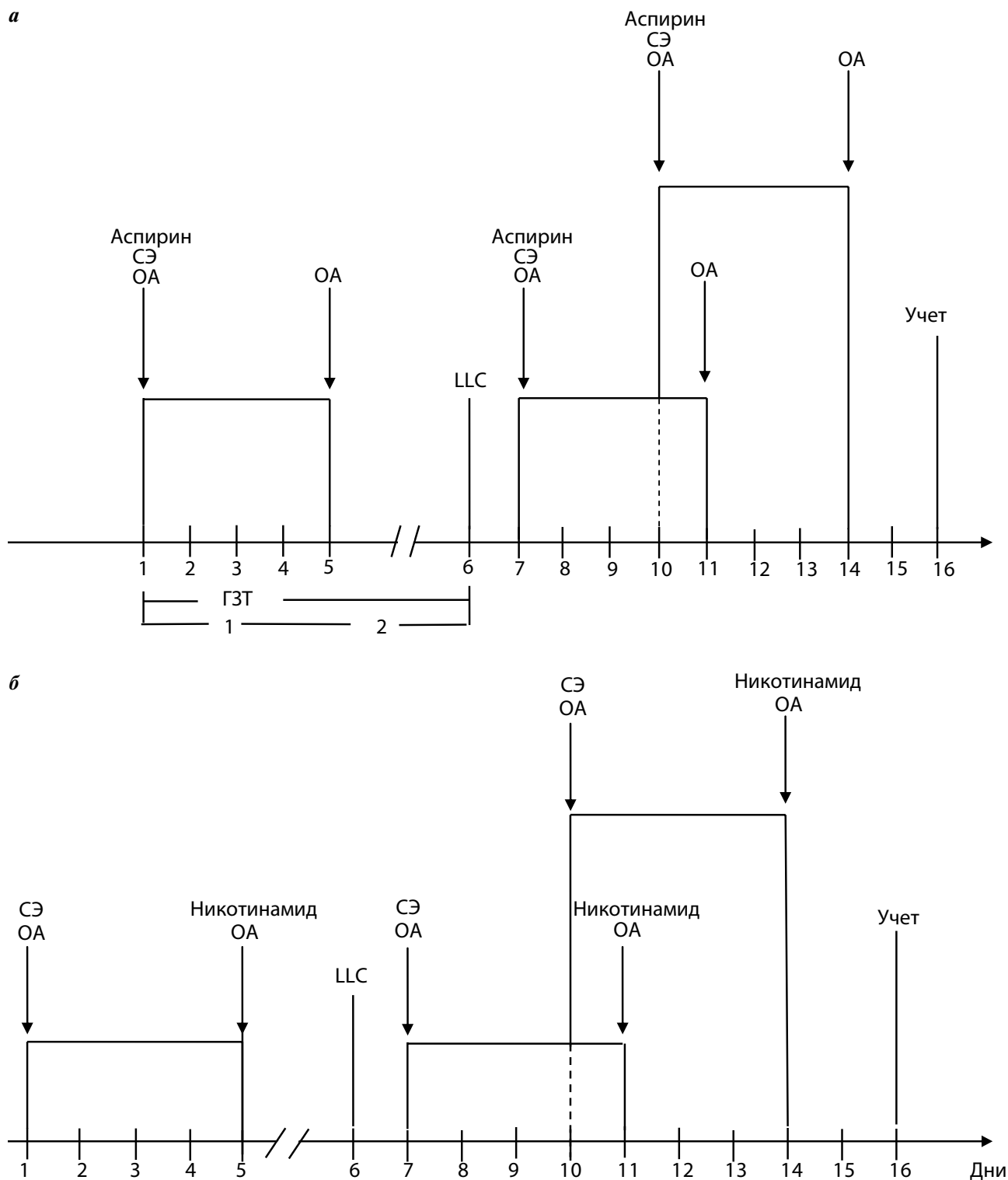


Схема стимуляции реакции гиперчувствительности замедленного типа к овальбумину: а – в стадии индукции, б – в эффекторной стадии. 1 – стадия индукции реакции, 2 – эффекторная стадия, OA – овальбумин, СЭ – синий Эванса, LLC – карцинома легкого Льюиса

на экспрессию I-A-a. Согласно данным литературы к увеличивающим экспрессию агентам, кроме аспирина, относятся индометацин, интерферон  $\lambda$ , интерлейкины 2, 4, 6, антигены, адьюванты и т. д., а к подавляющим ее – интерфероны  $\alpha$  и  $\beta$ , кортикостероиды,

ультрафиолетовое и рентгеновское облучение, фактор некроза опухоли, моноклональные антитела, серотонин, нейраминидаза, простагландин  $E_2$  и многие другие [7–9, 13–15]. Это ничтожная доля от общего числа средств, способных модулировать экспрессию

**Таблица 1.** Влияние аспирина и никотинамида на интенсивность реакции гиперчувствительности замедленного типа к овалбумину на разных ее стадиях

Группа	Стадия индукции		Эффекторная стадия		Индекс реакции, %
	Вводимые препараты	Способ введения	Вводимые препараты	Способ введения	
1	ОА, СЭ	Подкожно в холку	ОА	В подушечку задней лапы	18,9 ± 1,4
2	ОА, СЭ, аспирин	«-»	ОА	«-»	35,5 ± 0,7*
3	СЭ, аспирин	«-»	ОА	«-»	3,2 ± 1,6
4	ОА, СЭ	«-»	ОА, аспирин	«-»	7,7 ± 1,5**
5	СЭ	«-»	ОА, аспирин	«-»	3,5 ± 2,4
6	ОА, СЭ, НА	«-»	ОА	«-»	6,4 ± 2,2*
7	СЭ, НА	«-»	ОА	«-»	2,9 ± 0,8
8	ОА, СЭ	«-»	ОА, НА	«-»	30,6 ± 2,3*
9	СЭ	«-»	ОА, НА	«-»	2,5 ± 2,3

**Примечание.** ОА – овалбумин, СЭ – синий Эванса, НА – никотинамид. Группа 1 – положительный контроль: реакция гиперчувствительности замедленного типа без введения аспирина или никотинамида; группы 3, 5, 7, 9 – отрицательный контроль (пояснение в тексте). Достоверность различий по сравнению с контрольными показателями: \*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,02$ .

**Таблица 2.** Противоопухолевая активность интратуморально индуцированной реакции гиперчувствительности замедленного типа к овалбумину (гиперчувствительность замедленного типа стимулирована 2 способами: аспирином в стадии индукции и никотинамидом в эффекторной стадии)

Группа	Стадия индукции			Эффекторная стадия			ТРО, %	УПЖ, %
	Вводимые препараты	Способ введения	Дни введения с начала иммунотерапии	Вводимые препараты	Способ введения	Дни введения с начала иммунотерапии		
1	–	–	–	–	–	–	–	–
2	ОА, СЭ, аспирин	Подкожно в холку	1, 7, 10-й	ОА	Интратуморально	5, 11, 14-й	81,5 ± 4,6*	31
3	ОА, СЭ	«-»	«-»	ОА НА	«-»	«-»	86,5 ± 2,2*	27
4	СЭ, аспирин	«-»	«-»	–	–	–	15,5 ± 3,0**	4
5	СЭ	«-»	«-»	НА	«-»	«-»	+7,2 ± 3,1***	0

**Примечание.** \*ТРО – торможение роста опухоли, ОА – овалбумин, СЭ – синий Эванса, НА – никотинамид, УПЖ – увеличение продолжительности жизни. \*  $p < 0,05$  – достоверные отличия относительно группы 1 (нелеченой). \*\*  $p < 0,05$  – достоверные отличия относительно группы 2, \*\*\*  $p < 0,05$  – достоверные отличия относительно группы 3; «+» – означает прирост опухоли в группе 5.

антигенов II класса МНС. Такие препараты при неправильном их применении могут оказаться опасными для больных.

В представленной работе достигнут высокий уровень торможения роста опухоли с помощью ГЗТ даже к такому слабому антигену, как ОА. Предложенный способ иммунотерапии рассматривается как начальный этап разработки адекватной схемы лечения. В дальнейших исследованиях потребуются замена ОА на вакцины (к примеру, бациллу Кальметта – Герена) или на опухолеспецифические антигены.

### Заключение

Сведения о разнонаправленном механизме регуляции ГЗТ I-A-молекулами имеют большое значение. Данный механизм универсален, предсказуем, и с его помощью 2 способами можно как повысить уровень реакции, например в противоопухолевом иммунитете, так и подавить его на разных стадиях, как это требуется при других патологиях, например в трансплантологии, ожоговой болезни, кардиологии, при заболеваниях, связанных с воспалением, и др.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ben-Neriah Y., Karin M. Inflammation meets cancer, with NF- $\kappa$ B as the mathh-maker. *Nature immunol* 2011;12(8):715–23. DOI: 10.1038/ni.2060. PMID: 21772280.
2. Mantovani A., Allavena P., Sica A., Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008;454(7203):436–44. DOI: 10.1038/nature07205. PMID: 18650914.
3. Paik K.Y., Lee I.K., Lee Y.S. et al. Clinical implications of systemic inflammatory response markers as independent prognostic factors in colorectal cancer patients. *Cancer Res Treat* 2014;46(1):65–73. DOI: 10.4143/crt.2014.46.1.65. PMID: 24520225. PMCID: PMC3918529.
4. Sica A. Role of tumor-associated macrophages in cancer-related inflammation. *Exp Oncol* 2010;32(3):153–8. PMID: 21403610.
5. Yu H., Pardoll D., Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 2009;9(11):798–809. DOI: 10.1038/nrc2734. PMID: 19851315. PMCID: PMC4856025.
6. Карасева В.И. Разнонаправленный контроль I-A-молекулами, экспрессированными антигенпрезентирующими клетками, реакции гиперчувствительности замедленного типа к овалбумину. *Иммунология* 1997;6:21–3.
7. Медуницын Н.В., Алексеев Л.П. Система I-a-антигенов. М.: Медицина. 1987.
8. Hiromatsu Y., Sato M., Yamada K., Nonaka K. Inhibitory effects of nicotinamide on recombinant human interferon-gamma-induced intercellular adhesion(ICAM-1) and HLA-DR antigen expression on culture human endothelial cells. *Immunol Lett* 1991;31:35–40. PMID: 1347751.
9. Mochizuki M., Zigler J.S., Russell P. and Gery I. Cytostatic and cytolytic activities of macrophages. Regulation by Prostaglandins. *Cell Immunol* 1984;83(1):34–42. PMID: 6581870.
10. Большаков О.П., Незнанов Н.Г., Бабаханян Р.В. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных. *Качественная клиническая практика* 2002;1:58–61.
11. Подоплелов И.И., Крылов О.Р., Медуницын Н.В. Эванс синий как адьювант для получения повышенной чувствительности замедленного типа в эксперименте. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 1985;6:729.
12. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ: руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. чл.-корр. РАМН проф. Р.У. Хабриева. М.: Медицина, 2005:637–674.
13. Heagy W., Kelley V.E., Strom T.B. et al. Decreased expression of human class II antigens on monocytes from patients with acquired immune deficiency syndrome. Increased expression with interferon-gamma. *J Clin Invest* 1984;74(6):2089–96. DOI: 10.1172/JCI111633. PMID: 6439741. PMCID: PMC425399.
14. Stingl L.A., Sauder D.N., Iijima M. et al. Mechanism of UV-beta-induced impairment of the antigen-presenting capacity of murine epidermal cells. *J Immunol* 1983;130(4):1586–91. PMID: 6187815.
15. Наумов Ю.Н., Коненков В.И., Алексеев Л.П. Регуляция экспрессии генов гистосовместимости II класса. *Иммунология* 1993;2:6–11.