

Využití buněk renálního karcinomu při vývoji protinádorových imunoterapeutických přípravků v alogenních podmínkách.

Hanák L.^{1,2}, Lauerová L.², Matějková E.¹, Vidláková P.¹, Kyjovská D.¹, Stejskalová A.¹, Mužíková J.¹, Vališová E.¹, Hošková A.², Sekaninová R.², Nenutil R.², Křen L.⁴, Rychtetská H.⁴, Doležel J.², Žižková V.², Žaloudík J.², Hájek R.¹, Michálek J.^{1,3}

1) *Univerzitní centrum buněčné imunoterapie (UCBI) LF MU Brno*

2) *Masarykův onkologický ústav (MOÚ) Brno*

3) *I. dětská interní klinika FN Brno*

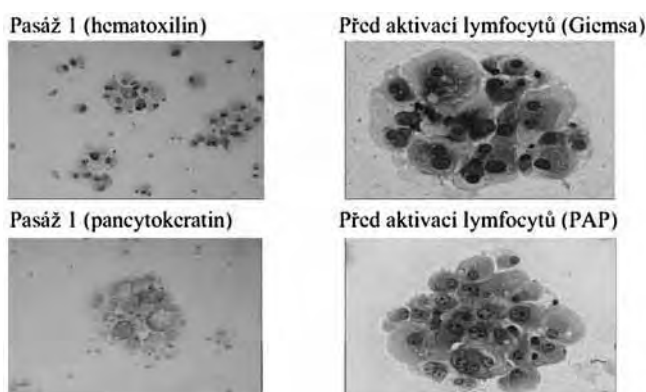
4) *Ústav patologie FN Brno*

Kultivace buněk primárního karcinomu ledvin

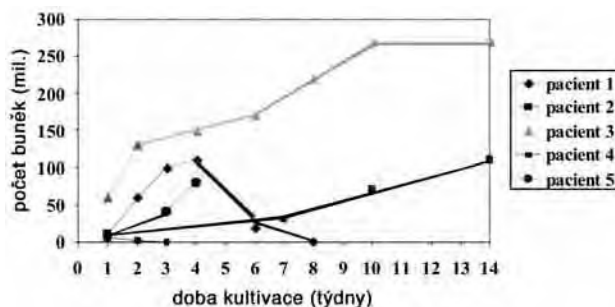
Hlavním účelem projektu „Národní program výzkumu II“ je vývoj biotechnologie vedoucí k bezpečné alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk (SCT) tak, aby na jedné straně byla zcela potlačena nežádoucí a často smrtelná reakce štěpu proti hostiteli (GVHD) vyvolaná alogenními lymfocyty dárce, a na druhé straně, aby byl maximálně využit protinádorový potenciál (GVL/GVT; graft-versus-leukemia/tumor) alogenních lymfocytů. Jeden ze způsobů jak eliminovat GVH-reaktivní klonny dárcovských T lymfocytů spočívá v jejich aktivaci nenádorovými buňkami příjemce v tzv. smíšené lymfocytární reakci a poté v jejich eliminaci specifickým imunotoxinem. Následně jsou ostatní lymfocyty aktivovány kultivovanými nádorovými buňkami (po jejich ozáření, aby byl zpřístupněn nádorový antigen) za účelem dosažení maximálního efektu GVL/GVH. Všechny kroky jsou prováděny v in vitro podmínkách. Kompletní remise po aplikaci infuze dárcovských lymfocytů byla pozorována především u chronické myeloidní leukémie, ale také u pacientů s dalšími nádorovými onemocněními, především u akutní myeloidní leukémie, mnohočetného myelomu a renálního karcinomu. Zatímco část projektu týkající se krevních malignit je již ve fázi povolené studie testování účinku na vybraných pacientech, s renálním karcinomem probíhá v současné době základní laboratorní výzkum.

NÁDOROVÁ IMUNOLOGIE

Pro stimulaci protinádorové aktivity T – lymfocytů je nutné zajistit prezentovatelný nádorový antigen, jehož zdrojem může být kultura příslušných nádorových buněk pacienta. Ty jsou získávány izolací z resektátu nádorové tkáně (ohledané patologem) získané od pacientů MOÚ Brno s primárním karcinomem ledvin, převážně po nefrektomii. Kultivace v laboratoři pak umožňuje jejich namnožení a selekci od nenádorových buněk za účelem vypěstování primokultury, jednak jako zdroje zmiňovaného nádorového antigenu a jednak pro její zamražení pro pozdější stimulaci lymfocytů mrtvými nádorovými buňkami. Vzhledem k tomu, že renální buňky patří k velmi obtížně kultivovatelným typům nádorů, bylo stěžejním úkolem na základě zkušeností nečetných prací vybrat vhodné médium, jehož základ tvořilo DMEM suplementované 15% fetálním sérem, antibiotiky penicilinem a streptomycinem, inzulinem, pyruvátém, glutaminem stabilizovaným proti rozkladu a glukózou. Buňky uvolněné z nastříhaných kousků tkáně jsou kultivovány na Petriho miskách do 1. pasáže (1 – 4 týdny), poté je část pěstována v R. lahvích pro realizaci výše zmíněných kultivací s lymfocyty v laboratořích Univerzitního centra buněčné imunoterapie (UCBI) LF Brno. Zbývající část se dále kultivuje v laboratoři MOÚ Brno pro navýšení počtu buněk, které jsou při dostatečném počtu zamrazeny na sucho a takto získané mrtvé buňky použity po převozu pro další stimulace těchto lymfocytů. Reprezentativní zastoupení vitálních nádorových buněk v kultuře je kontrolováno pomocí barvení cytopsinu buněk patologem před 1. pasáží (Odd. patologie MOÚ Brno) a před aktivací lymfocytů (PAÚ FN Brno). Výsledky barvení vybraného pacienta ukazující na v podstatě výhradní zastoupení živých buněk tumoru jsou znázorněny na **Obr. 1**.

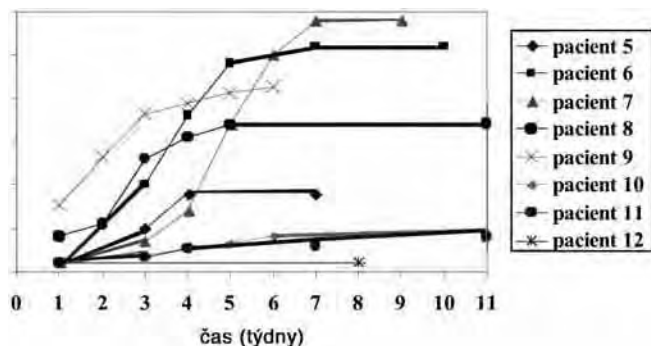


Obr. 1
Hodnocení zastoupení nádorových buněk (cytopsin, pacient 3, zvětšeno 200x)

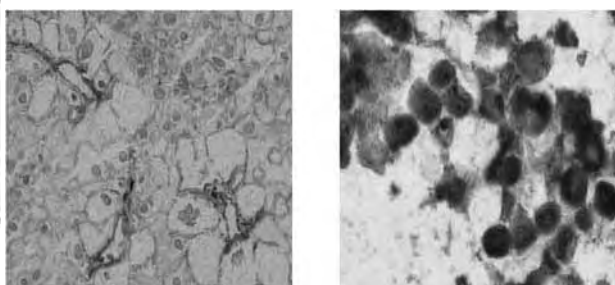


Obr. 2
Výsledky kultivace buněk renálního karcinomu

V úvodní části projektu (září – prosinec 2006) byly zpracovány a pěstovány buňky pocházející z karcinomu ledvin 4 pacientů, u nichž byla snaha o maximální zisk těchto buněk. Z **Obr. 2**, kde křivky představují kumulativní nárůst buněk v čase průběžně převážené do UCBI LF MU ke stimulaci lymfocytů, je patrné, že u tří z nich se podařilo vypěstovat primokulturu a namnožit dostatečný počet buněk alespoň pro 1. fázi pokusů s živými nádorovými buňkami, u dvou z nich (pacienti 2 a 3) pak i do další části s buňkami mrtvými. Pacienti 1 a 2 byli pasážováni 2x, pacient 3 3x. Z nastříhané tkáně posledního pacienta se uvolnilo jen velmi málo vitálních buněk, které by adherovaly na dně kultivačních misek a po 3 týdnech kultura odumřela.



Obr. 3
Výsledky kultivace buněk renálního karcinomu (leden 2007 – leden 2008)



Obr. 4
Hodnocení přítomnosti HLA antigenů (cytopsin, pacient 6)

Protože při pokusech s lymfocyty vyšlo najevo, že dochází ke ztrátě povrchových HLA antigenů I. třídy, které jsou rozhodujícím faktorem k lymfocytární stimulaci, byla u dalších vzorků snaha dobu kultivaci, jejíž délka byla považována za rizikový fak-

NÁDOROVÁ IMUNOLOGIE

tor, maximálně zkrátit pro získání nezbytně nutného počtu buněk a ty pak zamrazit v režimu postupného mražení pro zachování vitality a HLA antigenů do doby pokusů. Jak je patrné, podařilo se přesto získat u 5 z 8 nádorů (leden 2007 – leden 2008) obdobné, tedy vysoké počty buněk jako u předchozích vzorků pacientů (nárůst byl relativně rychlý), doba přežití buněk je přitom ale pochopitelně kratší než u předchozího souboru pacientů (**Obr. 3**). Z tkáně a kultury každého nádoru bylo pro kontrolu prováděno testování přítomnosti HLA antigenů, jak je patrné ze snímků tkáně a kultury obarvené pomocí protilátek proti HLA antigenům vybraného pacienta na **Obr. 4**, který je v obou případech na ně pozitivní. Přehled výsledků přítomnosti HLA antigenů u testovaných vzorků pacientů shrnuje tabulka na **Obr. 5**. Přestože se nejedná o velký soubor vzorků, je zřejmé, že ke ztrátě 50 – 100 % antigenů došlo u více jak poloviny z těch, které byly kultivovány 2 měsíce a déle. V jednom případě nebyly HLA antigeny již v samotné nádorové tkáni pacienta, v jiném případě zase sice tkáň nevykazovala téměř žádnou jejich přítomnost, buňky uvolněné při kultivaci do média však již ano. Z uvedených skutečností je možné shrnout, že nová opatření mají alespoň částečný přínos.

Současně byla sledována i sterilita vzorků z hlediska přítomnosti plísní pomocí vysoce citlivé metody PCR. Většina byla negativní jak ve tkáni, tak kultuře, ve dvou případech byl záchyt kmene plísně ve tkáni, nikoli však již v kulturách, což může být zapříčiněno vysokou citlivostí použité metodiky zachycující i fragmenty DNA. Kultura posledního pacienta byla pro pozitivní testy ve tkáni i kultuře vyřazena (**Obr. 6**).

pacient	HLA typizace			
	tkáň	kultura / den	kultura / den	kultura / den
5	-	neg / 20	-	-
6	poz+++	poz+++ / 16	poz+++ / 23	poz+ / 65
7*	neg (+)	poz+++ / 23	poz+ / 58	-
8	poz++ - +++	poz++ / 6	poz+++ / 42	-
9	poz++	poz+ / 6	poz++ / 37	neg / 141
10	poz++	poz++ / 19	poz++ / 76	-
11	poz++	poz++ / 22	-	-
12	poz++	-	-	-

* tkáň převážně HLA negativní, fokálně na periferii pozitivní
 * jen malá část z celkového počtu nádorových buněk nese na svém povrchu jen malý počet HLA antigenů
 +++ drtivá většina nádorových buněk nese na svém povrchu vysoký počet HLA antigenů

Obr. 5
 Vyšetření přítomnosti HLA antigenů

pacient	PCR plísní	
	tkáň	kultura / den
5	neg.	neg. / 12
6	Candida p.	neg. / 29
7	neurčený druh	neg. / 22
8	neg.	neg. / 16
9	neg.	neg. / 6
10	neg.	neg. / 20
11	neg.	neg. / 18
12	Candida r.	Candida r. / 13

Obr. 6
 Vyšetření přítomnosti plísní

Pokud shrneme výsledky práce za celé zmíněné období, bylo nakonec od plánovaných 19 pacientů s primárním renálním karcinomem založeno po operačním zákroku (většinou nefrektomií) 12 kultur, z nichž u 8 se podařilo vypěstovat buňky v dostatečném počtu pro aktivaci lymfocytů (80 – 280 mil.), dvě z těchto kultur byly pasážovány dvakrát, dalších 6 třikrát. Buňky dalších dvou kultur (každá po 40 mil.) byly využity pouze pro testy cytotoxicity. (**Obr. 7**).

pacient	PCR plísní	
	tkáň	kultura / den
5	neg.	neg. / 12
6	Candida p.	neg. / 29
7	neurčený druh	neg. / 22
8	neg.	neg. / 16
9	neg.	neg. / 6
10	neg.	neg. / 20
11	neg.	neg. / 18
12	Candida r.	Candida r. / 13

Obr. 7
 Shrnutí výsledků kultivace buněk

Jak již bylo zmíněno, ze zkušeností ve světě vyplývá, že nádorové buňky ledvin nevykazují přílišnou schopnost žít a rozrůstat se, ať již byla pro kultivace použita různá média. Práce na toto téma jsou spíše kusé, obšírnější výsledky publikuje Ueda a spol., kde z 52 primárních karcinomů ledvin se polovinu podařilo udržet alespoň do 1. pasáže a 17% do šesté. Přestože zkušenosti s kultivací buněk renálního karcinomu nejsou na jiných pracovištích dobré, podařilo se zde dvě třetiny založených kultur dovést do stádia získání minimálního počtu buněk (80 mil.) pro další kroky vývoje transplantačního přípravku na bázi alogenních lymfocytů.

Literatura

1. Ueda R., Shiku H., Pfreundschuh M. et al. Cell surface antigens of human renal cancer defined by autologous typing, J Exp Med. 1979,150: 564-679.

NÁDOROVÁ IMUNOLOGIE

2. Childs R., Chernoff A., Contentin N. et al. Regression of metastatic renal-cell carcinoma after nonmyeloablative allogeneic peripheral-blood stem-cell transplantation. *The New England Journal of Medicine* 2000, 343 (11): 750-758.
3. Michálek J, Collins RH, Vitetta ES. The effect of chain immunotoxindifferent enhancers on the ability of an anti-CD25 ricin a to deplete cells which are activated in an MLR. *Blood* 2000; 96: 312b.
4. Michálek J., Collins R.H., Vitetta E.S.: Clinical-scale selective depletion of alloreactive T cells using an anti-CD25 immunotoxin. *Neoplasma* 2003, 50: 296-9.

Podporováno grantem MŠMT NPVII – 2B06058