

IL-12 v nízkých dávkách stimuluje odpověď T lymfocytů v PBMC kultuře získané od pacientů s nemalobuněčným typem karcinomu plic



Dr. Ilaria Roato
CeRMS (Centro di Ricerca in Medicina Sperimentale), A.O.U. San Giovanni Battista, Torino

Abstrakt

Nádory indukují toleranci potlačením odpovědi imunitního systému, modulací aktivity pomocných T lymfocytů a navozením nerovnováhy cytokinů produkovaných lymfocyty. IL-12 je imunoregulační cytokin s výraznou protinádorovou aktivitou, jehož signalizace vede k polarizaci Th1 lymfocytů CD4+. V preklinických studiích se u rekombinantního IL-12, podávaného intravenózně či prostřednictvím plazmidové DNA kódující IL-12, prokázaly protinádorové účinky, zjištělné imunitní odpovědí, avšak také vážné vedlejší účinky závislé na dávce. Studovali jsme schopnost nízkých dávek IL-12 modulovat odpověď subpopulací T lymfocytů v kultuře mononukleárních buněk periferní krve (PBMC), získaných od pacientů trpících nemalobuněčným karcinomem plic (NSCLC). Kromě toho jsme zhodnotili schopnost IL-12 v nízkých dávkách navodit lýzu buněk adenokarcinomu plic T lymfocyty. Naše výsledky prokázaly,

že IL-12 v koncentraci 0,01 pg/ml výrazně zvyšuje počet T lymfocytů CD4+ a CD8+ v kultuře, zvláště jsme pozorovali nárůst počtu T lymfocytů CD4/IFN- γ (Th1). Tato nízká dávka IL-12 nestimulovala regulační T lymfocyty, nýbrž zvyšovala lýzu buněk adenokarcinomu spuštěnou T lymfocyty. Naše výsledky tudíž prokázaly, že nízké dávky IL-12 jsou schopné modulovat subpopulace T lymfocytů *in vitro* a posílit lytické působení T lymfocytů na buňky adenokarcinomu plic. Tyto studie je třeba dále potvrdit. Pokud by se jejich závěry podařilo potvrdit rovněž v experimentálních modelech *in vivo*, mohlo by se uvažovat o využití nízkých dávek IL-12 jako podpůrného léčebného prostředku v rámci standardních terapií onemocnění charakteristických nerovnováhou mezi T buňkami za účelem podpory imunomodulace imunitní odpovědi.

Klíčová slova: interleukin-12, imunomodulace, pomocné T buňky, regulační T lymfocyty, protinádorová imunitní odpověď.

Úvod

Za normálních podmínek inhibují buňky imunitního systému prostřednictvím mechanismů imunitního dohledu růst a množení nádorových buněk. Nádorové buňky však mohou vytvořit imunosupresivní mikroprostředí, a tím zablokovat protinádorovou imunitní odpověď, což následně způsobuje změnu stavu imunitního dohledu na imunitní toleranci vůči nádoru.¹

Nádorové buňky rovněž secernují látky, jako jsou TGF- β , IL-4, IL-6 a IL-10, jež bezprostředně zasahují do mezibuněčné komunikace nezbytné pro správnou imunitní odpověď.^{2,3} TGF- β inhibuje biologické působení IL-12,^{4,5} zatímco IL-4 indukuje

polarizaci buněk směrem k fenotypu Th2, čímž podporuje nově vzniklou toleranci vůči nádoru.⁶

epitelu, které mohou podpořit nádorový růst.¹² Tyto poznatky ukazují, že pacientům s adenokarcinomem

IL-12

IL-12 představuje základní regulační cytokin imunitního systému s velmi výrazným protinádorovým působením.

Na buněčné úrovni působí IL-12 parakrinně a vytváří kriticky důležitý mezičlánek mezi vrozenou a adaptivní imunitou.⁷ V sekundárních lymfatických orgánech podporuje IL-12 protinádorovou imunitu: indukuje polarizaci naivních lymfocytů CD4+ na pomocné T lymfocyty 1 (Th1). Ty se podílejí na mechanismech protinádorové imunity tím, že podporují proliferaci CD8+ lymfocytů a produkci IgG2a, jež posiluje cytotoxický účinek NK buněk.^{8,9} Tento dvojitý účinek – stimulace polarizace Th1 buněk a aktivace NK buněk – vysvětluje využití IL-12 jako adjuvans v protinádorové imunoterapii.¹⁰

IL-12 stimuluje produkci IFN- γ , jež inhibuje nádorovou angiogenezi prostřednictvím interakce mezi endoteliálními buňkami a lymfocyty, která snižuje přežívání a adhezi endoteliálních buněk. Současně vstupují NK buňky, atrahované cytokinem IL-12, do synergických vazeb s cytolytickou aktivitou endoteliálních buněk.

Karcinom plic představuje jednu z hlavních příčin úmrtí na celém světě. Ve většině případů se jedná o nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC), jehož prognóza je i nadále velmi špatná. Z toho důvodu jsou nové možnosti terapie velmi žádoucí.¹¹

Současné poznatky potvrzují protinádorovou aktivitu IL-12: bezprostředně inhibuje růst adenokarcinomu plic a zasahuje buňky přiléhající ke zdravému bronchiálnímu

plic lze aplikovat IL-12 přímo do ložiska nádoru, aby mohl působit bezprostředně v nádorovém mikroprostředí,¹³ případně je možné podávat ho systémově, abychom využili jeho imunomodulačního působení.¹⁴

Díky povzbudivým výsledkům v preklinických studiích bylo provedeno mnoho klinických studií 1. a 2. fáze, při nichž se zkoumalo působení rekombinantního lidského IL-12 podávaného intravenózně,^{10,15-16} či ve formě plazmidové DNA injekčně vpravené do nádoru.¹⁷⁻¹⁹ Výsledky dokazují protinádorové působení IL-12, imunologické reakce, ale také výrazné nežádoucí účinky závislé na dávce.

V nedávné době byla prokázána účinnost nízkých dávek IL-12 na modulaci Th1 buněk vůči Th2 v preklinickém modelu astmatu,²⁰ což naznačuje možnost nového terapeutického přístupu k onemocněním charakteristickým narušením rovnováhy mezi Th1 a Th2 buňkami. Ve zmíněné studii zkoumali Gariboldi a kol. různé dávky IL-12 použité v léčbě astmatu u laboratorních myši a určili jako účinnou dávku 0,01 pg/ml.¹⁶

Vzhledem k těmto nejnovějším výsledkům a k předcházejícím klinickým studiím jsme si v naší práci vytkli za cíl studovat schopnost nízkých dávek IL-12 (zvláště 0,01 pg/ml) modulovat subkultury T lymfocytů v kulturách mononukleárních buněk periferní krve (PBMC) získaných od NSCLC pacientů.

Materiál a metody

Pacienti a buněčné kultury

Po získání informovaného souhlasu jsme shromáždili vzorky krve od 20 pacientů s NSLC, kteří se měli podrobit resekci na oddělení hrudní chirurgie nemocnice A.O.U. San Giovanni Battista v Turíně.

Mononukleární buňky periferní krve jsme izolovali ze vzorků krve centrifugací pomocí média využívajícího hustotní gradient Lymphoprep (Nycomed Pharma, Norsko) a přenesli na 10 dní do média obsahujícího α -MEM, 10% FBS, penicilin 100U/ml a streptomycin 100 μ g/ml (Cambrex, Bio Science, Walkersville, MD, USA). Poté byly PBMC přeneseny na sterilní kultivační destičky s 24 jamkami v koncentraci 2×10^6 buněk/jamka, v přítomnosti různých koncentrací IL-12. Všechna použitá naředění IL-12 (10 ng/ml, 10 pg/ml (2CH), 1 pg/ml (3CH) a 0,01 pg/ml (4CH)) poskytla společnost Guna a.s. (Itálie).

Roztok naředěný na 2CH od samého počátku vykazoval známky toxicity srovnatelné s koncentrací 10 ng/ml, protože byl testován pouze zpočátku a posléze z experimentu zcela vyloučen. Všechny ostatní koncentrace IL-12 a placebo byly testovány na všech 20 pacientech.

IL-12 byl přidáván každý den až do ukončení kultivace. Pátý den kultivace byla polovina kultivačního média nahrazena, aniž by došlo k eliminaci buněk.

Cytofluorimetrická analýza

Pro monitorování počtu lymfocytů CD4+, CD8+, regulačních T lymfocytů a Th1 buněk byly analyzovány PBMC v okamžiku odběru a poté 5. a 10. den kultivace. Pro analýzu Th1 buněk (CD4/IFN- γ) byly použity metody značení buněk podle instrukcí obsažených v sadě BD Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit (BD, Bedford, MA, USA). Pro analýzu regulačních T lymfocytů (CD4/CD-25high/FoxP3) byl použit „Human Regulatory T cell staining kit“ (eBioscience, San Diego, CA, USA). Pro vyhodnocení počtu CD8+ buněk byla použita protilátka anti-human PerCP-CD8. Pro všechny protilátky byly použity odpovídající izotypové kontroly. Všechny vzorky byly analyzovány prostřednictvím cytofluorimetru FACsCalibur a data byla zpracována v programu CellQuest (BD, Bedford, MA, USA). Výsledná data jsou uváděna v procentuálním zastoupení pozitivních buněk po odečtení procentové hodnoty příslušné izotypové kontroly u každého vzorku.

Zkouška cytotoxicity prostřednictvím fluorescenčního značení s CFSE

Pro vyhodnocení schopnosti T buněk stimulovaných nízkými dávkami IL-12 zabít nádorové buňky, byla použita zkouška toxicity, při níž se označila jedna buněčná linie adenokarcinomu plic H1373 (target) pomocí CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester). Tato buněčná linie byla kultivována společně s PBMC v RPMI 1640 (GIBCO, Invitrogen, Paisley, UK), do něhož bylo přidáno 10% FBS, penicilin 100U/ml a streptomycin 100 μ g/ml Cambrex, Bio Science, Walkersville, MD, USA).

Buňky H1373 byly obarveny podle návodu výrobce (CellTrace CFSE Cell proliferation Kit, Invitrogen, Paisley, UK) 5 μ M roztokem CFSE. Po 7 dnech kultivace byly PBMC odděleny a společně s H1373 (dříve obarvené CFSE) naneseny na kultivační médium v poměru 1/10 (tj. 1.105 target buňky a 1.106 efektorové buňky, PBMC) při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin.

Pro vyhodnocení spontánní mortality byly buňky H1373 naneseny do média samostatně, zatímco nejvyšší úroveň mortality bylo dosaženo po lýze buněk způsobené přípravkem Triton. Cytotoxická aktivita PBMC pacientů byla měřena pomocí cytofluorimetrie založené na barvení target buněk pomocí CFSE a identifikace odumřelých buněk prostřednictvím propidium jodidu, jak bylo dříve popsáno.^{17, 18}

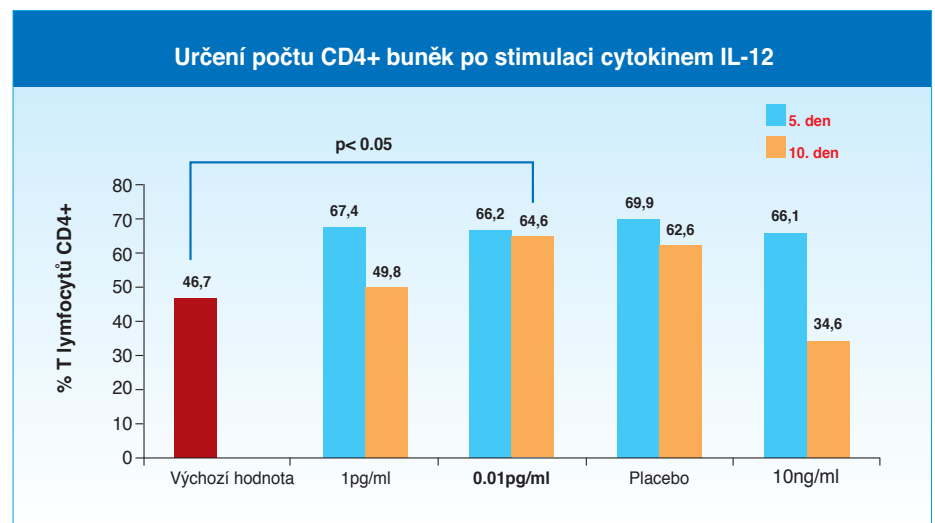
Statistická analýza

Normální rozdělení pravděpodobnosti každého sledovaného parametru byla vyhodnoceno pomocí koeficientu špičatosti (excesu). Počet CD4+ a CD8+ buněk neodpovídal normálnímu rozdělení, protože bylo k jejich analýze využito neparametrického Wilcoxonova testu. Pearsonův korelační test byl proveden pro univariační analýzu asociace. Všechny analýzy byly provedeny ve statistickém programu SPSS 17.0. Jako statisticky významné byly uvažovány výsledky s $p < 0,05$.

Výsledky

Nízké dávky IL-12 stimulují lymfocyty CD4 a CD8 v kultuře PBMC

Cytokin IL-12 je znám pro své stimulační působení na T lymfocyty CD4+. Byla proto zhodnocena schopnost nízkých dávek IL-12 modulovat subpopulaci CD4+ buněk v kultuře PBMC získaných od pacientů. Procentuální zastoupení CD4+ mezi PBMC činilo v okamžiku odběru 46,7 %. Po pěti dnech kultivace došlo k nárůstu procentuálního zastoupení CD4+ ve srovnatelné míře pro všechny podmínky kultivace. Na konci kultivace (10. den) se zastoupení CD4+ ještě zvýšilo při stimulaci 0,01 pg/ml roztokem IL-12 ($p < 0,05$), zatímco došlo ke snížení jejich zastoupení při stimulaci 1 pg/ml a 10 ng/ml roztokem IL-12 a placebem (graf 1). Byl zjištěn rovněž nárůst počtu T lymfocytů CD8+ vzhledem k výchozímu stavu ($p < 0,05$) v důsledku stimulace 0,01 pg/ml roztokem IL-12.

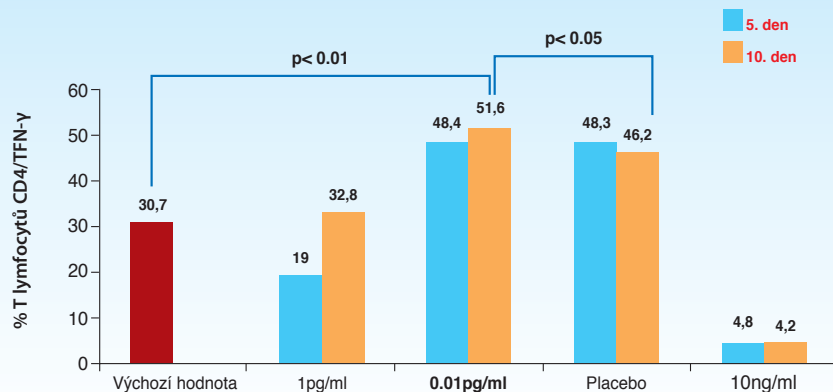


Graf 1: 5. den kultivace se neobjevují výrazné rozdíly v různých typech kultury.

10. den kultivace dochází v kultuře obsahující 0,01 pg/ml roztok IL-12 k výraznému nárůstu počtu T lymfocytů CD4+ v porovnání s výchozí hodnotou.

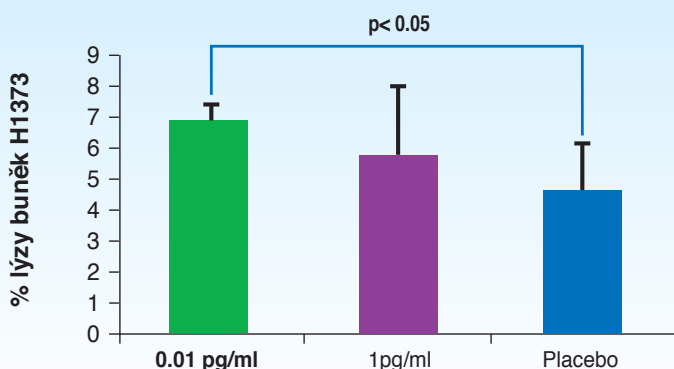
Čísla nad sloupky označují průměrné hodnoty + směrodatnou odchylku.

Nárůst počtu Th1 lymfocytů po stimulaci cytokinem IL-12 v nízké koncentraci



Graf 2: 5. den kultivace pozorujeme nárůst počtu Th1 (CD4/IFN- γ) lymfocytů vzhledem k výchozí hodnotě po stimulaci cytokinem IL-12 v koncentraci 0,01 pg/ml, $p < 0,01$. Rovněž 10. den došlo k výraznému nárůstu počtu Th1 lymfocytů vzhledem k placebu po stimulaci cytokinem IL-12 v koncentraci 0,01 pg/ml, $p < 0,05$. Čísla nad sloupci označují průměrné hodnoty + směrodatnou odchylku.

Lýza buněk H1373 zprostředkovaná T lymfocyty stimulovanými cytokinem IL-12 v nízké koncentraci



Graf 3: Sloupcový graf ukazuje průměrnou hodnotu lýzy buněk adenokarcinomu plic H1373 po společné kultuře s PBMC získaných od pacientů s NSCLC. IL-12 v koncentraci 0,01 pg/ml zvyšuje lýzu způsobenou PBMC, $p < 0,05$.

Nízké dávky IL-12 stimulují lymfocyty Th1, CD4/IFN- γ

Vzhledem k tomu, že stimulace Th1 buněk představuje zásadní krok směrem k efektivní protinádorové odpovědi imunitního systému, sledovali jsme schopnost nízkých dávek IL-12 modulovat Th1 buňky v kultuře. V okamžiku odběru odpovídalo zastoupení T buněk CD4/IFN- γ 30,7 %. Po pěti dnech kultivace se jejich počet snížil v kulturách s přidáním 1 pg/ml a 10 ng/ml roztoku IL-12, zatímco došlo k jejich významnému navýšení v kultuře s přidáním 0,01 pg/ml

(48,4 %) a placebo (48,3 %). Na konci kultivace (10. den) došlo k dalšímu nárůstu počtu CD4/IFN- γ buněk v kultuře s přidáním 0,01 pg/ml roztoku IL-12 vzhledem k výchozímu stavu ($p < 0,01$), zatímco nedošlo k žádným změnám mezi výchozími hodnotami a placebem (graf 2).

Nízké dávky IL-12 zvyšují rozpad (lýzu) buněk adenokarcinomu plic

Zvýšené uvolňování IFN- γ Th1 buňkami může stimulovat aktivaci cytotoxických T lymfocytů CD8+, pro-

to jsme zhodnotili schopnost nízkých dávek IL-12 indukovat lýzu buněk adenokarcinomu plic. Jelikož bylo zjištěno, že po stimulaci 0,01 pg/ml roztokem IL-12 dochází ke zvýšení počtu CD8+ buněk a současně také ke zvýšení počtu CD4/IFN- γ buněk, byly připraveny rovněž další kultury PBMC a buněk H1373. Byl zjištěn výrazný nárůst lýzy buněk H1373 po stimulaci 0,01 pg/ml roztokem IL-12 vzhledem k placebu, $p < 0,05$ (graf 3).

Nízké dávky IL-12 inhibují regulační T lymfocyty

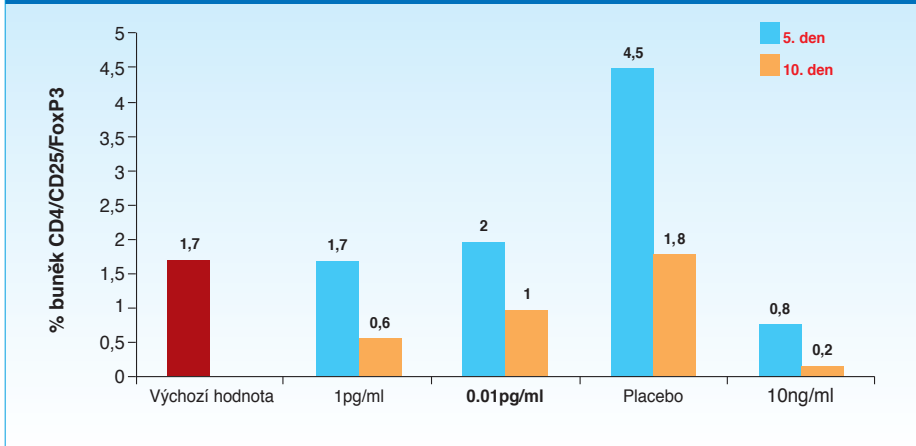
Pacienti s nádorovými onemocněními mají často zvýšený počet regulačních T lymfocytů. Z toho důvodu jsme analyzovali schopnost nízkých dávek IL-12 modulovat regulační T lymfocyty v kultuře. Průměrné zastoupení regulačních T lymfocytů (jedná se o buňky, jež exprimují CD4/CD25^{high}/FoxP3) ve výchozím stavu bylo 1,7 % (Graf 4). Po 5 dnech kultivace nedošlo k výraznému nárůstu počtu regulačních T lymfocytů v kultuře s IL-12, došlo k němu však s placebem. Na konci kultivace vykazovaly regulační T lymfocyty tendenci ke snižování svého počtu, což naznačuje inhibiční působení IL-12. V kultuře PBMC s placebem se počet regulačních T lymfocytů snižoval, byl však vyšší vzhledem k výchozímu stavu (Graf 4).

Diskuze

Některé studie in vitro prokázaly, že IL-12 může zvýšit cytolytický potenciál lymfocytů pocházejících od pacientů se solidními nádory a hematologickými malignitami. Inkubace přes noc s nízkými dávkami IL-12 vedla k lýze nádorových buněk způsobené T lymfocyty.^{19,20}

Na základě povzbudivých výsledků získaných na myších modelech byla provedena celá řada klinických zkoušek mnoha nádorů a podařilo se získat určité klinické výsledky, bylo však také pozorováno mnoho toxických důsledků.²¹ Jelikož IL-12 představuje významný modulátor imunitní odpovědi a zprostředkovává rozličné protinádorové účinky, analyzovali jsme

IL-12 v nízké koncentraci inhibuje regulační T lymfocyty v kultuře



Graf 4: 5. den kultivace nedochází po stimulaci cytokinem IL-12 k nárůstu počtu regulačních T lymfocytů CD4+/CD25+/FoxP3 v žádném testovaném vzorku, stimuluje je však placebo. 10. den pozorujeme snížení počtu regulačních T lymfocytů vzhledem k výchozím hodnotám, pokud jsou stimulovány nízkou koncentrací IL-12, třebaže se nejedná o statisticky významný jev. Čísla nad sloupci označují průměrné hodnoty + směrodatnou odchylku.

schopnost nízkých dávek IL-12 modulovat subpopulace T lymfocytů CD4+ v kulturách PBMC získaných od pacientů s NSCLC. V literatuře byla účinnost nízkých dávek IL-12 na modulaci Th1 proti Th2 buňkám popsána v případě preklinic-

aktivaci protinádorové imunitní odpovědi a nám se skutečně podařilo zjistit zvýšenou lýzu buněk adenokarcinomu kultivovaných s PBMC a stimulovaných nízkou dávkou IL-12.

Inhibiční působení regulačních T lymfocytů na protinádorovou imunitní odpověď již bylo prokázá-

no.²² Z toho důvodu jsme zhodnotili schopnost nízkých dávek IL-12 inhibovat regulační T lymfocyty v kultuře PBMC. Ukázalo se, že regulační T lymfocyty byly stimulovány placebem, zatímco nízké dávky IL-12 měly inhibiční účinek.

Tato data – třebaže zatím předběžná, neboť byla získána na malém vzorku pacientů – potvrzují naši výchozí hypotézu, že nízké dávky IL-12 jsou schopné imunomodulovat subpopulace T buněk v kultuře následujícím způsobem: stimulují Th1 lymfocyty a inhibují regulační T lymfocyty. Naše výsledky navíc dokazují biologickou aktivitu IL-12 v nízkých dávkách ve shodě se současnými poznatky o léčbě astmatu na myším modelu.¹⁶

Závěr

V této studii jsme prokázali, že nízké dávky IL-12 modulují subpopulace T lymfocytů v kultuře PBMC získaných od pacientů s NSCLC.

Podařilo se nám zdokumentovat nárůst počtu CD4+ a CD8+ buněk po jejich stimulaci nízkými dávkami IL-12, především Th1 buněk (CD4/IFN-γ), a snížení počtu regulačních T lymfocytů. IL-12 v koncentraci 0,01 pg/ml navíc inhibuje proliferaci buněk adenokarcinomu plíc *in vitro*. Možnost využít nízkých dávek IL-12 jako modulátoru imunitního systému otevírá nové příležitosti studia dalších cytokinů v nízkých dávkách, použitelných pro obnovu rovnováhy imunitní odpovědi v případě onemocnění charakteristických nerovnováhou mezi subpopulacemi lymfocytů.

Další studie, zvláště *in vivo*, jsou nezbytné pro lepší popis efektorových imunitních mechanismů působících v tomto modelu imunologické terapie a pro bližší určení možnosti využití nízkých dávek IL-12 na podporu imunitní odpovědi u pacientů trpících NSCLC.

Nízké dávky IL-12 jsou schopné inhibovat proliferaci nádorových buněk.

kého modelu astmatu,²⁰ což naznačuje možnost využití nízkých dávek IL-12 při léčbě dalších onemocnění charakteristických poruchou rovnováhy mezi Th1 a Th2 buňkami.

Naše výsledky ukazují, že CD4+ buňky proliferují v kultuře a zůstávají životaschopné do 5. dne, se stimulací pomocí IL-12 i bez ní, zatímco 0,01 pg/ml roztok IL-12 výrazně stimuluje CD4+ 10. den. To naznačuje, že nízké dávky IL-12 mohou podporovat dlouhodobé přežití a proliferaci CD4+ buněk.

Dávky IL-12 vyšší než 0,01 pg/ml a placebo nevykazují žádnou významnou stimulaci CD4+, takže nízká dávka IL-12 je zřejmě skutečně schopná modulovat subpopulaci CD4+. Po stimulaci s 0,01 pg/ml roztokem IL-12 došlo také ke zvýšení počtu lymfocytů CD8+, což napovídá také stimulaci cytotoxické protinádorové aktivity.

Abychom lépe specifikovali působení nízkých dávek IL-12, studovali jsme expresi IFN-γ CD4+ buňkami po jejich izolaci a stimulaci. IL-12 v koncentracích 1 pg/ml a 10 ng/ml nestimuloval Th1 buňky (CD4/IFN-γ), IL-12 v koncentraci 10 ng/ml působil na tyto buňky toxicky. IL-12 v koncentraci 0,01 pg/ml významnou měrou stimuloval Th1 buňky, jejichž počet vzhledem k placebo vzrostl.

Nárůst počtu Th1 buněk je podstatný pro

